



HAL
open science

Modulation de la génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en mélanges

Adeline Tarantini

► **To cite this version:**

Adeline Tarantini. Modulation de la génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en mélanges. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00456384

HAL Id: tel-00456384

<https://theses.hal.science/tel-00456384>

Submitted on 14 Feb 2010

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.

Ecole doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement (ED-ISCE)

THESE

Pour obtenir le grade de

Docteur en biologie

Spécialité :

Modèles, méthodes et algorithmes en biologie, santé et environnement

Présentée par

Adeline TARANTINI

MODULATION DE LA GENOTOXICITE DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP) EN MELANGES

Thèse dirigée par Pr Anne MAITRE et Dr Thierry DOUKI

Soutenue le 5 novembre 2009

Jury :

Dr Michèle BOUCHARD, Université de Montréal, Montréal
Dr Laurent DEBRAUWER, INRA, Toulouse
Pr Jean-Luc BESOMBES, Université de Savoie, Le Bourget-du-Lac
Pr Anne MAITRE, Université Joseph Fourier, Grenoble
Dr Thierry DOUKI, CEA Grenoble

Rapporteur
Rapporteur
Président
Directeur de thèse
Directeur de thèse

Thèse financée par la région Rhône-Alpes et préparée dans les laboratoires :
- TIMC (UMR 5525), équipe Environnement et Prédiction de la Santé des Populations (EPSP), UFR de Médecine, La Tronche.
- Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques (LAN), INAC/SCIB CEA Grenoble.

Mis en place et soutenu par

Rhône-Alpes Région

REMERCIEMENTS

Je remercie chaleureusement les membres du jury, Michèle Bouchard, Laurent Debrauwer et Jean-Luc Besombes pour avoir accepté d'évaluer ce travail et pour leurs corrections qui ont permis d'améliorer ce manuscrit.

Je remercie vivement les membres de l'Association pour le Contrôle et la Préservation de l'Air en Région Grenobloise (ASCOPARG) pour leur intérêt pour ce travail, leur collaboration et la fourniture des échantillons atmosphériques environnementaux. De la même façon, un grand merci à Jean-Luc Jafrezzo et Jean-Luc Besombes qui ont fourni les échantillons prélevés à Chamonix.

J'adresse également mes remerciements à la région Rhône-Alpes qui a financé ces travaux.

La thèse n'est pas un long fleuve tranquille et je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont aidée à le traverser.

Tout d'abord, merci à Anne Maître et Thierry Douki pour leur encadrement, leur implication, leur confiance et tous nos échanges scientifiques ! Merci chaleureusement à Thierry de m'avoir accueillie dans son labo et d'avoir accepté de reprendre la co-direction de cette thèse.

Un grand merci également à Marie Marquès et Emmanuel Lefèbvre pour leur contribution à ce travail, sur le terrain, avec les prélèvements atmosphériques dans des conditions souvent dantesques (et je joins à ces remerciements toute l'équipe du DBI), et au labo, avec les dosages des prélèvements atmosphériques et nos cinétiques comètes de 12h ! Au passage un clin d'œil à Brigitte Gonthier et Nathalie Signorini avec qui j'ai appris la technique comète en master et Frédéric Lamarche grâce à qui le MTT n'a plus eu de secret pour moi ! Je n'oublie pas non plus Jean-Luc Ravanat et Stéphane Mouret qui m'ont secourue plus d'une fois lors des caprices de l'API 3000 !

Au-delà des aspects techniques, la thèse comporte aussi des aspects administratifs et je ne remerciais jamais assez Pascale Palenzuela et Aurélie Augier à EPSP, Zohra Termache au LAN pour leur efficacité et leur disponibilité, ainsi que Sylvette Liaudy pour son aide sur les aspects littéraires et bibliographiques.

De manière générale, je remercie toute l'équipe du TIMC et du LAN pour leur gentillesse, leur soutien et leur bonne humeur, en particulier merci à mes « co-bureaux » : Sylvain Caillat, Violaine Chapuis, Jennifer Pradel, Cindy Picot, Renaud Persoon et Yves Nzengue pour les bons moments passés ensemble.

Merci à Anne-Sophie Belmont, Caroline Marie, Jennifer Pradel, Andry Rakotovao et Yves Nzengue pour leur amitié et leurs encouragements. Je n'oublie pas non plus les filles du LAN et mes copains du GMCAO pour les activités hors labo qui ont égayé ces trois années !

Enfin je remercie infiniment ma famille, mon frère Manu, Aurélie, mes amies Sarah et Delphine qui ont toujours été là dans les bons comme dans les mauvais moments. Je dédie ce travail à mes parents, pour leur inconditionnel et inestimable soutien et leurs encouragements qui m'ont accompagnée toutes ces années.

SOMMAIRE

<i>SOMMAIRE</i>	1
<i>LISTE DES ABREVIATIONS</i>	7
CHAPITRE 1- ETAT DES CONNAISSANCES	11
I. Généralités	11
1. Définition.....	11
2. Source d'exposition des populations aux HAP	13
3. Voie d'absorption et d'élimination des HAP	16
4. Toxicité des HAP.....	18
5. Classification.....	18
II. Métabolisme et mécanisme d'action des HAP	21
1. Voies de métabolisation des HAP	22
2. Les enzymes de la métabolisation	26
3. Susceptibilité génétique aux HAP	36
III. Des dommages de l'ADN au cancer	38
1. Dommages à l'ADN induits par le BaP	38
2. Réparation et apoptose.....	42
3. Mutagénèse et cancérogénèse.....	44
4. Etudes in vitro de la génotoxicité des HAP.....	48
IV. Evaluation environnementale du risque lié à l'exposition aux HAP	55
1. Surveillance atmosphérique	57
2. Surveillance biologique de l'exposition	63
3. Problématique des mélanges : approches pour l'évaluation des risques pour la santé humaine	64
V. Présentation du sujet de thèse	67
CHAPITRE 2-ETUDE DES HAP PURS SUR LA LIGNEE HUMAINE HEPG2	70
I. Effet du B[a]P seul sur les cellules HepG2	70
1. Cytotoxicité du B[a]P.....	70
2. Formation des cassures de l'ADN dans les cellules HepG2 exposées au B[a]P	71
3. Formation des adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN dans les cellules HepG2 exposées au B[a]P.....	73
4. Conclusion.....	77

II. Effet d'autres HAP particulières sur les cellules HepG2	77
1. Cytotoxicité de différents HAP particuliers à 1 et 8 μ M.....	78
2. Cassures à l'ADN induites dans les cellules HepG2 exposées à différents HAP	79
3. Conclusions	80
CHAPITRE 3-ETUDE DE MELANGES SYNTHETIQUES D'HAP	82
I. Modulation de la génotoxicité du B[a]P par les autres HAP en mélanges binaires en co-traitement.....	82
1. Effet du B[a]P en mélange binaire équimolaire avec d'autres HAP particuliers.....	82
2. Etude de l'effet du B[b]F et du B[k]F sur la génotoxicité du B[a]P	87
3. Conclusion.....	90
II. Modulation de la génotoxicité du B[a]P lors d'un prétraitement cellulaire par des HAP	91
1. Effet d'un prétraitement par du B[a]P ou par les HAP purs sur la formation des dommages à l'ADN	91
CHAPITRE 4-EVALUATION DE LA GENOTOXICITE DE MELANGES ATMOSPHERIQUES REELS D'HAP.....	95
I. Caractéristiques des échantillons atmosphériques environnementaux et industriels ..	95
1. Description des prélèvements.....	95
2. Concentrations en HAP.....	96
3. Présentation des expériences	99
II. Modulation de la génotoxicité du B[a]P par des mélanges atmosphériques	100
1. Profils en HAP des mélanges	100
2. Cytotoxicité du B[a]P et des mélanges	101
3. Etude des dommages à l'ADN induits dans les cellules HepG2 exposées aux mélanges environnementaux ou à la fraction d'HAP particulières correspondante reconstituée	103
4. Conclusions	108
III. Génotoxicité de mélanges atmosphériques.....	110
1. A concentration constante en B[a]P	110
2. Génotoxicité de mélanges atmosphériques à volume d'air constant	112
CHAPITRE 5- DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	116
1. Choix du modèle et des techniques d'analyse de la génotoxicité	117
2. Le B[a]P, une molécule génotoxique	118
3. Le B[a]P forme des adduits plutôt que des lésions oxydatives	119

4.	<i>Les HAP modulent la formation des adduits BPDE</i>	<i>121</i>
5.	<i>Hypothèses mécanistiques.....</i>	<i>123</i>
6.	<i>Domages de l'ADN et mélanges réels</i>	<i>126</i>
7.	<i>Vers une meilleure estimation des dangers liés à l'exposition à des mélanges réels</i>	<i>135</i>
 CHAPITRE 6-MATERIEL ET METHODE		143
I.	<i>Prélèvements et analyse des échantillons atmosphériques</i>	143
1.	<i>Prélèvements atmosphériques</i>	<i>143</i>
2.	<i>Analyses quantitatives des HAP particulières</i>	<i>144</i>
II.	<i>HAP commerciaux</i>	144
III.	<i>Culture cellulaire.....</i>	145
1.	<i>Produits de culture et lignée cellulaire</i>	<i>145</i>
2.	<i>Traitement cellulaire</i>	<i>146</i>
3.	<i>Récolte des cellules</i>	<i>146</i>
IV.	<i>Tests de cytotoxicité</i>	147
1.	<i>Test du MTT</i>	<i>147</i>
2.	<i>Test de viabilité au bleu de trypan</i>	<i>147</i>
V.	<i>Tests de génotoxicité.....</i>	148
1.	<i>Test des comètes</i>	<i>148</i>
2.	<i>Dosage des adduits BPDE-N2-dGuo et de la 8-oxodGuo par HPLC/MS/MS.....</i>	<i>149</i>
VI.	<i>Traitement des résultats</i>	151
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		153
 PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS AFFICHEES.....		168

LISTE DES ABREVIATIONS

1-OHP : 1-hydroxypyrene
3-OHB[a]P : 3-hydroxybenzo[a]pyrene
8-oxodGuo : 8-oxo-7,8-dihydro-2' déoxyguanosine
AASQA : Associations Agréées pour la Surveillance de la Qualité de l'Air
AC : Aberrations Chromosomiques
ACGIH : American Conference of Governmental Industrial Hygienists
ADN : Acide Désoxyribonucléique
AFNOR : Association Française de Normalisation
AhR : Récepteur Aryl hydrocarbure
AKR : Aldo-céto réductase
ARE : Élément de Réponse aux Anti-oxydants
ASE : Accelerated Solvent Extraction
B[a]A : Benz[a]anthracene
B[a]P : Benzo[a]pyrene
B[b]F : Benzo[b]fluoranthène
B[g,h,i]P : Benzo[g,h,i]perylene
B[k]F: Benzo[k]fluoranthene
BaP_{Teq} : B[a]P équivalent toxique
BER : Réparation par Excision de Base
BPDE : 7,8-Dihydro-7,8-dihydroxybenzo(a)pyrene 9,10-oxyde
CEN : Comité Européen de Normalisation
CG/MS : Chromatographie Gazeuse Couplée à la Spectrométrie de Masse
Chr: Chrysène
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
CITEPA : Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique
CNAMTS : Caisse Nationale d'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés
CSB : Cassure simple brin
CYP450 : Cytochrome P450
dAMP : désoxyadénosine monophosphate
DB[a,h]A : Dibenz[a,h]anthracène

DB[a,l]P : Dibenzo[a,l]pyrène
DD : Dihydrodiol Déshydrogénase
DMSO : Diméthyl sulfoxyde
EFSA : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
EH : Epoxydes Hydrolases
EPI: Equipement de Protection Individuelle
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
EROD : Ethoxyrésosfurine O-deethylase
FET : Facteur d'Equivalence Toxique
Flua: Fluoranthène
GGR : Global genome repair
GST : Gluthation-S-transférase
HAP : Hydrocarbures Aromatiques polycycliques
HPLC/MS/MS : Chromatographie Liquide Haute Performance Couplée à la Spectrométrie de Masse en mode tandem
IBE : Indice Biologique d'Exposition
IP : Indéno[1,2,3-cd]pyrène
LCSQA : Laboratoire Central de la Surveillance de la Qualité de l'Air
MTT : 3-[4,5-dimethyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NER: Réparation par Excision de Base
NQO1 : NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1
Nrf2 : NF-E2-related factor 2
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PCDD/F : polychlorodibenzo-p-dioxines et dibenzofuranes
PM : Matière Particulaire
Pyr : Pyrène
Site AP : Site apurinique, apyrimidique
SULT : Sulfotransférase
TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
TCR : Transcription couplée à la réparation
TEF : Facteur d'Equivalence Toxique
UE : Union Européenne
UGT : UDP-glucuronyl transférase
USEPA : United States Environmental Protection Agency

VLEP : Valeurs Limites d'Exposition Professionnelle

VME : Valeur Moyenne d'Exposition

XRE : Elément de Réponse aux Xénobiotiques

CHAPITRE 1

ETAT DES CONNAISSANCES

CHAPITRE 1- ETAT DES CONNAISSANCES

I. Généralités

1. Définition

L'atmosphère contient plus de 2800 composés chimiques (Lewtas 1990) dont plusieurs ont été identifiés ou sont suspectés mutagènes ou cancérogènes pour l'homme (Cohen 2000, Skarek 2007). Parmi ces composés, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont considérés comme une des principales familles de polluants atmosphériques, susceptibles d'entraîner des cancers (Grimmer 1991, IARC 1983).

Les HAP sont des composés organiques constitués de carbone et d'hydrogène possédant 2 ou plusieurs cycles benzéniques fusionnés et sont générés lors de la combustion incomplète de la matière organique (charbon, pétrole, bois etc...). Cette famille chimique compte plus d'une centaine de composés (Lee 1976) dont 16 présentés dans la Figure 1 sont considérés comme prioritaires en raison d'effets préoccupants sur la santé par l'United States Environmental Protection Agency (USEPA 1984). En particulier, certains d'entre eux à l'image du Benzo[a]pyrène (B[a]P) génèrent des mutations au niveau de l'ADN et peuvent être à l'origine de cancers.

➤ Formation

Les HAP sont formés en grande majorité par la pyrolyse (décomposition thermique) et la pyrosynthèse (recombinaison en produits nouveaux) lors de la combustion incomplète des matières organiques tels que les combustibles fossiles ou plus généralement les matières composées de C et H.

Dans l'atmosphère, les HAP de 2 ou 3 cycles sont sous forme gazeuse, alors que les HAP de 4 à 6 cycles sont sous forme particulaire dont 70 % sont adsorbés sur des particules ultrafines (<0,5 μm) (DeMaio 1966), (Sheu 1997). Certains HAP de 3 et 4 cycles (anthracène, phénanthrène, pyrène, fluoranthène) se retrouvent à la fois dans la phase gazeuse et dans la phase particulaire. En raison de leur caractère hydrophobe, liposoluble et volatil, les HAP ont tendance à s'adsorber sur les matrices solides, et en particulier sur les matières organiques.

➤ Réactivité

Dans l'air, ils peuvent réagir avec les ultra-violets et avec d'autres polluants comme l'ozone, le dioxyde d'azote (NO₂) et le dioxyde de soufre (SO₂) pour produire des diones, des nitro-HAP et des acides sulfoniques. Les composés ainsi formés peuvent être parfois plus dangereux que les composés parents (Nikolaou 1984).

- Photooxydation des HAP : la photooxydation des HAP produit des composés oxygénés, dont certains sont de probables cancérigènes (Durant 1996), (Lundstedt 2007)
- Réaction avec les oxydes d'azote : conduit à la formation de nitro-HAP. Les composés ainsi formés peuvent être des mutagènes directs (Pitts 1978, Tokiwa 1994)
- Réaction avec l'ozone : L'ozone réagit facilement avec les HAP. Plusieurs réactions ont été identifiées, les produits de réaction sont des diacides, des quinones ou des cétones (Pitts 1980). Certains d'entre eux sont des mutagènes directs dans le test d'Ames. C'est le cas du benzo[a]pyrene-4,5-oxide.
- Réaction avec des composés sulfurés : les HAP peuvent réagir avec SO₂, SO₃ ou H₂SO₄. Les produits de réaction sont des acides sulfoniques et sulfiniques (Jager 1974), (Tebbens 1966).

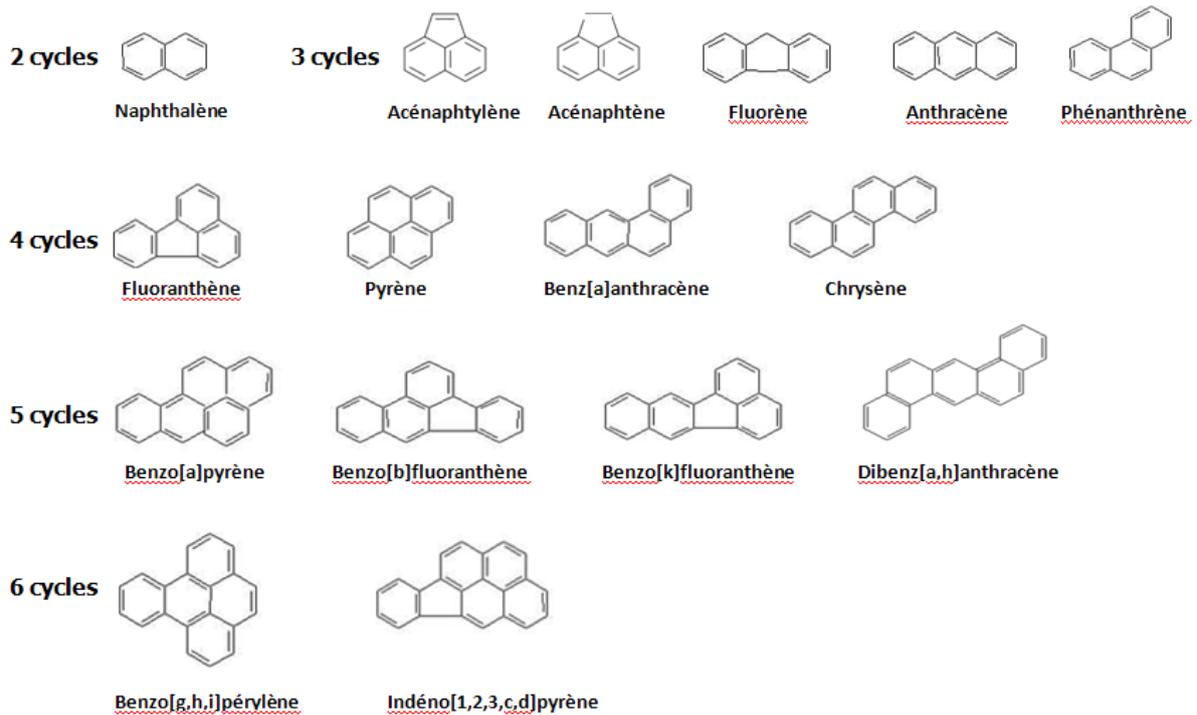


Figure 1 : Présentation des 16 HAP classés prioritaires par l'USEPA

2. Source d'exposition des populations aux HAP

2.1 Exposition environnementale

2.1.1 L'alimentation

La principale source d'exposition aux HAP dans la population générale est l'alimentation en particulier la consommation de viandes et poissons fumés ou grillés sur le feu, de graisses et huiles végétales ainsi que l'ingestion de produits contaminés par dépôt atmosphérique (végétaux) ou par bioaccumulation (mollusques). Les produits de la mer et les céréales constituent la principale source d'absorption quotidienne d'HAP dans les pays de l'UE. En ce qui concerne les céréales, leur teneur en HAP est modérée mais elles sont consommées en grande quantité. L'ingestion quotidienne moyenne de B[a]P a été estimée entre 50 à 290 ng/adulte d'après des études menées dans 6 pays européens (Scientific committee on food 2002).

Chez les sujets non fumeurs, l'alimentation représente ainsi environ 96 % des expositions totales en HAP.

2.1.2 Tabagisme

La fumée de tabac est une source importante d'HAP dans l'air. On estime qu'une personne fumant 20 cigarettes par jour absorbe en moyenne 105 ng/jour de BaP et un fumeur passif 40 ng/jour (EFSA 2008).

2.1.3 L'atmosphère

Il existe deux types de sources d'émission des HAP dans l'atmosphère : les sources naturelles (feu de forêt, volcans...) et les sources anthropiques comprenant les émissions industrielles et domestiques rassemblées sous le terme de sources stationnaires ainsi que les émissions liées aux modes de transport qualifiées de sources mobiles.

En France, les quantités d'HAP rejetés dans l'environnement en 2007 en ne prenant en compte que le Benzo[a]pyrène (B[a]P), Benzo[b]fluoranthène (B[b]F), Benzo[k]fluoranthène (B[k]F) et Indéno[1,2,3-cd]pyrène (IP) étaient estimées à 22 tonnes dont 74 % issus du secteur résidentiel/tertiaire (CITEPA 2009) (voir Figure 2).

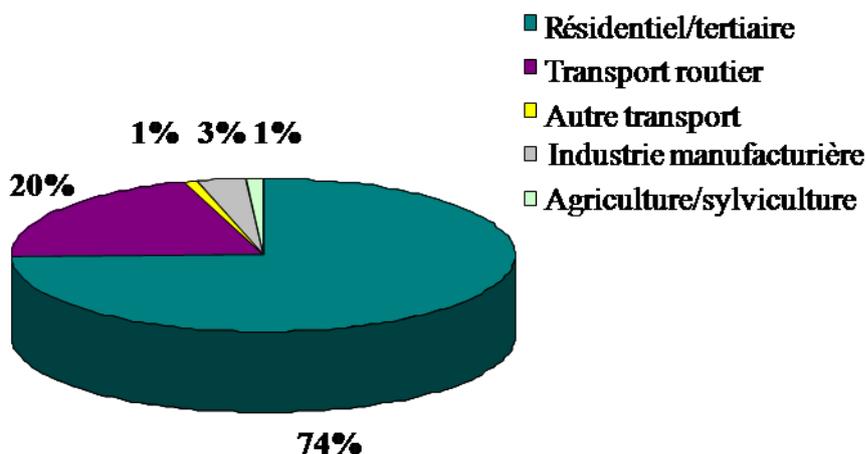


Figure 2 : Principales sources d'émission des HAP en France en 2007

Au niveau domestique, les HAP sont émis dans les fumées lors de la cuisson par grillade des aliments mais ils sont surtout issus du mode de chauffage et en particulier du chauffage au bois, au fuel ou au charbon des habitations. Contrairement aux sources industrielles celles-ci ne sont pas bien répertoriées et quantifiées.

Les véhicules automobiles sont les sources mobiles les plus importantes d'HAP en milieu urbain. Les gaz d'échappement sont dilués et refroidis dans l'atmosphère; ce qui provoque la condensation d'une partie des hydrocarbures présents. Cette condensation se fait préférentiellement sur les « germes » disponibles : suies et résidus de combustion des minéraux présents dans l'huile et le gazole. La plupart des particules émises ont une taille inférieure à 2.5 µm.

2.1.4 Emission industrielle

Les émissions industrielles comprennent l'ensemble des activités industrielles et les activités d'incinération de déchets.

2.2 Exposition professionnelle aux HAP

L'exposition professionnelle aux HAP concernerait près de 1,6 millions de salariés en France (Ministère de l'emploi 2005) plaçant les HAP en tête des composés responsables de cancers professionnels.

Les principales industries émettrices de quantités importantes d'HAP sont caractérisées par des procédés utilisant des produits dérivés de la houille : goudron et brai de houille.

Ces industries sont les suivantes :

- Cokeries produisant du coke à partir de distillation de la houille
- Sidérurgie par l'utilisation du coke
- Production d'électrodes en carbone à partir du brai
- Electrolyse de l'aluminium et production de silicium principalement par l'utilisation d'électrodes composées de brai de houille, mais également de pâte de brai nécessaire à la réfection des fours.
- Imprégnation du bois avec l'utilisation de créosote
- Aciérie

Dans les secteurs utilisant des produits dérivés du pétrole, les niveaux d'HAP sont beaucoup plus faibles :

- Fabrication de pneus à travers l'utilisation de noir de carbone entrant dans la fabrication du caoutchouc.
- Industries pétrochimiques et les industries du bitume et goudron.
- Mécanique avec l'utilisation d'huiles et de graisses.

3. Voie d'absorption et d'élimination des HAP

3.1 Voies d'exposition

Pour la population générale, les voies d'exposition aux HAP sont digestive par l'ingestion d'aliments contaminés et pulmonaire liée au tabagisme et à la pollution atmosphérique, notamment en zone urbaine et péri-industrielle.

En milieu professionnel, la voie d'exposition est essentiellement pulmonaire par l'inhalation d'air contenant de très fortes concentrations en HAP pouvant atteindre le mg/m^3 et des concentrations en B[a]P pouvant être parfois 5000 fois plus élevées que dans l'environnement.

Il existe également une absorption cutanée des HAP lors du contact direct avec des produits ou indirects avec des éléments souillés et aussi par retombées atmosphériques de poussières en suspension.

L'exposition est caractérisée par plusieurs paramètres, à savoir: les concentrations atmosphériques des différents HAP, le coefficient de partition entre la phase particulaire et la phase gazeuse ainsi que la taille des particules. Seules les particules de diamètre inférieur à 10 μm (PM10) peuvent atteindre l'appareil pulmonaire et sont dites particules inhalables.

3.2 Voies d'absorption, distribution et élimination des HAP

Les HAP, très liposolubles, sont absorbés par le poumon, l'intestin et la peau.

Absorption respiratoire : en fonction de la granulométrie et la composition des particules, il existe une clairance muco-ciliaire qui fait remonter les particules dans l'arbre respiratoire. Elles sont alors avalées et entrent dans l'organisme par voie digestive. Les particules les plus petites se déposent directement dans le parenchyme pulmonaire profond où une métabolisation a lieu.

Absorption digestive : rapide, facilitée par les aliments riches en graisse.

Absorption cutanée : chez l'homme, *in vitro*, la dose absorbée est de 1 à 3 % de la dose appliquée (Moody 1995). Elle constitue une voie d'entrée importante pour les HAP dans le cas d'expositions professionnelles. Il a été estimé chez des salariés des fours à coke que l'absorption du pyrène par la peau contribuait pour 50 % à la dose interne (VanRooij 1993) voire même 90 % chez les salariés utilisant de la créosote pour l'imprégnation du bois (Van Rooij 1993).

Les études chez l'animal montrent que les HAP sont rapidement transportés de la voie d'entrée vers d'autres organes via le sang et les vaisseaux lymphatiques. La distribution est rapide, quelle que soit la voie d'entrée et les HAP sont détectés dans pratiquement tous les organes. Un stockage se fait dans le foie, les reins et le tissu adipeux.

Les HAP, très lipophiles peuvent entrer dans les cellules en franchissant la membrane plasmique. Une fois dans la cellule, ils s'associent généralement avec des molécules hydrophobes qui participent à sa distribution à travers les compartiments intracellulaires. La plupart des HAP s'accumule préférentiellement dans la mitochondrie et le noyau.

L'élimination des métabolites des HAP se fait majoritairement par les fèces et les urines.

En ce qui concerne le B[a]P et ses métabolites, l'élimination se fait majoritairement par le biais du système hépato-biliaire et par le tractus intestinal. L'excrétion urinaire est une voie mineure (Moir 1998).

4. Toxicité des HAP

Les HAP peuvent être à l'origine d'une toxicité aigue et surtout d'une toxicité chronique.

Toxicité aigue :

Les HAP contribuent fortement à la réduction du développement de tous les organes et de plus à une pigmentation locale de la peau. L'exposition simultanée aux HAP et aux UV peut provoquer une dermatite phototoxique accompagnée de conjonctivite. Cette toxicité est très modérée et aucun cas de décès n'a été rapporté.

Les HAP peuvent être à l'origine d'irritations pulmonaires et d'eczéma et de troubles de l'immunité avec en particulier une diminution des immunoglobulines G et A sériques qui a été rapportée chez des salariés travaillant dans une fonderie (Szczeklik 1994).

Toxicité chronique :

Des études épidémiologiques ont montré une association entre des niveaux d'expositions professionnelles élevés aux HAP chez les salariés de certains secteurs industriels (cokerie, fonderie, utilisation de dérivés de houille...) et une augmentation des risques de cancer du poumon, de la vessie et de la peau (Bosetti 2007, Chen 2008, Gaertner 2002, Mastrangelo G 1996). Ces cancers figurent dans le tableau des cancers reconnus comme maladies professionnelles en France.

Des effets tératogènes et toxiques pour le fœtus ont été mis en évidence chez l'animal. Chez l'homme, des études sont actuellement en cours.

5. Classification

Les HAP ont été classés pour leur cancérogénicité par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) ainsi que par l'Union Européenne (UE) (voir Tableau 1), cette dernière classification étant la seule à avoir une valeur réglementaire en milieu du travail en France.

Des préparations contenant des HAP et des secteurs d'activité sont également classés par l'UE et le CIRC. Ces classifications sont établies sur la base de données épidémiologiques et le cas échéant d'études *in vivo* sur l'animal ou *in vitro*.

Classification du CIRC :

■ **Groupe 1**

L'agent ou le mélange est cancérigène pour l'homme.

■ **Groupe 2**

2A : L'agent ou le mélange est probablement cancérigène pour l'homme.

2B : L'agent ou le mélange est un cancérigène possible pour l'homme.

■ **Groupe 3**

L'agent (le mélange ou le mode d'exposition) est inclassable quant à sa cancérigénicité pour l'homme.

■ **Groupe 4**

L'agent (le mélange ou le mode d'exposition) n'est probablement pas cancérigène pour l'homme.

Classification de l'UE

■ **Catégorie 1:** Substances et préparations que l'on sait être cancérigènes pour l'homme.

■ **Catégorie 2:** Substances et préparations pour lesquelles il existe une forte présomption que l'exposition de l'homme à de telles substances et préparations peut provoquer un cancer ou en augmenter la fréquence.

■ **Catégorie 3:** Substances et préparations préoccupantes pour l'homme en raison d'effets cancérigènes possibles mais pour lesquelles les informations disponibles sont insuffisantes pour classer ces substances et préparations dans la catégorie 2.

Tableau 1 : Classification par le CIRC et l'UE de plusieurs HAP, ou préparations et secteurs d'activités émettant des HAP

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

Il convient de noter que parmi les HAP classés pour leur cancérogénicité, ne figurent aucun HAP gazeux mais uniquement des HAP particulaires. Le B[a]P est le seul HAP à avoir été classé dans le groupe 1 par le CIRC.

Les HAP ne sont pas tous cancérogènes. Ces HAP non cancérogènes sont généralement des HAP de moins de 4 cycles aromatiques, la cancérogénicité étant fréquemment associée à des HAP contenant 4 à 6 cycles. Ces HAP possèdent en effet des configurations structurales particulières appelées région baie et région fjord (Figure 3).

Ceci correspond à une zone structurée en anneau complexe formée par un anneau benzo angulaire et saturé fusionné avec un anneau aromatique. La structure angulaire formée par les

anneaux constitue une gêne stérique favorisant les réactions d'oxydation et la formation de radicaux.

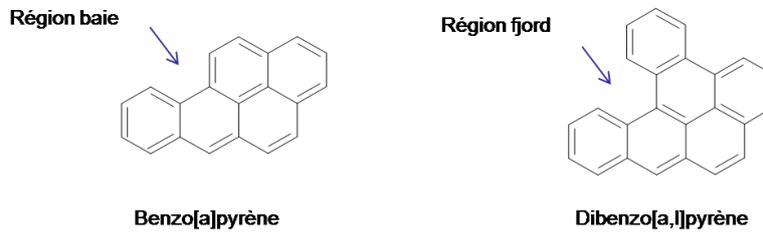


Figure 3 : Caractéristique structurale des HAP ayant un potentiel cancérigène

II. Métabolisme et mécanisme d'action des HAP

Les HAP, à l'image du Benzo[a]pyrène sont des procarcinogènes et nécessitent une activation métabolique par des enzymes pour acquérir des propriétés électrophiles et exercer leurs effets toxiques. Cette bioactivation dont la fonction première est de détoxifier l'organisme transforme des molécules inertes en intermédiaires réactifs pouvant réagir sur les biomolécules dont l'ADN (Miller 2001) (voir Figure 4).

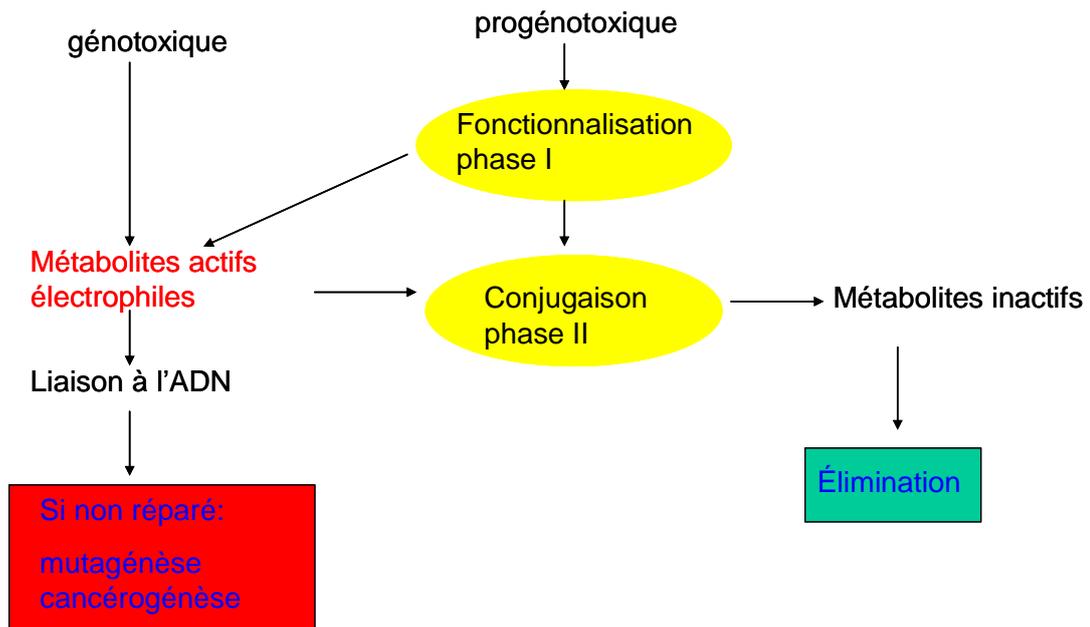


Figure 4 : Schéma général d'activation des substances génotoxiques

1. Voies de métabolisation des HAP

Il existe 3 principales voies de métabolisation des HAP (Xue 2005) (Figure 5). La plus importante implique la famille des cytochromes P450 (CYP450) qui catalyse la mono-oxygénation des HAP en époxyde. La 2^{ème} voie repose sur la formation d'un radical cation suite à l'oxydation à un électron des HAP, catalysée par des cytochromes P450 peroxydase. Enfin une voie mise en évidence plus récemment implique la formation de *o*-quinones à partir de catéchols, catalysée par des dihydrodiols déshydrogénases. Dans une moindre mesure, les HAP peuvent être activés par des prostaglandines synthases et lipoxygénases, (Miller 2001).

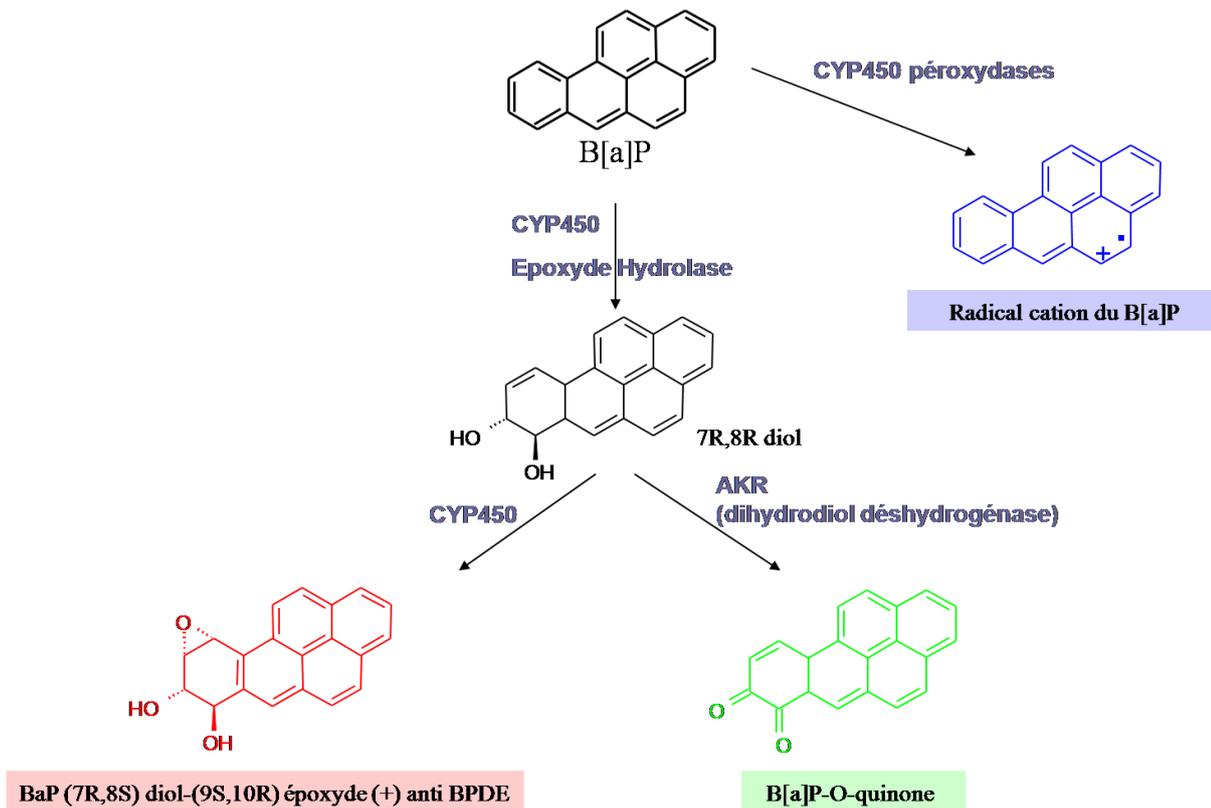


Figure 5 : Principales voies de métabolisation du BaP

1.1 La voie des CYP

Les cytochromes P450 réalisent une mono-oxygénation du B[a]P en époxyde sur les carbones C7 et C8 (Figure 6). L'hydrolyse de cet époxyde par une époxyde hydrolase (EH) conduit à la formation d'un dihydrodiol qui subit une nouvelle époxydation sur les carbones C9 et C10 par les CYP450 pour donner un diol époxyde ou 7,8-Dihydro-7,8-dihydroxybenzo(a)pyrène 9,10-oxyle (BPDE), métabolite terminal du B[a]P extrêmement réactif vis-à-vis de l'ADN.

Selon la théorie de la région baie, l'anneau époxyde placé de façon adjacente à la région baie (ce qui correspond à la position 10 du groupement benzyle du BPDE), serait le site ayant la plus grande réactivité électrophile et serait le site préférentiel d'interaction covalente du BPDE avec des sites nucléophiles telles que les bases puriques de l'ADN.

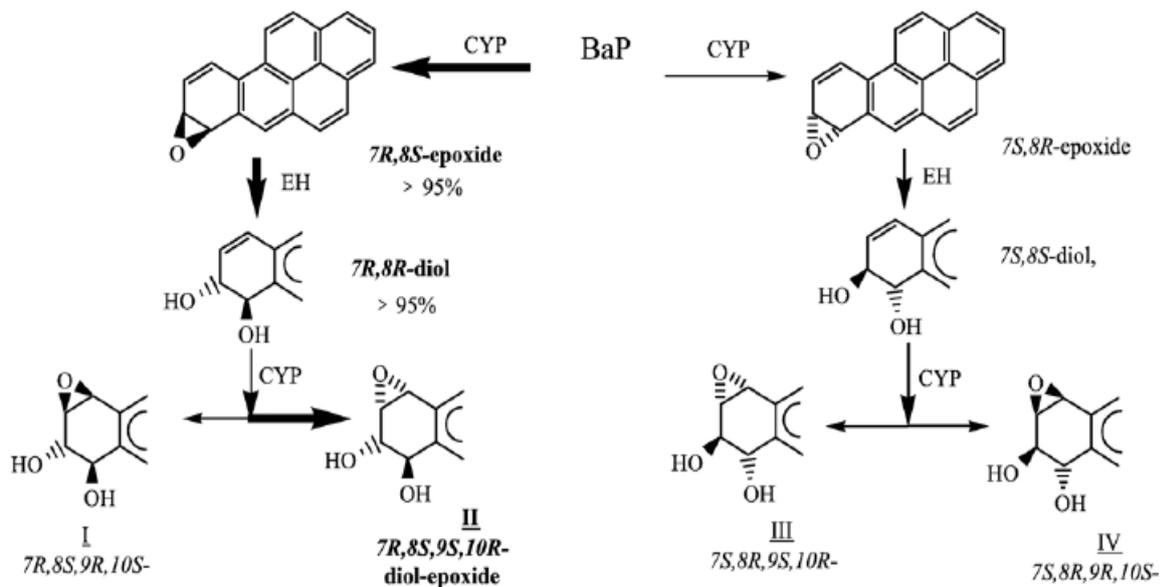


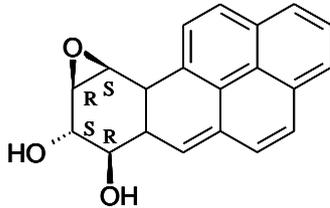
Figure 6 : Voie des CYP450

Cet époxyde comporte 2 diastéréoisomères *syn* et *anti* qui eux-mêmes possèdent 2 énantiomères optiquement actifs (+) et (-). Il existe donc 4 isomères du BPDE (Figure 7).

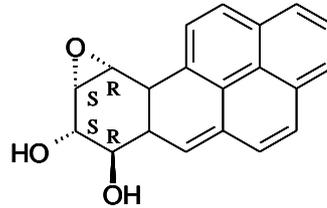
La formation des métabolites par les CYP et EH se fait avec une grande stéréosélectivité (Xue 2005). Elle se traduit dans des microsomes hépatiques de souris par la formation presque exclusive de l'isomère 7R,8S oxyde (Yang 1988) qui est converti préférentiellement en 7R,8R diol. Cette réaction donne majoritairement l'isomère diol époxyde 7R,8S,9S,10R c'est-à-dire l'isomère (+) anti BPDE.

Des expériences menées avec des CYP450 recombinantes humaines montrent que le B[a]P et le B[a]P-7,8-diol sont métabolisés avec un meilleur rendement par les CYP1A1 suivi des CYP1B1 puis des CYP1A2. Ces dernières sont incapables de former le 7,8 diol (Kim 1998)

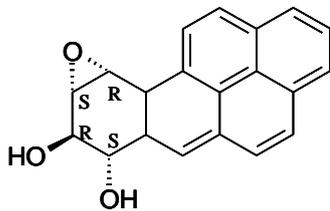
La voie des CYP450 aboutit à la formation du BPDE, métabolite ultime du BaP, qui forme des adduits avec certaines bases de l'ADN.



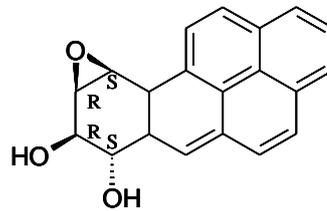
(-)-BaP (7R,8S) diol-(9R,10S) époxyde (-) syn BPDE



(+)-BaP (7R,8S) diol-(9S,10R) époxyde (+) anti BPDE



(+)-BaP (7S,8R) diol-(9S,10R) époxyde (+) syn BPDE



(-)-BaP (7S,8R) diol-(9R,10S) époxyde (-) anti BPDE

Figure 7 : Isomères du BPDE

1.2 Voie d'oxydation mono-électronique par les peroxydases

La voie d'oxydation mono-électronique par les peroxydases a pour mécanisme l'oxydation à un électron du B[a]P par les peroxydases cellulaires et/ou potentiellement par les cytochromes P450 (Figure 8). Elle conduit à la formation de radicaux cations.

Le radical cation, contrairement au BPDE est instable chimiquement.

Il peut être généré par des oxydants chimiques, mais également par électrochimie ou de façon enzymatique. La probabilité qu'un HAP perde un électron et donne naissance à un radical cation ainsi que la réactivité de ce dernier vis-à-vis de l'ADN dépendent de certains facteurs :

- Un potentiel d'ionisation qui doit être faible pour permettre l'arrachement d'un électron.
- La localisation de la charge sur le radical cation et qui rend cet intermédiaire plus réactif vis-à-vis d'espèces nucléophiles.
- Une configuration géométrique optimale facilitant leur liaison covalente avec les sites nucléophiles de l'ADN.

Les métabolites générés par cette voie forment également des adduits avec les bases de l'ADN.

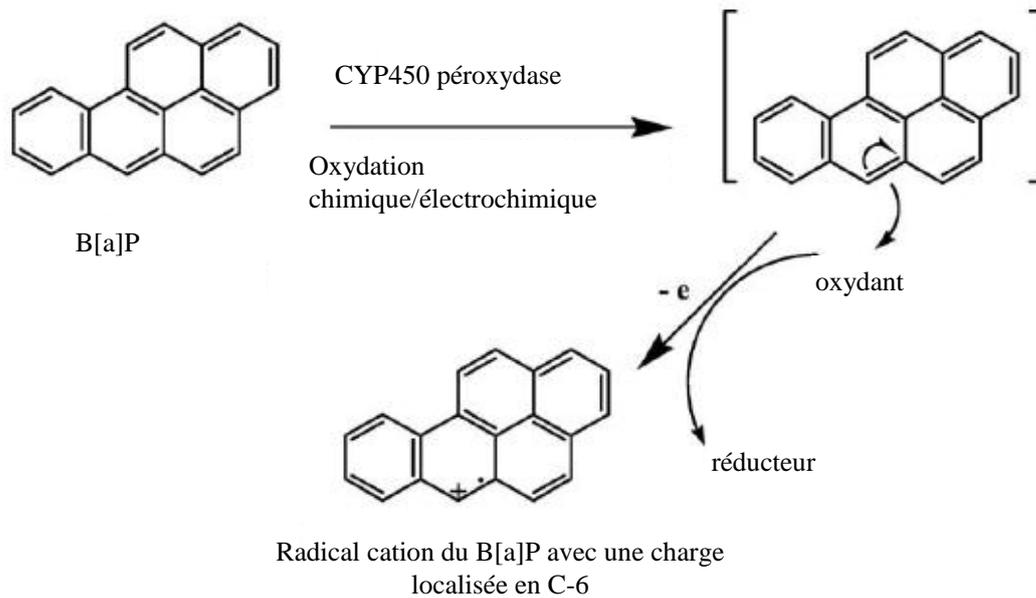


Figure 8 : Formation du radical cation

1.3 Voie des quinones

La voie métabolique des quinones met en jeu des dihydrodiol déshydrogénases (DD), enzymes appartenant à la superfamille des aldo-céto réductases (AKR). La métabolisation du B[a]P-diol par ces enzymes produit un catéchol (Figure 9). Ce catéchol subit deux oxydations à un électron avec la production concomitante d'espèces réactives de l'oxygène pour former des HAP *o*-quinones (Smithgall 1988).

La première oxydation produit un anion *o*-semiquinone et du peroxyde d'hydrogène suivi par une deuxième oxydation qui conduit à la formation de *o*-quinone et d'un anion superoxyde.

En présence d'équivalents réducteurs cellulaires (ex: NADPH), les HAP *o*-quinones peuvent aussi être réduites en catéchols entraînant des cycles rédox supplémentaires qui amplifient la production d'espèces réactives de l'oxygène H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$ (Penning 1996). En présence de métaux rédox tels que Fe^{2+} ou Cu^+ , H_2O_2 peut donner $\bullet\text{OH}$.

Dans l'ADN, ces espèces réactives conduisent à la génération de bases oxydées notamment au niveau de la guanine (7,8-dihydro-8-oxo-guanine). De plus, $\bullet\text{OH}$ est à l'origine de cassures de

brins (Penning 1999). Dans les membranes, une augmentation de la peroxydation lipidique (augmentation de la formation de malondialdéhyde) est observée.

Les HAP *o*-quinones sont à l'origine d'une production d'ERO mais peuvent également former des adduits à l'ADN.

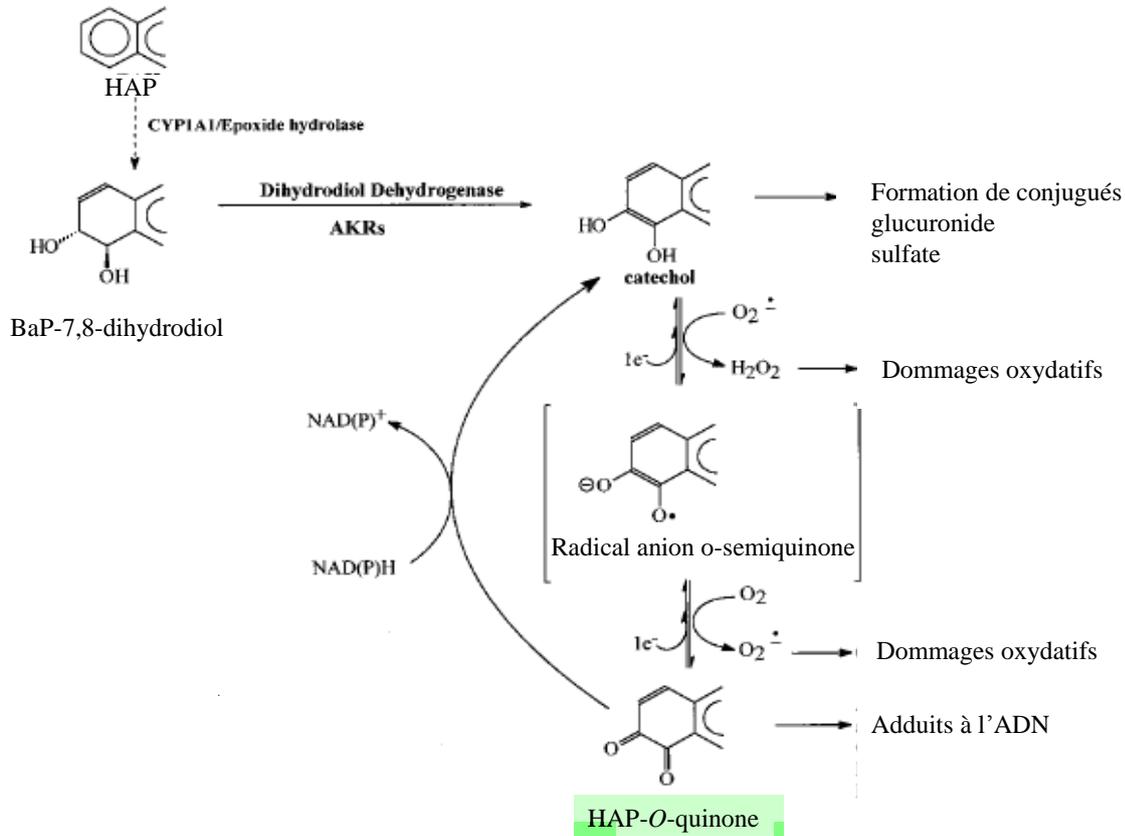


Figure 9 : Voie des quinones

2. Les enzymes de la métabolisation

Les enzymes chargées de la biotransformation des xénobiotiques dans l'organisme sont classées en deux catégories. On distingue les enzymes de phase I parmi lesquelles on retrouve les CYP450, les époxyde réductases et époxydes hydrolases (EH) et les enzymes de phase II avec la Gluthation-S-transférase (GST), l'UDP-glucuronyl transférase (UGT) et la Sulfotransférase (SULT) (Shimada 2006).

Les enzymes de phase I modifient ou introduisent des groupements fonctionnels au niveau des xénobiotiques par des réactions d'oxydation, hydrolyse etc... afin de les rendre plus hydrosolubles et faciliter leur conjugaison par les enzymes de phase II et leur élimination dans les urines, les fèces et la bile. Les enzymes de phase II réalisent la conjugaison des substances

chimiques modifiées par les enzymes de phase I, pour permettre à ces substances d'être éliminées via des pompes ou des transporteurs. Il s'agit par exemple de réactions de glucurono-conjugaison ou de sulfo-conjugaison, médiées respectivement par la UDP-glucuronyl-transférase, et la sulfotransférase, ou des réactions de conjugaison au glutathion.

2.1 Mécanismes d'induction des gènes de phase I et des gènes de phase II par les HAP

Les HAP ont la particularité d'être des substrats mais également des inducteurs des CYP450 et des enzymes de phase II. Cette induction est régulée par le récepteur AhR (aryl hydrocarbon) qui est spécifique des composés aromatiques plans et qui fait partie de la famille bHLH/PAS (basic Helix-Loop-Helix/Per-Arnt-Sim). Il est normalement présent dans le cytosol sous la forme d'un hétérotétramère 9S en complexe avec 2 protéines Heat shock 90 et une autre protéine XAP2 (immunophilin-like protein hepatitis B virus X-associated protein 2) (Delescluse 2000) comme représenté dans la Figure 10. Il permet l'expression des gènes des CYP1A1, CYP1B1, CYP1A2 ainsi que d'autres enzymes de la métabolisation après avoir formé un complexe avec un de ses ligands.

Les HAP sont considérés comme des inducteurs bifonctionnels : ils augmentent l'expression à la fois des CYP et des enzymes de détoxification de phase II (y compris les AKR) par 2 mécanismes (Prochaska 1985) illustrés à la Figure 11.

- 1^{er} mécanisme : Les HAP se lient directement au AhR. Une fois lié, le AhR se dissocie de la protéine Heat shock 90 et est rapidement transloqué dans le noyau où il forme un complexe avec son partenaire Arnt (Ah receptor nuclear translocator) pour former un hétérodimère 6S. Le complexe AhR/Arnt active l'expression d'une batterie de gènes contenant un élément de réponse aux xénobiotiques (XRE) dans leur région régulatrice (ex: CYP1A1 et CYP1B1) (voir Figure 10).
- 2^{ème} mécanisme: Les HAP sont activés par le métabolisme CYP1A1 en composés électrophiles. Ces composés électrophiles activent à leur tour d'autres composés qui

lient et activent des éléments de réponse (AREs ou EpREs) en amont de gènes de détoxification de phase II.

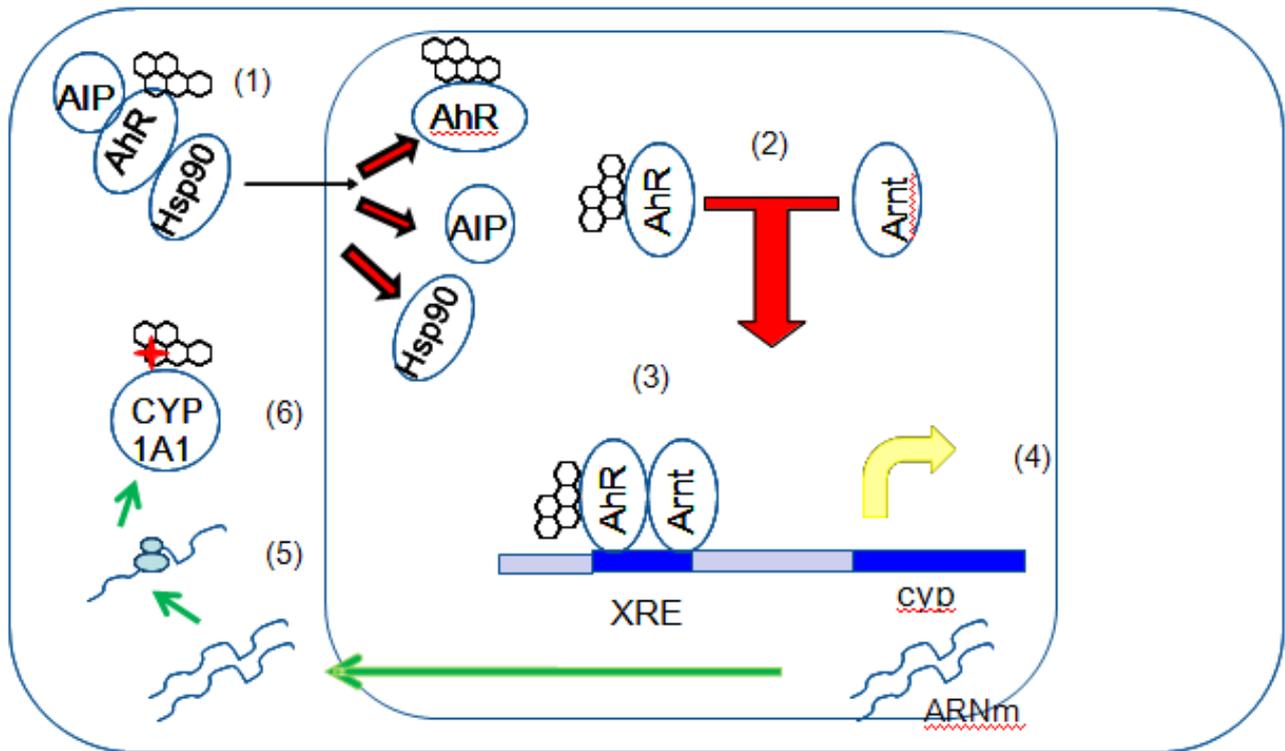


Figure 10 : Schéma simplifié de l'induction des gènes *cyp1a1* par le B[a]P : (1) Liaison du B[a]P au AhR, Translocation du complexe AhR/Hsp90 dans le noyau et dissociation (2) Dimérisation du AhR avec l'Arnt, (3) Fixation du complexe AhR/Arnt au niveau d'un élément de réponse aux xénobiotiques XRE, (4) Transcription des gènes *cyp*, (5) Translocation de l'ARNm dans le cytoplasme et traduction par les ribosomes pour donner une protéine CYP1A1, (6) Métabolisation d'une molécule de B[a]P par la protéine néo-synthétisée.

Récemment il a été démontré que certains intermédiaires électrophiles, les HAP *o*-quinones, étaient également des inducteurs bifonctionnels, capables d'induire directement l'expression des gènes par les deux mécanismes précédemment cités (Burczynski 2000).

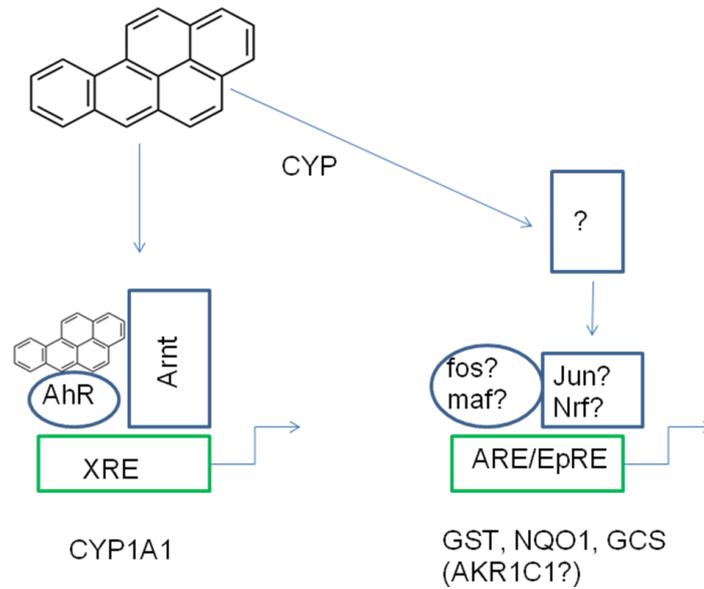


Figure 11 : Induction des gènes de phase I et de phase II via les voies de signalisation XRE et ARE/EpRE

Il est admis depuis peu que les enzymes de phase II faisant partie de la batterie des gènes régulés par le récepteur AhR sont reliées à une 2^{ème} batterie : celle du gène NF-E2-related factor 2 (Nrf2) impliquée dans la protection contre le stress oxydant (Nguyen 2009). Le facteur de transcription Nrf2 se lie aux éléments de réponse aux antioxydants (ARE) présents au niveau de séquences régulatrices de différents gènes dont certains gènes de phase II (NQO1, GSTA2, UGT1A6) (Venugopal 1998).

Le lien entre la batterie de gènes AhR et Nrf2 peut s'expliquer par le fait que Nrf2 est un gène cible de AhR (Miao 2005). D'autre part, Nrf2 peut être activé indirectement par des espèces réactives de l'oxygène (ERO) générées lors des réactions enzymatiques catalysées par les CYP1A1 (Marchand 2004, Radjendirane 1999).

Sur la base de leur réactivité chimique, les métabolites d'HAP générés suite à la biotransformation des molécules parents par les enzymes de phase I peuvent être définis en nucléophiles tels que les trans-dihydrodiols, phénols et quinols ou en électrophiles comprenant les arènes oxydes, diols époxydes et quinones.

Les composés sulfo-conjugués, glucuro-conjugués et conjugués au glutathion sont les principaux produits résultant de la biotransformation du B[a]P dans des hépatocytes de rat (Zaleski 1983).

En général, les métabolites nucléophiles des HAP subissent une détoxification enzymatique par conjugaison à l'acide glucuronique ou au sulfate.

Phénols et diols sont préférentiellement sulfo et glucuro-conjugués (Figure 12). Les B[a]P phénols et quinols (hydroquinones) sont des substrats préférentiels pour la UDP-glucuronyl-transférase (UGT). De façon alternative, des réactions de détoxification médiées par la formation d'arylester sulfates de dérivés phénols et dihydrodiols ont été décrites. Les réactions de conjugaison catalysées par les sulfotransférases (SULT) se font avec un faible renouvellement, aussi, lorsque la concentration des métabolites nucléophiles est élevée, les réactions de glucuro-conjugaison prédominent. La formation d'ester sulfate prédomine à des concentrations plus faibles en substrat grâce à la forte affinité des enzymes SULT.

La détoxification des métabolites électrophiles des HAP tels que les arènes oxydes et les diols époxydes est réalisée par conjugaison enzymatique au GSH. En particulier, la voie du GSH est très importante pour la détoxification du BPDE (Srivastava 1999). Les adduits au GSH formés sont soit immédiatement excrétés de la bile vers les fèces, soit transportés dans les reins où une dégradation enzymatique et une acétylation conduisent à la formation de dérivés d'acide mercapturique qui sont ensuite éliminés. Les tétraols sont retrouvés sous la forme de sulfo ou glucuro-conjugués.

Les HAP *o*-quinones sont elles inactivées en hydroquinones suite à une réduction à 2 électrons catalysée par la NADPH quinone oxydoréductase I.

Dans les urines de rat recevant des injections intrapéritonéales de [¹⁴C]B[a]P, les principaux conjugués mesurés sont pour 50 % de la quantité excrétée dans l'urine de l'acide mercapturique (conjugués de la N-acétyl-cystéine), et pour 30 % des sulfo-conjugués. Les conjugués au glutathion ne sont retrouvés qu'à l'état de trace (Yang 1999).

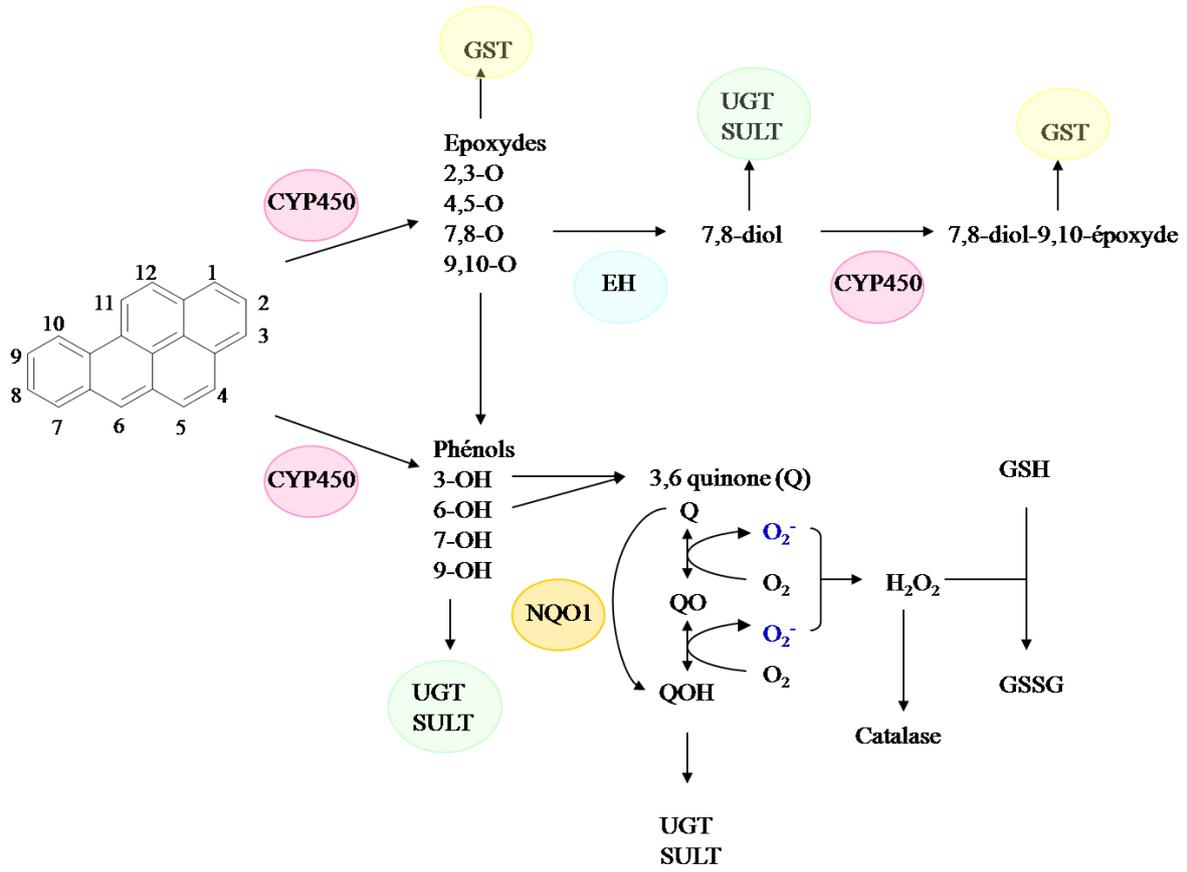


Figure 12 : Coordination entre les enzymes de phase I et de phase II pour la métabolisation des HAP

2.2 Les cytochromes P450

2.2.1 Définition

Les cytochromes P450 (CYP450) sont une grande famille d'hémoprotéines présentes chez la plupart des systèmes vivants, des bactéries aux humains, catalysant principalement des réactions de monooxygénation selon le schéma ci-dessous :

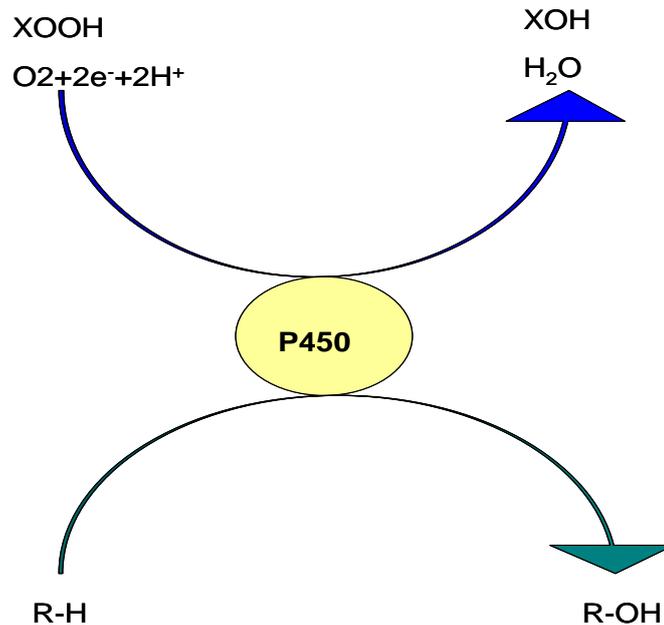


Figure 13 : Mécanisme d'action des CYP450
R-H substrat, ROH produit hydroxylé, XOOH peroxyde, XOH dérivé hydroxylé

Chez l'homme, on trouve les CYP450 dans presque tous les tissus, sauf dans les muscles, les os, et les globules rouges. Les organes particulièrement riches en CYP450 sont le foie et les glandes surrénales. Ces CYP450 sont localisés au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique des cellules.

Chez l'homme, il existe près de 60 CYP450 différents métabolisant une grande variété de xénobiotiques (Tableau 2). Les HAP sont métabolisés par les enzymes CYP1 : CYP1A1, 1A2 et 1B1. Le rôle clé de ces enzymes dans l'activation du B[a]P et d'autres HAP en diol époxydes a été largement démontré (Shimada 2004, Shimada 1989).

2.2.2 Expression et activité des CYP1

Ces enzymes sont exprimées de façons différentes dans les organes. Les CYP1A2 sont exprimés majoritairement dans le foie alors que les CYP1A1 et 1B1 sont surtout exprimés dans les organes extra-hépatiques mais à des niveaux d'expressions différents. Dans la plupart des organes, l'expression des CYP1B1 est plus élevée que celle des CYP1A1 excepté dans le pancréas, l'intestin grêle et le côlon (Shimada 1996). Notons que le CYP1B1 n'est pas exprimé dans le foie. Les CYP1A2 catalysent les réactions d'activation HAP et HAP dihydrodiols avec un taux plus faible que les CYP1A1 et 1B1 (Shimada 1996, Shimada 2001). Les CYP1B1 sont plus efficaces que les CYP1A1 dans la conversion du B[a]P en benzo[a]pyrène-7,8-diol (Shimada 2001).

2.2.3 Induction et inhibition des CYP1A1 et CYP1B1

L'induction de l'expression des CYP 1A1 et 1B1 par les HAP est régulée différemment selon les organes (Shimada 2003) : chez la souris, l'induction la plus forte du CYP1B1 par des HAP est mesurée dans les organes dans lesquels l'expression basale du CYP1B1 est la plus faible. Pour pouvoir lier le récepteur AhR, les molécules ligands doivent posséder une configuration structurale bien définie (Pushparajah 2008). En particulier, les inducteurs de la sous-catégorie CYP1A sont essentiellement des molécules planes caractérisées des dimensions maximum de 14Å x 12Å x 5Å (Denison 2002, Waller 1995). Les HAP à 3 cycles même non substitués comme l'anthracène, le pyrène ou le fluorène ne sont pas de bons ligands du récepteur AhR et sont de mauvais inducteurs des CYP1A (Shimada 2002). Il existerait, de plus, une corrélation entre l'inductibilité des CYP1A1 dans le foie et les poumons de rats et le rapport longueur/largeur des ligands (Pushparajah 2008).

CYP1A1 et CYP1B1 peuvent être inhibés par certains composés chimiques, en particulier l' α -naphthoflavone appartenant à la famille des flavonoïdes, ainsi que des composés synthétiques organo-séléniques tels que 1,2-, 1,3- et 1,4-phenylènebis(méthylène)sélocyanate (Shimada 1997) ou encore des HAP vinylés ou acétylés (après addition d'une molécule d'acétylène) (Peter Guengerich 2003, Shimada 1998). Des produits naturels à l'image du resvératrol (polyphénol du raisin) (Chun 1999) ou de la rhapontigénine (Chun 2001), métabolite aglycone de la rhaponticine (glucoside stylobène extrait de la rhubarbe) sont également des inhibiteurs de ces CYP1.

Plus récemment, il a été établi que certains HAP (B[a]P, 5-méthyl-chrysène) étaient capables d'inhiber l'activité éthoxyrésosurine O-dééthylase catalysée par les CYP1A1 et CYP1B1 (Shimada 2006).

2.3 Epoxyde hydrolase EH

L'époxyde hydrolase appartenant à la famille des hydrolases à feuillet $\alpha\beta$ est à l'interface entre les enzymes de phase I et les enzymes de phase II. Elle catalyse l'addition d'eau sur des époxydes donnant des diols vicinaux (Oesch 1973). Chez les mammifères il existe une forme microsomale (mEH) et une forme soluble (sEH).

La forme mEH est exprimée dans la plupart des tissus y compris le poumon et le tractus aéro-digestif supérieur. Elle est localisée principalement au niveau du réticulum endoplasmique des cellules où elle agit de concert avec les CYP1A afin de convertir les HAP époxydes en *trans*-dihydrodiols.

2.4 Glutathion-S-transférase (GST)

Quantitativement, la conjugaison au glutathion catalysée par la glutathion-S-transférase est la réaction de phase II prédominante chez de nombreuses espèces (Sheehan 2001). Ces enzymes catalysent la conjugaison de composés tels que des composés aromatiques halogénés, aliphatiques, peroxydes et époxydes, carbonyle $\alpha\beta$ insaturés ou encore isothiocyanates. Sur la base de leur structure tertiaire et quaternaire, de caractéristiques immunologiques et de leur spécificité vis-à-vis de substrats modèles, elles ont été divisées en 4 classes : alpha, mu, pi, et plus récemment theta. La Glutathion-S-transférase (GST) est présente dans les fractions cytosoliques et microsomiales.

Le BPDE est un bon substrat pour plusieurs isoformes (GSTM2, GSTM3) mais surtout pour la GSTM1 et la GSTP1.

2.5 UDP-glucuronyl-transférases (UGT) et sulfotransférases (SULT)

Les UGT qui comprennent plusieurs isoformes font partie intégrante de la membrane du réticulum endoplasmique des cellules. Elles catalysent des réactions de conjugaison principalement au niveau du foie mais elles sont exprimées dans d'autres organes extra-hépatiques (reins, poumons, cœur, cerveau, rate, muqueuse intestinale et estomac (Bock 1999, King 2000)).

Les SULT sont présentes dans le cytosol et constituent une voie métabolique importante pour les neurotransmetteurs et les composés phénoliques. Elles sont présentes principalement dans le foie (SULT1A1), le jéjunum et les intestins (SULT1A3) (Gamage 2006).

2.6 Autres enzymes

- NAD(P)H:quinone oxydoréductase 1 (NQO1)

Les NAD(P)H:quinone oxydoréductase 1 catalysent la réduction à 2 électrons des quinones en leurs hydroquinones correspondantes. Chez l'homme, elles sont détectées dans le poumon, sein, épithélium gastro-intestinal, endothélium vasculaire, et les adipocytes.

- Aldo-céto réductase (AKR)

Les aldo-céto réductases constituent une super famille d'oxidoréductases monomériques NADPH-dépendantes. Plus de 14 familles ont été identifiées à ce jour, représentant plus d'une centaine d'enzymes. Parmi elles on trouve des aldéhydes réductases, aldose réductases ou encore dihydrodiols déhydrogénases. Les AKR utilisent le co-facteur NADP⁺(H) pour réduire aldéhydes et cétones en alcool primaires et secondaires. Elles sont responsables en particulier de l'activation de dihydrodiols en catéchols convertis par la suite en quinones.

3. Susceptibilité génétique aux HAP

Il existe un polymorphisme au niveau des gènes de ces enzymes de phase I et de phase II. Au niveau des individus, ces polymorphismes se traduisent par une augmentation ou une diminution de la capacité à bioactiver et à détoxifier les HAP et leurs métabolites.

Trois polymorphismes génétiques ont été détectés au niveau du gène CYP1A1 mais leur prévalence chez les individus caucasiens est faible et aucune association n'a été clairement mise en évidence entre les différents allèles CYP1A1 et l'incidence du cancer du poumon dans ces populations (Hirvonen 1999).

Au niveau de l'EH, deux variants alléliques ont été identifiés, l'un portant une mutation (TC) au niveau de l'exon 3 et associée à une diminution de l'activité de l'enzyme de près de 50 % et à une diminution de la quantité d'adduits BPDE à l'ADN (Pastorelli 1998) et de la quantité d'aberrations chromosomiques (AC) par rapport aux porteurs de l'allèle sauvage (Salama 2001). Une autre mutation située sur l'exon 4 (AG) est associée à une augmentation de l'activité enzymatique de 25 % (Hassett 1994) et une augmentation des AC (Salama 2001).

Des mutations ont été identifiées dans 4 gènes de la GST : GSTM1, GSTM3, GSTP1 et GSTT1.

Concernant le gène GSTM1, particulièrement important pour la détoxification du BPDE, il est absent chez environ 50 % de la population caucasienne du fait d'une délétion homozygote (Board 1981, Ketterer 1992). Cette délétion serait associée à une augmentation de l'incidence de cancers pulmonaires (Benhamou 2002).

Enfin, un polymorphisme au niveau du gène NQO1 entraînant une activité catalytique diminuée semble être associé à une susceptibilité aux cancers du côlon (Begleiter 2006) et du poumon (Saldivar 2005).

Il existe différentes combinaisons de ces variants alléliques ce qui se traduit par une modification de la susceptibilité à la maladie, la combinaison de certains génotypes étant associée à une augmentation de l'incidence de cancers (Hayashi 1992).

Tableau 2 : Localisation, substrats et inducteurs des différents CYP450 métabolisant des xénobiotiques et des drogues

CYP	Localisation	Substrats types	Inducteurs types
1A1	poumon, foie, cerveau, tractus gastro-intestinal, lymphocytes, cœur, glande mammaire, prostate, thymus, utérus, glande surrénale, ovaires, pancréas	HAP	HAP, dioxines
1A2	foie	amines aromatiques, HAP, caféine	HAP, β naphtoflavone, cigarette
1B1	reins, utérus, glande mammaire, prostate, ovaires, thymus, rate, colon, glande surrénale, intestins, poumon, cerveau, testis, hypophyse	HAP	dioxine
2A6	foie	coumarine, stéroïdes	barbituriques, dexaméthasone
2B1/2	cerveau	morphine	nicotine
2B6	foie, cœur	nicotine	barbituriques
2C8	foie, reins	rétinoïdes, taxol	?
2C9/10	foie	tolbutamide, diclofenac	barbituriques, rifampicine
2C19	foie, cœur	(S)-mephenytoin, omeprazole, diazepam	barbituriques, rifampicine
2D6	foie, cerveau, cœur	antidépresseurs, β -bloquants	-
2E1	foie, poumon, cerveau, endothélium, cœur, moelle osseuse	Éthanol, nitrosamine, acétaminophène	éthanol, barbituriques
2F	poumon	coumarines	?
3A4/5	foie, tractus gastro-intestinal, reins, poumons, cerveau, endothélium, placenta, lymphocytes	inhibiteurs de canaux Ca, cyclosporine, acétaminophène, taxol, stéroïdes	stéroïdes, barbituriques
3A7	foetus, placenta, (foie)	Identique à 3A4	Stéroïdes, barbituriques
4A9/11	reins	Acides gras	clofibrate
4B1	poumon, placenta	?	?
4F2/3	reins	dérivés d'acide arachidonique	?

III. Des dommages de l'ADN au cancer...

Les dommages de l'ADN associés au BaP proviennent principalement de la formation d'adduits stables du BPDE au niveau des groupes amino exocycliques des purines. Ces adduits stables du BPDE restent fixés à l'ADN à moins d'être pris en charge par les systèmes de réparation. D'autre part, des adduits dépurinants de la voie du BPDE ou de la voie du radical cation sont formés en position N7 des purines produisant des sites abasiques suite au relargage des adduits hors de l'ADN par déstabilisation de la liaison N-glycosidique (Cavalieri 1992).

De façon indirecte, des phénomènes de cycles rédox donnent naissance à des ERO qui peuvent également endommager l'ADN à travers la formation de bases oxydées ou de cassures simple brins à l'ADN.

1. Dommages à l'ADN induits par le BaP

1.1 Adduits à l'ADN

1.1.1 Adduits de la voie du BPDE

Le BPDE se lie préférentiellement aux groupes amino exocycliques de la dGuo et dAdo de l'ADN (Dipple 1994). Les adduits principaux du BPDE se forment sur les atomes N2 de la dGuo, N6 de la dAdo, (Marie 2008) ( Figure 14). Des adduits se forment de façon minoritaire en position N4 de la dCyd (Wolfe 2004) et dans une moindre mesure sur l'atome N7 de la Gua. Cette dernière liaison est déstabilisatrice et donne naissance à un adduit dépurinant (Osborne 1978). L'activation métabolique de certains HAP peut conduire à la formation de 4 isomères du BPDE, chacun pouvant générer 2 adduits *cis* ou *trans* en fonction de l'ouverture de l'époxyde lors de la liaison au résidu dAdo ou dGuo dans l'ADN. Les adduits qui se forment majoritairement sont issus de l'isomère 7R, 8S, 9S, 10R sur la dGuo (Sayer 1991).

In vivo, la formation des adduits BPDE à l'ADN au niveau des différents organes dépend de la voie d'entrée du B[a]P. Chez le rat, l'exposition au B[a]P par voie intra trachéale ou par voie orale génère un maximum d'adduits au niveau du poumon, tandis que l'exposition cutanée entraîne la formation d'un maximum d'adduits au niveau de la peau (Godschalk

2000). Plusieurs expériences menées sur des rats exposés au B[a]P par voie intrapéritonéale montrent des niveaux d'adduits maximum au niveau du poumon (Ginsberg 1990, Qu 1996). La demi-vie de ces adduits est estimée pour le poumon entre 22 jours et 25 jours et 9 à 13 jours pour le foie (Qu 1996, Ross 1990). C'est dans cet organe que l'élimination des adduits est la plus courte, suivi par la rate, les cellules mononucléaires du sang périphérique et enfin le poumon (Qu 1996).

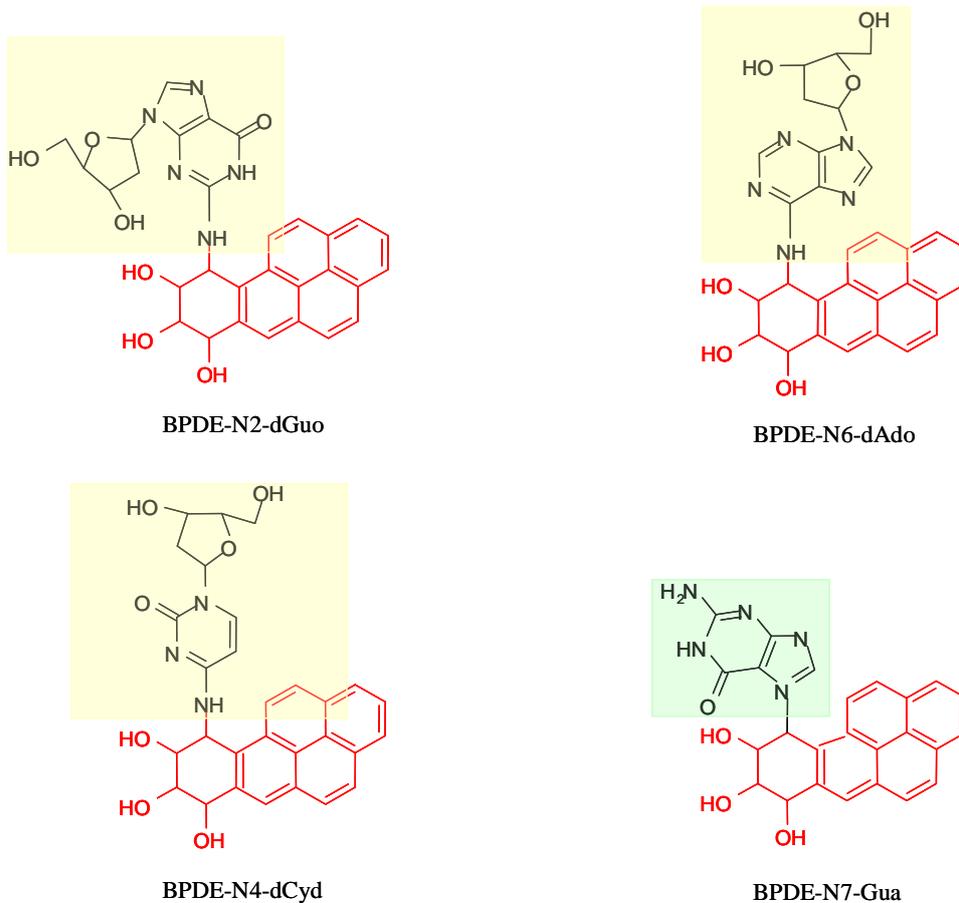


Figure 14 : Principaux adduits du BPDE

1.1.2 Adduits de la voie du radical cation

Les adduits de la voie du radical cation ne peuvent être produits que si le radical cation est produit à proximité de l'ADN ou de nucléosides. Les adduits ont été synthétisés par électrochimie et sont les adduits dépurinants B[a]P-N7-Gua, B[a]P-C8-Gua ainsi que les adduits stables B[a]P-C8-dGuo, B[a]P-N2-dGuo et B[a]P-N3-dGuo. En présence de dAdo l'adduit B[a]P-N7-Ade est formé (Figure 15).

Dans des expériences *in vitro* utilisant des microsomes hépatiques de rat, les adduits principalement formés sont l'adduits B[a]P-N7-Ade suivi de B[a]P-N7-Gua et de B[a]P-C8-Gua (Devanesan 1992).

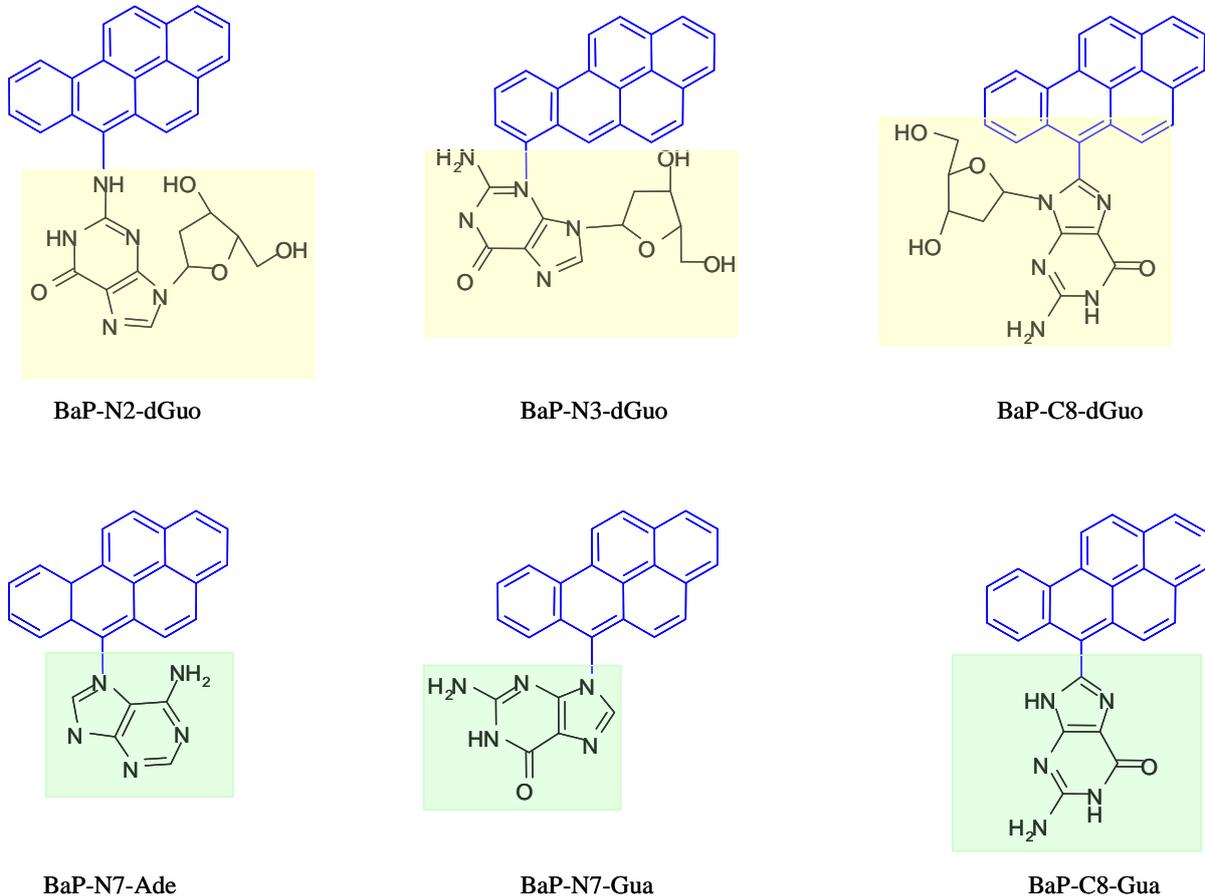


Figure 15 : Principaux adduits de la voie du radical cation

1.1.3 Adduits de la voie des quinones

Les HAP *o*-quinones peuvent réagir avec les groupes amino de la dGuo en position N2 ou en position N6 de la dAde pour former des adduits stables.

Elles peuvent également former des adduits dépurinants en position N7 de la Gua ou N7 de l'Ade. Des adduits dépurinants en position C8 de la Gua mais aussi C8 et N3 de l'Ade sont également possibles (Penning 1999).

1.2 Espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont générées lors du cycle rédox des quinones, mais les CYP1A1 peuvent également en produire, au cours de leur activité catalytique (Baulig 2003, Morel 1999). Ces ERO entraînent des cassures simple brins, double brins ainsi que des modifications au niveau des purines ou pyrimidines ou du désoxyribose (Klaunig 2004). Parmi ces ERO, le radical hydroxyl ($\bullet\text{OH}$) peut attaquer la liaison entre la base et le sucre générant un site abasique ou réagir avec le 2-désoxyribose ce qui conduit à la formation de cassures de chaînes d'ADN par arrachement d'un atome d'hydrogène (Figure 16).

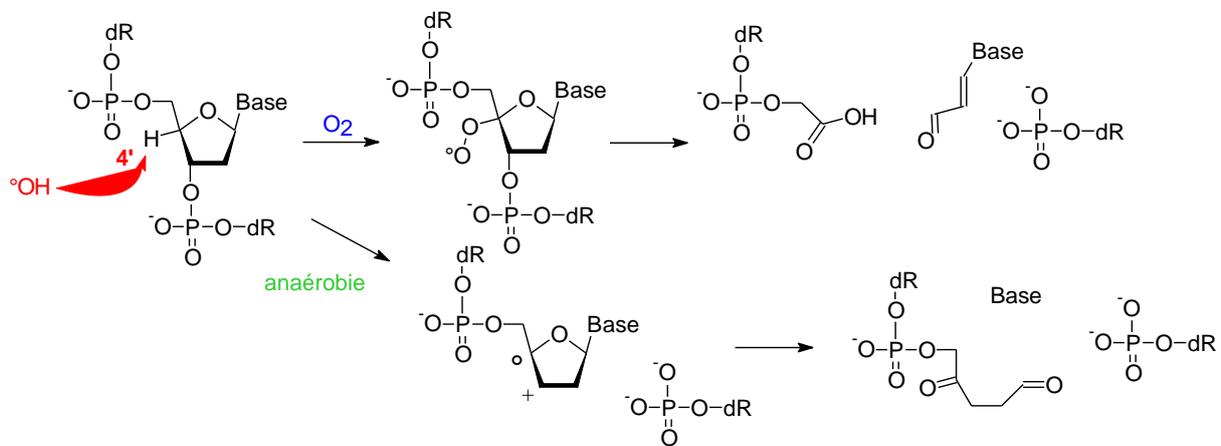


Figure 16 : Coupure de chaîne d'ADN par réaction du radical OH avec le 2-désoxyribose

Ce $\bullet\text{OH}$ ainsi que d'autres ERO sont à l'origine d'oxydation de bases. La plus fréquente survient en position 8 de la guanine, cette base ayant le plus faible potentiel d'ionisation, ce qui donne naissance à la 8-oxo-7,8-dihydro-2'désoxyguanosine (8-oxodGuo). Le principal mécanisme de formation de cette lésion est présenté Figure 17. L'addition du radical OH en position C8 de la dGuo conduit à la formation d'un intermédiaire radicalaire 8-hydroxy-7,8-dihydroguanyl qui après oxydation donne la 8-oxodGuo.

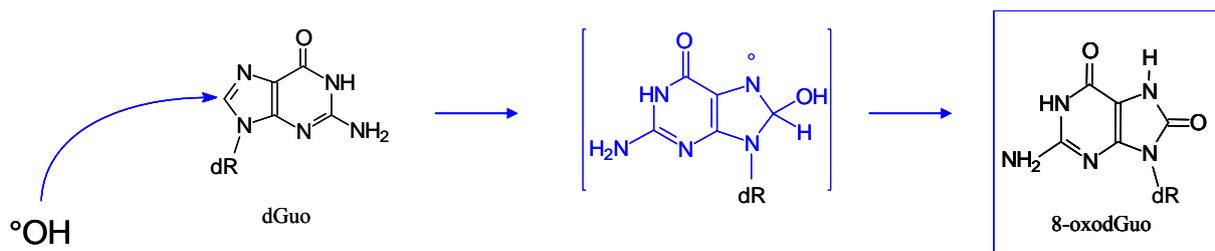


Figure 17 : Mécanisme de formation de la 8-oxodGuo

2. Réparation et apoptose

Afin de prendre en charge les différents types de dommages à l'ADN susceptibles de se produire, plusieurs voies de réparation ont été mises en place par la cellule (Hansen 2000). Les réparations induites par l'exposition aux HAP (adduits et sites abasiques) impliquent majoritairement les voies NER et BER.

2.1 Réparation de l'ADN

2.1.1 La voie NER

La réparation par excision de nucléotides (NER) prend en charge les lésions volumineuses (dimères de pyrimidines, adduits volumineux) qui entraînent une distorsion au niveau de la double hélice. Il existe 2 voies, l'une couplée à la transcription (TCR pour Transcription-coupled repair) qui répare spécifiquement les lésions induites au niveau des brins transcrits de gènes actifs, l'autre générale (GGR pour Global Genome Repair), plus lente, qui répare des lésions dans l'ensemble du génome (van Hoffen 2003). Ces deux voies diffèrent uniquement au niveau de l'étape de reconnaissance de la lésion.

Pour la voie GGR, la reconnaissance des dommages passe par le complexe protéique XPC-hHR23B qui va également avoir pour rôle de recruter les protéines nécessaires à la poursuite de la réparation. La protéine XPA longtemps considérée comme ayant un rôle dans la reconnaissance aurait plutôt une fonction de stabilisation du complexe d'incision, en association avec la protéine RPA. En ce qui concerne la voie TCR, la reconnaissance est assurée par les protéines CS (Cockayne Syndrome protein CSA et CSB).

Une fois le dommage identifié, les 2 voies font intervenir le facteur de transcription TFIIH dont les sous-unités XPB et XPD ont une activité hélicase et vont séparer les deux brins du complexe. La protéine RPA assure la stabilité de ce complexe. Le brin endommagé va ensuite être incisé de chaque côté de la lésion par les endonucléases XPG à l'extrémité 3' et XPF associée à ERCC1 au niveau de l'extrémité 5'. Ceci conduit à l'excision d'un fragment d'ADN simple brin de 25-30pb contenant la lésion.

La resynthèse du brin excisé est assurée par l'ADN polymérase δ ou ϵ associé au facteur de processivité PCNA. La ligation du double brin d'ADN est enfin réalisée par la ligase I.

2.1.2 La voie BER

La voie BER prend principalement en charge des petites liaisons qui entraînent une modification chimique de l'ADN sans conséquence au niveau de la distorsion de la double hélice, (méthylation, bases oxydées : 8-oxoGuanine...), les cassures simple brins et les sites AP.

Cette voie est initiée par une ADN glycosylase qui catalyse l'hydrolyse de la liaison N-glycosidique entre la base endommagée et le squelette sucre-phosphate ce qui libère la base générant un site AP. Ce site est clivé par une 5'AP endonucléase qui hydrolyse la liaison phosphodiester en 5' du site abasique, générant un groupement 3'OH libre nécessaire à l'élongation du brin d'ADN néosynthétisé.

La resynthèse du brin d'ADN peut se faire par deux voies différentes :

- Une voie de resynthèse courte dans laquelle l'ADN pol β associée à XRCC1 incorpore un à deux nucléotides en même temps qu'elle excise le 5'desoxyribose phosphate (dRp) généré lors de la coupure par l'endonucléase.
- Une voie de resynthèse longue qui fait intervenir les ADN pol δ et ϵ associées au PCNA. Dans cette voie, 5 à 7 nucléotides sont incorporés, générant une zone de recouvrement avec l'ancien brin d'ADN, les ADN pol n'ayant pas d'activité dRpase. Ce brin est alors éliminé par une flap endonucléase (FEN1) afin que l'étape de ligation puisse s'opérer.

La ligation du brin est réalisée par le complexe ADN ligase III-XRCC1 pour la voie courte et l'ADN ligase I-XRCC1 pour la voie longue.

Contribution des voies BER et NER dans la réparation des lésions induites par les HAP :

Les adduits du B[a]P sont réparés par la voie NER dans des études *in vivo* et *in vitro*. Cependant la réparation des lésions induites par d'autres HAP est moins bien connue.

Dans une étude *in vitro* réalisée avec un système acellulaire, Braithwaite et al. (Braithwaite 1998) ont mis en évidence que la NER était la voie principale de réparation des lésions induites par 6 HAP dihydrodiol epoxide mais il semblerait que la voie BER intervienne dans la réparation des sites AP dans les cellules traitées avec le benz[a]anthracene-trans-8,9-dihydrodiol-10,11-epoxide et le chrysène-trans-1,2-dihydrodiol-3,4-epoxide.

2.1.3 Réparation des cassures

Si les cassures simple brins peuvent être réparées par l'action d'une ligase, les cassures double brins de l'ADN sont réparées par deux voies différentes : la recombinaison homologue, ou bien la jonction des terminaisons non-homologues. Le premier assure une réparation fidèle du brin en prenant modèle sur le brin homologue, tandis que le deuxième permet de joindre des bouts d'ADN même s'ils n'ont pas d'homologie de séquence, pouvant induire des mutations au passage. Contrairement à la 1^{ère}, cette voie est peu fidèle mais c'est celle qui prédomine chez les eucaryotes.

Les systèmes de réparation conduisent à l'élimination du dommage et à la restitution fidèle de l'information génétique. Parfois ces réparations sont absentes ou fautive conduisant à l'apparition de mutations.

2.2 Apoptose

Le B[a]P et certains de ses métabolites, en particulier le BaP-7,8-dihydrodiol et le BPDE sont à l'origine d'une augmentation de l'apoptose dans les hépatocytes de souris hepa1c1c7 (Lei 1998), et dans les lignées cellulaires humaines de lymphocytes B (lignée Daudi) (Salas 1998), d'adénocarcinomes de l'endomètre (RL95-2) (Kim 2007), et les cellules HepG2 (Chen 2003).

Cette mort cellulaire programmée est liée à une accumulation de p53 dans les cellules hepa1c1c7 (Solhaug 2005) et nécessite l'induction des protéines du CYP1 (Chen 2003). En plus de ces signaux pro-apoptotiques, il a été démontré que le B[a]P induisait également des signaux anti-apoptotiques favorisant la survie cellulaire (Solhaug 2005, Solhaug 2004). L'induction de ces deux voies semblerait dépendre du taux de métabolisation du B[a]P et du type de métabolites formés (Holme 2007).

3. Mutagénèse et cancérogénèse

Le cancer est un processus multi-étapes avec trois grandes étapes : initiation, promotion, progression (Figure 18).

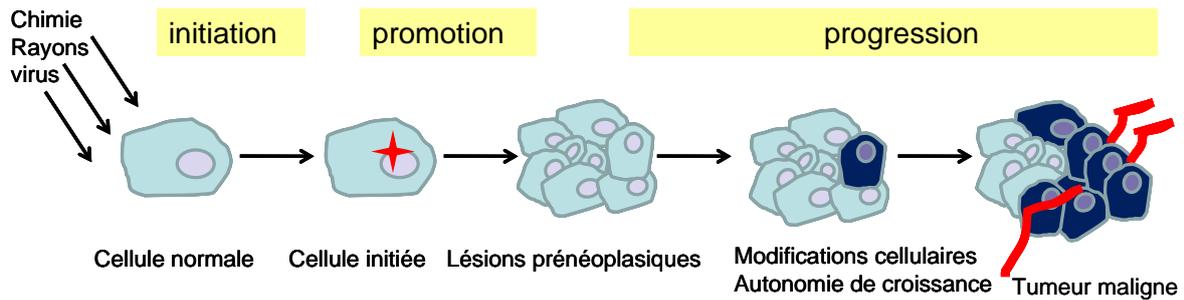


Figure 18 : Processus multi-étape du développement d'un cancer

Initiation : cette étape correspond à la formation d'une lésion au niveau de l'ADN générée par une substance génotoxique endogène ou exogène. Si ces lésions ne sont pas réparées, ou si la réparation est fautive, elles conduisent à la formation d'une mutation, transmise aux cellules filles lors du cycle cellulaire suivant. Les conséquences des mutations dépendent des gènes touchés. La plupart des mutations touchent des régions non codantes de l'ADN, n'entraînant aucune conséquence biologique pour l'individu. Les gènes clés de la cancérogénèse aboutissant à la transformation cellulaire si mutés sont de 2 types. On distingue :

- les proto-oncogènes, activables en oncogène par mutation. Ce sont des gènes associés au contrôle positif du cycle cellulaire, codant pour des facteurs de croissance cellulaire, des protéines de transduction ou encore des récepteurs membranaires (ex : RAS, ERB, MYC).
- Les gènes suppresseurs de tumeurs qui ont un rôle dans le contrôle et la régulation de la prolifération cellulaire ainsi que dans la réparation et la stabilisation du génome. Ces gènes codent pour des protéines ayant un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire afin de permettre les éventuelles réparations de l'ADN, mais aussi dans l'apoptose et également des protéines de la réparation (Figure 19) (ex : p53, p21).

Au cours de l'étape suivante, **la promotion**, les cellules initiées vont se multiplier de façon clonale entraînant une accumulation des mutations. Ceci se fait sous l'action d'un agent dit promoteur.

Progression : les cellules pré-néoplasiques deviennent des cellules néoplasiques avec l'acquisition de nouvelles mutations avec l'accroissement du taux de division. Cette étape se caractérise également par des mécanismes d'invasion tumorale, de capacités métastatiques et un mécanisme d'angiogénèse permettant d'irriguer la tumeur.

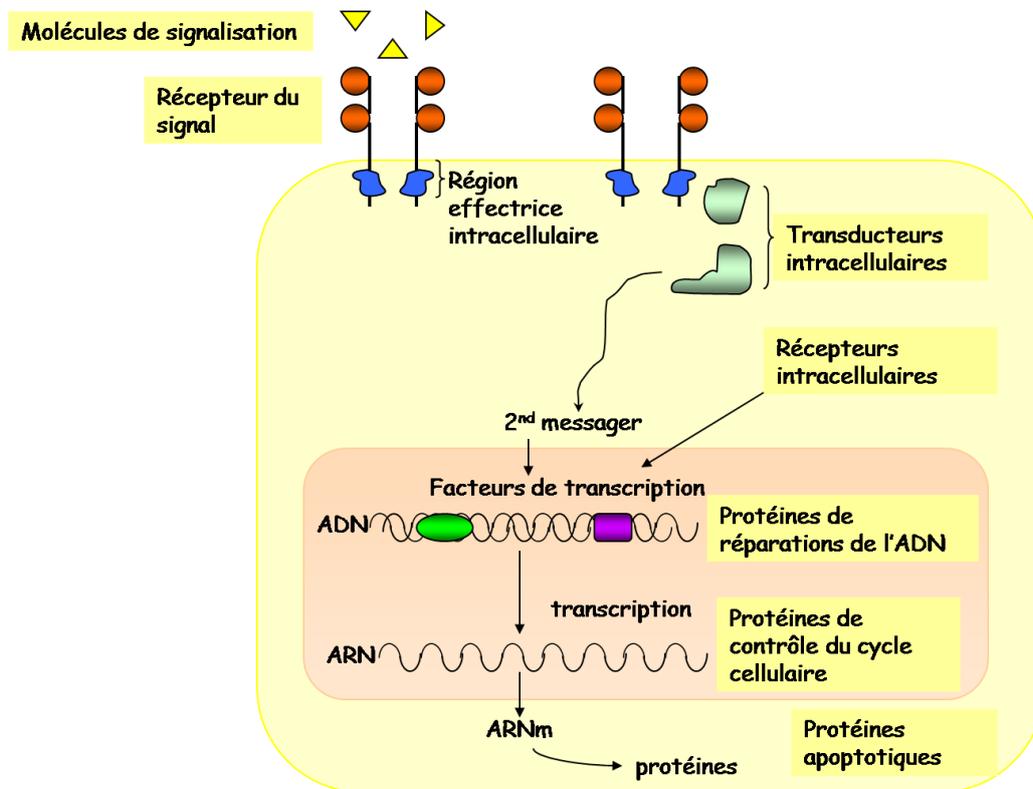


Figure 19 : Protéines impliquées dans la prolifération cellulaire et son contrôle

Comme nous l'avons vu précédemment, les HAP à l'image du B[a]P, subissent une activation métabolique générant des métabolites électrophiles capables de lier l'ADN mais également des métabolites capables de générer des espèces réactives de l'oxygène. La formation de ces dommages génotoxiques a un rôle dans la phase d'initiation du processus de cancérogénèse. Les dérivés métaboliques des HAP ont une action tumorigène car ils sont capables d'induire des dommages à l'ADN et des mutations au niveau de gènes de contrôle du cycle cellulaire tels que les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs.

La formation d'adduits stables à l'ADN, au niveau des groupes exocycliques des bases puriques génère des mutations ponctuelles au niveau des dGuo et dAdo suite au franchissement de lésions opérées par certaines polymérases au cours de la réplication. Des mutations de nucléotides tels que des transversions G \rightarrow T (substitutions d'une purine par

une pyrimidine ou vice versa) sont détectées au niveau de gènes suppresseurs de tumeurs p53 et de l'oncogène Ras (DeMarini 2001) en relation directe avec la carcinogénèse induite par les HAP au niveau de gènes cibles. En particulier, l'exposition de cellules épithéliales bronchiales avec du BPDE génère des transversions G : C \rightarrow T : A dans le gène p53 au niveau des codons 157, 248 et 249 (Hussain 2001). Ces codons sont également retrouvés mutés dans les cancers du poumon de fumeurs (Denissenko 1996) soulignant le rôle étiologique des HAP dans le cancer du poumon lié au tabagisme. D'autre part des transversions de nucléotides ont été retrouvées au niveau des codons 12 (GT) ou 61 (AT) du gène H Ras dans la peau de souris après exposition au BaP, au DMBA ou encore au DBaP. Les sites abasiques résultant de la formation d'adduits dépurinants sont eux aussi à l'origine de transversions GT et AT du fait de l'incorporation préférentielle de dA en face d'un site apurinique.

L'émission d'ERO peut être à l'origine de bases oxydées dont certaines comme la 8-oxodGuo sont mutagènes. Ainsi, dans des organismes bactériens et des cellules, la présence de 8-oxodGuo se traduit par des transversions GT dans l'ADN du fait de l'incorporation fautive de désoxyadénosine monophosphate (dAMP) en face de la 8-oxodGuo par les ADN polymérases (Cheng 1992, Le Page 1995, Moriya 1993). Ce type de mutation est retrouvé fréquemment au niveau des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs.

Il semblerait que les ERO aient également un rôle dans la phase de promotion du cancer à travers la dérégulation de voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, la différenciation ou encore l'apoptose (Franco 2008, Mates 2008).

Il faut noter qu'en plus d'avoir un rôle dans la phase d'initiation, le B[a]P a aussi un rôle dans la phase de promotion (Albert 1991) ce qui le classe parmi les cancérogènes complets. Les mécanismes de promotion sont mal connus mais ils pourraient impliquer les HAP *o*-quinones (Penning 1996) à travers la formation d'ERO pouvant avoir un effet sur la prolifération des cellules initiées (Cohen 1990) ou encore en entraînant la translocation et l'activation de la protéine kinase C (Larsson 1989).

4. Etudes in vitro de la génotoxicité des HAP

4.1 Introduction sur les lignées cellulaires

Classiquement l'évaluation de la génotoxicité des HAP peut être réalisée sur de l'ADN isolé (Binkova 2007), sur cellules procaryotes (bactéries) ou eucaryotes : levures mais surtout cellules animales ou humaines. Ces cellules peuvent être soit des cultures primaires c'est-à-dire mises en culture après biopsie, soit des lignées cellulaires : cellules cancéreuses prélevées par biopsie et rendues immortelles par modification génétique. Les lignées étant plus faciles à cultiver, elles sont très utilisées en laboratoires. Les plus couramment utilisées dans les études sur les HAP sont les suivantes :

- Cellules HEL : Human embryonic lung fibroblast, cellules normales de fibroblastes de poumon d'embryons humains : ils constituent un bon modèle d'étude in vitro du poumon.
- Cellules A549 : ces cellules épithéliales pulmonaires sont issues d'un adénocarcinome de poumon. Elles possèdent certaines caractéristiques des pneumocytes de type II, en particulier, elles expriment certaines CYP450 : CYP1A1 et CYP2B6 (Foster 1998).
- Cellules MCF7 : dérivées d'un carcinome mammaire humain, ces cellules possèdent des récepteurs à œstrogènes et progestérones.
- Cellules Caco-2 : cellules épithéliales d'adénocarcinome colorectal immortalisées, elles sont utilisées comme modèle pour l'étude des effets liés à l'absorption de composés dans l'intestin grêle. Une activité AhR et la formation d'adduits du B[a]P ont été identifiées dans ces cellules (Shah 2006).
- Cellules HepG2 : lignée cellulaire d'hépatocytes humain. Isolées en 1979 à partir de l'hépatoblastome d'un jeune argentin de 11 ans (Grant 1988), les cellules HepG2 possèdent de nombreuses enzymes de phase I et de phase II impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques. Les enzymes de phase I comprennent les enzymes du cytochrome P450, CYP1A1, CYP1A2, CYP2B and CYP2E1 et les enzymes de phase II, les glutathione-S-transférases, sulfotransférases, N-actétyltransférases et glucuranosyltransférases. Bien que l'expression des enzymes de phase I soit plus faible dans ces lignées que dans des hépatocytes primaires (Wilkening 2003), des études ont démontré qu'elles étaient de bons modèles pour l'évaluation de la

génotoxicité et le mutagénicité de pro-génotoxiques et génotoxiques (Uhl 2000, Valentin-Severin 2003).

4.2 Tests de génotoxicité et de mutagénicité

Les tests de génotoxicité et de mutagénicité ont pour but de mettre en évidence l'induction de modifications (dommages à l'ADN, mutations, transformations cellulaires *in vitro*...) considérées comme plus ou moins prédictives d'un potentiel mutagène et donc cancérigène.

Les tests les plus fréquemment utilisés sont les tests d'Ames, la mesure des adduits à l'ADN, les tests des comètes, des micronoyaux, et le test des aberrations chromosomiques.

Parmi ces tests, il faut distinguer ceux qui permettent de mesurer le potentiel génotoxique de ceux qui mesurent le pouvoir mutagène d'une substance.

Le pouvoir génotoxique d'une substance correspond à sa capacité à altérer le matériel génétique d'une cellule en se fixant de manière covalente à l'ADN, en produisant des espèces réactives de l'oxygène qui peuvent générer des dommages au niveau de l'ADN (oxydation de bases, cassures de brins d'ADN...) ou encore en inhibant les systèmes de réparation.

Le test des comètes et la mesure des adduits à l'ADN permettent de détecter ces lésions dites primaires à l'ADN.

D'autres modifications touchent les chromosomes, en entraînant soit des anomalies de structures, et on parle alors de mutations chromosomiques, soit des anomalies de nombres, ce sont les mutations génomiques.

Le test des micronoyaux et la mesure des aberrations chromosomiques permettent de mesurer ce type d'anomalies.

Le pouvoir mutagène d'une substance correspond à sa capacité à générer des mutations, c'est-à-dire des transformations permanentes du nombre ou de la structure des gènes.

Ces mutations peuvent altérer la séquence d'un gène par la modification d'un ou plusieurs nucléotides (additions, délétions, substitutions de nucléotides...). On parle alors de mutations géniques. Ce type d'anomalies peut être en mis en évidence par le test d'Ames.

4.2.1 Test des comètes

Le test des comètes (Figure 20) permet de détecter et mesurer des cassures simple et double brin au niveau de l'ADN ainsi que les sites abasiques instables en milieu alcalin et qui génèrent une cassure (c'est le cas par exemple des adduits instables à l'ADN). Ce test consiste à suspendre des cellules dans un gel d'agarose puis après une étape de lyse à faire migrer les noyaux dans un champ électrophorétique. L'ADN chargé négativement va migrer vers le pôle positif du champ d'électrophorèse. Les noyaux intacts migrent de façon homogène et apparaissent sous la forme de spot après révélation de l'ADN par du bromure d'ethidium, fluorescent. Au contraire, l'ADN endommagé par des coupures prend l'aspect d'une comète avec une tête correspondant à l'ADN intact et une queue formée par l'ADN lésé, étiré sous l'effet du champ électrique. Par le passé, les cassures étaient estimées visuellement au microscope à fluorescence avec un système de score établi selon la taille de la queue de la comète. Depuis, des logiciels ont remplacé l'œil humain et fournissent de façon plus objective différents paramètres permettant d'estimer le nombre de cassures. L'un des paramètres les plus pertinents et les plus utilisés est le % Tail DNA qui correspond au pourcentage d'ADN dans la queue de la comète. Cette valeur fournie tient compte à la fois de l'intensité de la fluorescence dans la tête et dans la queue de la comète, mais aussi de la longueur de la queue. Cette technique est simple, rapide et sensible et nécessite très peu de cellules ce qui permet de miniaturiser les expériences. Par contre elle ne fournit qu'une estimation qualitative du nombre de cassures. Une estimation quantitative du nombre de cassures est possible en calibrant le test par comparaison avec l'irradiation de cellules avec des rayons γ . Plus précisément, des lames de cellules exposées aux rayons γ sont incluses dans le bac d'électrophorèse avec les autres lames à analyser. L'irradiation de ces cellules permet de construire une droite d'étalonnage dont la pente fournit le % Tail DNA par Gy. Sachant qu'une irradiation de cellules à 1 Gy produit 0,14 cassures pour 10^6 nucléotides (Ahnström 1981, Goodhead 1989, Pouget 2000), il est possible de déterminer le nombre de cassures de l'ADN pour un % Tail DNA donné.

La calibration du test des comètes par irradiation aux rayons γ est cependant rarement utilisée dans les études de génotoxicité, car elle implique de disposer d'un irradiateur aux rayons γ , dispositif relativement coûteux.

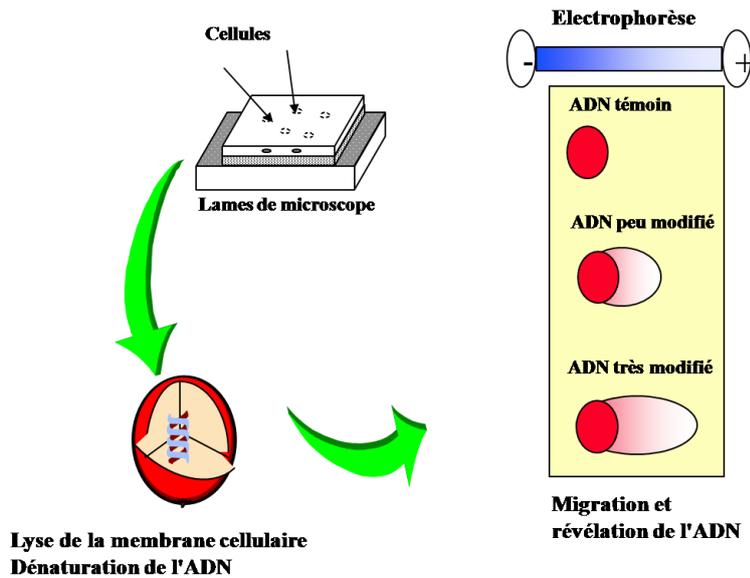


Figure 20 : Principe de la mesure des cassures à l'ADN par le test des comètes

4.2.2 Mesure des adduits BPDE à l'ADN

4.2.2.1 Post-marquage au phosphore 32

Mis au point par Randerath et al. (Randerath 1981), elle se fait en différentes étapes :

Après une étape d'extraction et de purification, l'ADN est hydrolysé en désoxyribonucléosides 3' monophosphate par deux enzymes : une endonucléase (nucléase de staphylocoque) et une exonucléase (phosphodiesterase de rate) libérant un mélange de nucléotides normaux et de nucléotides modifiés (adduits).

La sélection des adduits se fait par enrichissement à la nucléase P1. Par son activité 3'phosphatasique, la nucléase P1 coupe le phosphate en 3' des nucléotides normaux mais pas celui des nucléotides modifiés, la structure de l'adduit le protégeant.

Il se produit donc une déphosphorylation sélective des nucléotides normaux.

Les adduits sont ensuite marqués par phosphorylation en 5' par la T4 polynucléotide kinase en présence de γ -³²P ATP. Les nucléotides normaux et modifiés sont ensuite séparés par chromatographie sur couche mince multidirectionnelle. La séparation des adduits se fait ensuite par chromatographie bidimensionnelle échangeuse d'anions et la quantification est réalisée par comptage de la radioactivité.

Cette méthode même si elle est très sensible (1 adduit pour 10^9 nucléotides) présente l'inconvénient majeur de ne pas être spécifique. De plus, les réactions enzymatiques utilisées ne sont pas complètes ce qui gêne l'aspect quantitatif de la mesure.

4.2.2.2 Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem (HPLC/MS/MS)

La spectrométrie de masse permet de transformer des molécules dans leur état naturel en ions à l'état gazeux et d'obtenir leur masse moléculaire m en analysant le rapport de masse/charge, noté m/z . Le spectromètre de masse est constitué de plusieurs parties (Figure 21) :

- Une source d'ionisation dans laquelle l'échantillon à analyser passe en phase gazeuse et où les molécules sont ionisées.
- Un analyseur qui sépare les ions en fonction de leur rapport masse/charge.
- Un détecteur qui transforme les ions en signal électrique.

Il existe plusieurs types de sources d'ionisation et d'analyseurs. Nous nous attarderons uniquement sur le système utilisé pour notre étude. Il s'agit d'une ionisation par électrospray couplée à un analyseur à triple quadripôle.

La source d'ionisation vaporise et ionise les molécules séparées sur le système HPLC en mode positif ou en mode négatif. Pour cela, la molécule à analyser est introduite en solution ou en sortie de colonne HPLC à pression atmosphérique dans un capillaire. Le liquide est nébulisé sous forme de petites gouttelettes par un courant d'azote. Dans la chambre d'ionisation, sous l'effet d'un fort champ électrique (4 à 5000V) et l'application d'azote chaud, les gouttelettes sont polarisées tandis que le solvant s'évapore. Les répulsions électriques au niveau des gouttelettes augmentent jusqu'à atteindre le niveau des tensions superficielles. Les ions sont alors libérés par éclatement des gouttes et entrent dans le 1^{er} quadripôle. Un quadripôle est constitué de 4 cylindres en opposition de phase entre lesquels un champ électrique oscillant et un champ électrique fixe se superposent. Selon la tension appliquée, seuls les ions caractérisés par un certain rapport m/z traversent le quadripôle selon une trajectoire sinusoïdale. Les autres ions sont défocalisés et perdus dans le quadripôle. Ceci permet de filtrer et sélectionner des ions d'intérêt qui peuvent ensuite entrer dans le quadripôle suivant. Dans le cas d'un système triple quadripôle (3 quadripôles en série), le premier quadripôle sert à sélectionner les ions parents. Le deuxième quadripôle appelé cellule de collision permet la fragmentation des ions parents avec un gaz inerte pour donner des ions

fil. Ces ions fils sont sélectionnés dans le dernier quadripôle. Enfin la quantification des ions est réalisée grâce à un détecteur qui transforme le courant d'ions en courant électrique qui est visualisé sous la forme de chromatogrammes ou spectres de masse après traitement informatique.

Dans notre étude, le mode de fonctionnement de l'analyseur est le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) qui permet de sélectionner des couples de rapport m/z constitués du rapport m/z de l'ion parent et de l'un de ses ions fils.

Sa spécificité et sa bonne sensibilité à raison de quelques adduits pour 10^8 nucléosides normaux (pour $20 \mu\text{g}$ d'ADN) font de cette technique une technique de choix pour la mesure des adduits BPDE à l'ADN (Singh 2006). L'optimisation des conditions chromatographiques réalisées au laboratoire par Marie et al. (Marie 2008) permet la détection d'une fmol de BPDE-N2-dGuo injectée.

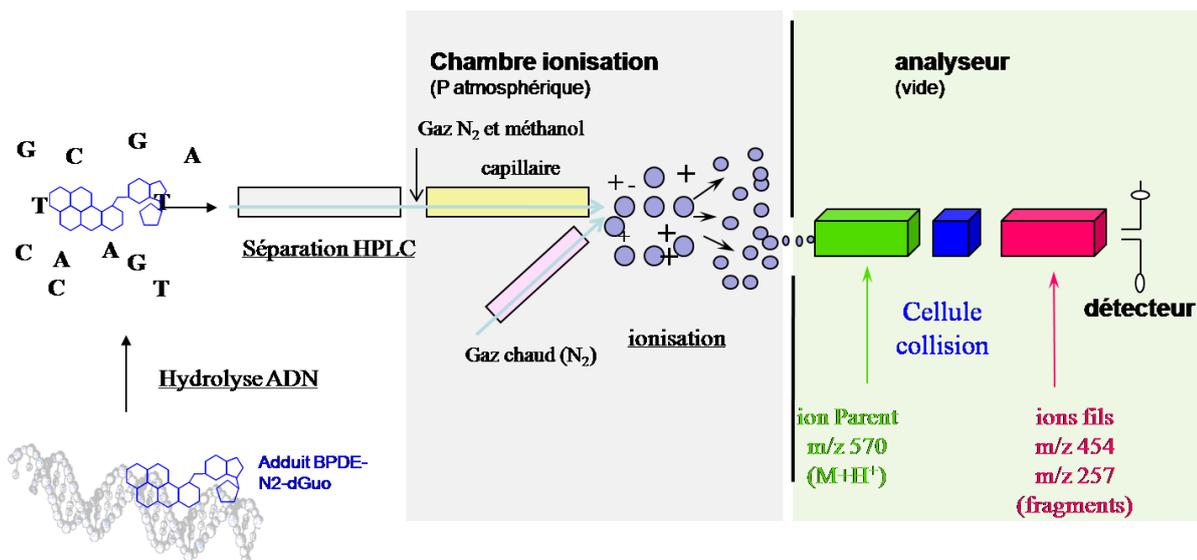


Figure 21 : Principe de la mesure des adduits BPDE-N2-dGuo par HPLC couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem (HPLC/MS/MS)

4.2.3 Test des micronoyaux

Les micronoyaux sont des entités visibles dans le cytoplasme, distinctes du noyau des cellules et formées à partir de fragments chromosomiques ou de chromosomes entiers suite à l'action d'agents mutagènes. Cette technique repose sur l'utilisation de cytochalasine B, un inhibiteur de la polymérisation des filaments d'actine nécessaire à la formation de l'anneau de

microfilaments qui permet la cytodierèse. La cellule se retrouve ainsi dans un état binucléé. Les chromosomes lésés par le stress sont incapables de migrer vers les pôles durant la mitose. En télophase, une membrane nucléaire se forme autour prenant l'aspect d'un petit noyau, c'est ce qu'on appelle un micronoyau. Il s'agit alors de comptabiliser le nombre de micronoyaux par cellules binucléées sur un total de 1000 cellules.

Ce test présente l'avantage de mettre en évidence à la fois les lésions aneugènes (anomalies du nombre des chromosomes) et les lésions clastogènes et constitue un biomarqueur d'effet précoce qui semble aussi prédictif du risque de cancer.

4.2.4 Test des aberrations chromosomiques

Le test des aberrations chromosomiques consiste à examiner au microscope optique et déceler des anomalies telles que des cassures de chromosomes avec ou sans délétion, des modifications de structures et d'appariements, des erreurs survenues en cours de mitose (échanges entre chromatides sœurs...). Cet examen se fait au cours de la métaphase de la mitose. La fréquence des aberrations est évaluée sur 200 mitoses par lames de microscope. L'augmentation de la fréquence des aberrations chromosomiques est prédictive de la survenue de cancers (Bonassi 1995, Hagmar 1998).

4.2.5 Test d'Ames

Mis au point par le Pr Ames (Ames 1975), le test d'Ames utilise des souches de *salmonella typhimurium* porteuses d'une mutation dans un des gènes gouvernant la synthèse de l'acide aminé histidine (Figure 22). Cette mutation His⁻ rend la bactérie incapable de se multiplier dans un milieu déficient en histidine. De façon spontanée, ces mutations His⁻ reversent vers His⁺ permettant aux bactéries de se multiplier mais ceci se produit avec une fréquence très faible. Cette fréquence de réversion peut augmenter en exposant les bactéries His⁻ à des agents mutagènes. Le test d'Ames consiste donc à compter le nombre de colonies ayant poussé sur un milieu sans histidine suite à l'incubation avec des agents mutagènes. Ce test est simple, rapide (48h) et peu coûteux et est largement utilisé par de nombreux laboratoires. Il présente un inconvénient majeur : il repose sur l'utilisation de cellules bactériennes dont le métabolisme diffère des cellules animales et humaines. Or certains composés cancérigènes nécessitent d'être métabolisés pour être actifs, ce qui signifie que certains composés peuvent

être activés dans les cellules bactériennes mais pas dans les cellules animales et/ou humaines et vice-versa. Une modification du test initial a consisté à utiliser un mélange de microsomes hépatiques de mammifères (S9) afin de réaliser l'activation métabolique de certains mutagènes. Néanmoins, malgré le recours aux extraits de foie, le test d'Ames ne détecte qu'environ la moitié des agents des cancérigènes potentiels.

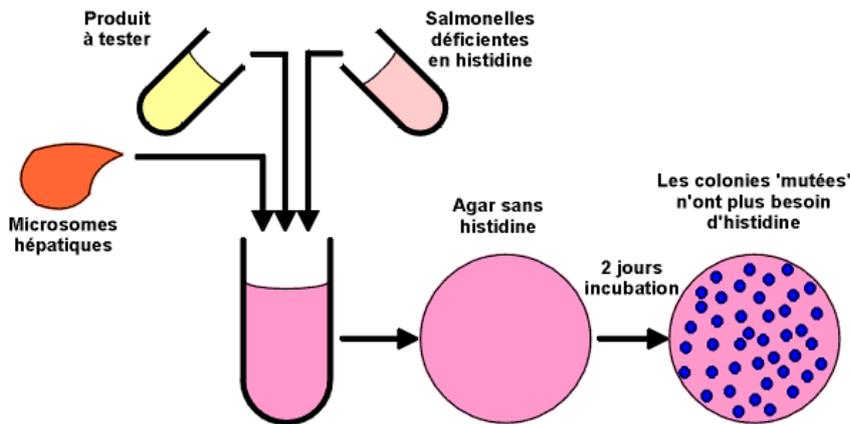


Figure 22 : Principe du test d'Ames

IV. Evaluation environnementale du risque lié à l'exposition aux HAP

L'évaluation des risques pour la santé des salariés passe par la mesure des niveaux d'exposition à des agents toxiques après leur identification. Pour cela, deux approches complémentaires sont mises en place :

- La surveillance des atmosphères de travail ou de l'environnement dont le but est d'estimer l'exposition des sujets (dose externe) à partir des mesures de concentrations atmosphériques des substances chimiques. Cette mesure a surtout un intérêt pour les substances dont la voie d'exposition majoritaire est la voie pulmonaire.

- La surveillance biologique de l'exposition qui repose sur la quantification de la substance elle-même ou de ses métabolites dans les différents milieux biologiques de l'individu (dose interne).

Notion de biomarqueurs :

Les biomarqueurs sont des outils nés de l'épidémiologie moléculaire, discipline qui tente de comprendre les mécanismes présidant à l'apparition d'effets de santé consécutifs à des expositions à des agents toxiques.

On distingue les biomarqueurs d'exposition et les biomarqueurs d'effet. Ce sont des indicateurs mesurables dans les milieux biologiques et qui permettent d'évaluer l'exposition à des agents chimiques ou de dépister les premières manifestations potentielles de toxicité dans l'organisme.

Concernant les biomarqueurs d'exposition, il en existe 2 types :

Un qui repose sur la mesure quantitative d'un produit chimique ou de ses métabolites dans un fluide biologique (souvent urine) et l'autre qui mesure un changement biochimique réversible précoce dans un fluide biologique (exemple : adduits à l'ADN à des macromolécules, protéines ou ADN).

Les biomarqueurs d'effet sont basés sur la détection d'altérations biologiques plus ou moins proches de l'apparition d'une maladie, au niveau de processus physiologiques ou sur le fonctionnement d'un organe. La plupart des biomarqueurs à l'image des tests de cytogénétiques sont dits d'effets précoces par contraste avec d'autres biomarqueurs tardifs, qui mettent en évidence des altérations plus proches de la survenue de la maladie. Ces effets ne sont cependant pas spécifiques du toxique.

Enfin il existe des biomarqueurs de susceptibilité individuelle qui prennent en compte les différences interindividuelles qui entrent en jeu dans la réponse à une exposition à un toxique. Ils intègrent l'ensemble des facteurs de susceptibilité individuelle tels que des facteurs génétiques ou physiologiques par exemple. Ces biomarqueurs reposent sur l'étude des polymorphismes au niveau de gènes impliqués dans le métabolisme ou dans la réparation des dommages à l'ADN.

1. Surveillance atmosphérique

La métrologie atmosphérique vise à mesurer la concentration des polluants gazeux ou particulaires dans l'air ambiant. Cette concentration s'exprime en unité de masse par unité de volume d'air prélevé ramenée aux conditions normales de température et de pression. La métrologie atmosphérique en milieu industriel et environnementale est standardisée et répond à des normes, européennes ou françaises déterminées par le Comité européen de normalisation (CEN) et/ou l'Association Française de Normalisation (AFNOR). Ces normes sont décrites ci-dessous.

1.1 Réglementation, méthodes de prélèvement et d'analyse

1.1.1 Environnement général

En environnement général, il n'existe pas de surveillance systématique de l'exposition des individus mais l'on parle plutôt d'une surveillance de la qualité de l'air. Cette surveillance est déléguée par l'état à des associations agréées pour la surveillance de la qualité de l'air (AASQA) chargées de mesurer périodiquement en routine des polluants réglementés grâce à des instruments de mesures répartis sur plus de 750 stations de prélèvement.

Le cadre de la surveillance des HAP dans l'air ambiant est défini dans la directive 2004/107/CE du Parlement Européen et du Conseil du 15 décembre 2004 concernant l'arsenic, le cadmium, le mercure, le nickel, le plomb, et les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'air ambiant. Cette directive établit une valeur cible pour le benzo(a)pyrène de 1 ng/m^3 en moyenne annuelle dans l'air ambiant, applicable en 2012. Elle impose également la surveillance d'autres HAP, comprenant au minimum benzo(a)anthracène, benzo(b)fluoranthène, benzo(j)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, indeno(1,2,3-cd)pyrène, dibenzo(a,h)anthracène.

Le B[a]P fait l'objet d'un projet de norme CEN PR EN 15549 qui définit la méthode de mesurage de la concentration en benzo(a)pyrène dans l'air ambiant. Le prélèvement et

L'analyse des autres HAP ne font pas l'objet de norme CEN mais suivent le guide de recommandation émis par le Laboratoire Central de la Surveillance de la Qualité de l'Air (LCSQA). Ce guide recommande l'utilisation des normes ISO 12884 et X 43-025 pour la mesure du B[a]P et autres HAP dans l'air ambiant, et les normes Norme X 43-014 et NF EN ISO 17993 pour les prélèvements et analyses des HAP dans les dépôts.

Concernant les prélèvements, une durée de 24 h avec un appareil haut débit (débit supérieur à 15 m³/h) muni d'une tête de prélèvement PM10 est préconisée. Cette tête de prélèvement réalise une coupure granulométrique, c'est-à-dire qu'elle permet de capter uniquement les particules dont la taille est inférieure à 10 µm. Les supports de prélèvements à utiliser sont des filtres en micro fibre de quartz avec un rendement de 99,99 % pour les particules de taille de 0,3 µm pour le LCSQA et des filtres en fibre de verre et/ou de quartz avec rendement de 99,99 % pour les particules de taille de 0,3 µm pour le PR EN 15549.

Aucune recommandation n'est émise concernant les mousses en polyuréthane.

La fréquence des prélèvements doit être de tous les 3 jours pour les mesures fixes et tous les 6 jours pour les mesures indicatives (mesures réalisées de manière discontinue au cours d'une année continue au cours d'une année et permettant de compléter les informations fournies par les stations de mesure fixes).

Concernant l'extraction des filtres et la concentration de l'extrait, différentes techniques peuvent être utilisées indifféremment par les laboratoires (extraction au soxhlet, par reflux, par micro-ondes, aux ultrasons, ou par ASE (Accelerated Solvent Extraction)). Cependant, les techniques de GC/MS ou HPLC- fluorescence/UV sont préconisées pour l'analyse.

Les résultats obtenus doivent être exprimés en ng/m³.

1.1.2 Milieu industriel

La directive 98/24/CE du conseil européen du 7 avril 1998 impose à l'employeur de disposer d'une évaluation des risques, et de mettre en place des actions de prévention et de protection vis-à-vis des agents chimiques dangereux pour les salariés.

La surveillance de l'exposition atmosphérique des salariés aux HAP suit des règles très strictes au niveau des conditions et des techniques de prélèvement (détails dans la partie métrologie atmosphérique). Elle présente l'avantage de mettre en évidence les pics d'exposition grâce à des mesures de courtes durées, d'identifier les sources d'émission et de caractériser la composition chimique des mélanges. Un autre intérêt important est aussi

d'évaluer l'efficacité des équipements de protection collective mise en place au sein des entreprises pour réduire les émissions. Les limites de cette surveillance atmosphérique résident dans le fait qu'elle ne prend en compte que l'absorption pulmonaire bien qu'il existe une voie d'absorption cutanée aux HAP. La surveillance biologique qui repose sur l'utilisation d'un biomarqueur de dose interne est alors à privilégier car elle prend en compte l'ensemble des voies d'absorption et des sources d'exposition (professionnelles mais aussi environnementales), l'efficacité des EPI ainsi que les facteurs de susceptibilité individuelle, (génétiques ou physiologiques).

Valeurs limites de références :

Les valeurs limites de références ont pour but de déterminer les concentrations dans l'atmosphère à ne pas dépasser pour préserver la santé des travailleurs. Les valeurs limites d'exposition professionnelle (VLEP) sont définies par le ministère du travail. Quelques valeurs sont aussi recommandées par la Caisse Nationale de l'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés (CNAMTS). Certaines sont réglementairement contraignantes par décret en conseil d'état et intégrées à l'article R 4412-149 du Code du travail (amiante, benzène...).

En France, concernant les HAP seul le B[a]P fait l'objet d'une recommandation par la CNAM qui, en l'absence de valeur limite de concentration officielle ou réglementaire fixe une valeur moyenne d'exposition (VME) à ne pas dépasser sur 8 h de travail à 150 ng/m^3 .

Les mesures atmosphériques des HAP sont régies par la norme AFNOR X 43-294.

Concernant les HAP, les prélèvements des molécules associées à la phase particulaire (>5 cycles) sont réalisés en piégeant la fraction particulaire sur filtre de verre, de quartz ou de téflon (diamètre 25, 37 ou 47 mm) à l'aide d'une pompe d'aspiration individuelle, portée par le salarié pendant ses activités et réglée à un débit de 1 L/min. Le filtre en téflon a l'avantage de piéger peu d'impuretés et 20 % plus d'HAP que les deux autres types de filtres mais se colmate rapidement lorsque les concentrations en particules sont trop élevées.

Les HAP présents dans la phase gazeuse sont quant à eux piégés sur résine amberlite XAD2 (résine de copolymère réticulée de styrène divinylbenzène piégeant les molécules hydrophobes).

L'extraction des HAP se fait au soxhlet, appareil permettant l'extraction d'une phase solide avec un solvant liquide, ou par ultrasonication en utilisant un mélange de solvants organiques.

L'analyse est effectuée par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CG/MS) ou par chromatographie liquide haute performance (HPLC) couplée à un détecteur à fluorescence.

Par cette technique sont mesurés les 16 HAP gazeux et/ou particulaires de l'USEPA.

1.2 Concentrations atmosphériques en HAP

1.2.1 Environnement général

En environnement général, les niveaux d'HAP dans l'air sont modulés par certains facteurs météorologiques : ces niveaux augmentent avec l'inversion de température ainsi qu'une haute pression atmosphérique. A l'inverse, les niveaux d'HAP sont diminués par la photolyse et la décomposition thermique ainsi qu'une forte concentration en ozone et un fort rayonnement solaire (Lodovici 2003).

Les profils d'abondance relative varient en fonction de la source d'émission, mais ces profils sont constants pour une même source. Ainsi dans l'environnement, les concentrations atmosphériques en HAP montrent des variations saisonnières : elles sont nettement plus élevées en hiver qu'en été (Mastral 2003, Rossi 1995) du fait :

- du nombre de sources d'émission plus important à cette période, et en particulier du chauffage domestique (Papageorgopoulou 1999).
- d'une modification de la répartition entre phase gazeuse et phase particulaire résultant de différences au niveau des températures ambiantes, la pression de vapeur, et la concentration en particules (Baek 1991).
- des phénomènes de dégradation des HAP, en particulier photodégradation, moins importants en hiver et des phénomènes de dispersion atmosphérique plus limités (Marchand 2005).

Si l'on prend l'exemple du B[a]P, en milieu urbain les concentrations en hiver peuvent être en moyenne 5 fois plus élevées qu'en été (Prevedouros 2004). Les concentrations moyennes en HAP mesurées sur différents sites européens figurent dans le Tableau 3.

1.2.2 Milieu industriel

En milieu industriel, les concentrations atmosphériques en HAP dépendent surtout du nombre et du type, de l'éloignement par rapport à la source d'émission mais aussi de l'existence d'un système d'équipement de protection efficace (aspiration à la source, filtration des émissions...).

Les niveaux d'exposition aux HAP peuvent être classés comme suit (encyclopédie de sécurité et de santé au travail):

- Exposition très élevée au B[a]P (supérieure à $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$) :
Raffineries et cokeries, unités de production d'électrodes de graphite, manipulation du goudron de houille et de brai chauds
- Exposition modérée ($0,1$ à $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$) :
Alumineries, aciéries
- Exposition faible (inférieure à $0,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$) :
Fonderies, productions et application de bitumes, ateliers de réparation d'automobile et garages, mines de fer et construction de tunnels.

Tableau 3 : Concentrations moyennes des HAP en ng/m³ en Europe sur différents sites [Source : Ambient Air Pollution by PAH– Position Paper – July 27th 2001 – EC]

HAP	Bruit de fond	Site rural	urbain	trafic	industriel
Acénaphthène	0,01	0,3-2,6			98
Acénaphtylène	0,01				
Anthracène	0,00	0,04-15		0,2-0,6	1,1
Benzo(a)anthracène	0,00-0,02	0,01-0,9		0,6-4,2	0,37-42
Benzo(a)pyrène	0,02	0,02-2,8	0,4-2	0,7-3,1	0,5-39
Benzo(e)pyrène	0,01-0,02	0,18-1,1	0,2-2,1	0,9-3,7	0,65-80
Benzo(b)fluoranthène	0,00-0,01	0,04-0,6			0,3-34
Benzo(g,h,i)perylène	0,01	0,15-1,0	0,5-2,8	1-4,7	0,7-52
Benzo(j)fluoranthène					
Benzo(k)fluoranthène		0,04-0,32	0,2-1		0,3-17
Chrysène		0,02-4,4	0,3-2,2		0,3-37
Coronène	0,00-0,01	0,02-0,5	0,1-0,6	0,4-2,5	0,26-5,2
Dibenzo (a,h)anthracène	0,00	0,02-1,1	0,06-0,3	0,1-0,4	0,05-7,5
Fluoranthène	0,14	0,04-7,4			42
Fluorène	0,2-0,4	0,3-46		9,9-16,7	
Indeno(1,2,3-cd)pyrène	0,02-0,04	0,04-0,21	0,3-2,1	1,3-2,6	0,4-37
Naphtalène	1-2,5	0,3-10			88
Phenanthrène	0,1-0,3	0,42-150			16
Pyrène	0,08	0,1-6,1	0,24-1,2	9,2-15	75

2. Surveillance biologique de l'exposition

En milieu professionnel, la mesure biologique la plus utilisée repose sur le dosage des concentrations urinaires de certains métabolites, le recueil de ce liquide biologique étant non invasif et facile à réaliser. Le biomarqueur de dose interne le plus utilisé pour évaluer l'exposition aux HAP est le 1-hydroxypyrene (1-OHP) (Strickland 1999), un métabolite phénolique du pyrène qui est un constituant majeur des mélanges d'HAP en milieu professionnel. Le dosage urinaire du 1-OHP est réalisé en général par HPLC couplée à une détection par fluorescence. Les valeurs sont données en $\mu\text{g/g}$ de créatinine et/ou en $\mu\text{g/L}$ d'urine. Celui-ci est un bon indicateur sensible et spécifique du pyrène or ce composé n'est pas cancérigène. Son utilisation est justifiée par le fait qu'il existe une corrélation entre les niveaux de 1-OHP urinaires en fin de poste et les concentrations atmosphériques en pyrène, en HAP totaux (Buchet 1992, Kuljukka 1996, Tsai 2002) et en B[a]P (Unwin 2006).

Le dosage urinaire du 3-hydroxybenzo(a)pyrène (3-OHB[a]P), métabolite du B[a]P, qui est lui cancérigène, a été proposé et semblerait plus pertinent (Forster 2008). Cependant, ses concentrations urinaires sont nettement plus faibles que celles du 1OHP, d'un facteur >1000 . Son utilisation est actuellement en cours de validation.

Valeurs et limites de référence :

Il n'existe pas d'indice biologique d'exposition (IBE) pour les HAP ayant valeur réglementaire en France mais la valeur de $1,4 \mu\text{g/g}$ de créatinine a été proposée comme valeur limite au-delà de laquelle des effets cytogénétiques sont observés dans des lymphocytes de sujets exposés (Buchet 1995). D'autre part, des valeurs de références concernant la dose urinaire de 1-OHP excrétée à la fin d'une semaine de travail (fin de semaine, fin de poste) ont été proposées. Ces valeurs ont été établies à $2,3 \mu\text{mol/mol}$ de créatinine et de $4,9 \mu\text{mol/mol}$ respectivement pour les salariés des fours à coke et de la production d'aluminium (Jongeneelen 2001). Plus récemment, une valeur seuil est proposée par l'American Conference of governmental Industrial Hygienists (ACGIH) pour le 1-OHP à $1 \mu\text{g/L}$ d'urine ($\sim 0,5 \mu\text{mol/mol}$ de créatinine) comme valeur au delà de laquelle on peut considérer qu'il y a une exposition professionnelle (ACGIH 2005).

En environnement général, ces méthodes de dosage urinaires de métabolites des HAP sont de plus en plus utilisées et permettent en particulier de déceler des niveaux d'exposition entre des sujets fumeurs et non fumeurs.

3. Problématique des mélanges : approches pour l'évaluation des risques pour la santé humaine

L'estimation des risques liés à l'exposition aux HAP est rendue difficile par le fait que les populations sont pratiquement toujours exposées à des mélanges souvent complexes et divers, ce qui les rend difficiles à caractériser. Afin de contourner cette difficulté, différentes approches s'appuyant sur un composé de référence représentatif de l'ensemble des autres composés du mélange ont été élaborées.

Dans cette approche, les données de toxicité obtenues chez l'homme ou chez l'animal pour un ensemble de mélanges sont appliquées à un autre mélange qui lui ressemble suffisamment afin d'estimer les risques potentiels de cancer chez l'homme.

3.1 Approche par les Facteurs d'Equivalence Toxique (FET)

Le concept de facteur d'équivalence toxique (FET) a émergé en 1977 dans le but d'établir une valeur toxicologique de référence pour des effets cancérigènes induits par un mélange de composés chimiquement proches. D'abord appliqué aux dioxines, il a été étendu aux HAP.

Ces FET sont des coefficients de pondération qui expriment la toxicité relative de chaque substance de manière individuelle par rapport à la substance de référence de la famille (ici le benzo[a]pyrène) auquel on assigne un FET de 1. Dans cette approche, on considère (1) que les doses et les effets de chacun des composés du mélange sont additifs, (2) qu'il n'existe pas d'interactions antagonistes ou synergiques entre les composés du mélange et (3) qu'ils agissent selon le même mécanisme d'action toxique. Cette approche permet de sommer les concentrations atmosphériques des HAP d'un mélange en les pondérant par des FET établis par rapport à un HAP considéré comme référence (B[a]P). Cette valeur est exprimée par la quantité en équivalent toxique (TEQ).

Il convient de noter cependant que les études expérimentales disponibles sur des HAP pris individuellement ou en mélange montrent que les trois conditions citées précédemment n'étant pas réunies dans le cas des HAP, l'application de ce concept peut conduire à une surestimation ou à une sous-estimation du risque. Pour être incluses dans l'approche FET, les molécules doivent remplir les critères suivants :

- Structure chimique proche des polychlorodibenzo-p-dioxines et dibenzofuranes (PCDD/F)
- Liaison au récepteur AhR
- Induction, *via* cette liaison à AhR, de réponses biochimiques et toxiques similaires aux PCDD/F
- Propriétés de persistance et de bioaccumulation.

Les FET sont établis sur les bases de données biologiques et biochimiques. Priorité est donnée aux études *in vivo* par rapport aux études *in vitro* selon la hiérarchie suivante : chroniques > subaiguës > aiguës. Les études prises en compte comprennent les études d'induction enzymatique, tératogénèse, toxicité hépatique et certains types d'immunotoxicité.

Les études à long terme sont à privilégier ainsi que les effets cancérogènes et les effets se produisant aux expositions les plus faibles (Safe 1997).

En ce qui concerne les HAP, des FET ont été établis par différents auteurs mais aucune n'a fait l'objet d'un consensus. Les principales tables sont présentées Tableau 4, l'une des plus utilisées étant celle de Nisbet et Lagoy (Nisbet 1992).

Avantages et limites du concept :

Le concept de FET présente plusieurs avantages :

- 1) Le risque attribué à une substance chimique bien définie peut être évalué
- 2) L'estimation du risque est basée sur des publications qui ont été validées.
- 3) Cette approche est relativement facile à appliquer quelles que soient les sources d'émission des HAP.

Néanmoins son application est limitée pour les motifs suivants :

- 1) Le risque peut être sous-estimé puisqu'il ne prend en compte que les HAP pour lesquels des données toxicologiques existent.
- 2) L'estimation du risque dépend de l'extrapolation des études animales à l'homme sans tenir compte des différences biologiques existant entre les deux.
- 3) Ce concept repose sur une hypothèse d'additivité. Les interactions pouvant exister au sein des mélanges ne sont pas prises en compte.
- 4) Les effets cancérigènes pouvant être induits par des substances autres que les HAP présents dans le mélange ne sont pas pris en compte.

L'approche par les TEF est donc une approche intéressante pour étudier l'effet des mélanges mais elle repose sur des hypothèses simplifiées pouvant conduire à une sous-estimation du risque.

Tableau 4 : Principales tables de facteurs d'équivalence toxique

Substance	INERIS (Doonaert 2003)	Nisbet et Lagoy (Nisbet 1992)	US EPA (USEPA 1984, USEPA 1993)	Thorslund (Thorslund 1991)	Chu and Chen (Chu 1984)
Acénaphène	0,001	0,001	0	ND	ND
Acénaphthylène	0,001	0,001	0	ND	ND
Anthracène	0,01	0,01	0	0,32	ND
Benz[a]anthracène	0,1	0,1	0,1	0,145	0,013
Benzo[a]pyrène	1	1	1	1	1
Benzo[b]fluoranthène	0,1	0,1	0,1	0,14	0,08
Benzo[g,h,i]perylène	0,01	0,01	0	0,022	ND
Benzo[k]fluoranthène	0,1	0,1	0,01	0,066	0,004
Chrysène	0,01	0,01	0,001	0,0044	0,001
Coronène	0,001	-	-	-	-
Cyclopenta[c,d]pyrène	0,1	-	-	-	-
Dibenz[a,c]anthracène	0,1	-	-	-	-
Dibenz[a,h]anthracène	1	5	1	1,1	0,69
Fluoranthène	0,001	0,001	0	ND	ND
Fluorène	0,001	0,001	0	ND	ND
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	0,1	0,1	0,1	0,232	0,017
Naphtalène	0,001	0,001	0	ND	ND
Phénanthrène	0,001	0,001	0	ND	ND
Pyrène	0,001	0,001	0	0,081	ND
2-Methylnaphtalene	-	0,001	0	ND	ND

V. Présentation du sujet de thèse

Les HAP sont des composés ubiquitaires de l'environnement dont les niveaux de concentration sont très variables, en fonction de l'urbanisation, du chauffage résidentiel et du trafic, et peuvent atteindre des concentrations particulièrement élevées en milieu industriel, entraînant un risque pour la santé des sujets exposés. La surveillance de l'exposition des populations aux HAP est donc un enjeu considérable pour estimer les risques sanitaires notamment cancérigènes des populations et passe par le développement de biomarqueurs d'exposition et de biomarqueurs d'effet génotoxique.

Alors que la génotoxicité du B[a]P a été largement étudiée, il existe beaucoup moins de données sur les mélanges d'HAP. Or les populations sont toujours exposées à des mélanges complexes pouvant exercer entre eux des effets additifs, synergiques ou inhibiteurs de polluants dont la composition chimique est très variable en fonction des sources d'émission.

L'objectif de cette thèse est donc d'évaluer *in vitro* la modulation du potentiel génotoxique du B[a]P en mélanges à travers l'utilisation de biomarqueurs de génotoxicité sur un modèle de cellule en culture. Ceci implique d'étudier les mécanismes d'action génotoxique des mélanges d'HAP afin d'évaluer si les composants du mélange exercent plutôt un effet additif, synergique ou inhibiteur. L'accent a été mis sur le B[a]P, seul HAP à avoir été démontré cancérigène pour l'homme et son métabolite le plus mutagène, le BPDE.

Adduits de l'ADN et stress oxydant sont des événements génotoxiques pouvant conduire à l'apparition de mutations, points clés dans la survenue des cancers.

La formation des adduits mais également les dommages oxydatifs consécutifs aux cycles rédox opérés par les HAP *o*-quinones et lors du fonctionnement des CYP450 sont investigués dans une lignée cellulaire d'hépatocytes humains exposée à des HAP purs ou en mélanges.

Une partie de ce travail est consacrée à l'étude des dommages induits par du B[a]P pur puis des mélanges binaires d'HAP en présence de B[a]P afin d'en caractériser les effets additifs, synergiques ou inhibiteurs de ces mélanges.

La modulation de la génotoxicité du B[a]P liée à la composition des mélanges est ensuite investiguée d'une part à partir des mélanges atmosphériques collectés sur différents sites industriels ou environnementaux et d'autre part par des mélanges d'HAP particuliers synthétiquement reconstitués à partir d'HAP purs.

Enfin dans une dernière partie plus appliquée, les tests des comètes et la mesure des adduits BPDE à l'ADN ont été mis en œuvre avec des extraits d'échantillons atmosphériques prélevés sur différents sites environnementaux, ceci afin d'évaluer l'applicabilité de ces tests au suivi de la génotoxicité de l'air ambiant.

Pour conduire ce travail, le test des comètes mesurant les cassures à l'ADN ainsi que la mesure des adduits BPDE à l'ADN par HPLC/MS/MS ont été choisis. Ces tests complémentaires permettent d'estimer les deux voies majeures de dommages générés par les HAP : lésions oxydatives et adduits à l'ADN. Les tests utilisés ont été choisis en raison de leur simplicité de mise en œuvre et leur rapidité. De plus, la grande spécificité de détection et la sensibilité de la détection par spectrométrie de masse en mode tandem en font une technique de choix pour l'analyse des adduits générés par le B[a]P. L'étude s'est focalisée uniquement sur la mesure de l'adduit BPDE-N2-dGuo, adduit majoritairement formé lors d'une exposition au B[a]P.

Le modèle cellulaire est la lignée d'hépatocytes humain HepG2. Ces cellules ne sont pas une cible des HAP car ils ne génèrent pas de cancers du foie, mais comme nous l'avons vu, elles possèdent de nombreuses enzymes de phase I et de phase II intervenant dans l'activation et la détoxification de promutagènes et de procarcinogènes dont le B[a]P.

CHAPITRE 2

ETUDE DES HAP PURS SUR LA LIGNEE HUMAINE HepG2

CHAPITRE 2-ETUDE DES HAP PURS SUR LA LIGNEE HUMAINE HEPG2

I. Effet du B[a]P seul sur les cellules HepG2

Avant d'évaluer les dommages à l'ADN induits lors d'une exposition au B[a]P, il convient d'évaluer la cytotoxicité de ce composé afin de sélectionner des concentrations qui n'altèrent pas ou peu la viabilité. Les cellules sont exposées à du B[a]P en solution dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) dilué dans le milieu de culture.

Dans toutes les expériences, un contrôle négatif est inclus. Il s'agit de cellules exposées à 0,5 % de DMSO.

1. Cytotoxicité du B[a]P

L'incubation des cellules pendant 14 h avec des concentrations de B[a]P allant jusqu'à 8 μM n'a pas d'incidence élevée sur la viabilité cellulaire mesurée par le test du 3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide ou MTT. A cette concentration, la viabilité est supérieure à 80 %. La DL_{50} est estimée à 64 μM de B[a]P (Figure 23).

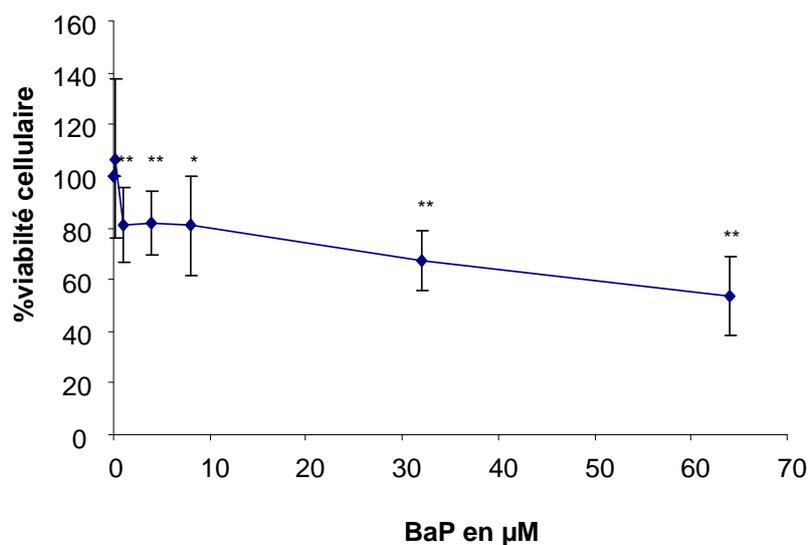


Figure 23 : Cytotoxicité du B[a]P à des concentrations allant jusqu'à 64 μM dans les cellules HepG2 exposées pendant 14 h par le test du MTT. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ par rapport au contrôle DMSO

2. Formation des cassures de l'ADN dans les cellules HepG2 exposées au B[a]P

2.1 Cinétique de formation des cassures de l'ADN induites par l'exposition au B[a]P

Afin d'évaluer le temps d'incubation permettant d'obtenir le maximum de cassures, une cinétique de formation des cassures à l'ADN a été réalisée.

La quantité de cassures de l'ADN mesurée par la méthode des comètes calibrée dans les cellules traitées avec du B[a]P à 8 μM de 0 à 24 h augmente avec le temps d'incubation (Figure 24). Cette augmentation se fait en 2 phases : le nombre de cassures augmente de façon linéaire dans les 8 premières heures d'incubation, puis au-delà, les cassures continuent de se former mais de façon moins importante. Une tendance à un plateau est observée au-delà de 10h d'incubation.

Afin d'obtenir des informations supplémentaires sur le stress oxydant, la quantité de 8-oxodGuo est mesurée dans les cellules traitées avec 8 μM de B[a]P à des temps d'incubation de 0 à 14 h. Aucune augmentation significative n'a pu être mise en évidence, les valeurs oscillant autour d'une quantité moyenne de $0,101 \pm 0,059$ 8-oxodGuo pour 10^6 bases.

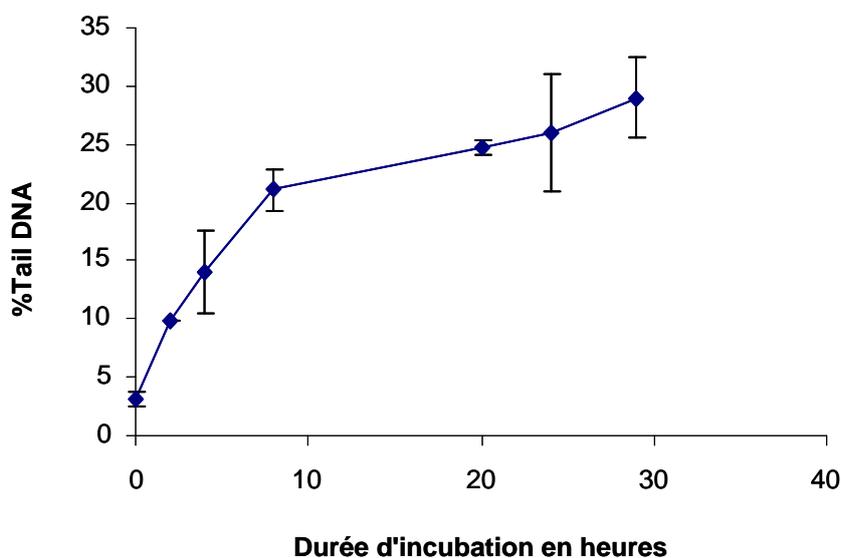


Figure 24: Cinétique de formation des cassures de l'ADN dans les cellules HepG2 exposées à 8 μM de B[a]P pendant 24 h

Nous avons ensuite déterminé les quantités de cassures et d'adduits à l'ADN formés par des concentrations croissantes de B[a]P.

2.2 Formation des cassures à l'ADN en fonction de la concentration en B[a]P

L'incubation des cellules pendant 24 h à des concentrations croissantes en B[a]P allant de 0 à 20 μM entraîne une augmentation dose-dépendante de la formation des cassures de l'ADN (Figure 25) qui est visible à partir de 1 μM . A 8 μM (Figure 26), la quantité de cassures augmente de 127 % par rapport au contrôle DMSO.

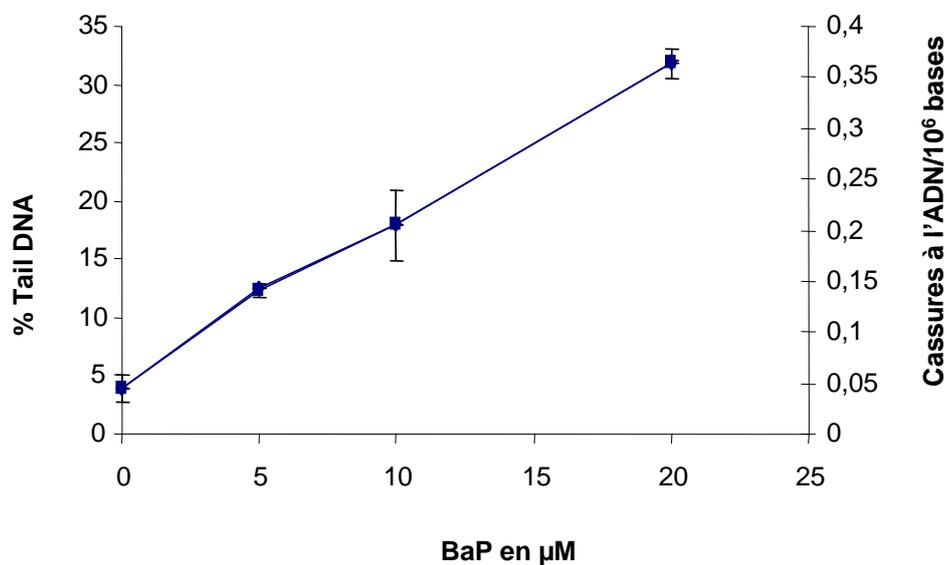


Figure 25 : Cassures de l'ADN induites dans les cellules HepG2 exposées 24 h à des concentrations croissantes de B[a]P allant de 0 à 20 μM

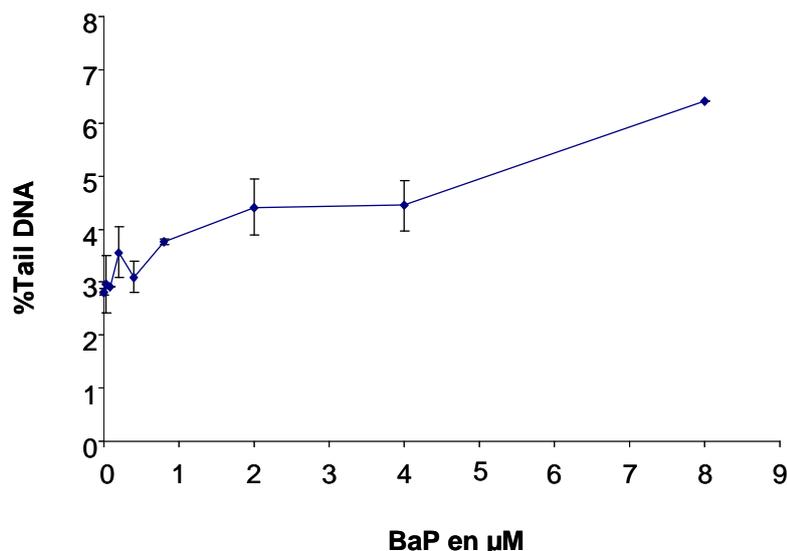


Figure 26 : Cassures de l'ADN induites dans les cellules HepG2 exposées 24 h à des concentrations croissantes de B[a]P de 0 à 8 μM

3. Formation des adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN dans les cellules HepG2 exposées au B[a]P

La mesure des adduits s'est portée uniquement sur l'adduit stable BPDE-N2-dGuo, adduit formé en majorité et pour lequel nous disposons d'un standard de calibration externe permettant de quantifier les adduits dans les échantillons par HPLC/MS/MS (voir chromatogramme Figure 27).

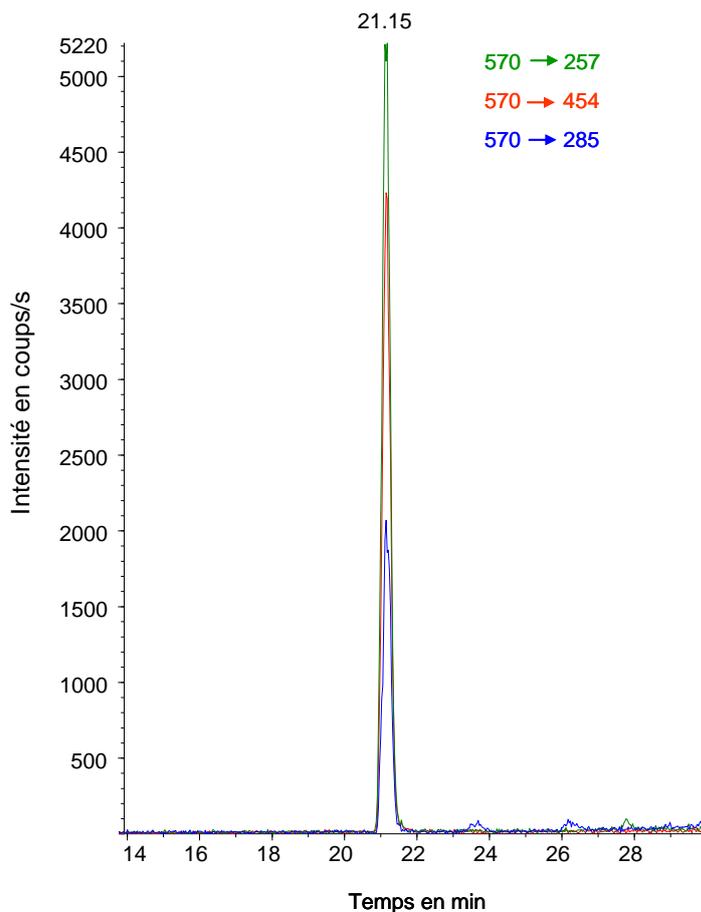


Figure 27 : Chromatogramme obtenu en HPLC/MS/MS lors de l'injection de 400 fmol de standard BPDE-N2-dGuo permettant la quantification des adduits dans les échantillons à tester par calibration externe.

3.1 Cinétique de formation des adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN induites par l'exposition des cellules à des concentrations de 0,25 et 8 μ M de B[a]P

Afin d'évaluer le temps d'incubation permettant d'obtenir le maximum d'adduits BPDE-N2-dGuo, une cinétique a été réalisée.

La cinétique de formation des adduits BPDE-N2-dGuo mesurée par HPLC/MS/MS diffère selon les concentrations de B[a]P :

Pour une concentration faible de B[a]P de 0,25 μM (Figure 28), le maximum d'adduits formés est atteint rapidement au bout de 4h d'incubation, puis cette quantité d'adduits diminue jusqu'à 24 h d'incubation.

Avec une concentration 32 fois plus élevée (8 μM de B[a]P Figure 29), il se forme autant d'adduits qu'à 0,25 μM au cours des quatre premières heures. La formation des adduits se poursuit entre 4 et 8 h, puis une augmentation très rapide est observée entre 8 et 14 h, avant d'atteindre un plateau. La quantité maximale d'adduits formés est 50 fois plus élevée à 8 μM qu'à 0,25 μM .

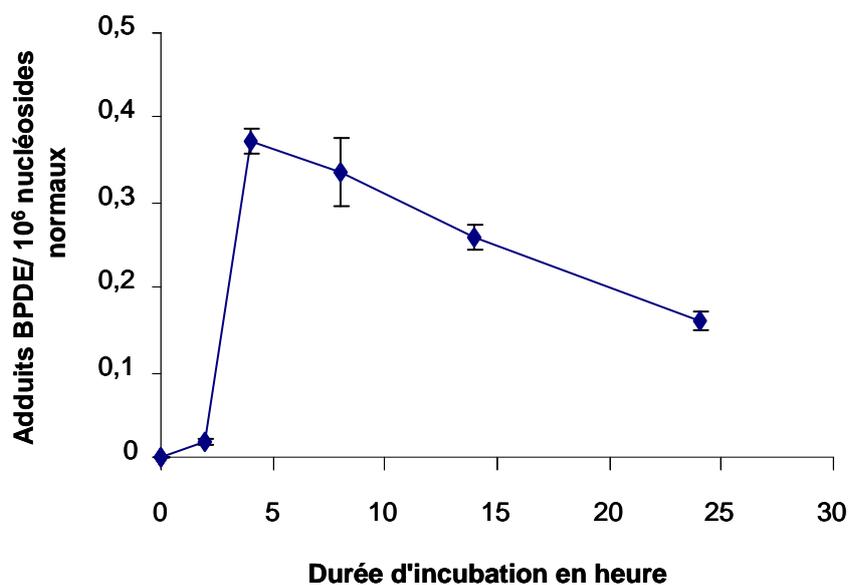


Figure 28 : Cinétique de formation des adduits BPDE-N2-dGuo lors du traitement des cellules HepG2 avec 0,25 μM de B[a]P. Les quantités d'adduits sont mesurées après 2, 4, 8, 14 et 24 h d'incubation.

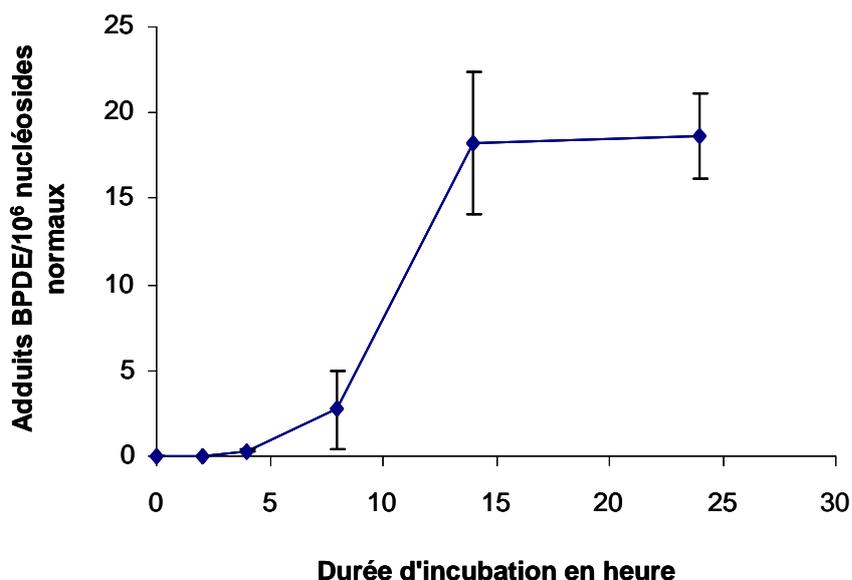


Figure 29 : Cinétique de formation des adduits BPDE-N2-dGuo lors du traitement des cellules HepG2 par 8 µM de B[a]P. Les quantités d'adduits sont mesurées après 2, 4, 8, 14 et 24 h d'incubation.

3.2 Formation des adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN en fonction de la concentration en B[a]P

La quantité d'adduits BPDE-N2-dGuo générée lors de l'exposition des cellules à des concentrations de B[a]P de 0 à 20 µM pendant 24 h augmente de façon linéaire jusqu'à 10 µM puis tend vers un plateau à des doses plus élevées (Figure 30).

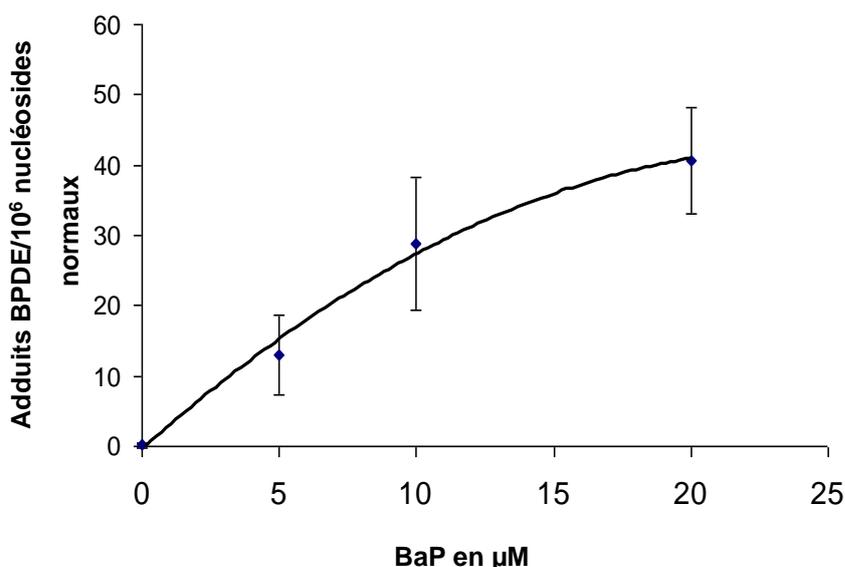


Figure 30 Quantité d'adduits BPDE-N2-dGuo formée lors du traitement des cellules par des concentrations croissantes de B[a]P de 5, 10 et 20 µM pendant 24 h

4. Conclusion

Le B[a]P génère des cassures détectables par le test des comètes au niveau de l'ADN des cellules HepG2 à partir de 1 μM et des adduits BPDE-N2-dGuo à des concentrations encore plus faibles.

Si l'on compare les pentes des droites de formation des cassures et des adduits à l'ADN en fonction de la concentration en B[a]P (0 à 10 μM), ces pentes sont respectivement égales à 0,03 et 2,86. Il ressort que le B[a]P génère presque 100 fois plus d'adduits BPDE que de cassures à l'ADN.

Les quantités d'adduits et de cassures dans les cellules HepG2 exposées au B[a]P augmentent de façon dose-dépendante. Le calcul du rapport quantité d'adduits/quantité de cassures montre que dans les deux premières heures d'incubation, à 8 μM , il se produit majoritairement plus de cassures de l'ADN que d'adduits BPDE. Au-delà de 2 h, la formation des adduits BPDE devient plus importante que la formation des cassures.

Pour la suite des expériences, une concentration de B[a]P et d'HAP de 1 μM a été choisie, cette concentration étant non cytotoxique. De plus il s'agit de la concentration la plus faible permettant de détecter des cassures de l'ADN. Afin d'obtenir de permettre la formation d'un maximum de dommages à l'ADN tout en limitant la cytotoxicité, un temps d'incubation de 14 h a été retenu. De plus, ce temps d'incubation correspond pour la formation des cassures, comme celle des adduits au début de la phase de plateau.

II. Effet d'autres HAP particuliers sur les cellules HepG2

En plus du B[a]P, les effets cytotoxiques et génotoxiques de 9 autres HAP particuliers classiquement mesurés dans l'atmosphère en milieu environnemental comme en milieu industriel a été évalué sur les cellules HepG2. Les concentrations atmosphériques de ces HAP sont surveillées dans l'atmosphère en raison de leur toxicité, leur abondance mais également en raison de leur qualité en tant que traceur de sources.

Dans un premier temps, la cytotoxicité de ces différents HAP à 1 et 8 μM a été investiguée dans les cellules HepG2.

1. Cytotoxicité de différents HAP particuliers à 1 et 8 μM

L'incubation des cellules HepG2 en présence des différents HAP pendant 14 h à la concentration de 1 μM diminue la viabilité cellulaire par rapport au témoin DMSO, à l'exception du B[a]A et du Flua (test du MTT). Mais cette viabilité cellulaire reste supérieure à 70 % sauf avec le B[g,h,i]P, le DB[a,h]A et le Chr (Figure 31). A 8 μM , la viabilité cellulaire diminue pour l'ensemble des composés et reste supérieure à 50 % sauf dans les cellules traitées avec du B[k]F, B[g,h,i]P, Chr et DB[a,h]A (Figure 32).

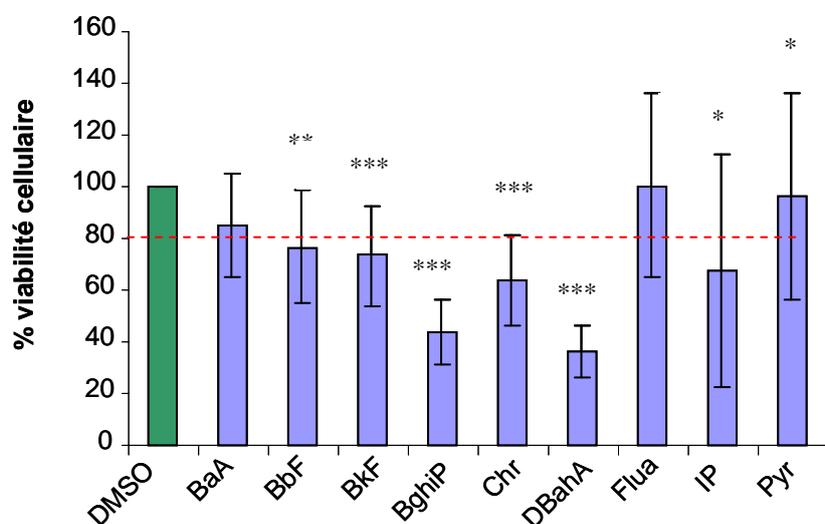


Figure 31 : Cytotoxicité induite par l'exposition des cellules avec différents HAP à 1 μM pendant 14 h. Résultat issu de 2 expériences indépendantes avec * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ par rapport au contrôle DMSO

----- Viabilité mesurée dans les cellules traitées avec du B[a]P 1 μM

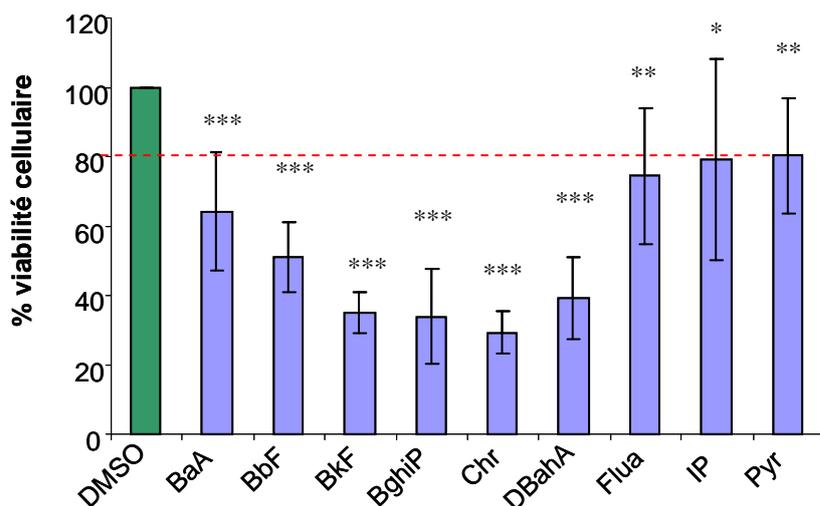


Figure 32 : Cytotoxicité induite par l'exposition des cellules avec différents HAP à 8 μ M pendant 14 h
 Résultat issu de 2 expériences indépendantes avec * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ par rapport au contrôle DMSO

--- Viabilité mesurée dans les cellules traitées avec du B[a]P 8 μ M

2. Cassures à l'ADN induites dans les cellules HepG2 exposées à différents HAP

Le traitement des cellules HepG2 pendant 14 h en présence des différents HAP purs à 1 μ M n'entraîne pas d'augmentation significative des cassures de l'ADN par rapport au contrôle négatif (Figure 33).

Parmi l'ensemble des HAP, le B[a]P est celui pour lequel le tail DNA est le plus élevé. A plus forte concentration, 8 μ M, (Figure 34) tous les HAP, à l'exception du Pyr, génèrent un plus grand nombre de cassures à l'ADN que le contrôle négatif. bien que les différences ne soient pas statistiquement significatives. Les cassures les plus importantes sont observées dans les cellules traitées avec du B[a]P et de l'IP.

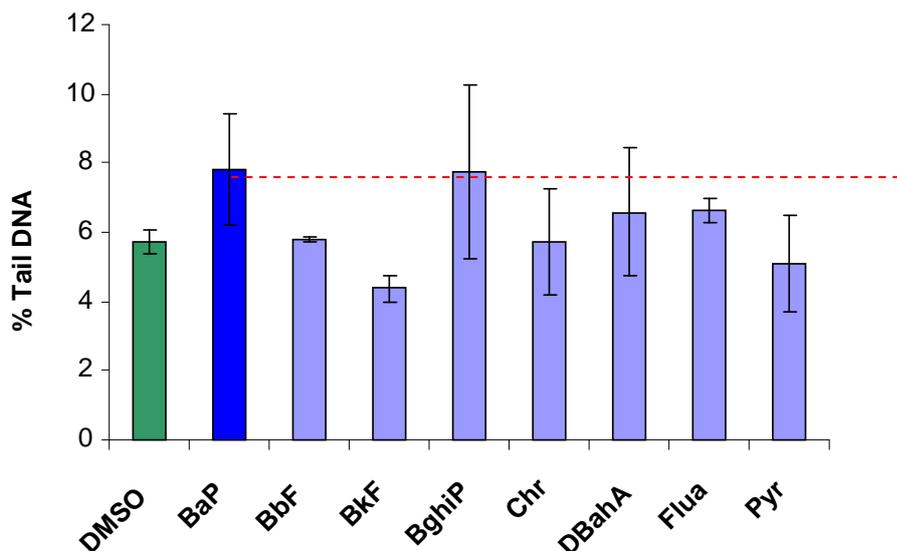


Figure 33 : Cassures induites par l'incubation des cellules HepG2 avec différents HAP purs à 1 µM pendant 14 h. Pas de différences significatives par rapport au contrôle DMSO

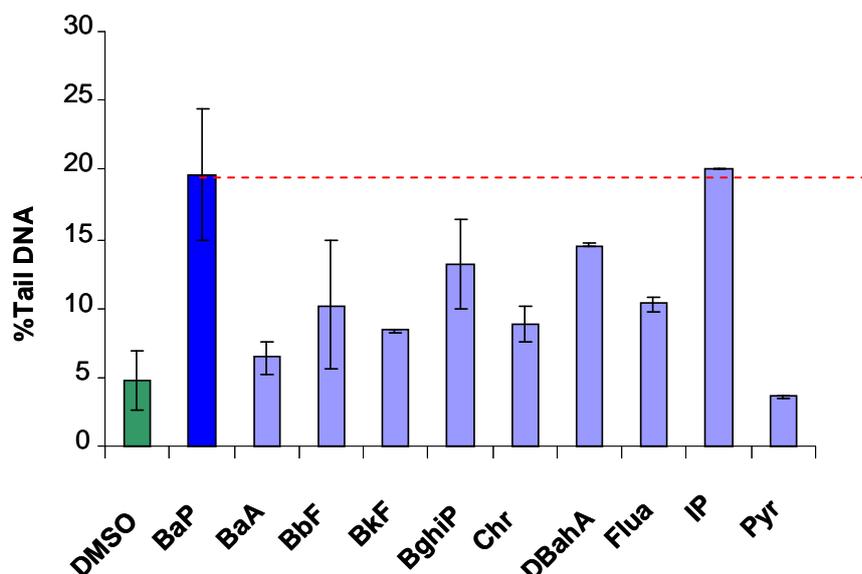


Figure 34 : Cassures induites par l'incubation des cellules HepG2 avec différents HAP purs à 8 µM pendant 14 h. Pas de différences significatives par rapport au contrôle DMSO

3. Conclusions

Les différents HAP à 1 µM, n'entraînent une mortalité cellulaire supérieure à 30 %, à l'exception du B[g,h,i]P et du DB[a,h]A, et n'entraînent pas d'augmentation significative des cassures de l'ADN dans les cellules HepG2 exposées pendant 14 h. A cette concentration, seul le B[a]P, entraîne une augmentation significative des cassures par rapport au contrôle négatif. Que ce soit à 1 ou à 8 µM, aucun HAP ne forme plus de cassures à l'ADN que le B[a]P.

CHAPITRE 3

ETUDE DE MELANGES SYNTHETIQUES D'HAP

CHAPITRE 3-ETUDE DE MELANGES SYNTHETIQUES D'HAP

I. Modulation de la génotoxicité du B[a]P par les autres HAP en mélanges binaires en co-traitement

1. Effet du B[a]P en mélange binaire équimolaire avec d'autres HAP particuliers

1.1 Cytotoxicité du B[a]P en mélange binaire

En mélanges équimolaires (1 μ M) les cellules co-traitées avec B[a]P+B[k]F, B[a]P+Chr, B[a]P+B[g,h,i]P pendant 14 h (Figure 35) ont une viabilité cellulaire inférieure à 70 % par le test du MTT. L'effet le plus important est observé lors du co-traitement avec le DB[a,h]A avec une viabilité cellulaire inférieure à 30 %.

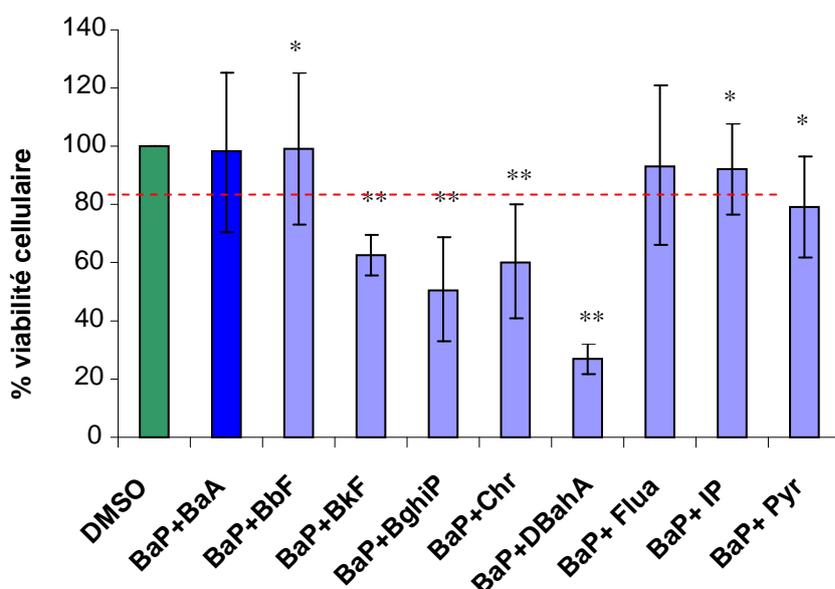


Figure 35 : Cytotoxicité du BaP en mélange binaire équimolaire (1 μ M) avec d'autres HAP dans les cellules HepG2 traitées pendant 14 h. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ par rapport au contrôle DMSO
 --- Viabilité mesurée dans les cellules traitées avec 1 μ M de B[a]P

1.2 Cassures à l'ADN induites dans les cellules HepG2 exposées à du B[a]P en mélange binaire avec d'autres HAP

Parmi les mélanges binaires B[a]P + HAP particulières classés dans le groupe des cancérogènes probables ou possibles par le CIRC, les mélanges, B[a]P+DB[a,h]A B[a]P+IP et B[a]P+BbF (Figure 36) entraînent une augmentation du Tail DNA de respectivement 45 % pour le premier et 30 % pour les deux autres par rapport au B[a]P pur. Ces mélanges semblent donc augmenter les quantités de cassures par rapport au B[a]P seul alors qu'ils n'entraînent pas d'augmentation du nombre de cassures quand ils sont purs. En revanche, aucun effet potentialisateur ou inhibiteur n'est mis en évidence lors du co-traitement B[a]P avec les autres HAP classés 3 ou non cancérogènes (Figure 37).

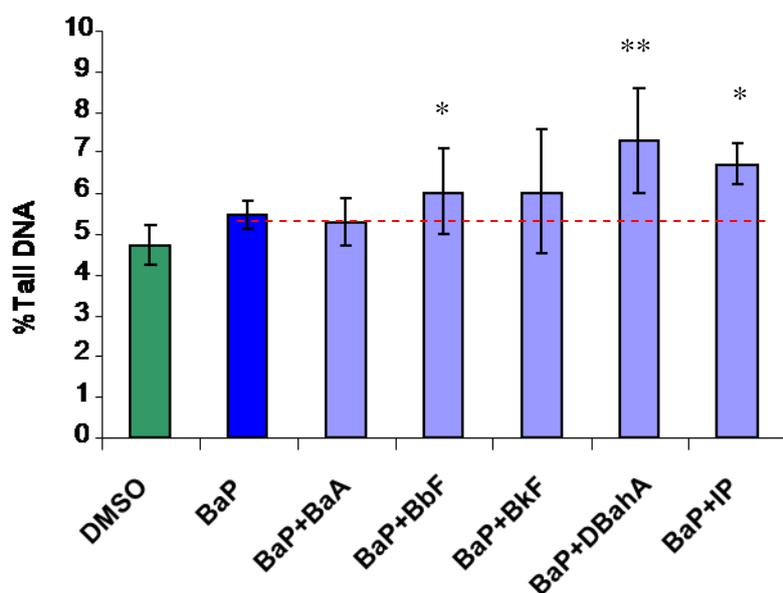


Figure 36 : Cassures à l'ADN induites par du BaP en mélange binaire équimolaire (1 μ M) avec d'autres HAP classés dans la catégorie 2A ou 2B par le CIRC dans les cellules HepG2 exposées pendant 14 h. Résultat issu de 2 expériences indépendantes avec * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$ par rapport aux cellules traitées par le B[a]P

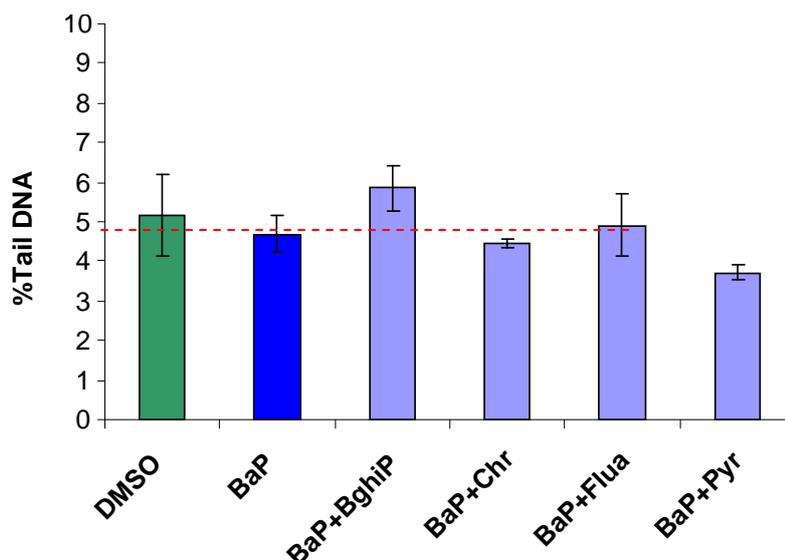


Figure 37 : Cassures à l'ADN induites par du BaP en mélange binaire équimolaire (1 μ M) avec d'autres HAP classés dans la catégorie 3 ou non cancérigènes par le CIRC dans les cellules HepG2 exposées pendant 14 h. Absence de différence significative par rapport au B[a]P

1.3 Formation des adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN dans les cellules HepG2 exposées à du B[a]P en mélange binaire avec d'autres HAP

Le B[a]P à 1 μ M génère environ 1,5 adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN pour 10^6 nucléotides (voir chromatogramme Figure 38). En mélange binaire équimolaire (1 μ M), le B[b]F et l'IP potentialisent la quantité d'adduits BPDE à l'ADN (Figure 39). Cette quantité d'adduits augmente en moyenne de 73 %, 66 % et 53 % respectivement dans les cellules traitées avec les mélanges B[a]P+ IP, B[a]P+B[b]F et B[a]P+DB[a,h]A.

Le co-traitement des cellules avec du B[a]P et du B[a]A n'a pas d'effet significatif sur la formation des adduits BPDE à l'ADN par rapport au B[a]P pur.

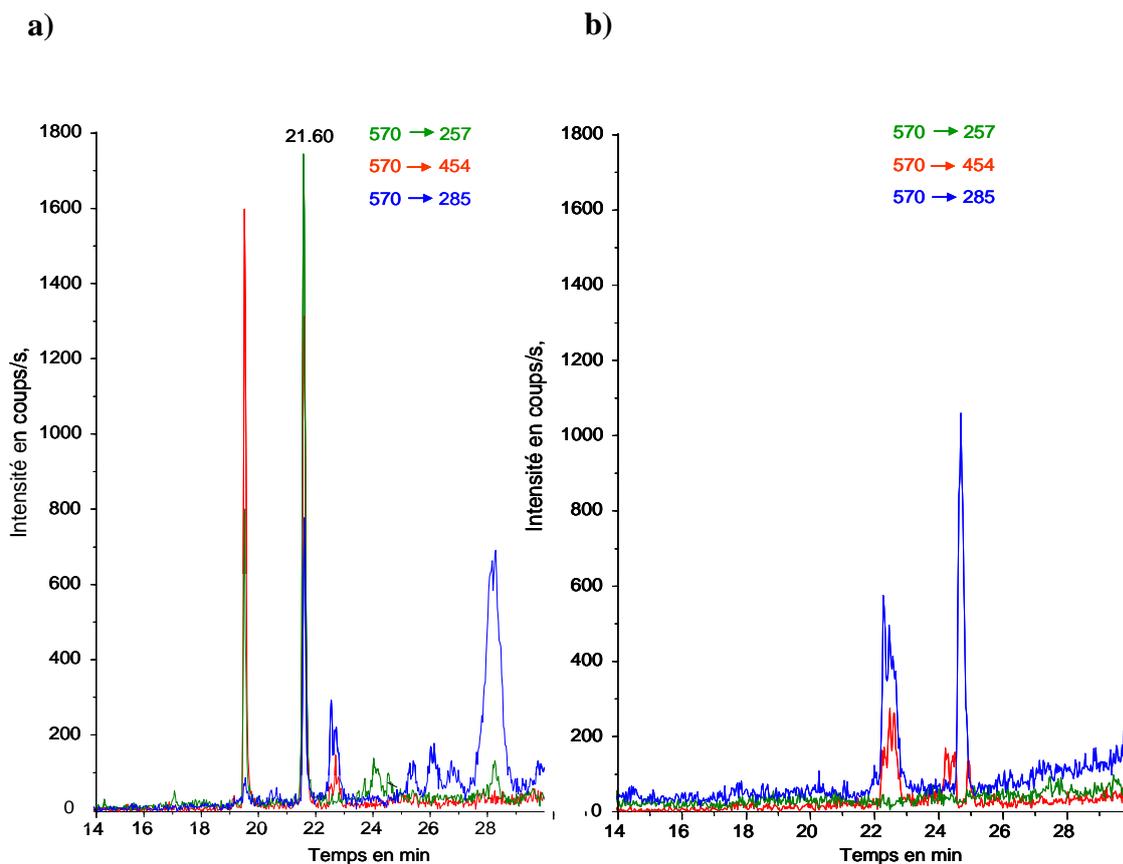


Figure 38 : Chromatogramme obtenu lors de la mesure des adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN dans les cellules traitées avec 1 μ M de B[a]P a) ou dans les cellules traitées avec du DMSO b)

Seul le B[k]F inhibe fortement la formation des adduits BPDE à l'ADN avec une diminution de la quantité d'adduits de 73 % par rapport à ce qui est observé lors du traitement des cellules par du B[a]P pur.

Les HAP non classés cancérigènes ou classés 3 selon la classification du CIRC, n'augmentent pas la quantité d'adduits BPDE induits par le B[a]P (Figure 40).

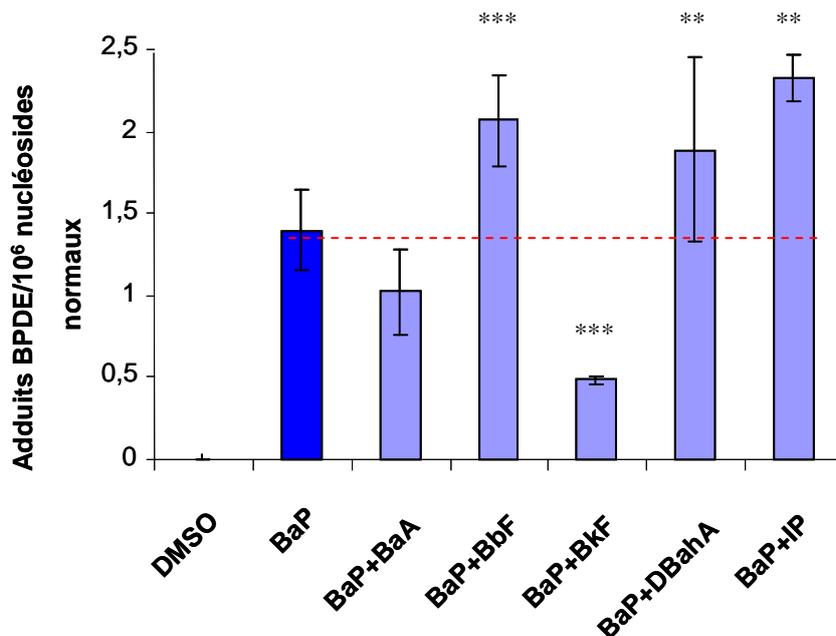


Figure 39 : Adduits à l'ADN induits par du BaP en mélange binaire équimolaire (1 µM) avec d'autres HAP classés dans la catégorie 2A ou 2B par le CIRC. Résultat issu de 2 expériences indépendantes avec * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$ par rapport au B[a]P

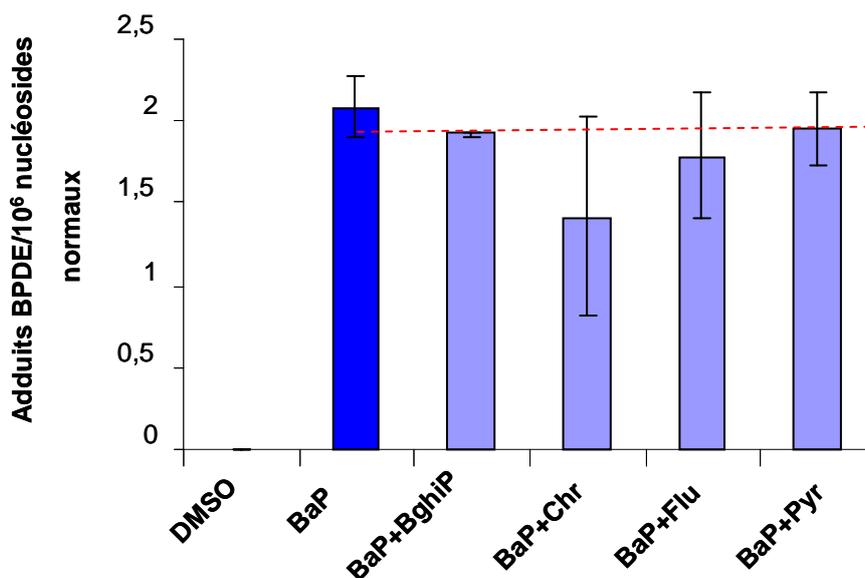


Figure 40 : Adduits à l'ADN induits par du BaP en mélange binaire équimolaire (1 µM) avec d'autres HAP classés dans la catégorie 3 ou non cancérigènes par le CIRC. Absence de différence significative par rapport au B[a]P

B[b]F et B[k]F sont deux HAP ayant des structures chimiques assez similaires possédant tous les deux une région baie. Pourtant, en mélange avec le B[a]P, ils entraînent des effets totalement différents, le B[b]F étant à l'origine d'un effet potentialisateur alors que le B[k]F est à l'origine d'un effet inhibiteur au niveau de la formation des adduits BPDE-N2-dGuo.

Nous nous sommes donc intéressés à ces deux mélanges en particulier.

2. Etude de l'effet du B[b]F et du B[k]F sur la génotoxicité du B[a]P

Afin d'évaluer si les niveaux d'adduits observés à $t = 14$ h s'expliquaient par une différence au niveau de la vitesse de formation/élimination des cassures et des adduits BPDE induits par le B[b]F ou le B[k]F, la cinétique de formation de ces dommages est mesurée dans les cellules HepG2 traitées avec du B[a]P pur ou en mélanges équimolaires ($1 \mu\text{M}$).

2.1 Cinétique de formation des cassures à l'ADN induites par les mélanges binaires B[a]P+B[b]F et B[a]P+B[k]F

Comparé au B[a]P pur, l'ajout de B[b]F et le B[k]F ne modifient ni la vitesse de formation ni la quantité de cassures à l'ADN (Figure 41). Les cinétiques de formation de cassures de l'ADN reflétées par le % Tail DNA sont identiques pour le B[a]P seul ou en mélange.

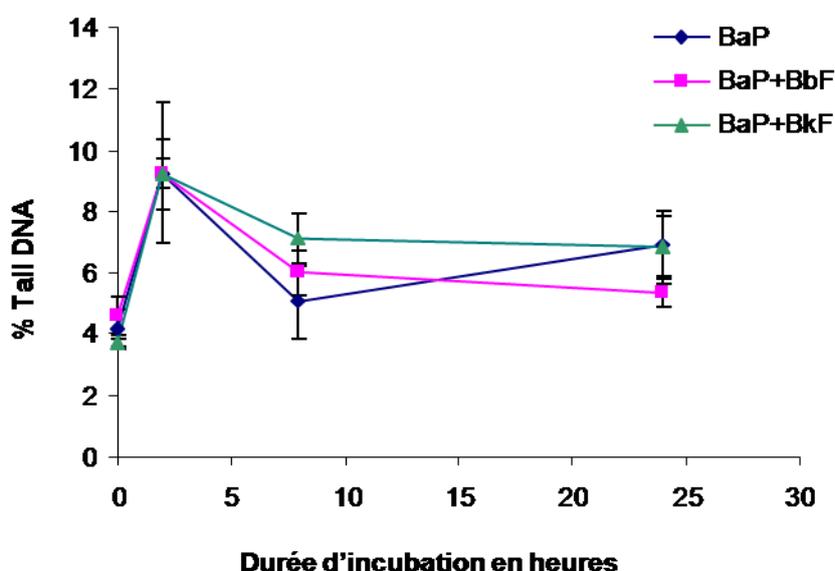


Figure 41 : Cinétique de formation des cassures à l'ADN induites par du BaP seul ou en mélange binaire équimolaire ($1 \mu\text{M}$) avec du B[b]F ou du B[k]F

2.2 Cinétique de formation des adduits BPDE-N2-dGuo par le B[a]P seul ou en mélange avec du B[b]F ou du B[k]F

On obtient des profils de cinétique de formation d'adduits assez similaires pour le B[a]P seul et le mélange BaP+BkF (Figure 42) : le pic de formation des adduits BPDE est atteint plus rapidement dans les cellules exposées au B[a]P pur ou en mélange avec le B[k]F (4h) que dans les cellules traitées avec le B[b]F (8h). Au-delà, la quantité d'adduits diminue pour atteindre un plateau entre 14 h et 24 h quelque soit l'exposition.

En revanche, les quantités d'adduits sont différentes : alors que dans les cellules traitées avec le mélange B[a]P+B[k]F il existe une inhibition de la formation des adduits BPDE par rapport au B[a]P pur à partir de 2 h et ce, jusqu'à 24 h d'incubation, le B[b]F potentialise la formation des adduits BPDE au-delà de 4 h et ce jusqu'à 24 h d'incubation.

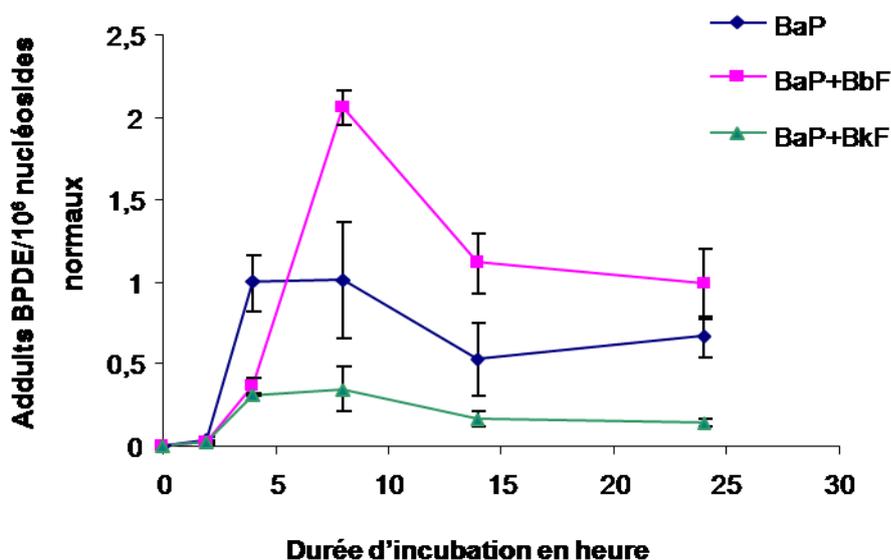


Figure 42 : Cinétique de formation des BPDE-N2-dGuo à l'ADN induites par du BaP seul ou en mélange binaire équimolaire (1 µM) avec du B[b]F ou du B[k]F

2.3 Formation des adduits BPDE-N2-dGuo par le B[a]P en présence de différentes concentrations de B[b]F et de B[k]F

L'effet de concentrations croissantes (0,25 à 8 µM) de B[b]F ou de B[k]F sur la formation des adduits BPDE-N2-dGuo par le B[a]P est évalué en co-incubant les cellules HepG2 avec du BaP 1 µM et différentes concentrations de B[b]F ou B[k]F pendant 14 h.

Jusqu'à 0,5 μM , le B[b]F n'a pas d'effet sur la formation des adduits BPDE à l'ADN pour 1 μM de B[a]P (Figure 43). Un plateau est atteint à partir de 1 μM de B[b]F. A l'inverse, l'inhibition de la formation des adduits BPDE par le B[k]F est concentration dépendante (Figure 44) et s'exerce même à faible concentration avec une inhibition de 30 % pour une concentration de B[k]F de 0,25 μM .

L'IC₅₀ est évaluée entre 0,25 μM et 0,5 μM .

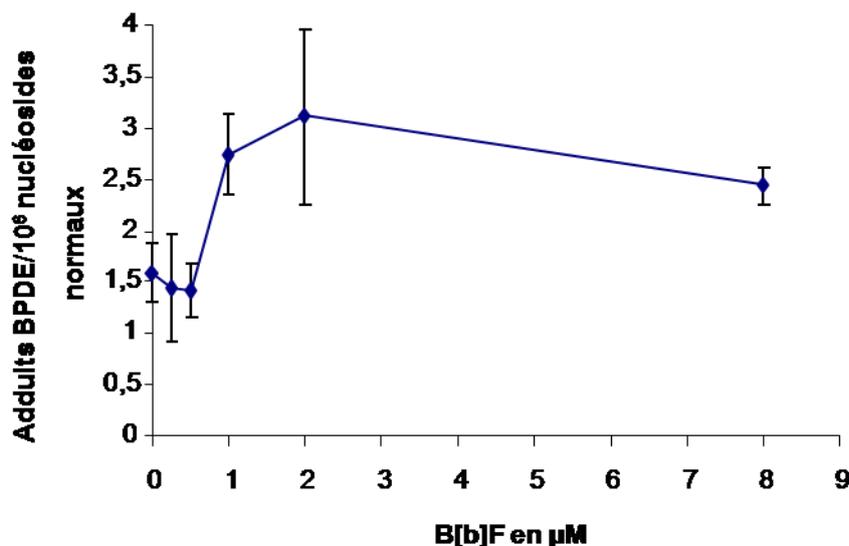


Figure 43 : Effet de la concentration en B[b]F sur la quantité d'adduits BPDE-N2-dGuo formés par du B[a]P 1 μM en co-traitement pendant 14 h

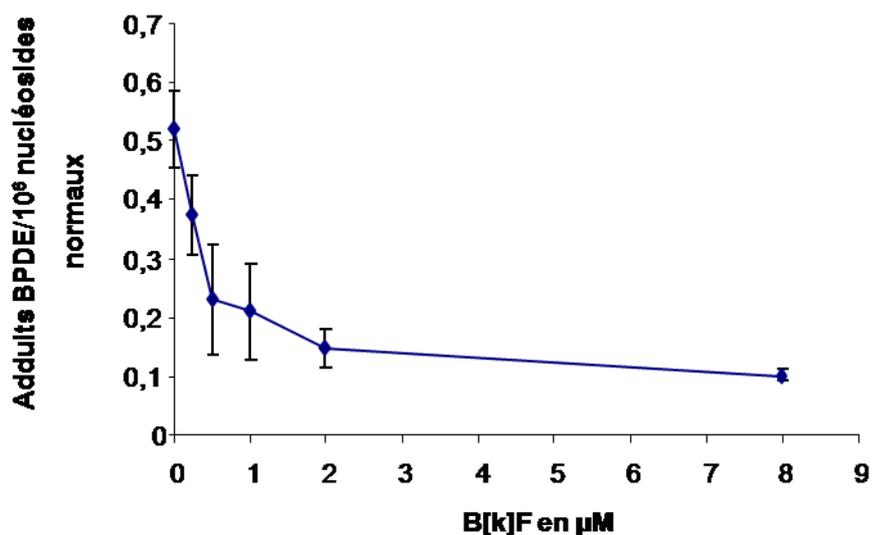


Figure 44 : Effet de la concentration en B[k]F sur la quantité d'adduits BPDE-N2-dGuo formés par du B[a]P 1 μM en co-traitement pendant 14 h

3. Conclusion

Alors que le B[b]F ou le B[k]F ne modifient ni la vitesse de formation, ni la quantité de cassures à l'ADN, à $t = 14$ h, la formation des adduits BPDE-N2-dGuo entre dans une phase de plateau que ce soit avec le B[a]P seul ou avec les deux mélanges. Les effets potentialisateurs du B[b]F et inhibiteurs du B[k]F ne peuvent donc pas s'expliquer par une différence de cinétique de la formation des adduits BPDE qui serait le reflet d'une accélération ou au contraire d'un ralentissement de la formation/élimination des adduits BPDE.

Ces résultats ne permettent pas de déterminer les mécanismes par lesquels ces HAP exercent leur action potentialisatrice ou inhibitrice. On peut toutefois penser que ces mécanismes sont de nature différente car le B[k]F inhibe en effet la formation des adduits BPDE de façon dose-dépendante alors que le B[b]F semble avoir un effet seuil.

Afin de déterminer si les effets potentialisateurs/inhibiteurs observés lors du co-traitement sont dus à l'action combinée des deux HAP présents dans le mélange ou par un autre mécanisme, un prétraitement par du B[a]P pur ou par les autres HAP pendant 2 h est réalisé, avant que les cellules ne soient traitées avec $8 \mu\text{M}$ de B[a]P pur (après avoir retiré le milieu de culture de prétraitement).

II. Modulation de la génotoxicité du B[a]P lors d'un prétraitement cellulaire par des HAP

1. Effet d'un prétraitement par du B[a]P ou par les HAP purs sur la formation des dommages à l'ADN

1.1 Effet d'un prétraitement par du B[a]P à 0,25 μM sur la cinétique de formation des cassures et des adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN induits par du B[a]P 8 μM

Au niveau de la formation des cassures de l'ADN, le prétraitement n'a pas d'effet sur la vitesse de formation ni sur la quantité de cassures à l'ADN à $t = 2$ h et $t = 4$ h (Figure 45 a).

Concernant la formation des adduits BPDE-N2-dGuo (Figure 45 b), les cellules préalablement traitées pendant 2 h avec 0,25 μM de B[a]P avant d'être exposées à 8 μM de B[a]P génèrent plus d'adduits BPDE-N2-dGuo à $t = 2$ h et $t = 4$ h par rapport aux cellules non prétraitées. Aux plus fortes concentrations de prétraitement, les niveaux d'adduits sont identiques, voire un peu plus faibles (2 μM).

Les niveaux d'adduits n'augmentent pas lorsque la concentration du prétraitement en B[a]P augmente (Figure 46 a). Les niveaux d'adduits BPDE-N2-dGuo mesurés dans les cellules après 2 h de prétraitement, soit à $t = 0$, ainsi que 2 h et 4 h après le prétraitement sont identiques quelque soit la dose de B[a]P.

Un prétraitement de 2 h par du B[a]P potentialise donc la formation des adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN par rapport aux cellules non prétraitées, mais les niveaux d'adduits sont similaires quelque soit la dose de B[a]P utilisée pour le prétraitement (Figure 46 b).

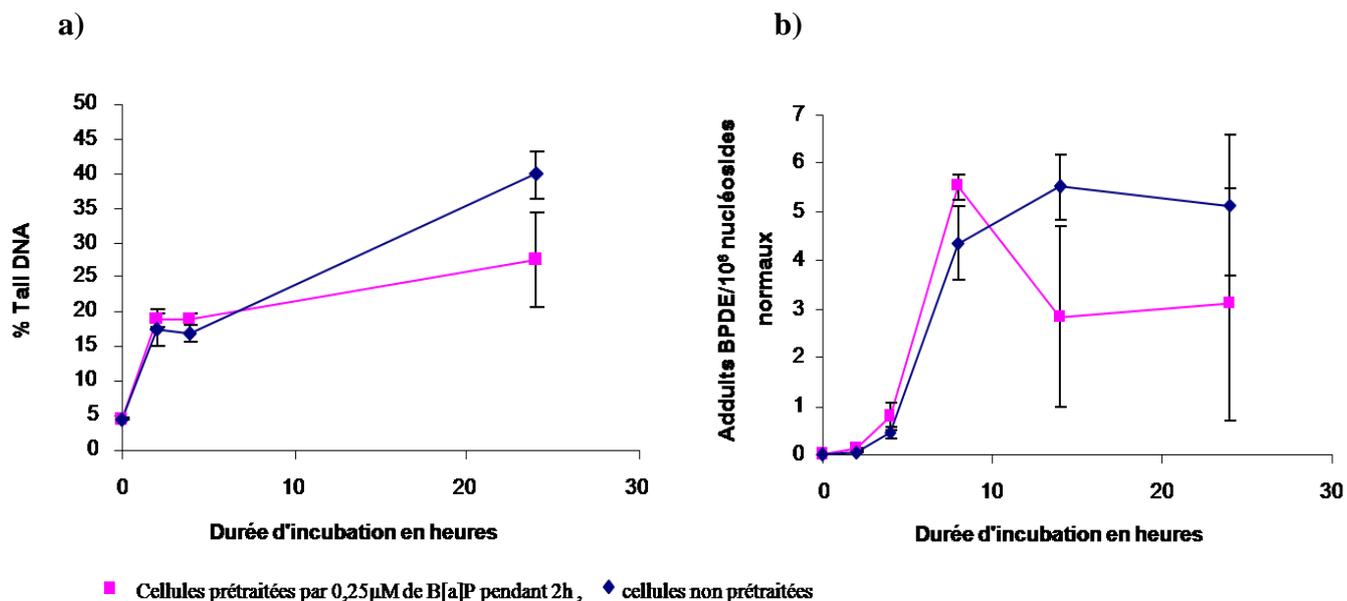


Figure 45 : Effet d'un prétraitement de 2 h par du B[a]P sur la cinétique de formation des cassures a) et des adduits b) induits par une exposition des cellules HepG2 à 8 µM de B[a]P.

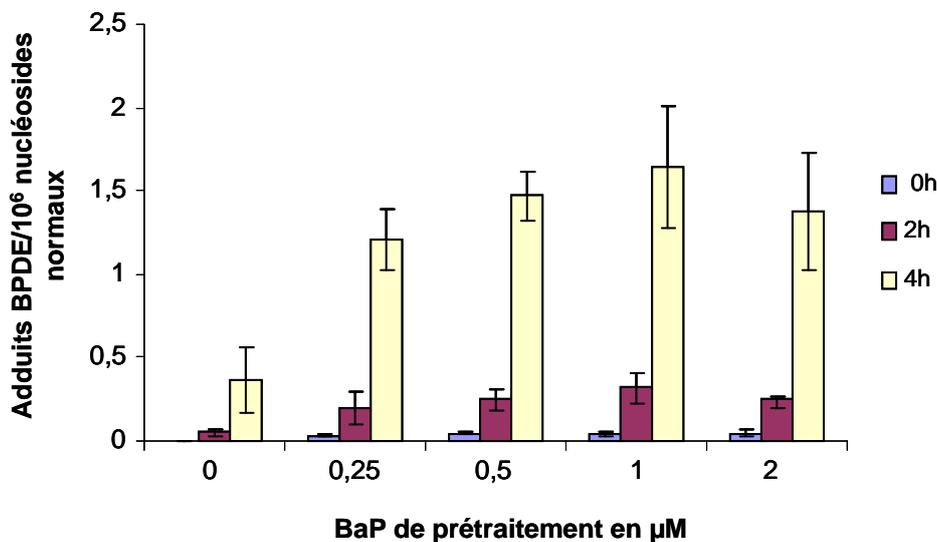


Figure 46 : Effet d'un prétraitement de 2 h par du B[a]P à différentes concentrations sur la cinétique formation des adduits BPDE-N2-dGuo à 2 h et 4 h après traitement des cellules HepG2 par 8 µM de B[a]P

1.2 Effet d'un prétraitement par différents HAP sur la formation des adduits BPDE-N2-dGuo dans les cellules HepG2 exposées au B[a]P 8 μ M

Dans une deuxième expérience, les cellules sont prétraitées 2 h avec les différents HAP comme précédemment, puis les cellules sont incubées pendant 14 h avec 8 μ M de B[a]P. L'effet sur la formation des adduits BPDE est semblable à celui obtenu dans les cellules traitées directement avec les mélanges, avec un effet potentialisateur du BbF, DB[a,h]A et IP et un effet inhibiteur du BkF (Figure 47). Les différences ne sont pas significatives, en raison du trop faible nombre de données. Les quantités d'adduits formées sont comparables à celles obtenues dans les cellules traitées par co-incubation (Figure 39). Ces résultats indiquent que les effets potentialisateurs ou inhibiteurs observés lors des co-traitements par les mélanges binaires ne sont pas dus à l'interaction directe entre le B[a]P et les autres HAP mais plutôt à un effet indirect. On peut penser à une action de ces HAP via le récepteur AhR ou via les enzymes de la métabolisation qui aurait pour conséquence soit de favoriser la formation des adduits BPDE soit de la diminuer dans le cas du B[k]F.

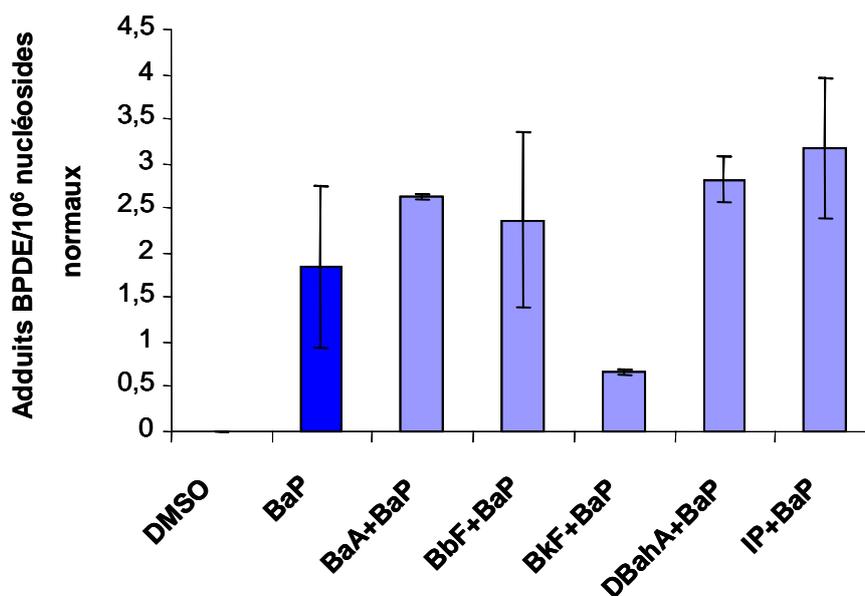


Figure 47 : Effet d'un prétraitement de 2 h par différents HAP à 1 μ M sur la formation des adduits BPDE-N2-dGuo générés par l'exposition des cellules HepG2 à du BaP 1 μ M pendant 14 h. Absence de différence significative par rapport au B[a]

CHAPITRE 4

EVALUATION DE LA GENOTOXICITE DE MELANGES ATMOSPHERIQUES REELS D'HAP

CHAPITRE 4-EVALUATION DE LA GENOTOXICITE DE MELANGES ATMOSPHERIQUES REELS D'HAP

I. Caractéristiques des échantillons atmosphériques environnementaux et industriels

1. Description des prélèvements

Des prélèvements atmosphériques sont réalisés sur différents sites et à différentes périodes de l'année afin d'obtenir des échantillons atmosphériques qui soient caractéristiques de différents types d'émissions.

Ces échantillons sont soit d'origine environnementale, soit d'origine industrielle, prélevés à l'intérieur d'installations industrielles émettant des HAP (Tableau 5). Les prélèvements environnementaux sont de plusieurs types :

- Urbain : prélèvements au centre-ville de Grenoble durant plusieurs mois de juillet 2008 à mars 2009
- Urbain péri-industriels : prélèvements à Vénissieux en septembre 2007 et novembre 2008
- Trafic : prélèvement à Grenoble en été près d'une zone routière où le flux automobile est important
- Montagne : prélèvement à Chamonix en hiver avec une émission d'HAP issus à la fois du trafic routier et du chauffage essentiellement au feu de bois.

Les échantillons industriels proviennent de trois usines différentes, dont l'activité est décrite ci-dessous :

- Fabrication du silicium avec des niveaux très élevés en HAP émis d'une part lors du chargement du brai de houille par les ouvriers mais également lors de la combustion des électrodes de graphite dans les fours.

-Electrolyse de l'aluminium : pour laquelle des anodes Söderberg composées de coke et de brai de pétrole sont cuites in situ.

-Fabrication d'électrodes en graphites composés de carbone avec des émissions très élevées lors de la cuisson.

Tableau 5 : Présentation des échantillons atmosphériques utilisés dans l'étude

Lieu	Date	Type de prélèvements
Grenoble	Juillet-Août 2008 Septembre-Octobre 2008	Urbain
Grenoble	23, 26, 27 Juillet 2008	Trafic routier
Vénissieux	30 Novembre 2007 27 Septembre 2008	Urbain péri-industriel
Chamonix	18 Décembre 2007	Trafic+feu de bois
Industrie du silicium		industriel
Industrie de l'aluminium	13 Juin 2008	industriel
Fabrication électrodes carbone	10 Avril 2008	industriel

2. Concentrations en HAP

Les concentrations atmosphériques en HAP sont nettement plus élevées dans les échantillons industriels par rapport aux échantillons urbains (Tableau 6). La concentration atmosphérique totale des HAP mesurés est de 1500 à 20000 fois plus élevée en milieu industriel qu'en environnement. Dans ces derniers, elle varie également en fonction des saisons. En prenant l'exemple du site urbain, les concentrations atmosphériques en HAP sont 4 fois plus élevées et la concentration en B[a]P 6 fois plus élevée dans les échantillons collectés en automne que dans les échantillons prélevés en été. Il faut toutefois noter qu'en ce qui concerne les quantités d'HAP désorbées de la fraction particulaire collectée sur les filtres, les débits de prélèvement en environnement sont telles, que les masses de matière disponibles sont relativement comparables en environnement général et en industrie (Tableau 7). Les quantités totales en HAP particulières et les équivalents toxiques (B[a]P_{teq}) dans les extraits issus d'échantillons atmosphériques figurent dans le Tableau 8.

Tableau 6 : Concentration en HAP en ng/m³ sur différents sites industriels et environnementaux

HAP en ng/m ³	Flua	Pyr	BaA	Chr	BeP	BbF	BkF	BaP	DBahA	BghiP	IP	ΣHAP
Industrie aluminium	4345,5	4251,3	3066,1	3074,0	912,2	3875,0	2382,6	5282,5	153,5	2590,9	3490,6	33424,2
Industrie carbone	215,3	187,7	446,1	878,3	nd	1184,0	312,3	417,1	43,5	278,2	<ld	3962,6
Industrie silicium	50984,3	54616,7	20810,1	19538,3	nd	34930,3	17125,4	37883,3	1785,7	30182,9	14712,5	282569,7
Péri-industriel (30/11)	3,5	3,9	0,4	8,4	nd	7,7	3,5	7,8	<ld	7,9	2,9	46,0
Péri-industriel (27/09)	1,0	0,9	1,8	3,4	3,0	5,9	1,7	1,4	0,4	0,8	1,2	21,5
Urbain été	0,3	0,3	0,0	0,3	0,5	0,6	0,2	0,3	0,0	0,6	0,6	3,8
Urbain automne	1,1	1,3	0,4	1,3	1,9	2,6	1,0	1,9	0,1	2,7	2,5	16,6
Trafic routier	0,4	0,5	0,0	0,2	0,2	0,2	0,1	0,1	0,0	0,3	0,2	2,3
Chamonix	23,7	11,6	8,5	8,4	11,0	6,1	4,2	12,9	1,5	4,4	6,3	98,6

Tableau 7 : Quantité d'HAP en ng/filtre désorbés de la fraction particulaire collectée sur les filtres de prélèvement

HAP en ng/filtre	Flua	Pyr	BaA	Chr	BeP	BbF	BkF	BaP	DBahA	BghiP	IP	ΣHAP
Industrie aluminium	1287	1260	908	911	270	1148	706	1565	45	768	1034	9903
Industrie carbone	44	45	136	273	273	392	115	180	16	89	<ld	1562
Industrie silicium	5853	6270	2389	2243	nd	4010	1966	4349	205	3465	1689	32439
Péri-industriel (30/11)	2485	2751	264	5928	nd	5412	2486	5456	<ld	5559	2066	32408
Péri-industriel (27/09)	773	689	1347	2589	2269	4495	1282	1049	288	639	888	16308
Urbain été	264	256	25	224	349	456	158	234	16	446	439	2867
Urbain automne	829	972	267	975	1365	1887	726	1381	60	1958	1846	12268
Trafic routier	291	417	4	188	151	177	63	111	2	210	129	1744
Chamonix	1685	2049	1850	819	509	671	340	977	22	714	774	10409

Tableau 8 : Somme des concentrations des HAP cancérrogènes (HAPc) et B[a]P_{teq} dans les échantillons en ng/m³

	ΣHAPc CIRC	ΣHAPc UE	BaP _{teq}
Industrie aluminium	19162,5	18745,9	6782,7
Industrie carbone	2403,1	3281,4	666,9
Industrie silicium	127247,4	132073,2	49029,6
Péri-industriel (30/11)	22,3	27,8	2,9
Péri-industriel (27/09)	15,3	17,5	9,4
Urbain été	2,2	1,9	0,5
Urbain automne	10,2	9,0	2,6
Trafic routier	0,8	0,9	0,2
Chamonix	50,6	52,7	17,1

Profils en HAP particuliers dans les échantillons :

Des chromatogrammes obtenus lors de la mesure des concentrations en HAP par HPLC couplée à une détection par fluorescence dans les extraits d'échantillons atmosphériques sont représentés dans les Figure 48 et Figure 59.

La proportion en B[a]P est relativement élevée dans tous les échantillons et en particulier dans les échantillons provenant des industries du silicium et de l'aluminium ainsi que dans

l'échantillon péri-industriel (30/11). Dans l'échantillon silicium, on note également de fortes proportions en Pyr et Flu de même que dans les échantillons trafic et Chamonix.

La proportion d'HAP cancérigènes est particulièrement élevée dans les échantillons urbains, péri-urbain industriel et l'échantillon industriel carbone, représentant 70 % des HAP particuliers mesurés en considérant la classification CIRC, et plus de 80 % selon la classification de l'UE qui inclut le Chr.

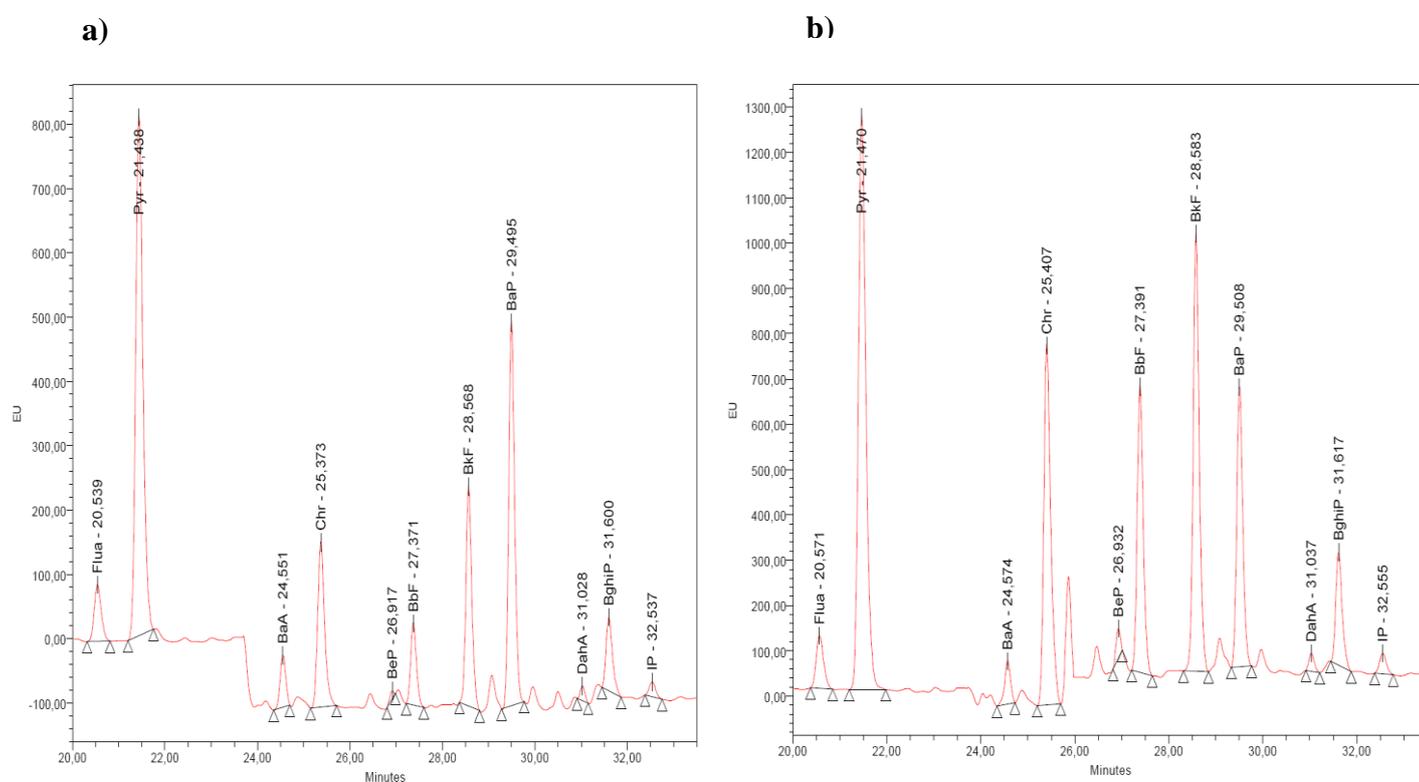


Figure 48 : Chromatogramme correspondant à la mesure des concentrations atmosphériques en HAP particuliers dans les échantillons industrie silicium a) et péri-industriel b) par HPLC-fluo

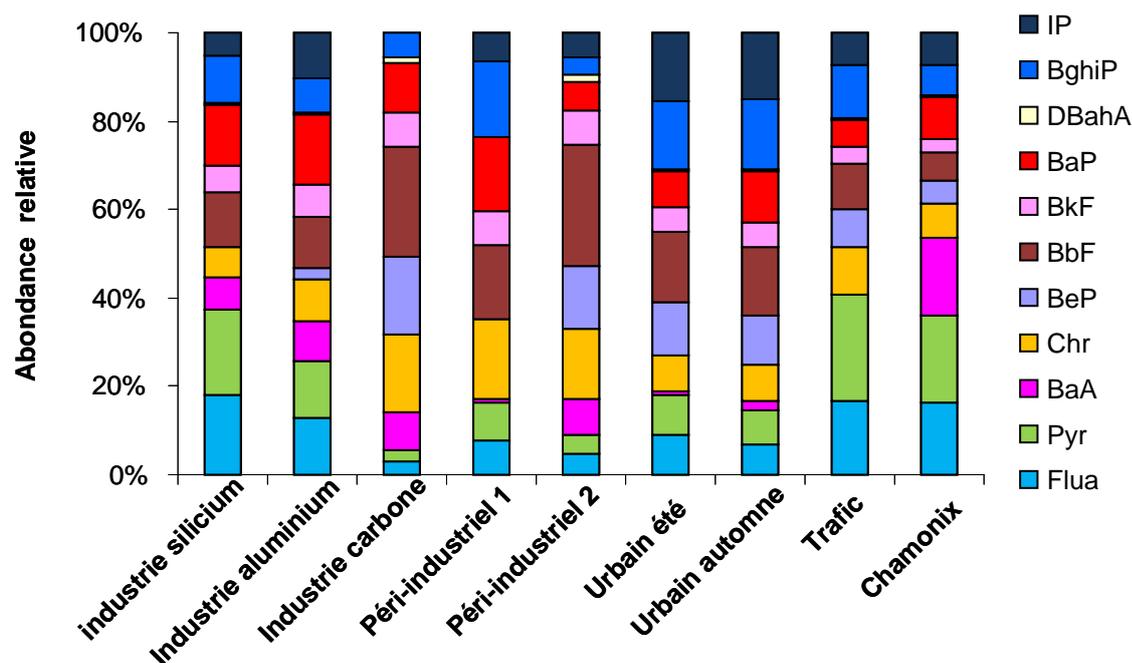


Figure 49 : Abondance relative en HAP particulaires dans les mélanges exprimée en %

3. Présentation des expériences

Deux types d'expériences ont été réalisés avec ces échantillons. Il convient de bien noter que ces extraits atmosphériques correspondent uniquement à la fraction organique atmosphérique piégée sur les filtres et désorbée par un solvant.

Dans un but d'étude mécanistique, les cellules sont traitées avec ces extraits atmosphériques à une concentration constante en B[a]P. C'est-à-dire que les extraits sont dilués dans le milieu de culture de façon à ce que la concentration finale en B[a]P soit la même quelque soit l'extrait testé. Dans une première série d'expérience, cette concentration de B[a]P est fixée à 40 ng/mL soit 0,16 μ M, puis dans une deuxième expérience, afin de limiter les effets cytotoxiques, la concentration en B[a]P est abaissée à 10 ng/mL soit 0,04 μ M. Ces expériences réalisées à concentration constante en B[a]P ont pour but d'évaluer la modulation de la génotoxicité du BaP par les autres composants du mélange.

Le deuxième objectif étant d'évaluer la génotoxicité de l'air atmosphérique afin d'estimer a priori les dangers potentiels pour les populations exposées, nous avons exposé les cellules à la matière organique contenue dans un volume fixe d'air.

Un volume d'air de 20 m³ a été choisi pour les mélanges environnementaux. Ce volume correspond approximativement au volume d'air moyen respiré par un être humain durant 24 h (à un débit de 0,15 m³/h).

En ce qui concerne les échantillons industriels, les débits et les durées de prélèvement utilisés ne permettent pas d'atteindre de tels volumes. Aussi, les cellules sont exposées à l'équivalent de 20 L soit un volume 1000 fois moins élevé que les échantillons environnementaux.

Dans toutes les expériences, deux contrôles négatifs sont inclus. L'un noté « DMSO » correspond aux cellules traitées avec 0,5 % de DMSO. L'autre noté « contrôle filtre » correspond à l'extraction d'un filtre n'ayant pas servi pour le prélèvement (blanc de terrain) et repris par du DMSO.

II. Modulation de la génotoxicité du B[a]P par des mélanges atmosphériques

1. Profils en HAP des mélanges

Afin d'évaluer comment un mélange peut modifier la génotoxicité d'un HAP, le B[a]P, deux échantillons atmosphériques différents ont été particulièrement étudiés : un échantillon prélevé sur un site industriel spécialisé dans la fabrication de silicium (selon la norme AFNOR X 43-294) et un échantillon issu d'un milieu urbain péri-industriel situé à proximité d'industries de fabrication d'électrodes en carbone et prélevé selon la norme AFNOR X 43-025.

Les concentrations atmosphériques sont 1000 fois à 10 000 fois plus élevées sur le site industriel que sur le site urbain mais les abondances relatives en B[a]P sont très comparables dans les deux échantillons (13,4 % et 16,8 % respectivement pour l'échantillon industriel et l'échantillon urbain).

L'échantillon industriel contient majoritairement du Pyr et Flu qui représentent presque 40 % de la quantité d'HAP. Dans l'échantillon urbain ce sont Chr, B[g,h,i]P, et B[b]F qui prédominent.

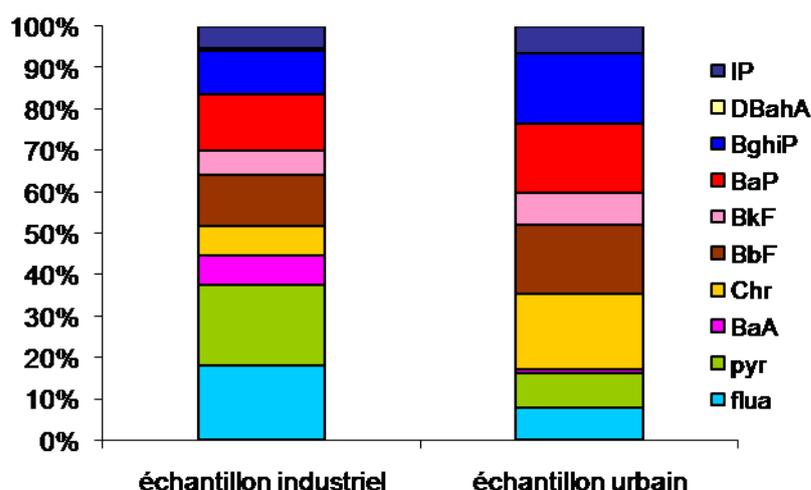


Figure 50 : Proportion relative en HAP particulières mesurés dans les échantillons industriels et urbains péri-industriels

Dans la série d'expériences ci-dessous, les cellules sont traitées avec 40 ng/mL de B[a]P pur soit 0,16 μ M et avec les extraits atmosphériques dilués de façon à ce que la concentration de B[a]P dans le milieu final soit également de 0,16 μ M.

2. Cytotoxicité du B[a]P et des mélanges

La viabilité cellulaire est mise en évidence par deux tests différents de viabilité cellulaire : le test au bleu de trypan et le test du MTT.

Le test au bleu de trypan (Figure 51) ne met pas en évidence de mortalité dans les cellules traitées avec 0,5 % de DMSO ni dans les cellules traitées avec du B[a]P pur ou avec l'échantillon industriel pendant 14 h.

En revanche, la viabilité des cellules traitées avec l'échantillon urbain péri-industriel diminue de 30 % par rapport au contrôle négatif.

La viabilité cellulaire mesurée par le test du MTT est nettement inférieure à celle qui est déterminée par le test au bleu de trypan Figure 51. Cette différence s'explique tout d'abord par le fait que le test du MTT repose sur la mesure de l'activité enzymatique des mitochondries alors que le test au bleu de trypan repose sur l'intégrité membranaire des cellules.

Cette activité enzymatique peut être perturbée alors que la cellule est encore vivante ce qui peut conduire à des faux négatifs. D'autre part, cette différence peut également s'expliquer par le fait que lors des différents rinçages cellulaires au PBS réalisés dans le test au bleu de trypan, les cellules mortes peuvent se décoller comme le montre la Figure 52. Ces 2 approches complémentaires d'étude de la viabilité montrent que si une part des cellules meurent, celles qui restent adhérentes et qui sont utilisées pour les tests sont en grande majorité viables.

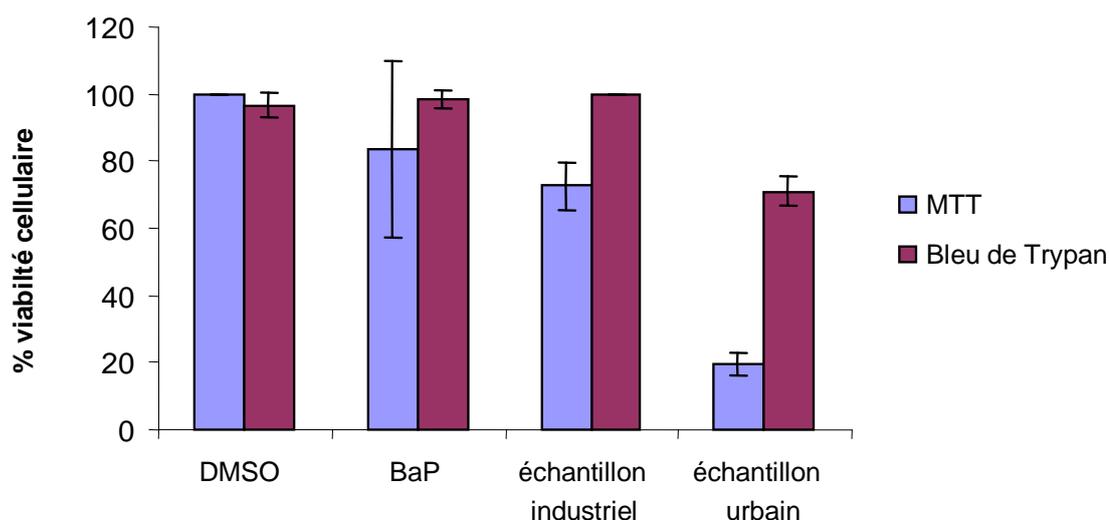


Figure 51 : Cytotoxicité mesurée par le test du MTT et le test au bleu de trypan dans les cellules HepG2 traitées pendant 14 h avec du BaP pur ou avec des extraits d'échantillons industriel et urbain à 0,16 μ M de B[a]P

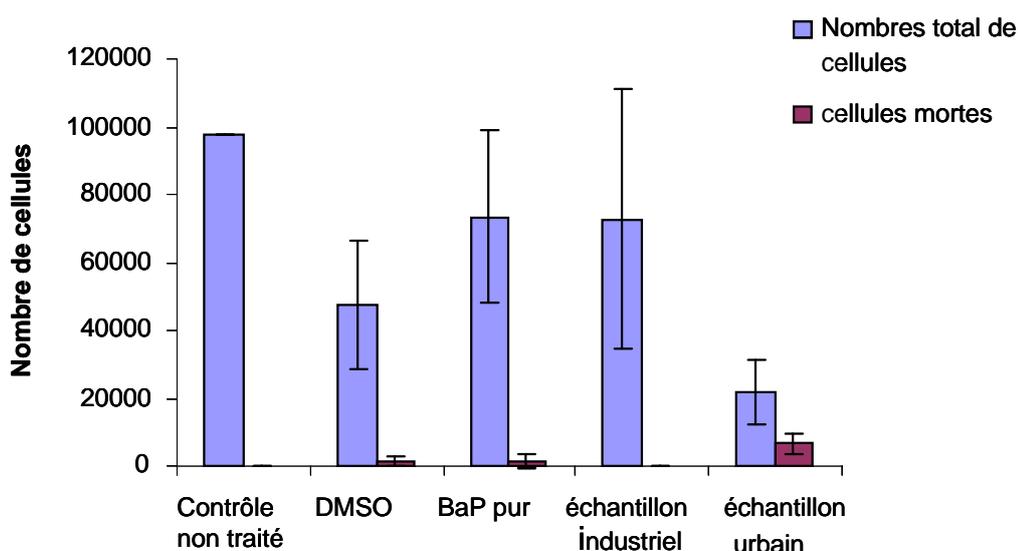


Figure 52 : Comptage au bleu de trypan du nombre de cellules totales et du nombre de cellules mortes suite à un traitement de 14 h avec du BaP pur ou les extraits d'échantillons industriel et urbain à 0,16 μ M de B[a]P

3. Etude des dommages à l'ADN induits dans les cellules HepG2 exposées aux mélanges environnementaux ou à la fraction d'HAP particulaires correspondante reconstituée

3.1 Mélanges atmosphériques environnementaux

Les nombres de cassures et d'adduits BPDE-N2-dGuo induits lors de l'exposition des cellules HepG2 avec les deux types d'échantillons sont ensuite investigués.

3.1.1 Cassures à l'ADN dans les cellules HepG2 traitées avec du B[a]P pur ou par les mélanges environnementaux

Aucune augmentation du nombre de cassures de l'ADN n'est détectée dans les cellules traitées avec une concentration de B[a]P de 40 ng/mL soit 0,16 μ M par rapport aux contrôles (Figure 53). En revanche, à concentration équivalente en B[a]P, le traitement cellulaire par les extraits atmosphériques prélevés en milieu industriel ou urbain entraîne une augmentation des cassures de l'ADN, respectivement de 200 et 370 % par rapport au BaP pur.

La cinétique de formation de ces cassures n'est pas différente pour les deux types d'échantillons. Alors qu'un plateau est atteint à partir de 2 h d'incubation dans l'échantillon industriel (Figure 54 b), les cassures continuent d'augmenter tout au long de l'incubation dans les cellules traitées avec le mélange urbain (Figure 54 a).

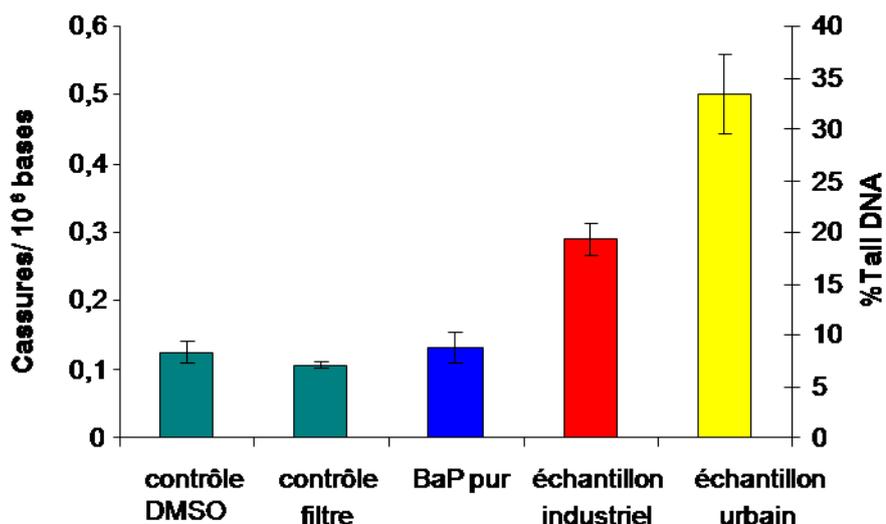


Figure 53 : Cassures à l'ADN induites par une exposition de 14 h des cellules HepG2 à du BaP seul à 0,16 μ M ou à des mélanges industriels et urbains à 0,16 μ M de BaP

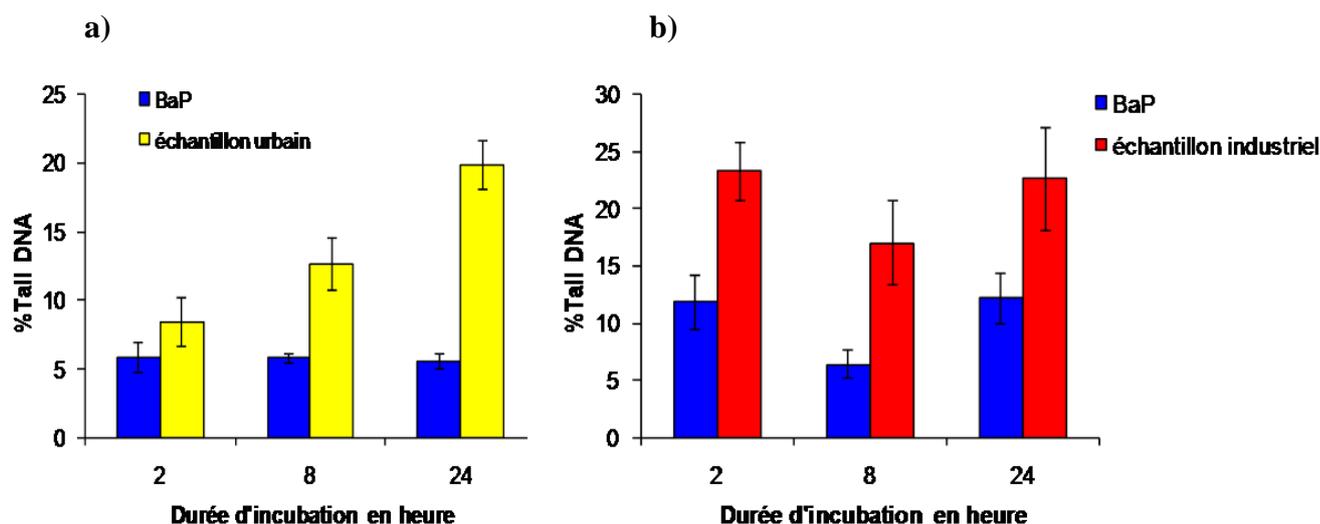


Figure 54 : Cinétique de formation des cassures de l'ADN induites par une exposition de 14 h des cellules HepG2 à du BaP seul à 0,16 μ M ou à des mélanges urbains a) et industriels b) à 0,16 μ M de BaP

Afin d'obtenir des informations supplémentaires sur le stress oxydant, la quantité de 8-oxodGuo est mesurée dans les cellules par HPLC/MS/MS (Figure 55).

Aucune augmentation de la quantité de 8-oxodGuo n'a pu être mise en évidence dans le contrôle filtre, ni dans les cellules traitées avec du B[a]P pur ou avec l'extrait industriel.

Par contre, une augmentation de 35 % de la quantité de 8-oxodGuo est observée dans les cellules exposées à l'extrait de l'échantillon urbain.

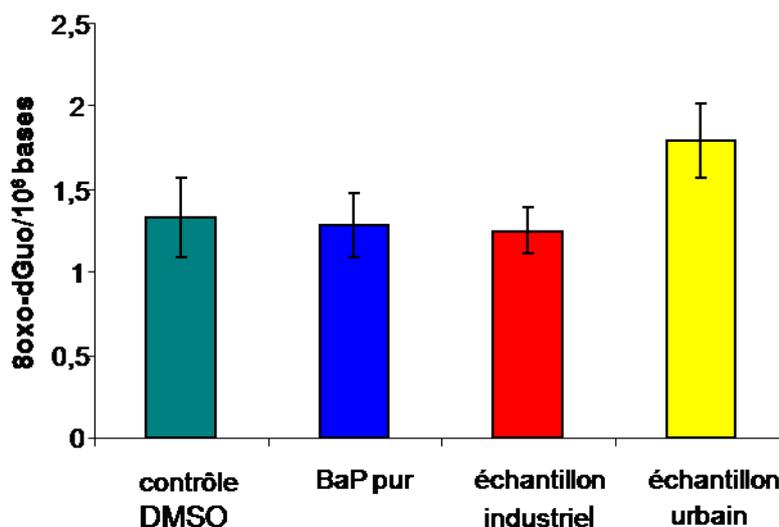


Figure 55 : Quantité de 8-oxodGuo formée dans les cellules HepG2 exposées 14 h à du BaP pur ou aux mélanges industriel et urbain à 0,16 μ M de B[a]P

3.1.2 Adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN dans les cellules HepG2 traitées avec du B[a]P pur ou par les mélanges environnementaux

La quantité d'adduits BPDE-N2-dGuo est également mesurée dans les cellules traitées avec le B[a]P pur ou avec les extraits des échantillons atmosphériques. Aucun adduit n'est mis en évidence dans le contrôle DMSO (Figure 56). Le traitement des cellules par 40 ng/ mL de B[a]P pur génère une quantité de 0,13 adduits BPDE pour 10⁶ nucléotides. Dans les cellules incubées avec le mélange industriel, à concentration équivalente en B[a]P, une augmentation de 30 % de la quantité d'adduits BPDE à l'ADN par rapport au B[a]P pur est observée. A l'inverse, le traitement par l'extrait de l'échantillon urbain conduit à une quantité d'adduits BPDE à l'ADN plus faible de 90 % par rapport au B[a]P pur.

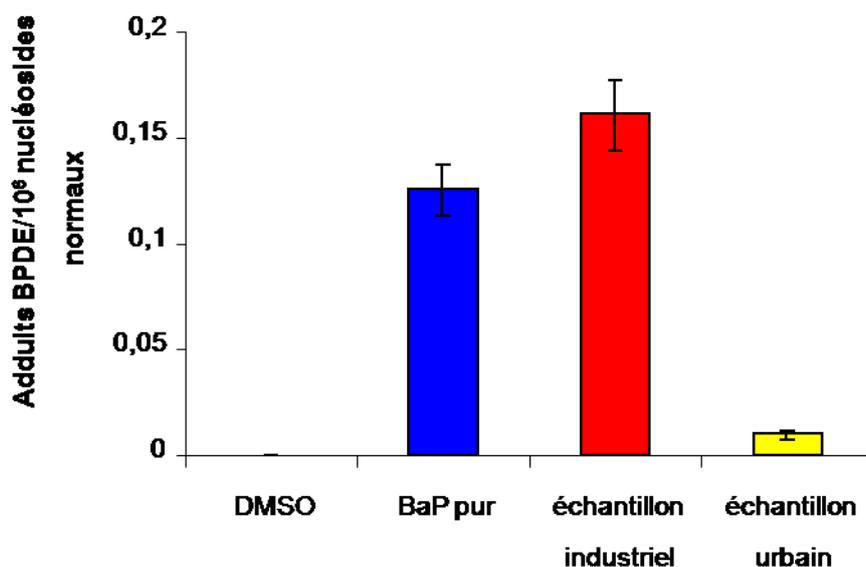


Figure 56 : Quantité d'adduits BPDE-N2-dGuo formée dans les cellules HepG2 exposées 14 h à du BaP pur ou aux mélanges industriel et urbain à 0,16 μ M de B[a]P

3.2 Mélanges d'HAP reconstitués

3.2.1 Mesure des cassures et des adduits BPDE-N2-dGuo dans les cellules HepG2 exposées à la fraction d'HAP particulaire reconstituée des mélanges atmosphériques

Afin de déterminer si ces effets sont dus aux HAP, la fraction d'HAP particulières a été reconstituée artificiellement dans les mêmes proportions que celles qui étaient mesurées dans les extraits atmosphériques. Les cellules ont été exposées à ces extraits des échantillons reconstitués pendant 14 h.

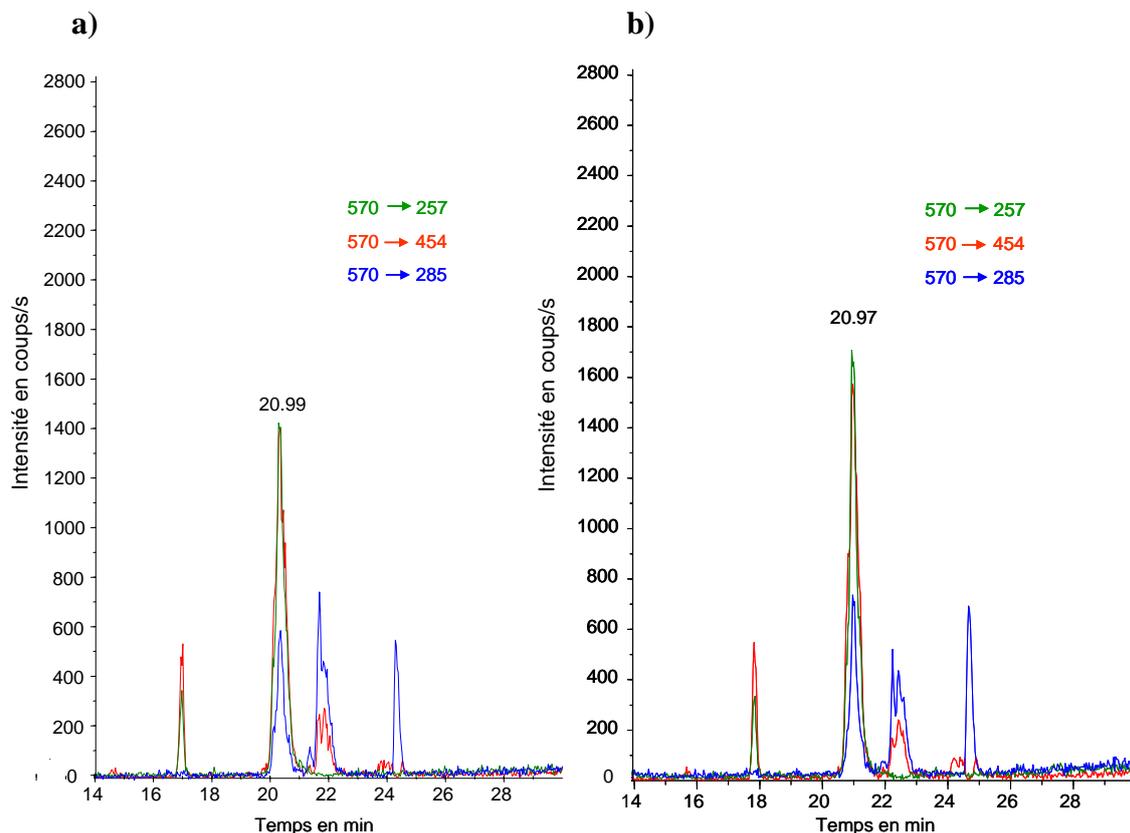
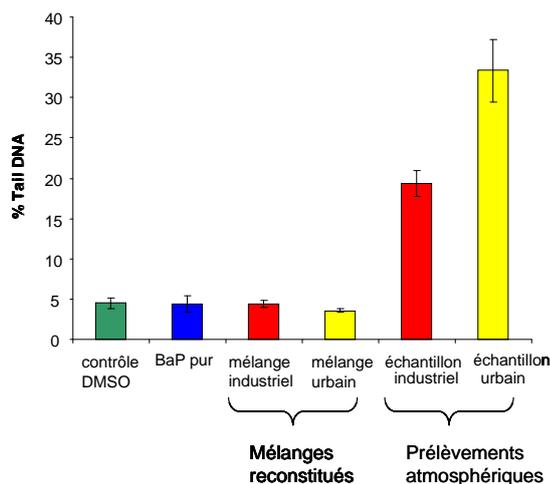


Figure 57 : Chromatogramme obtenu lors de la mesure des adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN dans les cellules traitées avec les mélanges reconstitués correspondant à l'échantillon urbain péri-industriel a) et à l'échantillon industriel b)

Aucune augmentation des cassures de l'ADN n'a pu être détectée que ce soit dans les cellules traitées avec le B[a]P pur ou dans les cellules traitées avec les mélanges d'HAP reconstitués alors que les échantillons atmosphériques correspondant entraînent une augmentation importante des cassures à l'ADN.

A l'opposé, les mélanges reconstitués entraînent une forte potentialisation au niveau de la formation des adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN (voir chromatogramme Figure 57), alors qu'une augmentation modérée est observée avec l'échantillon industriel réel et que l'échantillon urbain conduit à une inhibition de la formation des adduits.

a)



b)

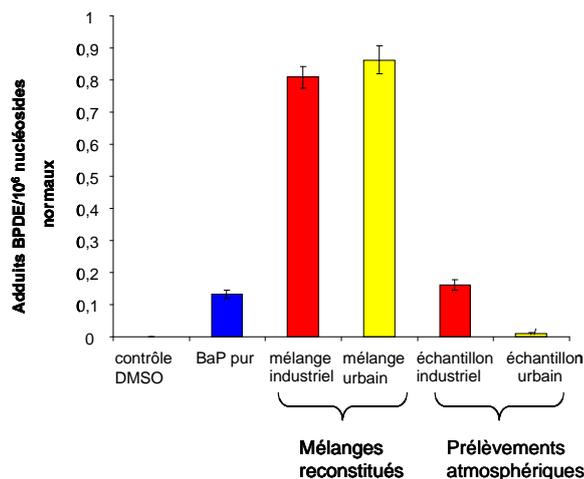


Figure 58 : Comparaison entre les quantités de cassures de l'ADN a) et les quantités d'adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN b) induites par les mélanges atmosphériques industriels et urbains et les fractions d'HAP particulières reconstituées correspondantes lors d'une exposition des cellules HepG2 pendant 14 h.

4. Conclusions

L'exposition des cellules HepG2 à la matière organique prélevée dans l'atmosphère d'une usine d'électrometallurgie ou en zone urbaine péri-industrielle, entraîne des conséquences très différentes au niveau de la formation des adduits et des cassures.

L'échantillon industriel génère environ deux fois plus d'adduits BPDE-N2dGuo que de cassures à l'ADN alors que B[a]P pur génère 13 fois plus d'adduits que de cassures. En revanche, l'échantillon urbain génère 37 fois plus de cassures à l'ADN que d'adduits BPDE N2dGuo.

Ces effets ne sont pas observés lorsque l'on traite les cellules avec la fraction d'HAP particulière reconstituée synthétiquement puisque les mélanges potentialisent la formation des adduits mais n'entraînent pas de cassures à l'ADN.

Les conclusions que l'on peut tirer de ces résultats sont d'une part :

-au niveau de la génotoxicité des HAP en mélange :

Pas de cassures par les mélanges d'HAP proprement dits mais on observe une potentialisation au niveau de la formation des adduits induits par le B[a]P dans les cellules traitées avec les mélanges reconstitués. A l'inverse, les mélanges atmosphériques réels augmentent les cassures à l'ADN mais diminuent ou inhibent la formation des adduits BPDE à l'ADN. Ces

effets ne sont donc pas dus aux HAP eux-mêmes mais à d'autres composés présents dans la matière organique.

-au niveau des tests de génotoxicité employés : la nécessité d'utiliser à la fois le test des comètes et la mesure par spectrométrie de masse des adduits BPDE à l'ADN. En effet l'utilisation du seul test des comètes tendrait à montrer que le B[a]P pur à 0,16 μ M n'est pas génotoxique alors qu'il génère des adduits à l'ADN. A l'inverse, l'usage de la seule mesure des adduits BPDE conduirait à conclure que le mélange urbain n'est pas génotoxique alors qu'il entraîne une formation très élevée de cassures à l'ADN.

L'utilisation des deux approches, complémentaires, est donc à privilégier.

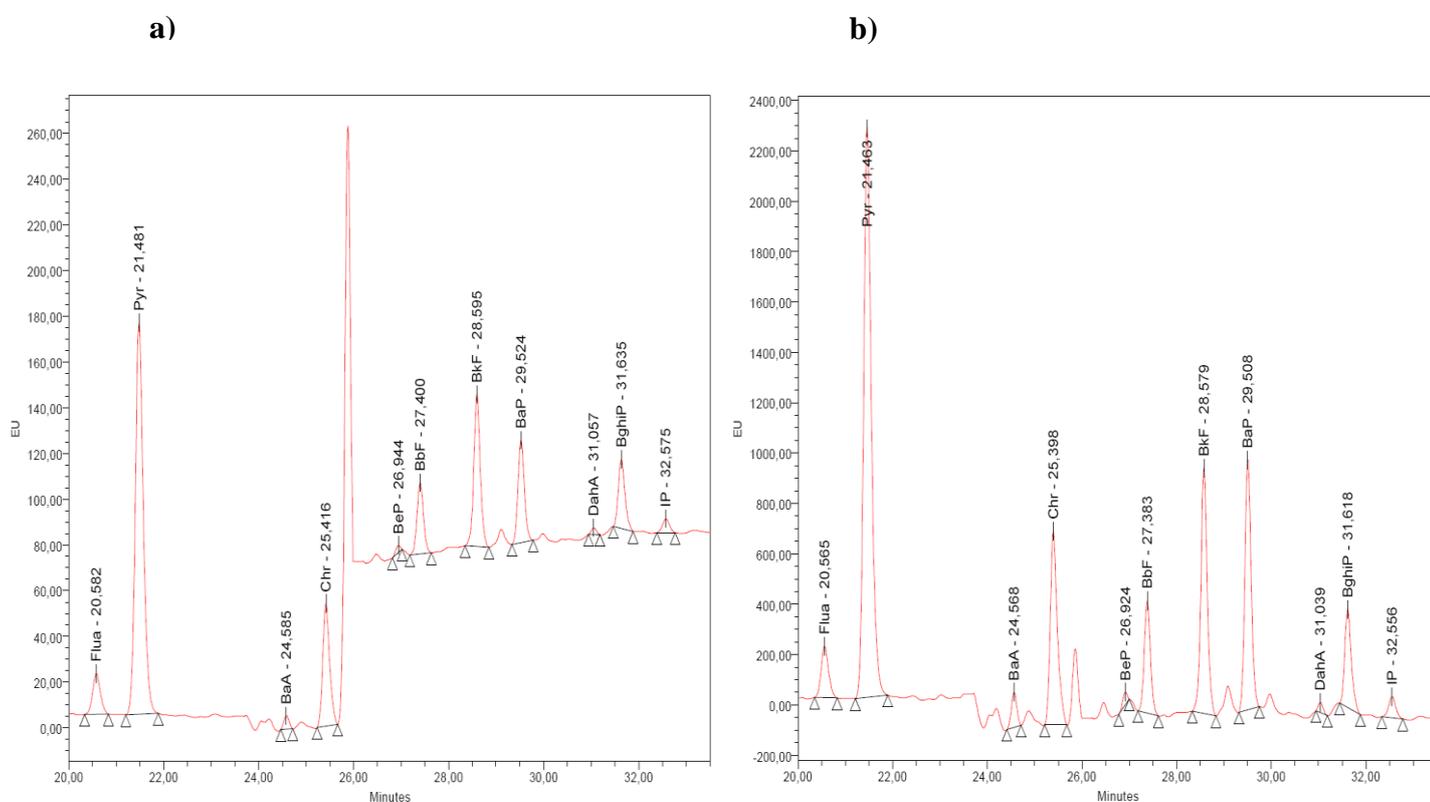


Figure 59 : Chromatogramme correspondant à la mesure des concentrations atmosphériques en HAP particuliers par HPLC-fluo dans les échantillons urbains prélevés sur le site des Frênes a) au printemps et b) en hiver

III. Génotoxicité de mélanges atmosphériques

1. A concentration constante en B[a]P

1.1 Cassures à l'ADN dans les cellules HePG2 traitées avec différents mélanges contenant 0,04 μM (10 ng/mL) de B[a]P en concentration finale

Les $\text{B[a]P}_{\text{Teq}}$ calculées dans le milieu de culture d'après les FET établis par l'INERIS sont équivalentes pour chaque extrait excepté pour l'échantillon péri-industriel (27/09) dont la $\text{B[a]P}_{\text{Teq}}$ est supérieur à tous les autres (20 contre 14).

Le traitement cellulaire par les différents mélanges n'a pas d'effet sur la viabilité.

Par rapport au B[a]P pur à concentration équivalente (0,04 μM soit 10 ng/mL), les deux mélanges industriels et le mélange urbain péri-industriel entraînent une augmentation de 15 des cassures de l'ADN (Figure 60). Une augmentation de plus de 40 % est mesurée avec le mélange prélevé à Chamonix et de 150 % avec le mélange prélevé en milieu urbain. L'augmentation la plus importante est obtenue avec l'échantillon urbain prélevé en été (1000 %).

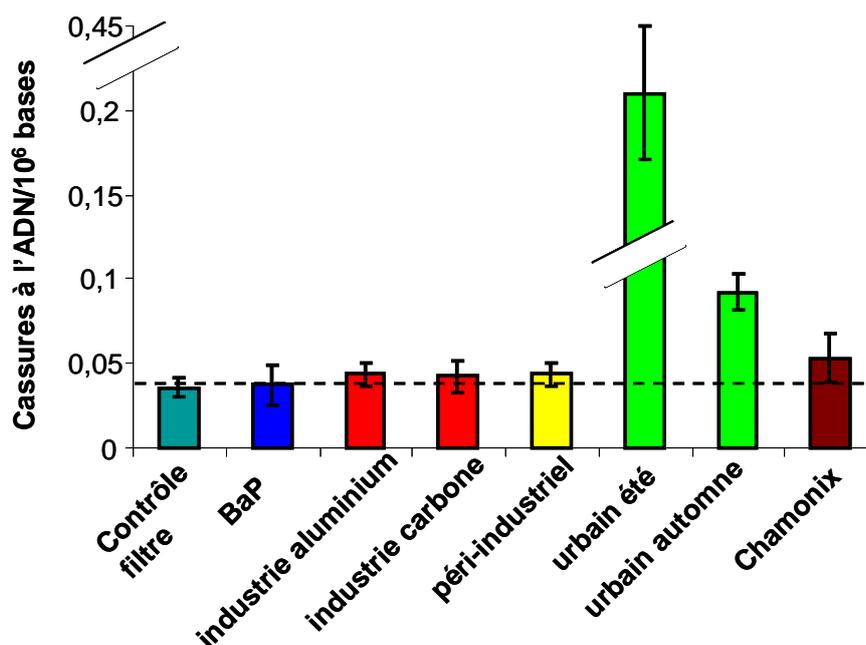


Figure 60 : Cassures à l'ADN induites lors de l'exposition des cellules HepG2 pendant 14 h avec du B[a]P pur ou différents extraits atmosphériques industriels et environnementaux à 0,04 μM de B[a]P

1.2 Adduits à l'ADN dans les cellules HePG2 traitées avec différents mélanges contenant 10 ng/mL de B[a]P en concentration finale

A l'inverse de ce qui était observé avec le test des comètes, le B[a]P pur qui n'était pas source de cassures à l'ADN génère des adduits BPDE-N2-dGuo à hauteur de 0,01 adduit pour 10^6 nucléotides (

Figure 61).

De la même façon, les échantillons industriels potentialisent les quantités d'adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN avec une augmentation de 500 % et 100 % respectivement avec les mélanges issus de l'industrie de l'aluminium et du carbone par rapport au B[a]P pur. En revanche, avec les mélanges environnementaux, une inhibition des quantités d'adduits BPDE-N2-dGuo est observée avec le mélange urbain péri-industriel et le mélange urbain été. A l'inverse, le mélange urbain d'automne entraine une augmentation de 118 % de la quantité d'adduits.

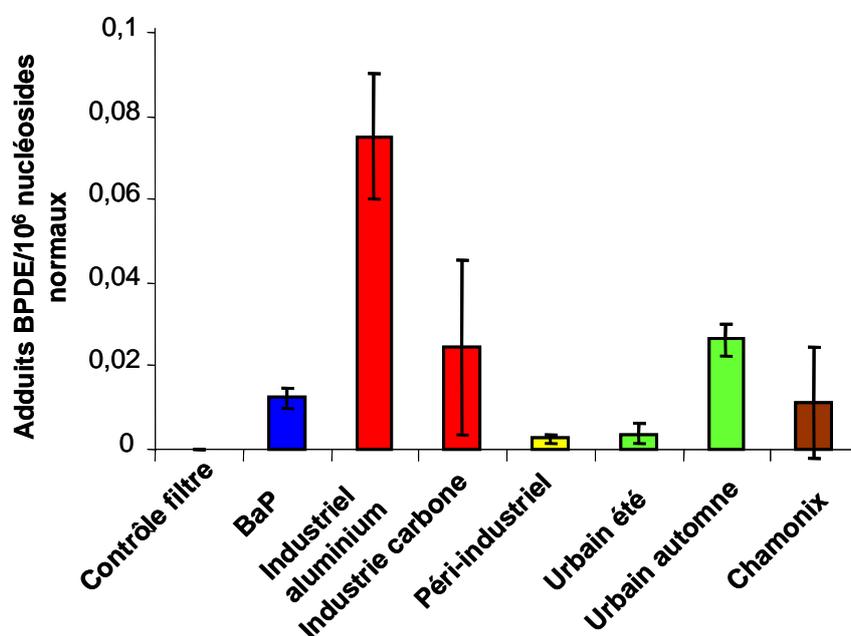


Figure 61 : Quantité d'adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN formés lors de l'exposition des cellules HepG2 pendant 14 h avec du B[a]P pur ou différents extraits atmosphériques industriels et environnementaux à 0,04 μ M de B[a]P

Pour résumer, une modulation de la génotoxicité du B[a]P est donc observée avec les mélanges. A concentration équivalente en B[a]P, les échantillons industriels n'entraînent pas cassures de l'ADN mais potentialisent la formation des adduits BPDE-N2-dGuo.

A l'inverse, les échantillons environnementaux diminuent la formation de ces adduits dans les cellules HepG2. Seul l'échantillon prélevé sur le site urbain en septembre-octobre augmente à la fois les cassures et les adduits à l'ADN.

2. Génotoxicité de mélanges atmosphériques à volume d'air constant

2.1 Cassures à l'ADN dans les cellules HepG2 exposées à un même volume d'air

Dans la suite des expériences, nous avons évaluée la génotoxicité des mélanges atmosphériques à volume d'air fixe.

Plus exactement, les cellules sont exposées à la matière organique contenue dans l'équivalent d'un volume d'air fixe : 20 m³ pour les prélèvements environnementaux et 20 L pour les prélèvements industriels.

A volume d'air équivalent, seul l'extrait atmosphérique prélevé à Chamonix entraîne une augmentation des cassures de l'ADN par rapport au contrôle (Figure 62).

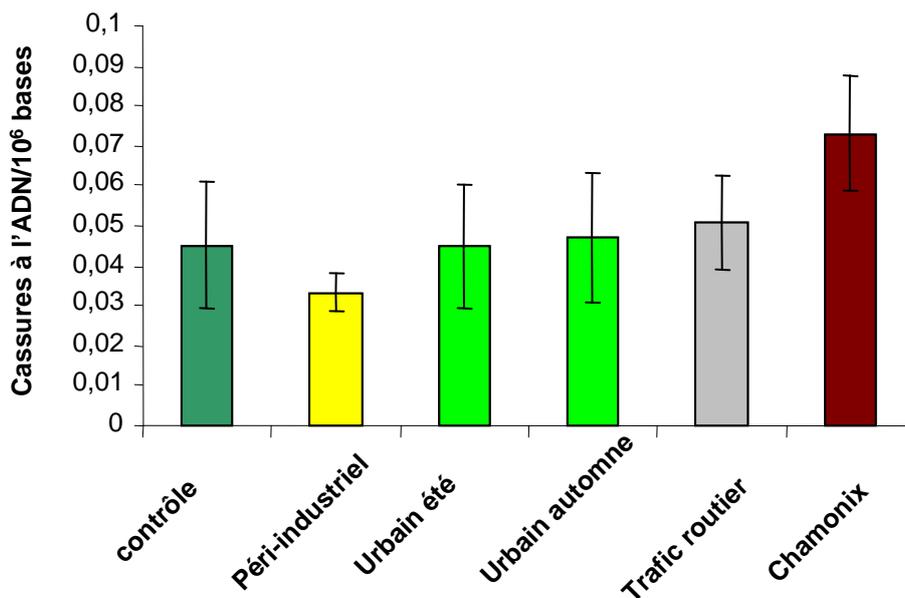


Figure 62 : Cassures à l'ADN induites lors de l'exposition des cellules HepG2 pendant 14 h avec la matière organique contenue dans l'équivalent de 20 m³ d'air prélevés sur différents sites environnementaux

L'équivalent de 20L d'air prélevé en milieu industriel n'entraîne pas de cassures à l'ADN (Figure 63).

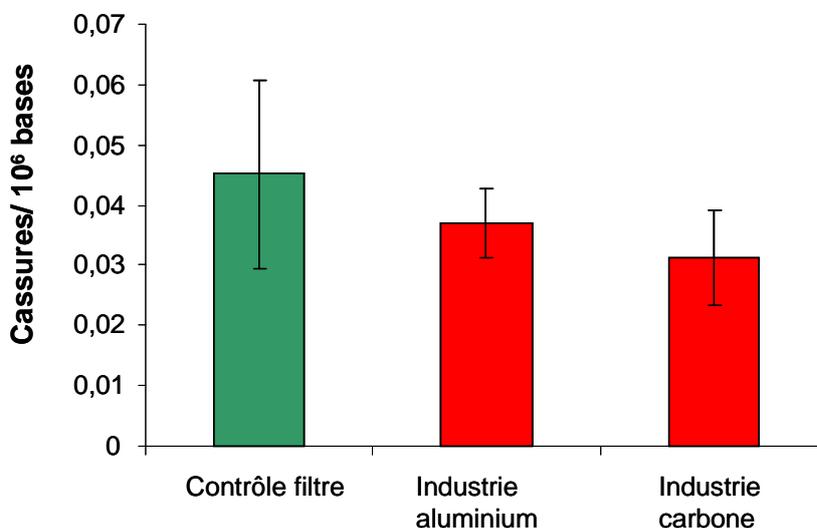


Figure 63 : Cassures à l'ADN induites lors de l'exposition des cellules HepG2 pendant 14 h avec la matière organique contenue dans l'équivalent de 20 L d'air prélevés sur deux sites industriels

2.2 Adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN dans les cellules HepG2 exposées à un même volume d'air prélevé sur différents sites

Concernant les adduits à l'ADN, seuls les échantillons industriels (Figure 64) et l'échantillon prélevé à Chamonix (Figure 65) génèrent des niveaux d'adduits détectables. Aucun adduits n'a pu être détecté avec les autres échantillons.

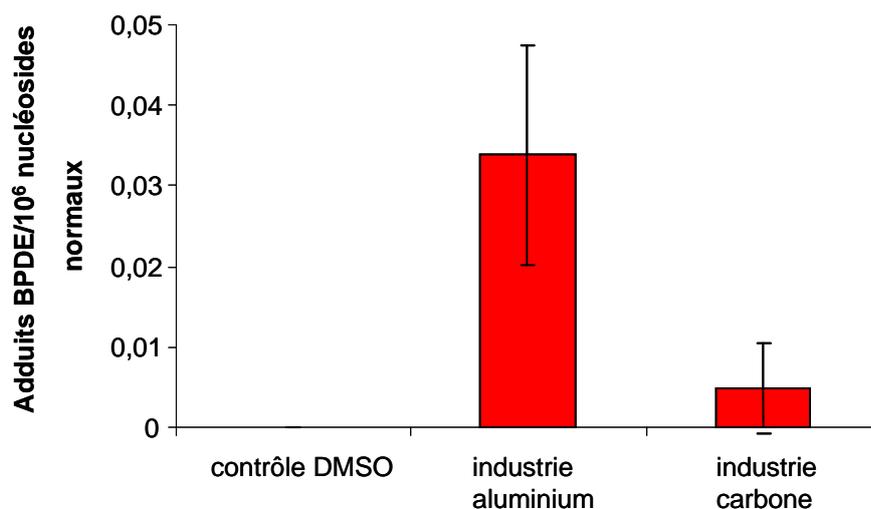


Figure 64 : Quantité d'adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN formée lors de l'exposition des cellules HepG2 pendant 14 h avec la matière organique contenue dans l'équivalent de 20 L d'air prélevés sur deux sites industriels

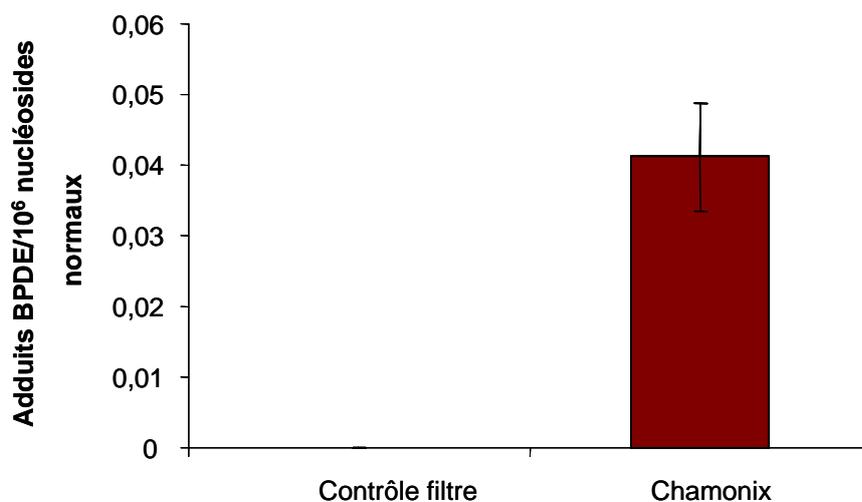


Figure 65 : Quantité d'adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN formée lors de l'exposition des cellules HepG2 pendant 14 h avec la matière organique contenue dans l'équivalent de 20 m³ d'air prélevé à Chamonix

CHAPITRE 5

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CHAPITRE 5- DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'évaluation des risques sanitaires pour les populations exposées à des contaminants environnementaux est un véritable enjeu de santé publique mais demeure une tâche particulièrement difficile pour deux raisons principales. D'une part, les mélanges environnementaux sont complexes, composés à la fois de contaminants organiques et inorganiques. D'autre part, la composition et les concentrations des composés chimiques sont soumises à des variations spatio-temporelles notamment en fonction de la nature et de la distance par rapport aux sources d'émission, des saisons et des conditions météorologiques.

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux HAP, famille de composés chimiques ubiquitaires de l'environnement issus des processus de combustion ou de la distillation de la houille, et dont certains composés sont connus ou suspectés d'être cancérigènes chez l'homme.

Ce travail a permis d'évaluer *in vitro* la modulation de la génotoxicité du B[a]P dans des mélanges complexes tels qu'on les retrouve dans l'atmosphère. Ceci implique de mettre en évidence et de comprendre la nature des interactions existant au sein des mélanges. Il existe en effet peu de données sur la génotoxicité des mélanges, ou alors des données contradictoires. La grande majorité des études reste focalisée sur l'effet d'un seul HAP, principalement le B[a]P.

Ceci s'explique d'une part par la difficulté d'étudier des mélanges par rapport à des composés purs mais également par la problématique du choix : quel mélange choisir ? Notre démarche s'est basée dans un premier temps sur des mélanges synthétiques puis a été étendue à des échantillons réels environnementaux et industriels.

L'accent a été mis sur le B[a]P, seul HAP à avoir été démontré cancérigène pour l'homme et pour lequel un précédent travail (Marie 2007) avait permis de synthétiser et purifier l'adduit BPDE-N2-dGuo, adduit stable et majoritaire du B[a]P. D'autres HAP sont soupçonnés d'être cancérigènes probables pour l'homme comme le B[a]A et le DB[a,h]A classés dans le groupe 2A par le CIRC. Enfin, certains HAP à l'image du B[g,h,i]P ne semblent pas être cancérigènes par eux-mêmes mais peuvent favoriser l'action d'autres cancérigènes (Cherng 2001).

1. Choix du modèle et des techniques d'analyse de la génotoxicité

Pour mener à bien cette étude, nous avons choisi d'utiliser les cellules HepG2. Cette lignée d'hépatocytes humains, bien qu'issue d'un organe qui ne soit pas une cible des cancers induits par les HAP, possède un certain nombre d'enzymes de phase I et de phase II nécessaires à l'activation métabolique de promutagènes, et notamment du B[a]P. Ces enzymes sont exprimées à des niveaux moins élevés que dans des cultures primaires, néanmoins, des études comparatives ont démontré la pertinence de ce modèle dans des études de génotoxicité par rapport à d'autres lignées, les cellules HEL (fibroblastes pulmonaires embryonnaires) et les cellules THP1 (lymphocytes T) (Sevastyanova 2007).

Dans la littérature, la génotoxicité de la matière organique associée aux particules atmosphériques a été investiguée en utilisant différents tests *in vitro*, le test d'Ames en particulier (Cerna 2000, De Kok TM 2005, Du Four 2005), le test des comètes (Gabelova 2004, Lazarova M 2004) ou la mesure des adduits par post-marquage au ^{32}P (Sevastyanova 2007, Topinka J 2000). Quelques études se sont attachées à comparer les résultats issus de ces différentes approches. Dans une étude comparative, (Valentin-Severin 2003), le test des micronoyaux se montre plus sensible que le test des comètes avec des cellules HepG2 traitées avec du B[a]P. Les concentrations de B[a]P nécessaires pour augmenter d'un facteur 2 le nombre de micronoyaux ou le paramètre mesurant les dommages à l'ADN dans le test comète (ici, Olive Tail Moment), sont respectivement de 0,26 μM et 3.67 μM . A l'inverse le test des comètes est plus sensible que le test des micronoyaux lors de l'irradiation aux rayons X de lymphocytes humains (He 2000). Dans une autre étude comparant le test des comètes et les tests de mutagenicité (test d'Ames ou test de mutagenicité avec *S. cerevisiae*) (Buschini 2001), une corrélation est obtenue entre les résultats comètes et le test d'Ames sur des lymphocytes traités avec des extraits environnementaux extraits à l'acétone mais pas avec les extraits au toluène. Cette corrélation n'est pas observée dans l'étude de Hartman et al. (Hartmann 2001) comparant la génotoxicité d'une trentaine de composés différents. Il n'existe donc pas de consensus sur la sensibilité des tests, les réponses semblant dépendre de la nature du composé testé.

Nous avons choisi d'utiliser deux tests mesurant des lésions primaires de l'ADN, le test des comètes et la détection des adduits BPDE à l'ADN par HPLC/MS/MS. Ces tests ont été choisis en raison de leur complémentarité, puisqu'ils permettent de mesurer les deux types de dommages générés par les HAP : les adduits BPDE à l'ADN et notamment l'adduit stable

majoritaire BPDE-N2-dGuo, ainsi que les cassures de brins résultant d'une part de l'effet du stress oxydant et d'autre part des adduits instables en milieu alcalin, en particulier BPDE-N7-Gua, se traduisant par des cassures. De plus, ces deux tests ont été choisis pour leur simplicité de mise en œuvre (test comètes) et leur grande spécificité (HPLC/MS/MS pour la détection des adduits BPDE). Enfin, des données supplémentaires sur l'oxydation des bases ont été apportées par la mesure par HPLC/MS/MS du niveau de 8-oxodGuo.

Les adduits BPDE à l'ADN sont des biomarqueurs intéressants pour le suivi de l'exposition génotoxique des individus aux HAP (Marie 2007). Les niveaux d'adduits mesurés dans les liquides biologiques (sang, urine) ou les tissus de sujets reflètent l'exposition des individus au B[a]P. Les quantités d'adduits mesurés dans les poumons de sujets fumeurs par post marquage au ^{32}P sont de l'ordre de $11 \pm 6,9$ adduits pour 10^8 nucléosides normaux contre $4,7 \pm 3$ chez des non fumeurs (Gyorffy 2004). Chez des ouvriers du secteur de l'aluminium, les quantités d'adduits mesurés dans les lymphocytes et monocytes sont en moyenne de $51,5 \pm 49,8$ et $31 \pm 34,5$ adduits pour 10^8 nucléosides normaux respectivement chez des fumeurs et des non fumeurs exposés à des concentrations atmosphériques de B[a]P de 0,35 à 1,51 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Chez des sujets exposés à de plus faibles concentrations (0,02 à 0,03 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), ces niveaux d'adduits sont de $6,9 \pm 6,1$ et $10,5 \pm 9,9$ adduits pour 10^8 nucléosides normaux respectivement chez les sujets fumeurs et non fumeurs (van Schooten 1992). Chez des salariés d'une cokerie exposés à des concentrations moyennes de B[a]P de 26,1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, les niveaux moyens sont de 20 adduits pour 10^8 nucléosides normaux (Mensing 2005).

De plus, chez l'homme, les adduits BPDE semblent être impliqués dans le développement du cancer du poumon. Le profil des mutations induites par le BPDE au niveau du gène p53 correspondrait aux points chauds de mutations retrouvés dans le gène p53 de poumons de sujets fumeurs (Denissenko 1996).

2. Le B[a]P, une molécule génotoxique

Nos résultats montrent que l'exposition des cellules HepG2 au B[a]P augmente les quantités de cassures et d'adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN.

Ces cassures de l'ADN augmentent de façon dose dépendante dans les cellules traitées 24 h avec des concentrations de B[a]P allant jusqu'à 20 μM , en accord avec d'autres données de la littérature (Uhl 2000, Valentin-Severin 2003). De la même façon, les adduits BPDE-N2-dGuo

augmentent avec la concentration en B[a]P, mais à partir de 10 μM , la courbe de dose-réponse tend vers un plateau. Ceci est également retrouvé par Marie et al. dans les mêmes cellules (Marie 2008). Dans les cellules MCF7 (Kuljukka-Rabb 2001) et HEL (Binkova 2000), une diminution des quantités d'adduits est observée aux concentrations les plus élevées (respectivement 6 μM et 4 μM) lors d'une incubation de 24 h. L'hypothèse la plus vraisemblable pour expliquer nos résultats serait une saturation de l'activation métabolique du B[a]P qui empêcherait la formation supplémentaire de BPDE dans les cellules (Swenberg 1995).

En ce qui concerne les vitesses de formation des dommages à l'ADN induits par le B[a]P, nos résultats mettent clairement en évidence que la formation des cassures à l'ADN est rapide et se fait dès les deux premières heures d'incubation. Les CYP450 sont connues pour générer des ERO au cours de leur cycle catalytique (Morel 1999), il est donc possible que cette augmentation des cassures de l'ADN dès les premières heures d'exposition au B[a]P soit liée au fonctionnement des CYP450. De plus, les cycles rédox réalisés par les dérivés quinones du B[a]P sont également sources de stress oxydant. A l'inverse, il se forme peu d'adduits BPDE-N2-dGuo au cours des deux premières heures d'incubation, mais par la suite, les quantités d'adduits dépassent largement le nombre de cassures. De plus, ces quantités d'adduits sont plus élevées lorsque les cellules sont prétraitées avec du B[a]P. La même observation est faite par Harrigan et al. (Harrigan 2004), avec des coupes cellulaires de foie et de poumon de rat prétraitées avec la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD). Les quantités d'ARNm des CYP 1A1 et CYP 1B1 sont également plus élevées dans les cellules prétraitées avec la TCDD que dans les cellules non prétraitées (Harrigan 2006), ce qui suggère que l'augmentation des adduits BPDE dans les cellules prétraitées avec la TCDD ou dans notre cas avec du B[a]P pourrait être due à l'induction des enzymes de bioactivation du B[a]P. Le fait que les quantités d'adduits BPDE-N2-dGuo soient identiques quelque soit la concentration du prétraitement avec le B[a]P reflète probablement une saturation de l'induction enzymatique via la voie AhR.

3. Le B[a]P forme des adduits plutôt que des lésions oxydatives

Peu d'études ont comparé les niveaux de formation de cassures et d'adduits à l'ADN. La contribution des adduits à l'ADN et du stress oxydatif au niveau des mécanismes de génotoxicité des HAP est notamment peu connue.

La comparaison des quantités de cassures et les quantités d'adduits BPDE-N2-dGuo formées dans nos expériences montre que l'exposition des cellules HepG2 à des concentrations de B[a]P allant de 0 à 20µM, génère en moyenne 100 fois plus d'adduits BPDE-N2-dGuo que de cassures à l'ADN. Ces résultats sont en accord avec ceux de Melendez-Colon (Melendez-Colon 2000) qui compare les quantités d'adduits stables mesurés au ³³P et les quantités de sites AP (sites apuriniques, apyrimidiques) mesurés par la technique ARP (aldehyde reactive probe). Cette technique repose sur le marquage et la révélation de groupements aldéhydes présents dans les sites AP par une sonde biotinylée. La comparaison de la quantité d'adduits stables et de la quantité de sites abasiques dans les cellules MCF7 exposées à 1 ou 2 µM de B[a]P pendant 24 h montre que les adduits stables représentent 70 % des lésions formées. Cependant lors d'une courte exposition (4h), ce sont les sites AP qui prédominent par rapport aux adduits stables. Cette observation va bien dans le sens de nos résultats qui montrent une prépondérance des cassures par rapport aux adduits BPDE-N2-dGuo au cours des premières heures d'incubation. Dans l'étude de Melendez, l'origine de la formation des sites abasiques n'est pas mise en évidence. Ils peuvent être dus à un stress oxydant ou encore résulter de la formation d'adduits instables BPDE-N7-dGuo. Dans notre travail, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'augmentation de la quantité de 8-oxodGuo dans les cellules traitées avec 8 µM de B[a]P. Dans une étude *in vivo*, Briede (Briede 2004) observe qu'une exposition au B[a]P favorise la formation d'ERO, en particulier dans le poumon de rat. Nos résultats montrent que le stress oxydant induit par le B[a]P est trop faible pour induire une quantité significative de 8-oxodGuo. En accord avec ces résultats, il a été montré récemment que 20 µM de B[a]P-7,8-dione conduit à la formation de 0,4 8-oxodGuo par million de bases dans des cellules humaines. Dans nos expériences, à la même concentration de B[a]P, nous détectons 100 fois plus d'adduits BPDE-N2-dGuo. Ainsi, même si tout le B[a]P était converti en quinones, les lésions oxydatives de l'ADN seraient produites en faible quantité. Ces résultats *in vitro* sont confirmés par Singh (Singh 2007) qui montre une corrélation négative entre les niveaux de 8-oxodGuo et les niveaux d'adduits HAP totaux et adduits B[a]P à l'ADN dans une étude menée sur des populations exposées à la pollution environnementale. De même, aucune augmentation du taux de 8-oxodGuo urinaire n'a été mesurée par HPLC/MS/MS chez les salariés d'une entreprise de métallurgie exposés à de fortes concentrations atmosphériques en HAP (Marie 2009).

De ces expériences, nous pouvons tirer trois conclusions :

(1) L'exposition cellulaire au B[a]P génère majoritairement plus d'adduits BPDE à l'ADN que de dommages oxydatifs, ce qui à notre connaissance n'avait jamais été évalué auparavant. Ceci suggère que le cycle rédox opéré par les dérivés B[a]P quinones (Burdick 2003, Shen 2006) ne semble jouer qu'un rôle mineur et que la voie de métabolisation prédominante pour la métabolisation du B[a]P est la voie des CYP450.

(2) Les dommages oxydatifs reflétés par le test des comètes sont les dommages qui se forment de façon prépondérante immédiatement après addition de B[a]P, dans les deux premières heures d'incubation. Ceci pourrait s'expliquer par la production d'ERO liée à l'activité catalytique des CYP450.

(3) Les adduits formés par le B[a]P sont en grande majorité des adduits stables, les adduits instables (adduits BPDE en position N7 des purines ainsi que celui du radical cation) représentant moins de 1 % des adduits formés.

Ces résultats ont des implications dans la cancérogénèse puisqu'il a été démontré que la phase d'initiation des cancers de la peau induits chez la souris par les HAP était causée plutôt par les adduits stables que par les adduits instables (Melendez-Colon 2000).

4. Les HAP modulent la formation des adduits BPDE

Après avoir étudié et caractérisé la nature des dommages générés par le B[a]P seul, nous nous sommes intéressés à la génotoxicité du B[a]P en mélanges. Dans un premier temps, des mélanges synthétiques d'HAP commerciaux ont été utilisés. L'effet du B[a]P en mélange binaire avec 9 autres HAP particuliers a été évalué dans les cellules HepG2. Ces autres HAP sont ceux mesurés classiquement dans l'atmosphère. L'objectif était d'évaluer si les composés présents au sein des mélanges avaient des effets génotoxiques additifs ou s'ils interagissaient entre eux pour entraîner des effets synergiques ou bien encore inhibiteurs sur le B[a]P.

Nos résultats montrent que selon les mélanges considérés, il existe une modulation au niveau de la quantité de dommages à l'ADN mais il existe également des différences en terme de type de dommages : la modulation est plus marquée au niveau de la formation des adduits BPDE qu'au niveau des cassures de l'ADN et ne concerne que les mélanges B[a]P+HAP classés parmi les cancérogènes probables ou possibles par le CIRC. Le type cellulaire utilisé semble également entrer en compte. En effet, une étude comparative entre trois lignées

cellulaires, les cellules HepG2, THP1 et HEL montre une meilleure sensibilité des cellules HepG2 au niveau de la formation des adduits lors d'un traitement par différents mélanges binaires contenant du B[a]P (Sevastyanova 2007). Cette sensibilité pourrait s'expliquer par une meilleure capacité de métabolisation de ces cellules.

Dans nos expériences, la formation des adduits BPDE-N2-dGuo est fortement potentialisée en co-traitement avec le B[b]F, DB[a,h]A et IP. Une telle potentialisation avait déjà été rapportée dans la littérature par ces composés mais également lors du co-traitement des cellules HepG2 par du Flua et 1-méthylphénanthrène (1-MPA) alors que ces composés ne forment pas eux-mêmes d'adduits (Staal 2007). A l'inverse, nous observons une forte inhibition de la formation des adduits dans les cellules traitées avec le mélange B[a]P+B[k]F. De tels effets ont aussi déjà été rapportés dans les cellules HepG2 en utilisant la technique de post-marquage au ³²P (Sevastyanova 2007, Staal 2007).

Lorsque l'on considère des mélanges plus complexes en reconstituant la fraction particulaire d'HAP dans des proportions identiques à ce qui était retrouvé dans les prélèvements atmosphériques, aucune augmentation de la quantité de cassures n'est mise en évidence avec les mélanges reconstitués. Il convient de noter qu'aucun des HAP purs ou des mélanges testés ne conclut à une augmentation élevée des niveaux de cassures mesurés par le test des comètes. La faible implication du stress oxydant dans la génotoxicité semble être une caractéristique de nombreux HAP.

En revanche, la formation des adduits BPDE-N2-dGuo est très fortement potentialisée dans les cellules traitées avec les mélanges reconstitués.

Pour résumer, il existe donc une forte modulation de la génotoxicité du B[a]P lorsque que celui-ci est en mélange avec d'autres HAP. Cette modulation est particulièrement visible au niveau de la formation des adduits BPDE, biomarqueur plus spécifique du B[a]P que le test des comètes. A l'inverse, les HAP en mélanges binaires ou en mélanges complexes n'entraînent pas d'augmentations des cassures de l'ADN.

Les niveaux d'adduits mesurés lors des co-traitements B[a]P+HAP sont comparables à ceux qui sont retrouvés dans les cellules prétraitées 2 h avec les HAP avant traitement par le B[a]P. Ceci suggère donc que les effets potentialisateurs ou inhibiteurs du B[a]P par les autres HAP se font par des mécanismes indirects.

Dès lors, comment expliquer ces phénomènes de potentialisation ou d'inhibition ?

5. Hypothèses mécanistes

➤ **Hypothèse 1 : action agoniste des HAP vis-à-vis du récepteur AhR**

Les HAP, nous l'avons vu, nécessitent une activation métabolique pour exercer leur action toxique, en particulier vis-à-vis de l'ADN. Les enzymes de métabolisation sont induites par les HAP eux-mêmes via le récepteur AhR. C'est de l'induction de ces enzymes que dépendent les quantités de métabolites électrophiles réactifs générés.

La capacité des HAP à induire les CYP dépend de leur capacité à lier le récepteur AhR. Cette capacité est définie par des caractéristiques structurales : elles concernent des molécules planes, possédant une région baie (Skupinska 2006, Skupinska 2007) et des ratios taille/profondeur semblent également intervenir (Pushparajah 2008).

Les capacités d'induction des CYP1A1 par les HAP a fait l'objet de plusieurs études, *in vivo* chez le rat (Till 1999), *in vitro* sur des hépatocytes H4IIE de rat (Bosveld 2002, Machala 2001) ou encore sur cellules humaines MCF7 et HepG2 (Skupinska 2006). Ces essais reposent pour la plupart sur le test de mesure de l'activité de 7-ethoxyresofurin*O*-deethylation ou test EROD par les CYP1. Le 7-ethoxyresofurin est un substrat des CYP1 qui est dégradé en résosofurin, fluorescent, avec un ordre d'activité spécifique : CYP1A1 > CYP1B1 > CYP1A2. L'augmentation de fluorescence émise lors de l'apparition du produit résosofurin, et mesurée par fluorométrie, reflète la quantité de CYP1 présente (Prough 1978).

➤ **Hypothèse 2 : action indirecte par compétition sur d'autres protéines : exemple du B[g,h,i]P.**

Merchant et al. (Merchant 1992) ont montré que dans des cellules Hepa1c1c7, le B[a]P et le B[g,h,i]P étaient en compétition pour la liaison à une autre protéine, la protéine 4S (PAH-binding protein), sans pour autant modifier l'affinité du B[a]P pour le récepteur AhR.

Cette protéine 4S connue comme étant une protéine liant les cancérigènes a été identifiée dans la voie d'activation des CYP1A1 (Sterling 1994). Le B[g,h,i]P qui a une forte affinité pour cette protéine 4S pourrait donc diminuer la quantité de B[a]P liée à cette protéine, avec pour conséquence la présence de fortes quantités de B[a]P libres qui pourraient alors se lier au récepteur AhR et induire la transcription des gènes du CYP1A1.

De la même façon, le B[g,h,i]P peut être métabolisé par les CYP1A1 et entre en compétition avec le B[a]P pour la métabolisation. Le B[a]P libre, non métabolisé, est ainsi disponible pour se fixer sur le AhR.

➤ Hypothèse 3 : Inhibition des CYP450

Des études récentes ont mis en évidence que certains HAP étaient des inhibiteurs potentiels de l'activité EROD catalysée par les CYP450 1A2 et 1B1 et dans de nombreux cas également de CYP450 1A1 (Shimada 2006). Selon les HAP, cette inhibition est soit directe, causée par la molécule parent, soit indirecte, causée par les métabolites générés (Shimada 2007).

On peut penser que certains HAP, ayant une plus grande affinité pour les CYP450 que le B[a]P, vont être métabolisés préférentiellement par rapport à celui-ci, d'où une formation d'adduits BPDE moins élevée.

Le DB[a,h]A est l'un des meilleurs inducteurs des CYP1A1 dans les cellules HepG2 (Skupinska 2007) et inhibe faiblement l'activité EROD catalysée par les CYP1A1 *in vitro*, avec un $IC_{50} > 1000nM$ (Shimada 2006). Dès lors, cet HAP favorisant l'induction des CYP450 et ayant une affinité moins élevée que le B[a]P pour les CYP450 peut favoriser l'activation métabolique du B[a]P et donc la formation des adduits BPDE à l'ADN.

On peut supposer que cette hypothèse est également valable pour le B[b]F qui est un bon inducteur des CYP450 1A1 même s'il inhibe l'activité EROD de ces enzymes avec un IC_{50} de 250nM.

L'IP induit fortement l'activité EROD dans un système *in vitro* utilisant les cellules H4IIE (Bosveld 2002) mais aucune donnée n'existe quant à son action inhibitrice.

Le B[a]A entraîne une forte activation de l'activité EROD dans certaines études (Bosveld 2002), mais dans une autre étude, l'effet du B[a]A sur l'induction des CYP1A1 semble faible (Topinka 2008). De plus, son action inhibitrice de l'activité catalytique des CYP450 1A1 est très forte ($IC_{50} < 10nM$). Ces résultats concordent avec l'absence de potentialisation de la formation des adduits BPDE-N2-dGuo observés dans nos expériences lors de l'exposition des cellules au B[a]P et B[a]A en co-traitement.

De même pour le Flua qui est un faible inducteur des CYP450 mais inhibe l'activité EROD avec un $IC_{50} > 1000$.

Cependant, le Chr qui fait partie des HAP capables d'induire fortement les CYP450 1A1 et qui inhibe faiblement ces mêmes CYP ($IC_{50} > 1000$), ne potentialise pas la formation des adduits BPDE-N2dGuo dans nos expériences de co-traitement.

De la même façon, le B[k]F qui inhibe fortement la formation des adduits BPDE-N2-dGuo dès 0,25 μ M dans nos expériences est pourtant l'un des meilleurs inducteurs des CYP1A1 et ne présente pas d'activité inhibitrice forte pour celles-ci. De plus, une étude récente (Spink 2008) a mis en évidence que des co-traitements de B[a]P et B[k]F à des concentrations de 0,02 à 0,6 μ M avaient un effet synergique sur la voie métabolique catalysée par les CYP1A1 et un effet additif sur la voie catalysée par les CYP1B1.

On peut émettre l'hypothèse que le B[k]F ou ses métabolites ont une meilleure affinité pour les CYP450 que le B[a]P, diminuant ou empêchant l'activité métabolique de celui-ci et par conséquent la conversion en BPDE.

Le B[k]F possède en effet, comme le B[a]P une région baie et peut former des diol époxydes capables de former des adduits à l'ADN après activation métabolique par les CYP450. La quantification par HPLC/MS/MS des adduits à l'ADN formés à la fois par le B[a]P mais aussi le B[k]F permettrait de connaître l'HAP préférentiellement métabolisé par les CYP450.

Enfin, il convient de noter que nous n'avons pas pu mettre en évidence de potentialisation de la quantité d'adduits BPDE à l'ADN par le B[g,h,i]P, contrairement à une autre étude réalisée sur les cellules HepG2 (Cherng 2001) à des concentrations de B[a]P et B[g,h,i]P identiques aux nôtres (1 μ M). Le temps d'incubation de 24 h (contre 14 h dans notre étude) et l'utilisation du post-marquage au 32 P utilisée, moins spécifique mais plus sensible que notre détection par HPLC/MS/MS expliquent peut-être cette différence.

Pour résumer, la capacité des HAP à générer des métabolites réactifs semble majoritairement dépendre de leur capacité à induire les CYP450 ou à les inhiber par des phénomènes de compétition au niveau de la métabolisation par les CYP450. Au niveau individuel, certains HAP et/ou leurs métabolites induisent fortement les CYP450 via leur action agoniste vis-à-vis du AhR (B[k]F, B[a]P...). Parmi ces HAP, certains semblent également inhiber l'activité catalytique de ces CYP (B[a]A, B[b]F...). L'affinité des HAP vis-à-vis des CYP450, et donc la compétition entre HAP pour leur métabolisation paraît également jouer un rôle. A travers ces mécanismes, ils vont affecter leur propre métabolisation mais également celle des autres

HAP avec pour conséquence une modulation de la génotoxicité et la cancérogénicité des HAP présents au sein des mélanges.

Nous avons pu mettre en évidence qu'en co-traitement avec du B[a]P, les HAP modulaient la formation des adduits BPDE à l'ADN. Qu'en est-il des mélanges plus complexes ?

6. Dommages de l'ADN et mélanges réels

6.1 La composition en HAP comme signature de source

Différents types d'extraits d'échantillons atmosphériques ont été utilisés dans cette étude à partir de prélèvements réalisés sur différents sites en environnement général ainsi qu'en milieu industriel en respectant des normes standardisées qui sont différentes en environnement et en industrie. Les appareils et les débits de prélèvements utilisés en environnement général et en industrie sont très différents ce qui pourrait avoir une incidence sur la composition de la matière particulaire collectée. Aucune étude comparative n'a été réalisée entre ces deux types de prélèvements, mais les filtres utilisés (filtres en quartz) dans les deux cas étant identiques on peut penser que la matière particulaire collectée est semblable. Les appareils haut-débits employés en environnement ne comportent pas de dénuder à ozone, appareil permettant de piéger l'ozone et l'empêchant de réagir et de dégrader les HAP adsorbés sur les filtres. En l'absence de ce dénuder, une sous-estimation d'un facteur 2 a été rapportée au niveau de la concentration en HAP (Goriaux 2006). Il est donc possible que les concentrations atmosphériques mesurées dans nos échantillons soient sous estimées mais pour l'instant, l'utilisation de dénuder au niveau des réseaux de surveillance du LCSQA n'est pas validée (LCSQA 2008). Ces denuders ne sont pas utilisés en milieu industriels car inutiles du fait de l'absence de réaction avec l'ozone en milieu intérieur. Les mélanges prélevés en milieu industriel diffèrent par rapport aux mélanges environnementaux par des concentrations en HAP beaucoup plus élevées (jusqu'à 5000 fois), mais aussi par leur composition, avec une proportion d'HAP plus importante que les autres composés. Par rapport aux mélanges prélevés en industrie, les mélanges environnementaux ont une composition chimique qui change en fonction des saisons mais également en fonction du degré d'urbanisation, du trafic automobile, du mode de chauffage, de la proximité d'une

industrie. Dans ces prélèvements, il existe une part importante de composés autres que les HAP (produits photooxydés, métaux etc...).

Les échantillons industriels sont issus de trois entreprises différentes du secteur de électrométallurgie, l'une spécialisée dans la fabrication de silicium, l'autre dans l'aluminium et enfin la troisième, dans la fabrication d'électrodes en carbone. Ces activités sont connues pour générer de fortes concentrations en HAP.

Concernant l'industrie du silicium, les HAP sont émis majoritairement lors du chargement des électrodes composites avec des boulets de brai de houille. Cette activité réalisée le plus souvent par un opérateur est à l'origine d'un dégagement important d'HAP particuliers qui entrent dans la composition des boulets.

La production d'aluminium est réalisée par réduction de l'alumine dans des cuves électrolytiques. Les anodes utilisées dans le procédé sont constituées de coke et de brai de houille. La cuisson de la pâte carbonée de ces anodes peut se faire in situ, à l'origine d'un dégagement d'HAP produit par évaporation de la matière volatile comme dans la fabrication des électrodes en graphites.

Des différences au niveau de l'abondance relative en HAP sont relevées entre les échantillons industriels et environnementaux d'une part, mais également entre les différents échantillons environnementaux. La diversité des sources d'émission sur les différents sites de prélèvement explique les différences de composition chimique des mélanges. En effet, il existe des HAP caractéristiques de certaines sources d'émission. Leur présence ou leur abondance constitue une signature de source (Khalili 1995, Masclet 1984). Le calcul de ratios d'HAP est utilisé pour identifier la contribution de certaines sources d'émission dans une atmosphère donnée. Les plus couramment utilisés sont $IP/(IP+B[g,h,i]P)$, $B[a]A/(B[a]A+Chr)$, ou encore $B[e]P/(B[e]P+B[a]P)$ dont les valeurs semblent caractéristiques d'une source d'émission (Bucheli 2004, Del Rosario Sienna 2005, Khalili 1995, Simcik 1999, Yunker 2002). Comme nous l'avons vu en introduction, le chauffage domestique et le trafic automobile sont les principales sources d'émission d'HAP en zone urbaine et dans leurs alentours. Concernant le chauffage, une prépondérance du B[a]A et du Chr est mesurée par Masclet (Masclet 1984). Le chauffage au bois émettrait en grande proportion du Chr ainsi que du B[b]F et du B[k]F. Les HAP majoritairement émis par les sources automobiles diffèrent entre les véhicules essence et les véhicules diesel. Les émissions de véhicules essence sont caractérisées par des HAP de plus haut poids moléculaire que les véhicules diesel comme le B[g,h,i]P par exemple (Rogge 1993), ou l'IP dans une moindre mesure (Masclet 1984). Quant aux émissions diesel, elles

contiendraient en majorité du B[b]F, B[k]F et Chr mais en plus forte proportion que les quantités émises lors de la combustion du bois.

Dans nos échantillons, le B[a]P est présent de façon constante avec une abondance relative supérieure à 10 % en moyenne quelque soit la saison. Les concentrations totales en HAP sont plus élevées pour les prélèvements urbains d'automne et d'hiver par rapport aux prélèvements d'été. En particulier, les concentrations totales en HAP particulières sont augmentées d'un facteur 4 entre les prélèvements urbains d'automne et ceux prélevés en d'été, et la concentration en B[a]P varie d'un facteur 6.

Les concentrations atmosphériques en HAP que nous avons mesurées sur les sites urbains en été et en hiver correspondent aux concentrations habituellement relevées sur ces sites (Leoz-Garziandia). Les profils en HAP correspondent à ceux retrouvés dans la littérature (Smith 1996) avec une prédominance du B[g,h,i]P, de l'IP et du B[b]F qui représentent 50 % des HAP particuliers totaux, en accord avec Smith (Smith 1996). Les émissions d'HAP semblent donc être influencées par le trafic routier sur le site urbain. Le ratio $IP/(IP+B[g,h,i]P)$ est de 0,50 et 0,49 respectivement pour les échantillons d'été et d'automne ce qui correspond aux valeurs retrouvées dans des émissions diesel avec un ratio compris entre 0,37 et 0,7 (Del Rosario Sienna 2005).

Les concentrations atmosphériques totales en HAP mesurées dans notre échantillon prélevé sur le site trafic en été sont faibles ($2,3 \text{ ng/m}^3$), en raison de la diminution du trafic routier et l'absence de chauffage durant la période estivale. Le Pyr et le Flua représentent environ 40 % des HAP totaux de cet échantillon, le B[g,h,i]P et l'IP 20 %. La prédominance de ces quatre HAP est également constatée dans des échantillons atmosphériques prélevés dans des tunnels routiers (Smith 1996). Le ratio $IP/(IP+B[g,h,i]P)$ évalué à 0,38 semble indiquer une prédominance de source automobile diesel.

En ce qui concerne le site Chamonix, les concentrations atmosphériques en HAP particulières mesurées dans notre échantillon sont plus élevées que les concentrations moyennes mesurées pendant l'hiver 2001 (Marchand 2004), période correspondant à la fermeture du tunnel du Mont-Blanc. Les profils en HAP sont comparables, excepté pour le B[a]P en proportion trois fois plus importante et le Pyr en proportion deux fois moins importante dans notre échantillon que celui de Marchand. La concentration totale en HAP particulières s'élève à $98,6 \text{ ng/m}^3$ dans notre prélèvement contre $47,6 \text{ ng/m}^3$ en moyenne pendant l'hiver 2001. Cependant, des concentrations totales en HAP allant jusqu'à 115 ng/m^3 peuvent être atteintes sur ce site (Marchand 2004). Les niveaux atmosphériques élevés en B[a]A laissent supposer que les émissions d'HAP sont issues du chauffage résidentiel. Les concentrations de Chr, B[b]F et

B[k]F ne sont cependant pas prédominants ce qui ne va pas dans le sens d'un mode de chauffage au bois.

De façon intéressante, les profils d'abondance relative en HAP du mélange prélevé à Vénissieux à l'intérieur et à l'extérieur de l'usine sont très similaires avec notamment des niveaux très élevés en B[b]F et Chr, témoignant de l'influence des émissions industrielles dans la zone urbaine alentour. Les concentrations atmosphériques sont très élevées dans l'échantillon péri-industriel du 30/11 en raison d'un épisode de pic de pollution aux particules.

6.2 Génotoxicité des mélanges réels

Nous avons cherché à caractériser la nature des dommages induits par l'exposition cellulaire à différents mélanges atmosphériques et évaluer l'influence de la composition des mélanges sur ces dommages. Dans une première série d'expérience, la modulation de la génotoxicité du B[a]P par les composés HAP et autres contaminants présents dans les différents mélanges est évaluée. Les cellules sont traitées avec les différents extraits d'échantillons environnementaux dilués de façon à obtenir une concentration de B[a]P identique dans le milieu de culture pour tous ces extraits. Une concentration en B[a]P de 0,16 μM (40 ng/mL) est choisie dans une première série d'expérience, afin d'être assez sensible, puis dans une deuxième série, la concentration est diminuée à 0,04 μM (10 ng/mL) pour limiter les effets cytotoxiques.

La première remarque que l'on peut faire est que dans les cellules exposées à 0,16 μM de B[a]P, la mortalité cellulaire est plus élevée dans les cellules traitées avec les mélanges que les cellules traitées avec le B[a]P pur. La mortalité cellulaire la plus élevée est observée dans les cellules exposées au mélange urbain péri-industriel. Ceci n'est pas surprenant étant donné la présence dans les mélanges, en plus du B[a]P, d'autres HAP dont certains sont cytotoxiques, mais aussi d'autres composés organiques.

Par rapport aux cellules exposées au B[a]P pur à 0,16 μM , une augmentation des cassures est mesurée dans les cellules exposées aux mélanges urbains péri-industriels et industriels. Dans les mélanges à plus faible concentration en B[a]P (0,04 μM), une augmentation des cassures de l'ADN par rapport au B[a]P pur est observée dans les cellules exposées aux mélanges

urbains prélevés en été et en automne et dans une moindre mesure, le mélange prélevé à Chamonix. Aucune augmentation des cassures n'est mesurée dans les mélanges industriels.

L'effet le plus important est observé avec le mélange prélevé en été. Un résultat similaire est obtenu par Cavallo (Cavallo 2009) avec les cellules A549 exposées à des extraits prélevés en été par rapport aux extraits prélevés en hiver. L'augmentation des dommages oxydatifs observée avec les extraits d'été semble être corrélée à des concentrations plus élevées de nitro-HAP durant cette saison qu'en hiver. De la même façon, d'autres composés tels que les quinones par exemple, sont émis en plus grande proportion que les HAP parents durant l'été (Pierce 1976) et pourraient également contribuer à la formation des cassures observées dans notre échantillon urbain d'été.

Dans les cellules exposées au mélange urbain péri-industriel à 0,16 μ M de B[a]P, on pourrait penser que les cassures de l'ADN très élevées soient liées à la mortalité cellulaire importante mesurée par le test du MTT. Or, la mesure de la cytotoxicité par le test au bleu de trypan est moins élevée que celle qui est mesurée par le test du MTT, probablement en raison de la perte des cellules les plus endommagées lors des rinçages. Ce résultat semble indiquer que les cellules utilisées pour réaliser le test des comètes sont en majorité des cellules vivantes. De plus, les valeurs de % Tail DNA obtenues dans nos expériences ne suivent pas une distribution bimodale, indicatrice de la présence de cellules en apoptose avec la présence à la fois de cellules avec des forts et des faibles % Tail DNA (Patton 1999).

Une forte potentialisation de la formation des adduits BPDE-N2-dGuo est mesurée dans les cellules exposées aux mélanges industriels issus des sites de fabrication du silicium et de l'aluminium par rapport aux cellules exposées au B[a]P pur à concentration équivalente, alors qu'une inhibition de la formation des adduits BPDE-N2-dGuo est plutôt observée avec les mélanges environnementaux.

La génotoxicité du B[a]P semble donc fortement modulée par les autres composés du mélange, en accord avec nos résultats réalisés avec les mélanges synthétiques.

La comparaison des effets induits par les extraits d'échantillons environnementaux et la fraction d'HAP particulaires reconstituée leur correspondant, montre que les niveaux de cassures élevés et l'inhibition de la formation des adduits BPDE-N2-dGuo mesurés dans les cellules traitées avec ces extraits d'échantillons environnementaux ne sont pas dus aux HAP. Dès lors, on peut penser que les effets observés impliquent d'autres HAP que ceux mesurés ou plutôt d'autres composés organiques ou inorganiques présents dans la phase particulaire et désorbés des filtres avec les HAP. La proportion de ces composés « contaminants » dans les

prélèvements atmosphériques environnementaux est probablement plus élevée que dans les échantillons industriels qui sont prélevés au plus près de la source d'émission des HAP. De plus, étant donné les différences importantes de concentration atmosphérique en B[a]P, il faut aspirer à travers le filtre beaucoup plus d'air en environnement général pour atteindre les mêmes niveaux de B[a]P que ceux qui sont prélevés en milieu industriel. Ceci augmente également la part de composés contaminants dans les échantillons environnementaux. La caractérisation et l'identification de ces autres composés extraits dans la phase organique pourraient être réalisées au cours de prochains travaux.

Le calcul du ratio adduits / cassures est d'environ 9 avec l'extrait issu de l'industrie de l'aluminium, et de 3 pour l'industrie du carbone. Pour tous les autres échantillons environnementaux ce ratio est inférieur à 1.

En résumé, il semble donc que les mélanges à forte proportion en HAP ou contenant presque exclusivement des HAP comme les mélanges prélevés sur sites industriels forment plutôt des adduits BPDE-N2-dGuo et pas ou peu de cassures. A l'inverse, les mélanges plus hétérogènes tels que les prélèvements environnementaux dans lesquels la proportion d'HAP est plus faible, inhibent la formation des adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN et forment surtout des cassures à l'ADN qui ne sont pas dues aux HAP eux-mêmes, mais à d'autres composés contaminants.

Ces résultats montrent clairement l'importance et la nécessité d'utiliser à la fois le test des comètes et la mesure des adduits BPDE à l'ADN par HPLC/MS/MS pour évaluer la génotoxicité des mélanges. L'utilisation du seul test des comètes conduirait à classer comme non génotoxique des mélanges ne générant pas de cassures mais qui pourtant forment des adduits et inversement pour la mesure des adduits par HPLC/MS/MS.

6.3 Effet des mélanges réels sur le métabolisme

Des études un peu différentes de la nôtre montrent que les quantités d'adduits formés par du B[a]P pur (20,2 µg soit 80 µmol) diminuent dans des cellules co-traitées par avec 20,2 µg (80 µmol) de B[a]P et des mélanges standards de référence SRM (400 µg). Ces mélanges standards correspondent à de la matière particulaire prélevée dans des conditions bien déterminées et dont la composition en matière organique et inorganique est certifiée et

standardisée. Le co-traitement des cellules MCF7 par du B[a]P avec un mélange standard issu de brai de houille (SRM 1597a) (Mahadevan 2005) ou de poussière urbaine (SRM 1649a) (Mahadevan 2005, Musafia-Jeknic 2005) génère moins d'adduits diol-époxydes (mesurés par post-marquage au ^{32}P) par rapport au traitement par du B[a]P seul. La même observation est faite avec la lignée épithéliale mammaire MCF-10A et avec les fibroblastes pulmonaires d'hamster chinois V79 en co-traitement avec respectivement un mélange provenant d'émission diesel (SRM 1975) et le mélange issu du brai de houille (SRM 1597a). Un même constat est fait *in vivo* sur des souris suite à l'application cutanée du mélange SRM 1597a (Marston CP 2001) ou du mélange 1649a (Courter 2007) alors que les CYP450 1A1 et 1B1 sont induites. Seul le co-traitement avec le mélange « émission diesel » 1975 tend à augmenter les quantités d'adduits par rapport au traitement B[a]P seul mais de façon non significative.

De façon étonnante, cette diminution de la quantité d'adduits ne s'accompagne pas toujours d'une diminution de l'incidence de tumeurs chez les souris traitées. Au contraire, le nombre de tumeurs peut demeurer constant (Marston CP 2001) ou même augmenter (Courter 2008) illustrant le fait que la tumorigénèse ne dépend pas uniquement de la quantité totale d'adduits formés. La persistance de certains adduits, même en faible quantité, semble être également un facteur déterminant.

Ces travaux ne sont pas tout à fait comparables aux nôtres puisque les cellules sont exposées directement à des particules au lieu de la matière organique désorbée de ces particules comme dans notre cas, ce qui peut entraîner des différences au niveau de la composition chimique des mélanges. D'autre part, les concentrations de B[a]P testées ne correspondent pas aux concentrations retrouvées dans les mélanges complexes SRM. Néanmoins ces études montrent de la même façon que nous, que la formation des adduits par le B[a]P est modulée par d'autres composés présents dans des mélanges qui s'apparentent à nos mélanges industriels (SRM 1597a) ou urbains (SRM 1649a).

Ces résultats soulèvent quelques questions : Comment expliquer les différences en termes de niveaux de cassures et d'adduits observées entre certains mélanges industriels et les mélanges environnementaux ? D'autre part, quels sont les mécanismes à l'origine de l'inhibition de la formation des adduits BPDE obtenue avec les mélanges environnementaux ?

Plusieurs hypothèses sont émises :

Comme expliqué précédemment, ces phénomènes pourraient être dus à la capacité de certains composés, HAP ou autres, présents dans le mélange à inhiber l'activation d'HAP

carcinogènes via l'inhibition des CYP 1A1 ou CYP 1B1. Des données montrent en effet une inhibition compétitive de l'activité EROD catalysée par les CYP450 1A1 et 1B1 en présence de mélanges SRM 1597 (Mahadevan 2007) et non compétitive en présence du mélange 1649a (Courter 2007). Dans le même temps, une synergie au niveau de l'induction de l'activité EROD et de l'induction de l'ARNm CYP1A1 est observée chez des souris B6C3F1 ayant reçu des injections intra péritonéales d'un mélange issu de la production de gaz manufacturé (Chaloupka 1993). Les composés présents dans les mélanges sont donc à la fois agonistes du récepteur AhR et induisent les CYP450 1A1 et 1B1 et en même temps, certains sont des inhibiteurs de ces CYP450.

Nos résultats montrent que les mélanges reconstitués correspondant à la fraction d'HAP particulaires des mélanges atmosphériques ont un effet synergique au niveau de la formation des adduits BPDE-N2-dGuo. On peut donc penser que l'inhibition observée avec les mélanges atmosphériques est due à d'autres composés présents dans la matière organique désorbée des particules. La matière organique associée aux particules atmosphériques contient en effet, en plus des HAP de nombreux autres composés parmi lesquels on trouve des alcanes, des acides alcanoniques, acides carboxyliques, des cétones ou encore des aldéhydes. Elle est composée également de produits issus de réaction secondaire : nitro HAP, oxy-HAP, HAP méthylés qui ont également une activité mutagène (Skarek 2007).

Une différence au niveau de la cinétique de formation des cassures de l'ADN a été retrouvée entre les échantillons urbains péri-industriels et les échantillons industriels.

A l'image de ce qui est observé avec le B[a]P pur, dans les cellules traitées avec l'échantillon industriel prélevé sur le site de fabrication du silicium, un plateau est atteint rapidement au niveau des cassures de l'ADN. Ceci est probablement lié au fait que ce mélange est presque essentiellement constitué d'HAP qui, de la même façon que le B[a]P sont métabolisés rapidement donnant naissance à des dommages au niveau de l'ADN. A l'inverse, une augmentation des cassures est mesurée avec le mélange urbain péri-industriel au cours du temps, pendant la période 0 à 24 h. La présence de composés très différents par rapport au mélange industriel et en particulier de composés qui oxydent directement l'ADN tels que des métaux pourraient expliquer les niveaux de cassures élevés.

La possibilité que de la matière inorganique, notamment des métaux, soit présente dans nos mélanges solubilisés dans le DMSO n'est pas à exclure et pourrait expliquer les niveaux de cassures élevés retrouvés dans les cellules exposées à certains échantillons environnementaux. En particulier le cadmium, le fer, cuivre, plomb, zinc, arsenic sont présents dans l'atmosphère

et certains métaux de transition comme le fer ou le cuivre sont connus pour être à l'origine de stress oxydant à travers des réactions de Fenton (Stohs 1995). D'autres à l'image du cadmium, inhibent la réparation des dommages à l'ADN (Dally 1997, Fatur 2003). De plus, il a été montré que certains métaux (arsenic, plomb, cadmium et mercure) avaient la capacité de diminuer les capacités d'induction des CYP1A1 et 1A2 médiée par certains HAP (Vakharia 2001, Vakharia 2001).

Cependant, les techniques d'échantillonnage et d'extraction utilisées dans nos expériences ne sont pas optimales pour récolter les métaux. Malheureusement, les faibles quantités d'HAP dans les extraits atmosphériques en notre possession ne nous ont pas permis de doser les métaux dans ces échantillons. Aussi, une contamination de nos échantillons par ces derniers n'est pas à exclure mais elle est probablement très faible.

La deuxième hypothèse pouvant expliquer nos résultats est celle d'un passage, sous l'influence des constituants des mélanges, de la voie de métabolisation du BPDE vers une autre voie métabolique, en particulier la voie des quinones. En effet, une augmentation de l'expression des gènes AKR codant pour l'aldo-céto réductase, a été rapportée dans des cellules co-traitées avec des HAP et un mélange issu d'émission diesel, par rapport aux cellules traitées avec les HAP seuls (Courter 2007). Ceci s'accompagne d'une augmentation de la quantité de 8-oxodGuo dans les cellules co-traitées avec du B[a]P et le mélange, conjointement à une diminution de la quantité d'adduits BPDE mesurée par post-marquage au ³²P.

Le changement métabolique pourrait également se faire par une activité renforcée de la détoxification de phase II, avec pour conséquence une élimination plus rapide des métabolites électrophiles du B[a]P conduisant à des niveaux d'adduits plus faibles (De waard 2008, Ebert 2005).

7. Vers une meilleure estimation des dangers liés à l'exposition à des mélanges réels

7.1 Le manque de pertinence de l'approche des facteurs d'équivalent toxiques

Nos expériences réalisées avec les différents mélanges issus d'extraits atmosphériques à une concentration fixe en B[a]P montre que les conséquences en termes de lésions à l'ADN diffèrent d'un mélange à l'autre alors que la concentration en B[a]P au sein des mélanges et la $B[a]P_{Teq}$ sont identiques. L'échantillon urbain péri-industriel (du 27/09) se distingue des autres échantillons par une $B[a]P_{Teq}$ de 20 ng/mL au lieu de 14 ng/mL, du fait de la présence en plus grande quantité de DB[a,h]A et de B[b]F. Dans nos expériences de mélanges binaires, ces deux HAP potentialisent fortement la formation des adduits BPDE-N2-dGuo. Or, cette potentialisation n'est pas observée lorsque les mélanges sont plus complexes à l'image du mélange péri-industriel.

Les niveaux de cassures et d'adduits à l'ADN dans les mélanges exposés à une concentration en B[a]P constante ne sont donc pas corrélés entre eux, ni avec les concentrations en B[a]P ni avec les $B[a]P_{Teq}$. D'autre part, le fait de relever de si grandes différences de niveaux de dommages avec des échantillons ayant des $B[a]P_{Teq}$ et des $\sum HAPc$ équivalents pose la question de la pertinence de ces paramètres en termes de génotoxicité.

A la vue de l'importance des phénomènes d'interaction existant entre les composés d'un mélange, le calcul des $B[a]P_{Teq}$ semble clairement insuffisant pour évaluer la génotoxicité d'un mélange. Cette conclusion est en accord avec Schneider (Schneider 2002) qui montre que le potentiel cancérigène de mélanges basé sur le calcul des $B[a]P_{Teq}$ sous-estime le plus souvent le potentiel cancérigène observé dans des études expérimentales menées chez l'animal.

7.2 L'apport des tests *in vitro*

Les tests cellulaires *in vitro* peuvent pallier ce problème. Le test d'Ames est souvent utilisé pour évaluer la génotoxicité de l'air ambiant (Claxton 2004). Cependant il repose sur

l'utilisation de bactéries, procaryotes, dont le métabolisme est très éloigné de l'humain. De plus, selon le composé testé, ce test n'est pas toujours corrélé avec les tests de cancérogénicité réalisés sur l'animal (Claxton 1988).

Aussi, les tests utilisant des cellules humaines semblent plus pertinents. Cependant, certains de ces tests reposent sur un comptage visuel, fastidieux, (test des micronoyaux, comptage des aberrations chromosomiques) ou sont lourds à mettre en oeuvre (mesure des adduits au ^{32}P) ce qui rend leur application difficile dans le cadre d'un suivi régulier de la génotoxicité de l'air.

Le test des comètes et la mesure des adduits BPDE à l'ADN par HPLC/MS/MS beaucoup plus simples à réaliser semblent plus appropriés pour ce genre de suivi. De plus, le test des comètes nécessite très peu de cellules et peut donc être « miniaturisé » permettant le test d'un grand nombre d'échantillons à la fois.

Par ailleurs, l'acquisition de données expérimentales obtenues à partir de différents mélanges atmosphériques avec ces tests pourrait permettre de construire des modèles mathématiques qui tiendraient compte à la fois des TEF des différents composés mais également des interactions pouvant exister entre les différents composés présents. Ceci permettrait de caractériser de façon plus juste les dangers pour les populations exposées à des atmosphères par rapport aux seuls calculs des $\text{B[a]P}_{\text{Teq}}$.

Nous avons donc cherché à déterminer s'il était possible d'appliquer les tests des comètes et la mesure des adduits BPDE à l'ADN par HPLC/MS/MS au suivi de l'exposition des populations.

Dans ce but, nous avons évalué et comparé la génotoxicité liée à l'exposition à un certain volume d'air de différents mélanges atmosphériques, prélevés dans l'environnement ou sur sites industriels.

Les cellules HepG2 ont été exposées 14 h à la matière organique contenue dans l'équivalent de 20 m^3 d'air prélevé dans l'environnement ou alors à l'équivalent de 20 L prélevés dans les industries aluminium et carbone émettant des HAP.

Le débit d'air respiré par jour par un être humain étant d'environ $1,5 \text{ m}^3/\text{h}$, la valeur 20 m^3 d'air correspond au volume respiré par un homme en une journée. En ce qui concerne les extraits d'échantillons industriels, étant données les concentrations atmosphériques très élevées en HAP, un tel volume entrainerait une mortalité cellulaire trop élevée. Aussi, nous avons choisi de tester un volume d'air 1000 fois moins élevé qu'en environnement et qui pourrait correspondre au volume d'air respiré par un salarié pendant 1,5 min (20 L). Ce temps

peut sembler court, cependant il faut garder à l'esprit que les salariés portent des équipements de protection individuelle qui diminuent leur exposition.

Parmi les échantillons environnementaux, seul l'échantillon prélevé à Chamonix entraîne des niveaux de cassures et des adduits BPDE-N2-dGuo en quantités élevées par rapport au contrôle négatif et c'est celui qui contient la plus forte quantité de B[a]P. Les traitements par les échantillons industriels ne génèrent pas de cassures par rapport au contrôle négatif mais forment des adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN à des volumes d'air 1000 fois moins élevés que les volumes environnementaux. Encore une fois, ces résultats soulignent l'importance des composés autres que les HAP présents dans l'environnement général et qui sont responsables d'une certaine modulation de la génotoxicité du B[a]P dans le mélange.

A volume d'air égal, l'échantillon industriel aluminium est à l'origine d'un plus grand nombre d'adduits que l'échantillon industrie du carbone. Ceci peut être mis en relation avec les concentrations atmosphériques en B[a]P et en HAP particulaires beaucoup plus élevées dans l'échantillon aluminium par rapport à l'échantillon carbone.

Il est intéressant de noter qu'il semble exister une corrélation entre les concentrations atmosphériques en B[a]P dans les échantillons et les quantités d'adduits formés *in vitro*. En effet, une concentration atmosphérique 13 fois plus élevée sur le site aluminium que sur le site carbone est à l'origine de 7 fois plus d'adduits dans les cellules exposées à l'extrait prélevé sur le site aluminium. De la même façon, ramené à un même volume d'air en litre, pour une concentration environ 400 fois plus élevée sur le site industriel de l'aluminium que sur le site Chamonix une quantité d'adduits 700 fois plus importante est formée dans les cellules exposées à l'extrait industriel.

Le test des comètes et la mesure des adduits BPDE à l'ADN par HPLC/MS/MS montrent donc leur intérêt dans le cadre d'un suivi a priori de l'exposition des populations grâce à leur bonne sensibilité dans la détection de dommages induits par des concentrations très faibles d'extraits atmosphériques et notamment de faibles concentrations en HAP. Même s'il n'est pas possible d'extrapoler les résultats observés sur cellules *in vitro* à l'échelle d'un organisme entier, ces résultats sont toutefois des indications d'un danger potentiel pour les populations exposées.

La question de la signification et l'interprétation de ces résultats en termes de cancérogénèse peut se poser. Cassures et adduits à l'ADN peuvent être considérés comme des biomarqueurs d'exposition à un ou des génotoxiques mais en l'absence de réparation ou en cas de réparation

fautive, ils constituent également une première étape dans la génération de mutations, point de départ du processus de cancérogénèse. On peut donc penser que l'augmentation de ces niveaux de dommages reflète une augmentation des risques d'apparition de cancer chez les sujets exposés, même si d'autres facteurs entrent en compte, en particulier les facteurs individuels, en particulier de susceptibilité génétique.

Ces résultats *in vitro* ne sont donc en aucun cas prédictifs d'une apparition de cancer mais permettent une comparaison des dangers liés à différents types d'environnements. Il serait intéressant de rechercher l'existence d'une relation entre les niveaux de dommages induits *in vitro* sur cellules et les niveaux de dommages mesurés dans les liquides biologiques des sujets exposés.

Conclusions et perspectives

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons évalué la génotoxicité de mélanges d'HAP particuliers prélevés sur différents sites environnementaux et industriels par deux approches complémentaires, le test des comètes pour la mesure des cassures à l'ADN et l'HPLC/MS/MS pour la mesure de l'adduit stable BPDE-N2-dGuo. L'accent a été mis sur le B[a]P, seul HAP à avoir été démontré cancérigène avéré pour l'homme et pour lequel nous disposons d'une méthode de dosage des adduits stables et instables (Marie 2007). En particulier, la modulation de sa génotoxicité a été évaluée à travers l'exposition des cellules HepG2 à des mélanges binaires avec d'autres HAP mais aussi à des mélanges d'HAP reconstitués et des extraits d'échantillons atmosphériques réels.

1) Nous avons mis en évidence que le B[a]P pur induit beaucoup plus d'adduits BPDE-N2-dGuo que de dommages oxydatifs. Ceci s'explique par la prépondérance de la voie des CYP450 par rapport aux autres voies métaboliques dans la métabolisation du B[a]P.

2) Dans les cellules exposées à du B[a]P en mélange binaire avec certains HAP (B[b]F, DB[a,h]A, IP, B[g,h,i]P) on observe une légère augmentation des cassures à l'ADN et surtout une potentialisation de la formation des adduits BPDE-N2-dGuo par rapport à ce qui est observé dans les cellules exposées au seul BaP. Une exception concerne le B[k]F qui inhibe la formation des adduits BPDE-N2-dGuo.

3) Ni le B[a]P ni les HAP mesurés dans les mélanges ne sont à l'origine de l'induction importante des lésions oxydatives.

4) La nature des lésions de l'ADN est fortement influencée par la nature des échantillons atmosphériques réels.

Les mélanges composés presque exclusivement d'HAP et où la proportion des autres « contaminants » est minoritaire tels que les mélanges industriels ont plutôt tendance à former des adduits BPDE voire à les potentialiser. Ils forment de plus peu de cassures. Au contraire, avec les mélanges environnementaux où la proportion d'HAP est plus faible par rapport aux autres composés du mélange en raison de l'éloignement par rapport aux sources environnementales d'émission et de l'action de nombreux facteurs environnementaux (photooxydation par exemple), les dommages générés sont plutôt de type oxydatif et la formation des adduits BPDE à l'ADN a tendance à être inhibée.

5) Les mécanismes par lesquels s'exercent les effets potentialisateurs et inhibiteurs des mélanges restent encore à élucider. Des phénomènes de potentialisation au niveau de l'induction des CYP450 par certains composés pourraient intervenir ainsi que des phénomènes de compétition entre les composés au niveau de la métabolisation. Une autre hypothèse serait celle d'un changement métabolique de la voie du BPDE en faveur d'une autre voie, en particulier vers la voie des quinones, ou bien une augmentation de la conjugaison de phase II ou encore à une augmentation des réparations des dommages à l'ADN.

6) Nos expériences montrent que les niveaux de dommages à l'ADN dans les cellules exposées à ces mélanges atmosphériques dépendent de la concentration en B[a]P et en HAP totaux mais également à la présence d'autres contaminants non identifiés qui ont également pour effet de moduler la génotoxicité du mélange. Cette modulation de la génotoxicité du mélange en fonction des composés présents rend difficile la prédiction du risque lié à l'exposition à ces mélanges. La connaissance de la composition en HAP d'un mélange n'est donc pas suffisamment prédictive de sa génotoxicité surtout en environnement général où de nombreux autres composés présents peuvent conduire à une potentialisation de génotoxicité des HAP ou parfois à leur inhibition. Ces résultats montrent clairement que l'estimation de la toxicité des mélanges basée sur le seul calcul des FET et qui repose sur une hypothèse d'additivité des composés peut conduire à une sous estimation ou bien à une surestimation du

risque. Le suivi spatio-temporel de la génotoxicité d'échantillons atmosphériques montre tout son intérêt dans le cadre de l'évaluation à priori des dangers et la prévention des risques liés à l'exposition des populations à certaines « ambiances polluées ». Même si les conditions expérimentales sont relativement éloignées des conditions physiologiques réelles puisqu'il s'agit d'un travail réalisé *in vitro*, on peut penser que les dommages observés au niveau des cellules pourraient servir d'indicateurs d'un danger potentiel pour l'humain.

Afin d'argumenter l'hypothèse d'une inhibition de la formation des adduits par des composés contaminants, il serait intéressant d'identifier et caractériser ces autres contaminants présents dans les mélanges atmosphériques. Les études pourraient être étendues à d'autres HAP, moins étudiés, par exemple le Benzo(j)fluoranthène classé dans la catégorie 2B par le CIRC et abondant dans l'atmosphère ou encore les dérivés oxydés ou nitrés des HAP.

D'autre part, il serait intéressant d'évaluer la contribution des différentes voies métaboliques en présence de différents mélanges atmosphériques, notamment par le dosage de certains métabolites dans le milieu de culture cellulaire, le 3-OHB[a]P par exemple, ou encore le tétraol et les catéchols. De plus, la mise au point des adduits formés par les autres HAP du mélange et leur identification dans les cellules permettraient de déterminer si la diminution des adduits BPDE se ferait à la faveur d'une formation plus importante des adduits d'autres HAP.

Enfin, dans le cadre du suivi de l'exposition génotoxique des populations, il pourrait être intéressant notamment en milieu professionnel de comparer des extraits atmosphériques issus de différentes entreprises ou de différents postes de travail et également de voir ou de comparer la génotoxicité d'un volume d'air environnemental par rapport à une atmosphère qui servirait de référence. On pourrait également envisager de comparer les dommages induits par ces extraits atmosphériques sur cellules *in vitro* avec les dommages retrouvés chez les sujets exposés à ces atmosphères. En particulier, on pourrait comparer les quantités d'adduits formés dans les cellules *in vitro* avec les quantités d'adduits mesurés dans les lymphocytes de salariés, en plus des dosages urinaires de 8-oxodGuo. Enfin, le recueil de données expérimentales obtenues à partir de différents mélanges atmosphériques pourrait permettre de construire des modèles mathématiques qui tiendraient compte à la fois des TEF de chaque composé, mais également des interactions pouvant exister au sein des mélanges. Le recours à la modélisation pourrait ainsi permettre de caractériser les dangers liés à l'exposition

atmosphérique des populations de façon plus réaliste que les simples calculs de $B[a]P_{Teq}$ actuellement utilisés.

CHAPITRE 6

MATERIEL ET METHODE

CHAPITRE 6-MATERIEL ET METHODE

I. Prélèvements et analyse des échantillons atmosphériques

1. Prélèvements atmosphériques

Les méthodes de prélèvements atmosphériques et d'analyse des HAP en milieu industriel et environnemental obéissent aux normes françaises AFNOR X 43-294 (AFNOR 1995) en milieu industriel et AFNOR X 43-025 (AFNOR 1988) en milieu environnemental.

1.1 Prélèvements en milieu industriels

La matière particulaire est collectée sur des filtres de quartz Whatman ($\varnothing 37$ mm) à l'aide d'une pompe SKC à un débit de 1 litre par minute pendant 7 h. La stabilité du débit est vérifiée en comparant les débits en début et en fin de prélèvement. Des variations supérieures à 10 % entraînent l'exclusion de l'échantillon.

Après prélèvement, les filtres sont stockés à l'abri de la lumière à -20 °C jusqu'à l'extraction. La matière organique est désorbée des filtres par du dichlorométhane dans un bain à ultrason pendant 30 minutes suivie d'une homogénéisation par vortex. Le solvant est ensuite évaporé grâce à un rotavapeur à la température de 30 °C. Après évaporation du solvant, la matière organique est dissoute dans 1 mL d'acétonitrile et filtrée sur un filtre à $0,22$ μm avant analyse.

1.2 Prélèvements environnementaux

La matière particulaire est prélevée sur des filtres de quartz à l'aide d'une pompe haut-débit (Digitel) équipée d'une tête de prélèvement sélectionnant les PM₁₀. Le prélèvement d'une durée de 24 h est réalisé à un débit de 30 m³ par heure. Après prélèvement, les filtres sont stockés à l'abri de la lumière à -20 °C jusqu'à l'extraction. La matière organique est extraite au Soxhlet en utilisant du dichlorométhane. Après évaporation du solvant au rotavapor à 30 °C, les échantillons sont dissous dans 500 μl d'acétonitrile pour être analysés.

2. Analyses quantitatives des HAP particuliers

Elles sont conduites de façon identique pour les 2 types de prélèvements :

10µl de l'extrait dans l'acétonitrile sont injectés.

Les concentrations de 10 HAP, Fluoranthène (Flua), Pyrène (Pyr), Benz[a]anthracène (B[a]A), Chrysène (Chr), Benzo[b]fluoranthène (B[b]F), Benzo[k]fluoranthène (B[k]F), Benzo[a]pyrène (B[a]P), Dibenz[a,h]anthracène (DB[a,h]A), Benzo[g,h,i]perylène (B[g,h,i]P) et Indéno[1,2,3-cd]pyrène (IP) sont déterminées par chromatographie liquide haute performance (HPLC) Waters avec une détection par fluorescence. La séparation chromatographique est réalisée sur une colonne HAP C18 (Supelco 300x2 mm ID, 3,5 µm) avec un gradient acétonitrile/eau.

La température du four à colonne est fixée à 32 °C. Les longueurs d'onde utilisées pour la détection sont les suivantes (excitation/émission) :

285/450 nm pour détecter le fluoranthène et 333/390 pour le pyrène. Un changement de longueur d'onde est réalisé à 265/380 nm pour détecter le benzo[a]anthracène et le chrysène puis à 296/405 nm pour détecter le benzo[b]fluoranthène, le benzo[k]fluoranthène, le benzo[a]pyrène, le dibenz[a,h]anthracène benzo[g,h,i]perylène et enfin, à 302/500 nm pour détecter l'indéno[1,2,3-cd]pyrène.

La limite de détection des HAP particuliers est de 0,1ng/filtre excepté pour le Pyr, le B[k]F et le B[a]P où elle est à 0,05 ng/filtre.

II. HAP commerciaux

Le B[a]P (CAS no. 50-32-8, Sigma) en poudre est mis en suspension dans du DMSO. Les solutions stock de B[a]P sont conservées à l'abri de la lumière à 4 °C et diluées directement dans le milieu de culture pour les expériences.

Les HAP Flua, Pyr, Chr, B[b]F, B[k]F, B[a]P, DB[a,h]A, B[g,h,i]P, (Sigma) conditionnés en poudre sont remis en suspension dans un volume de DMSO aux concentrations respectives : 2,70 mg/mL (soit 13,3 mM), 2,77 mg/mL (13,7 mM), 5 mg/mL (21,9 mM), 25 mg/mL (100 mM), 25mg/mL (100 mM), 4 mg/mL (16 mM), 5 mg/mL (18 mM), 2,5 mg/mL (9,05 mM).

A partir de ces solutions mères stockées à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, des solutions de travail à 1 mM sont préparées dans le DMSO.

Le B[a]A et l'IP sont achetés en solution dans le cyclohexane à la concentration de 100 ng/mL (soit respectivement $0,44\text{ mM}$ et $0,36\text{ mM}$). Pour les expériences, le cyclohexane est évaporé à l'air libre sous une sorbonne et les HAP sont repris dans du DMSO.

III. Culture cellulaire

1. Produits de culture et lignée cellulaire

Le milieu de culture cellulaire Dubelcco's Modified Eagles's medium (DMEM, Gibco) contenant 4500 mg/mL de glucose et 4 mM de glutamine est complété par 10% de sérum de veau fœtal (Gibco), 1% d'acides aminés non essentiels (sigma), 500 U de pénicilline et $500\text{ }\mu\text{g}$ de streptomycine (Gibco).

Le tampon phosphate (PBS) sans calcium ni magnésium ($-\text{CaCl}_2 -\text{MgCl}_2$) et avec calcium et magnésium ($+\text{CaCl}_2 +\text{MgCl}_2$) et la trypsine $0,25\%$ proviennent de chez Gibco.

Les flacons de culture sont pré conditionnés au collagène type I (queue de rat, sigma) 1 mg/mL dilué au $1/100^{\text{ème}}$ dans de l'eau stérile.

La lignée cellulaire HepG2, issue d'un hépatocarcinome humain provient de la banque américaine de culture cellulaire (American Type Culture Collection ATCC). Les cellules sont repiquées une fois par semaine dans des flacons de culture de 75 cm^2 tapissés de collagène. Le milieu de culture est complété par 10% de sérum de veau fœtal, 1% d'acides aminés non essentiels, 500 U de pénicilline et $500\text{ }\mu\text{g}$ de streptomycine. Les cellules sont rincées 2 fois par du PBS ($-\text{CaCl}_2 -\text{MgCl}_2$) puis trypsinées pendant 5 minutes. L'effet de la trypsine est arrêté en ajoutant 7 mL de milieu de culture puis les cellules sont centrifugées 5 min (1400 rpm). Le culot est alors repris par 6 mL de milieu et 1

mL de cette suspension cellulaire estensemencé dans un nouveau flacon de culture pour un volume final de milieu de 15 mL. Les cellules sont alors incubées à 37 °C sous 5 % de CO₂.

Pour les expérimentations, les cellules sontensemencées dans des flacons de culture 25 cm² ou dans des boîtes de pétri de 35 mm à la densité de 28000 cellules par cm² et cultivées pendant 72 h.

Le milieu DMEM utilisé lors des traitements cellulaires n'est pas complémenté en sérum de veau.

2. Traitement cellulaire

Le milieu de culture est retiré puis remplacé par du milieu de culture dans lesquels les HAP purs ou les mélanges issus d'extraits atmosphériques et dilués dans le DMSO ont été directement dilués. La concentration de DMSO dans le milieu de culture n'excède pas 0,5 % (v/v). Dans chaque expérience un contrôle négatif est inclus. Il s'agit de cellules traitées avec du DMSO à une concentration de 0,5 % dans le milieu de culture.

Pour les expériences réalisées avec des extraits d'échantillons atmosphériques, un témoin « filtre » est ajouté. Ce contrôle est un blanc de terrain, c'est-à-dire un filtre n'ayant pas servi au prélèvement atmosphérique mais traité et extrait dans les mêmes conditions que les autres.

Les cellules sont incubées à 37 °C sous 5 % de CO₂ durant toute la durée de traitement.

Concernant les expériences de prétraitement, les cellules sont pré-incubées avec du milieu de culture contenant les HAP pendant 2 h puis ce milieu est retiré et remplacé par un nouveau milieu de culture dans lequel le B[a]P a été dilué.

3. Récolte des cellules

A la fin du traitement, les cellules sont rincées 2 fois par du PBS (-CaCl₂ -MgCl₂) puis trypsinées par 1 mL de trypsine. Les effets de la trypsine sont stoppés en ajoutant 4 mL de milieu de culture puis les cellules sont centrifugées pendant 5 min à 1400 rpm.

Le surnageant est retiré et le culot cellulaire est repris par un volume de PBS de façon à ce que la concentration cellulaire soit de 10^6 cellules/mL. 10 μ l de suspension cellulaire sont prélevés pour le test des comètes. Le reste de la suspension cellulaire est centrifugé une nouvelle fois pendant 5 min (1400 rpm), le surnageant est retiré et les culots cellulaires sont stockés à -80 °C jusqu'à extraction de l'ADN.

IV. Tests de cytotoxicité

1. Test du MTT

Principe : Le MTT (3-[4,5-diméthyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium bromide) est un sel monotétrazolium converti en formazan principalement au niveau des mitochondries des cellules intactes. Sous l'action de déshydrogénases génératrices de NADH il se forme un précipité violet analysable par spectrophotométrie. La coloration violette est donc proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Les cellules sontensemencées en plaque 96 puits à raison de 100000 cellules par puits. Les expériences sont réalisées 24 h après l'ensemencement.

Une solution de MTT à 5 mg/mL est préparée dans du PBS contenant du Ca^{2+} et du Mg^{2+} . Cette solution est alors diluée au 1/10^{ème} dans du milieu de culture. 100 μ l de cette solution sont ajoutés dans chaque puits préalablement vidés et les cellules sont incubées 1 h à 37 °C sous 5 % CO_2 . A la fin du traitement, les puits sont vidés et rincés 2 fois par du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} . Puis 100 μ L de DMSO sont ajoutés par puits. Après 10 minutes d'agitation, la plaque est lue au spectrophotomètre équipé d'un lecteur de plaque à $\lambda = 570$ nm.

2. Test de viabilité au bleu de trypan

Le bleu trypan est un colorant anionique exclu des cellules vivantes. Il pénètre et se concentre dans les cellules mortes dont la membrane cellulaire est lésée, les colorant en bleu.

Le comptage des cellules vivantes et des cellules mortes se fait sur une lame kova. La totalité de la lame est comptabilisée après avoir introduit 10 μ l d'une suspension cellulaire diluée au quart dans une solution de bleu de trypan 0,4 %.

Le test est réalisé avec un aliquot cellulaire prélevé au moment de la récolte des cellules traitées pour les tests comètes et/ou adduits.

V. Tests de génotoxicité

1. Test des comètes

L'agarose de routine, l'agarose low melt et le bromure d'éthidium (BET) proviennent de chez Sigma.

Le test des comètes est réalisé selon le protocole de Singh (Singh NP 1988) et selon les recommandations de Tice (Singh NP 1988, Tice 1991).

Les cellules HepG2 sont suspendues dans de l'agarose low melt point à 0,5 % et déposées sur lame de microscope préalablement couverte d'agarose 1 % dans du PBS sans Ca^{2+} , ni Mg^{2+} , à raison de 10000 cellules par lame et 3 lames par condition. Une fois l'agarose Low melt solidifié, les lames sont placées dans une solution de lyse (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM tris-HCl, pH10, 10 % DMSO et 1 % triton X100) à 4 °C pendant 1 h.

Après la lyse, les lames sont placées dans un bac d'électrophorèse et immergées dans une solution alcaline (1 mM EDTA, 300 mM NaOH, pH>13). Après 40 minutes de débobinage de l'ADN, l'électrophorèse est réalisée à 25 V (300 mA) pendant 30 minutes.

Les lames sont ensuite rincées à raison de 3x5 minutes par une solution de neutralisation (Trizma 0,4 M, pH 7.5) et l'ADN est révélé par une solution de bromure d'éthidium (BET 50 µl à 20 µg/mL).

Les noyaux sont observés grâce à un microscope à fluorescence et analysés par le biais du logiciel Komet 3.2. 50 spots sont analysés par lame. Le nombre de cassures est représenté par le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète (% Tail DNA). Cette valeur fournie par le logiciel tient compte à la fois de l'intensité de la fluorescence dans la tête et dans la queue de la comète, mais aussi de la longueur de la queue.

La valeur mesurée est donc globale et non une mesure absolue du nombre de cassures. Afin de pouvoir transcrire le % Tail DNA en nombre de cassures de l'ADN, nous avons calibré le test des comètes en incluant dans le batch des lames contenant des cellules témoins irradiées par des rayons gamma γ générés par une source de ^{60}Co .

L'irradiation des cellules HepG2 à 2 Gy et 4 Gy permet de construire une droite d'étalonnage dont la pente fournit le % Tail DNA par Gy.

Il est établi que l'irradiation de cellules à 1 Gy génère 0,14 cassures pour 10^6 nucléotides soit 1000 cassures par cellules (Ahnström 1981, Goodhead 1989, Pouget 2000). On peut alors déterminer le nombre de cassures de l'ADN pour un % Tail DNA donné.

2. Dosage des adduits BPDE-N2-dGuo et de la 8-oxodGuo par HPLC/MS/MS

2.1 Extraction et digestion de l'ADN

Ribonucléase T1 et ribonucléase A proviennent de chez Sigma, la protéase de chez Qiagen.

2.1.1 Extraction de l'ADN

Lyse de la membrane plasmique : le culot cellulaire est repris et homogénéisé par pipetage dans 0,75 mL de tampon de lyse A (320 mM de sucrose, 5 mM de $MgCl_2$, 10 mM de Tris-HCl, 0,1 mM de déféroxamine, et 1 % de triton X-100, pH 7,5). Les échantillons sont alors centrifugés pendant 5min à 1500g à 4 °C. Le surnageant est éliminé pour garder le culot nucléaire. Cette étape est répétée une deuxième fois.

Lyse de la membrane nucléaire : le culot nucléaire est remis en suspension dans 0,300 mL de tampon de lyse B (5 mM d'EDTA-Na, 10 mM 2 de Tris-HCl, 0,15 mM de déféroxamine, pH 8). Après homogénéisation, 15 μ l de dodécylsulfate de sodium (SDS) à 10 % sont ajoutés, suivi de 1,5 μ l de RNase A (100 mg/mL) et 3.5 μ l de RNase T1 (1 U/ μ l). Les échantillons sont alors incubés pendant 15 min à 50 °C puis pendant 1 h à 37 °C après addition de 15 μ l de protéase (20 mg/mL).

Précipitation de l'ADN : l'ADN est précipité par addition de 0,6 mL de solution de NaI (20 mM d'EDTA-Na₂, 7,6 M de NaI, 40 mM de Tris-HCl, 0,3 mM de déféroxamine, pH 8) et 1 mL d'isopropanol (100 %). Les cellules sont alors centrifugées pendant 5 min à 1500 g à 4 °C puis après retrait du surnageant les culots d'ADN sont repris dans 1 mL d'isopropanol (40 %).

Une nouvelle centrifugation est réalisée comme précédemment à l'issue de laquelle 1 mL d'éthanol 70 % est ajouté. Après une dernière centrifugation, et élimination de l'éthanol, l'ADN est dissout dans 50 µl de déféroxamine 0,1 mM pour éviter l'oxydation et stocké à -20 °C jusqu'à l'hydrolyse.

2.1.2 Hydrolyse de l'ADN

La nucléase P1 (de *penicillium citrinum*), la phosphodiesterase II, la phosphatase alcaline et la Phosphodiesterase I (de *crotalus adamanteus* Venom) proviennent de chez sigma.

L'ADN est digéré en nucléosides après incubation à 37 °C avec un mélange d'enzymes comprenant nucléase P1, phosphodiesterase II et un tampon 10X (200 mM acide succinique, 100 mM CaCl₂, pH 6.0). Puis au bout de 2 h sont ajoutés du tampon de phosphatase alcaline dans 10X (500 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) ainsi que de la phosphodiesterase I et de la phosphatase alcaline. Après 2 h de digestion, la solution contenant les nucléosides est neutralisée par 0,1 µM d'HCl et centrifugée 5 min à 5000g. Le surnageant est transféré dans un vial d'HPLC puis analysé par HPLC-MS/MS.

2.2 Mesure des adduits par HPLC/MS/MS

2.2.1 Produits

L'acétonitrile et le méthanol sont de qualité analytique. Le formiate d'ammonium 2 mM est préparé à partir d'une solution mère à 1 mM (acide formique 25.44 M, pH 6 avec hydroxide d'ammonium 28 %) filtrée sur membrane.

2.2.2 Méthode

Le système est composé d'une chaîne de chromatographie liquide haute performance Agilent couplée en ligne à un spectromètre de masse en mode tandem API 3000 (SCIEX). Le spectromètre de masse est constitué d'une source d'ionisation de type électrospray couplée à un analyseur à triple quadripôle. L'analyseur est utilisé en mode MRM avec une ionisation

positive par électrospray. Les transitions sélectionnées sont les suivantes : m/z 570 $[M + H]^+$ \rightarrow m/z 454 $[M + H - 116]^+$; m/z 570 $[M + H]^+$ \rightarrow m/z 257 $[BPDE-H_2O-CO]^+$.

Les échantillons d'ADN sont resuspendus après lyophilisation dans 30 μ l d'un mélange $H_2O/MeOH$ (50/50).

La séparation chromatographique est réalisée en utilisant une colonne de silice greffée C_{18} Uptisphere ODB à phase inverse 150x2 mm (Interchim).

L'élution est réalisée par un gradient linéaire de 0 % à 100 % d'acétonitrile pendant 30 minutes dans du formiate d'ammonium 2 mM à un débit de 0,2 mL/min. Le temps de rétention est d'environ 21 minutes pour les isomères du BPDE-N2-dGuo qui sont élués en un seul pic. Les nucléosides normaux sont détectés simultanément par UV à la longueur d'onde 270 nm par un détecteur UV placé avant le spectromètre de masse.

La quantification des adduits BPDE-N2-dGuo est réalisée par calibration externe en utilisant les transitions 454 et 257. Dans ces conditions, la limite de détection est de 1 fmol.

2.3 Mesure de la 8-oxodGuo

Pour la détection de la 8-oxodGuo, la transition utilisée est m/z 284 $[M + H]^+$ \rightarrow m/z 168 $[M + H - 116]^+$ (Frelon 2000). L'élution est réalisée par un gradient de 0 à 10 % de méthanol pendant 33 min dans du formiate d'ammonium 2 mM.

VI. Traitement des résultats

Pour chacune des expériences, chaque point est réalisé en triplicat et les expériences sont reproduites 2 à 3 fois. Les données issues de ces expériences indépendantes sont analysées statistiquement par le test non paramétrique de Mann-Whitney Wilcoxon en raison des faibles effectifs

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ACGIH. TLVs and BEIs. Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices. . American Conference of Governmental Industrial Hygienists; Cincinnati, OH: 2005.
- Qualité de l'air-air ambiant. Détermination des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Norme AFNOR NF X 43-025, (1988).
- Air des lieux de travail. Echantillonnage et analyse des hydrocarbures aromatiques polycycliques. Norme AFNOR NF X 43-294, (1995).
- Ahnström G, Erixon K. Measurement of strand breaks by alkaline denaturation and hydroxyapatite chromatography. In: Friedberg EC, Hanawalt PC, editors. DNA repair: A Laboratory Manual Research Procedures. New-York: Marcel Dekker; 1981. p. 403-18.
- Albert RE, Miller ML, Cody T, Andringa A, Shukla R, Baxter CS. Benzo[a]pyrene-induced skin damage and tumor promotion in the mouse. *Carcinogenesis* 1991 Jul;12(7):1273-80.
- Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 1975 Dec;31(6):347-64.
- Baek S, Field R, Goldstone M, Kikk P, Lester J, Perry R. A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Sources, fate and behavior *Water, Air, & Soil Pollution* 1991;60 (3-4):279-300.
- Baulig A, Garlatti M, Bonvallot V, Marchand A, Barouki R, Marano F, et al. Involvement of reactive oxygen species in the metabolic pathways triggered by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003 Sep;285(3):L671-9.
- Begleiter A, Hewitt D, Maksymiuk AW, Ross DA, Bird RP. A NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 polymorphism is a risk factor for human colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006 Dec;15(12):2422-6.
- Benhamou S, Lee WJ, Alexandrie AK, Boffetta P, Bouchardy C, Butkiewicz D, et al. Meta-and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk. *Carcinogenesis* 2002 Aug;23(8):1343-50.
- Binkova B, Giguere Y, Rossner P, Jr., Dostal M, Sram RJ. The effect of dibenzo[a,1]pyrene and benzo[a]pyrene on human diploid lung fibroblasts: the induction of DNA adducts, expression of p53 and p21(WAF1) proteins and cell cycle distribution. *Mutat Res* 2000 Nov 20;471(1-2):57-70.
- Binkova B, Topinka J, Sram RJ, Sevastyanova O, Novakova Z, Schmuczerova J, et al. In vitro genotoxicity of PAH mixtures and organic extract from urban air particles part I: acellular assay. *Mutat Res* 2007 Jul 1;620(1-2):114-22.
- Board PG. Biochemical genetics of glutathione-S-transferase in man. *American journal of human genetics* 1981 Jan;33(1):36-43.
- Bock KW, Gschaidmeier H, Heel H, Lehmkoetter T, Munzel PA, Bock-Hennig BS. Functions and transcriptional regulation of PAH-inducible human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug metabolism reviews* 1999 May;31(2):411-22.
- Bonassi S, Abbondandolo A, Camurri L, Dal Pra L, De Ferrari M, Degraffi F, et al. Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. *Cancer Genet Cytogenet* 1995 Feb;79(2):133-5.

- Bosetti C, Boffetta P, La Vecchia C. Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers: a quantitative review to 2005. *Ann Oncol* 2007 Mar;18(3):431-46.
- Bosveld AT, de Bie PA, van den Brink NW, Jongepier H, Klomp AV. In vitro EROD induction equivalency factors for the 10 PAHs generally monitored in risk assessment studies in The Netherlands. *Chemosphere* 2002 Oct;49(1):75-83.
- Braithwaite E, Wu X, Wang Z. Repair of DNA lesions induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-free extracts: involvement of two excision repair mechanisms in vitro. *Carcinogenesis* 1998 Jul;19(7):1239-46.
- Briede JJ, Godschalk RW, Emans MT, De Kok TM, Van Agen E, Van Maanen J, et al. In vitro and in vivo studies on oxygen free radical and DNA adduct formation in rat lung and liver during benzo[a]pyrene metabolism. *Free Radic Res* 2004 Sep;38(9):995-1002.
- Bucheli TD, Blum F, Desaulles A, Gustafsson O. Polycyclic aromatic hydrocarbons, black carbon, and molecular markers in soils of Switzerland. *Chemosphere* 2004 Sep;56(11):1061-76.
- Buchet JP, Ferreira M, Jr., Burrion JB, Leroy T, Kirsch-Volders M, Van Hummelen P, et al. Tumor markers in serum, polyamines and modified nucleosides in urine, and cytogenetic aberrations in lymphocytes of workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Am J Ind Med* 1995 Apr;27(4):523-43.
- Buchet JP, Gennart JP, Mercado-Calderon F, Delavignette JP, Cupers L, Lauwerys R. Evaluation of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a coke production and a graphite electrode manufacturing plant: assessment of urinary excretion of 1-hydroxypyrene as a biological indicator of exposure. *British journal of industrial medicine* 1992 Nov;49(11):761-8.
- Burczynski ME, Penning TM. Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Res* 2000 Feb 15;60(4):908-15.
- Burdick AD, Davis JW, 2nd, Liu KJ, Hudson LG, Shi H, Monske ML, et al. Benzo(a)pyrene quinones increase cell proliferation, generate reactive oxygen species, and transactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cells. *Cancer Res* 2003 Nov 15;63(22):7825-33.
- Buschini A, Cassoni F, Anceschi E, Pasini L, Poli P, Rossi C. Urban airborne particulate: genotoxicity evaluation of different size fractions by mutagenesis tests on microorganisms and comet assay. *Chemosphere* 2001 Sep;44(8):1723-36.
- Cavalieri EL, Rogan EG. The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation *Pharmacol Ther* 1992;55(2):183-99.
- Cavallo D, Ursini C, Di Filippo P, Ciervo A, Spicaglia S, Pomata D, et al. Evaluation of Direct-Oxidative DNA Damage on Human Lung Epithelial Cells Exposed to Urban Airborne Particulate Matter *Water Air Soil Pollut* 2009 April 2009; 9 (1-2):69-77.
- Cerna M, Pochmanova D, Pastorkova A, Benes I, Lenicek J, Topinka J, et al. Genotoxicity of urban air pollutants in the Czech Republic. Part I. Bacterial mutagenic potencies of organic compounds adsorbed on PM10 particulates. *Mutat Res* 2000 Aug 21;469(1):71-82.
- Chaloupka K, Harper N, Krishnan V, Santostefano M, Rodriguez LV, Safe S. Synergistic activity of polynuclear aromatic hydrocarbon mixtures as aryl hydrocarbon (Ah) receptor agonists. *Chem Biol Interact* 1993 Dec;89(2-3):141-58.
- Chen MR, Tsai PJ, Wang YF. Assessing inhalatory and dermal exposures and their resultant health-risks for workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)

- contained in oil mists in a fastener manufacturing industry. *Environment international* 2008 Oct;34(7):971-5.
- Chen S, Nguyen N, Tamura K, Karin M, Tukey RH. The role of the Ah receptor and p38 in benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2003 May 23;278(21):19526-33.
- Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *J Biol Chem* 1992 Jan 5;267(1):166-72.
- Cherng SH, Lin P, Yang JL, Hsu SL, Lee H. Benzo[g,h,i]perylene synergistically transactivates benzo[a]pyrene-induced CYP1A1 gene expression by aryl hydrocarbon receptor pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001 Jan 1;170(1):63-8.
- Chu M, Chen C, editors. Evaluation and estimation of potential carcinogenic risks of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. Symposium on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the workplace; 1984; Honolulu.
- Chun YJ, Kim MY, Guengerich FP. Resveratrol is a selective human cytochrome P450 1A1 inhibitor. *Biochemical and biophysical research communications* 1999 Aug 19;262(1):20-4.
- Chun YJ, Kim S, Kim D, Lee SK, Guengerich FP. A new selective and potent inhibitor of human cytochrome P450 1B1 and its application to antimutagenesis. *Cancer Res* 2001 Nov 15;61(22):8164-70.
- CITEPA. Inventaire des émissions de polluants atmosphériques en France-Séries sectorielles et analyses étendues: Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique 2009.
- Claxton LD, Matthews PP, Warren SH. The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: Salmonella mutagenicity. *Mutat Res* 2004 Nov;567(2-3):347-99.
- Claxton LD, Stead AG, Walsh D. An analysis by chemical class of Salmonella mutagenicity tests as predictors of animal carcinogenicity. *Mutat Res* 1988 May-Aug;205(1-4):197-225.
- Cohen AJ. Outdoor air pollution and lung cancer. *Environmental health perspectives* 2000 Aug;108 Suppl 4:743-50.
- Cohen SM, Ellwein LB. Cell proliferation in carcinogenesis. *Science (New York, NY)* 1990 Aug 31;249(4972):1007-11.
- Courter LA, Luch A, Musafia-Jeknic T, Arlt VM, Fischer K, Bildfell R, et al. The influence of diesel exhaust on polycyclic aromatic hydrocarbon-induced DNA damage, gene expression, and tumor initiation in Sencar mice in vivo. *Cancer Lett* 2008 Jun 28;265(1):135-47.
- Courter LA, Musafia-Jeknic T, Fischer K, Bildfell R, Giovanini J, Pereira C, et al. Urban dust particulate matter alters PAH-induced carcinogenesis by inhibition of CYP1A1 and CYP1B1. *Toxicol Sci* 2007 Jan;95(1):63-73.
- Courter LA, Pereira C, Baird WM. Diesel exhaust influences carcinogenic PAH-induced genotoxicity and gene expression in human breast epithelial cells in culture. *Mutat Res* 2007 May 21.
- Dally H, Hartwig A. Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis* 1997 May;18(5):1021-6.
- De Kok TM, Hogervorst J, Briedé JJ, Van Herwijnen MH, Maas LM, Moonen EJ, et al. Genotoxicity and physicochemical characteristics of traffic-related ambient particulate matter. *Environ Mol Mutagen* 2005;46:71-80.
- De waard P, De Kok T, Maas L, Peijnenburg A, Hoogenboom R, Aarts J, et al. Influence of TCDD and natural Ah receptor agonists on benzo[a]pyrene-DNA adduct formation in the Caco-2 human colon cell line. *Mutagenesis* 2008;23(1):67-73.

- Del Rosario Sienna M, Rosazza N, Préndez M. Polycyclic aromatic hydrocarbons and their molecular diagnostic ratios in urban atmospheric respirable particulate matter. *Atmospheric Environment* 2005;75(4):267-81
- Del Rosario Sienna T, Nelson G, Rosazza N, Margarita Prendez M. Polycyclic aromatic hydrocarbons and their molecular diagnostic ratios in urban atmospheric respirable particulate matter. *Atmospheric research* 2005;75(4):267-81.
- Delescluse C, Lemaire G, de Sousa G, Rahmani R. Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway? *Toxicology* 2000 Nov 16;153(1-3):73-82.
- DeMaio L, Corn M. Polynuclear aromatic hydrocarbons associated with particulates in Pittsburgh air. *Journal of the Air Pollution Control Association* 1966 Feb;16(2):67-71.
- DeMarini DM, Landi S, Tian D, Hanley NM, Li X, Hu F, et al. Lung tumor KRAS and TP53 mutations in nonsmokers reflect exposure to PAH-rich coal combustion emissions. *Cancer Res* 2001 Sep 15;61(18):6679-81.
- Denison MS, Pandini A, Nagy SR, Baldwin EP, Bonati L. Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem Biol Interact* 2002 Sep 20;141(1-2):3-24.
- Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science (New York, NY)* 1996 Oct 18;274(5286):430-2.
- Devanesan PD, RamaKrishna NV, Todorovic R, Rogan EG, Cavalieri EL, Jeong H, et al. Identification and quantitation of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed by rat liver microsomes in vitro. *Chem Res Toxicol* 1992 Mar-Apr;5(2):302-9.
- Doonaert B, Pichard A. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs). Rapport final. ETSC: INERIS2003.
- Du Four VA, Janssen CR, Brits E, Van Larebeke N. Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples from different rural, urban and industrial sites in Flanders, Belgium. *Mutat Res* 2005 Dec 30;588(2):106-17.
- Durant JL, Busby WF, Jr., Lafleur AL, Penman BW, Crespi CL. Human cell mutagenicity of oxygenated, nitrated and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons associated with urban aerosols. *Mutat Res* 1996 Dec 20;371(3-4):123-57.
- Ebert B, Seidel A, Lampen A. Induction of phase-1 metabolizing enzymes by oltipraz, flavone and indole-3-carbinol enhance the formation and transport of benzo[a]pyrene sulfate conjugates in intestinal Caco-2 cells. *Toxicology letters* 2005 Aug 14;158(2):140-51.
- EFSA. Polycyclic Aromatic hydrocarbons in food-Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *The EFSA journal* 2008;724:1-114.
- Fatur T, Lah TT, Filipic M. Cadmium inhibits repair of UV-, methyl methanesulfonate- and N-methyl-N-nitrosourea-induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 2003 Aug 28;529(1-2):109-16.
- Forster K, Preuss R, Rossbach B, Bruning T, Angerer J, Simon P. 3-Hydroxybenzo[a]pyrene in the urine of workers with occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in different industries. *Occupational and environmental medicine* 2008 Apr;65(4):224-9.
- Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res* 1998 Sep 15;243(2):359-66.
- Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. *Cancer Lett* 2008 Jul 18;266(1):6-11.
- Frelon S, Douki T, Ravanat J-L, Tornabene C, Cadet J. High performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry measurement of radiation-induced base

- damage to isolated and cellular DNA. *Chemical Research in Toxicology* 2000;13:1002-10.
- Gabelova A, Valovicova Z, Horvathova E, Slamenova D, Binkova B, Sram RJ, et al. Genotoxicity of environmental air pollution in three European cities: Prague, Kosice and Sofia. *Mutat Res* 2004 Sep 12;563(1):49-59.
- Gaertner RR, Theriault GP. Risk of bladder cancer in foundry workers: a meta-analysis. *Occupational and environmental medicine* 2002 Oct;59(10):655-63.
- Gamage N, Barnett A, Hempel N, Duggleby RG, Windmill KF, Martin JL, et al. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicol Sci* 2006 Mar;90(1):5-22.
- Ginsberg GL, Atherholt TB. DNA adduct formation in mouse tissues in relation to serum levels of benzo(a)pyrene-diol-epoxide after injection of benzo(a)pyrene or the diol-epoxide. *Cancer Res* 1990 Feb 15;50(4):1189-94.
- Godschalk RW, Moonen EJ, Schilderman PA, Broekmans WM, Kleinjans JC, Van Schooten FJ. Exposure-route-dependent DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* 2000 Jan;21(1):87-92.
- Goodhead DT. The initial physical damage produced by ionizing radiations. *International Journal of Radiation Biology* 1989;56:623-34.
- Goriaux M, Jourdain B, Temime B, Besombes JL, Marchand N, Albinet A, et al. Field comparison of particulate PAH measurements using a low-flow denuder device and conventional sampling systems. *Environmental science & technology* 2006 Oct 15;40(20):6398-404.
- Grant MH, Duthie SJ, Gray AG, Burke MD. Mixed function oxidase and UDP-glucuronyltransferase activities in the human Hep G2 hepatoma cell line. *Biochemical pharmacology* 1988 Nov 1;37(21):4111-6.
- Grimmer G, Brune H, Dettbarn G, Jacob J, Misfeld J, Mohr U, et al. Relevance of polycyclic aromatic hydrocarbons as environmental carcinogens. *Fresenius' journal of analytical chemistry* 1991;339, no (12 ref.), pp. (10):792-5.
- Gyorffy E, Anna L, Gyori Z, Segesdi J, Minarovits J, Soltesz I, et al. DNA adducts in tumour, normal peripheral lung and bronchus, and peripheral blood lymphocytes from smoking and non-smoking lung cancer patients: correlations between tissues and detection by 32P-postlabelling and immunoassay. *Carcinogenesis* 2004 Jul;25(7):1201-9.
- Hagmar L, Bonassi S, Stromberg U, Brogger A, Knudsen LE, Norppa H, et al. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res* 1998 Sep 15;58(18):4117-21.
- Hansen WK, Kelley MR. Review of mammalian DNA repair and translational implications. *J Pharmacol Exp Ther* 2000 Oct;295(1):1-9.
- Harrigan J, McGarrigle B, Sutter T, Olson J. Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo(a)pyrene. *Toxicol In Vitro* 2006 Jun;20(4):426-38.
- Harrigan JA, Vezina CM, McGarrigle BP, Ersing N, Box HC, Maccubbin AE, et al. DNA adduct formation in precision-cut rat liver and lung slices exposed to benzo[a]pyrene. *Toxicol Sci* 2004 Feb;77(2):307-14.
- Hartmann A, Elhajouji A, Kiskinis E, Poetter F, Martus H-J, Fjallman A, et al. Use of the alkaline comet assay for industrial genotoxicity screening - comparative investigation with the micronucleus test *Food Chem Toxicol* 2001 August 2001 39(8):843-58.
- Hassett C, Aicher L, Sidhu JS, Omiecinski CJ. Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Human molecular genetics* 1994 Mar;3(3):421-8.

- Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri K. High susceptibility to lung cancer analyzed in terms of combined genotypes of P450IA1 and Mu-class glutathione S-transferase genes. *Jpn J Cancer Res* 1992 Aug;83(8):866-70.
- He JL, Chen WL, Jin LF, Jin HY. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. *Mutat Res* 2000 Sep 20;469(2):223-31.
- Hirvonen A. Polymorphisms of xenobiotic-metabolizing enzymes and susceptibility to cancer. *Environmental health perspectives* 1999 Feb;107 Suppl 1:37-47.
- Holme JA, Gorria M, Arlt VM, Ovrebo S, Solhaug A, Tekpli X, et al. Different mechanisms involved in apoptosis following exposure to benzo[a]pyrene in F258 and Hepalcl7 cells. *Chem Biol Interact* 2007 Apr 5;167(1):41-55.
- Hussain SP, Amstad P, Raja K, Sawyer M, Hofseth L, Shields PG, et al. Mutability of p53 hotspot codons to benzo(a)pyrene diol epoxide (BPDE) and the frequency of p53 mutations in nontumorous human lung. *Cancer Res* 2001 Sep 1;61(17):6350-5.
- IARC. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man: Polycyclic aromatic hydrocarbons. In: IARC, editor. Lyon1983. p. 211-24.
- Jager J, Rakovic M. Sulphur-dioxide-induced qualitative changes in polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed on solid carriers. *Journal of hygiene, epidemiology, microbiology, and immunology* 1974;18(2):137-43.
- Jongeneelen FJ. Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *The Annals of occupational hygiene* 2001 Jan;45(1):3-13.
- Ketterer B, Harris JM, Talaska G, Meyer DJ, Pemble SE, Taylor JB, et al. The human glutathione S-transferase supergene family, its polymorphism, and its effects on susceptibility to lung cancer. *Environmental health perspectives* 1992 Nov;98:87-94.
- Khalili N, Scheff P, Holsen T. PAH source fingerprints for coke ovens, diesel and gasoline engines, highway tunnels, and wood combustion emissions. *Atmospheric environment* 1995;29:533-42.
- Kim J, Stransbury K, Walker N, Trush M, Strickland P, Sutter T. Metabolism of benzo(a)pyrene and benzo(a)pyrene-7,8-diol by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis* 1998;19(10):1847-53.
- Kim JY, Chung JY, Park JE, Lee SG, Kim YJ, Cha MS, et al. Benzo[a]pyrene induces apoptosis in RL95-2 human endometrial cancer cells by cytochrome P450 1A1 activation. *Endocrinology* 2007 Oct;148(10):5112-22.
- King CD, Rios GR, Green MD, Tephly TR. UDP-glucuronosyltransferases. *Current drug metabolism* 2000 Sep;1(2):143-61.
- Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004;44:239-67.
- Kuljukka-Rabb T, Peltonen K, Isotalo S, Mikkonen S, Rantanen L, Savela K. Time- and dose-dependent DNA binding of PAHs derived from diesel particle extracts, benzo[a]pyrene and 5-methylchrysene in a human mammary carcinoma cell line (MCF-7). *Mutagenesis* 2001 Jul;16(4):353-8.
- Kuljukka T, Vaaranrinta R, Veidebaum T, Sorsa M, Peltonen K. Exposure to PAH compounds among cokery workers in the oil shale industry. *Environmental health perspectives* 1996 May;104 Suppl 3:539-41.
- Larsson R, Cerutti P. Translocation and enhancement of phosphotransferase activity of protein kinase C following exposure in mouse epidermal cells to oxidants. *Cancer Res* 1989 Oct 15;49(20):5627-32.

- Lazarova M, Slamenova D. Genotoxic effects of a complex mixture adsorbed onto ambient air particles on human cells in vitro; the effects of Vitamins E and C. *Mutat Res* 2004;557:167-75.
- LCSQA. rapport de recommandation pour le prélèvement et l'analyse des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) dans l'air ambiant: Laboratoire Central de la Surveillance de la Qualité de l'Air 2008.
- Le Page F, Margot A, Grollman AP, Sarasin A, Gentil A. Mutagenicity of a unique 8-oxoguanine in a human Ha-ras sequence in mammalian cells. *Carcinogenesis* 1995 Nov;16(11):2779-84.
- Lee ML, Novotny M, Bartle KD. Gas chromatography/mass spectrometric and nuclear magnetic resonance determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in airborne particulates. *Analytical chemistry* 1976 Sep;48(11):1566-72.
- Lei W, Yu R, Mandlekar S, Kong AN. Induction of apoptosis and activation of interleukin 1beta-converting enzyme/Ced-3 protease (caspase-3) and c-Jun NH2-terminal kinase 1 by benzo(a)pyrene. *Cancer Res* 1998 May 15;58(10):2102-6.
- Leoz-Garziandia E. Programme pilote national de surveillance des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP): Institut National de l'environnement industriel et des risques (INERIS) Décembre 2003. Report No.: DRC/AIRE-03-45568 (I)-Elen°876v2.
- Lewtas J, Gallagher J. Complex mixtures of urban air pollutants: identification and comparative assessment of mutagenic and tumorigenic chemicals and emission sources. *IARC scientific publications* 1990(104):252-60.
- Lodovici M, Venturini M, Marini E, Grechi D, Dolara P. Polycyclic aromatic hydrocarbons air levels in Florence, Italy, and their correlation with other air pollutants. *Chemosphere* 2003 Jan;50(3):377-82.
- Lundstedt S, White PA, Lemieux CL, Lynes KD, Lambert IB, Oberg L, et al. Sources, fate, and toxic hazards of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at PAH-contaminated sites. *Ambio* 2007 Sep;36(6):475-85.
- Machala M, Vondracek J, Blaha L, Ciganek M, Neca JV. Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay. *Mutat Res* 2001 Oct 18;497(1-2):49-62.
- Mahadevan B, Keshava C, Musafia-Jeknic T, Pecaj A, Weston A, Baird W. Altered gene expression patterns in MCF-7 cells induced by the urban dust particulate complex mixture standard reference material 1649a. *Cancer Res* 2005;65(4):1251-8.
- Mahadevan B, Marston C, Dashwood W, Li Y, Pereira C, Baird W. Effect of a standardized complex mixture derived from coal tar on the metabolic activation of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human cells in culture. *Chem Res Toxicol* 2005;18(2):224-31.
- Mahadevan B, Marston CP, Luch A, Dashwood WM, Brooks E, Pereira C, et al. Competitive inhibition of carcinogen-activating CYP1A1 and CYP1B1 enzymes by a standardized complex mixture of PAH extracted from coal tar. *Int J Cancer* 2007 Mar 15;120(6):1161-8.
- Marchand A, Barouki R, Garlatti M. Regulation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression by CYP1A1 activity. *Molecular pharmacology* 2004 Apr;65(4):1029-37.
- Marchand N, Besombes J-L, Masclet P, Jaffrezo J-L. Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Two French Alpine Valleys In: Heidelberg SB, editor. *Environmental Chemistry* 2005. p. 409-17.
- Marchand N, Besombes J, Chevron N, Masclet P, Aymoz G, JL. J. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the atmospheres of two French alpine valleys: sources and temporal patterns. *Atmos Chem Phys*, , 2004;4(5):1167-81.

- Marie C. Recherche de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques à travers l'étude des lésions de l'ADN chez l'homme. Grenoble: Université Joseph Fourier; 2007.
- Marie C, Maitre A, Douki T, Gateau M, Tarantini A, Guiraud P, et al. Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo[a]pyrene DNA adducts. *J Appl Toxicol* 2008 Jul;28(5):579-90.
- Marie C, Ravanat JL, Badouard C, Marques M, Balducci F, Maitre A. Urinary levels of oxidative DNA and RNA damage among workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in silicon production: comparison with 1-hydroxypyrene. *Environmental and molecular mutagenesis* 2009 Mar;50(2):88-95.
- Marston CP, Pereira C, Ferguson J, Fisher K, Hedstrom O, Dashwood W-M, et al. Effect of a complex environmental mixture from coal tar containing PAH on the tumor initiation, PAH-DNA binding and metabolic activation of carcinogenic PAH in mouse epidermis. *Carcinogenesis* 2001;22(7):1077-86.
- Masclet P, Nikolau K, Mouvier G, editors. Identification des sources d'hydrocarbures aromatiques polycycliques particulières dans l'atmosphère urbaine. In *Physico-Chemical behavior of atmospheric pollutant Third European Symposium*; 1984; Varese, Italy.
- Mastral AM, Lopez JM, Callen MS, Garcia T, Murillo R, Navarro MV. Spatial and temporal PAH concentrations in Zaragoza, Spain. *Sci Total Environ* 2003 May 20;307(1-3):111-24.
- Mastrangelo G, Fadda E, Marzia V. Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environ Health Perspect* 1996;104(11):1166-70.
- Mates JM, Segura JA, Alonso FJ, Marquez J. Intracellular redox status and oxidative stress: implications for cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Archives of toxicology* 2008 May;82(5):273-99.
- Melendez-Colon VJ, Luch A, Seidel A, Baird WM. Formation of stable DNA adducts and apurinic sites upon metabolic activation of bay and fjord region polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell cultures. *Chem Res Toxicol* 2000 Jan;13(1):10-7.
- Mensing T, Marczynski B, Engelhardt B, Wilhelm M, Preuss R, Kappler M, et al. DNA adduct formation of benzo[a]pyrene in white blood cells of workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int J Hyg Environ Health* 2005;208(3):173-8.
- Merchant M, Wang X, Kamps C, Rosengren R, Morrison V, Safe S. Mechanism of benzo[a]pyrene-induced Cyp1a-1 gene expression in mouse Hepa 1c1c7 cells: role of the nuclear 6 s and 4 s proteins. *Archives of biochemistry and biophysics* 1992 Jan;292(1):250-7.
- Miao W, Hu L, Scrivens PJ, Batist G. 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. *J Biol Chem* 2005 May 27;280(21):20340-8.
- Miller KP, Ramos KS. Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. *Drug metabolism reviews* 2001 Feb;33(1):1-35.
- Ministère de l'emploi. Les expositions aux produits cancérigènes enquête SUMER. 2005.
- Moir D, Viau A, Chu I, Withey J, McMullen E. Pharmacokinetics of benzo[a]pyrene in the rat. *J Toxicol Environ Health A* 1998 Apr 10;53(7):507-30.
- Moody RP, Nadeau B, Chu I. In vivo and in vitro dermal absorption of benzo[a]pyrene in rat, guinea pig, human and tissue-cultured skin. *J Dermatol Sci* 1995 Jan;9(1):48-58.
- Morel Y, Mermod N, Barouki R. An autoregulatory loop controlling CYP1A1 gene expression: role of H(2)O(2) and NFI. *Mol Cell Biol* 1999 Oct;19(10):6825-32.

- Moriya M. Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C-->T.A transversions in simian kidney cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993 Feb 1;90(3):1122-6.
- Musafia-Jeknic T, Mahadevan B, Pereira C, Baird WM. Long-term effects of a standardized complex mixture of urban dust particulate on the metabolic activation of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human cells in culture. *Toxicol Sci* 2005 Dec;88(2):358-66.
- Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* 2009 May 15;284(20):13291-5.
- Nikolaou K, Masclat P, Mouvier G. Sources and chemical reactivity of polynuclear aromatic hydrocarbons in the atmosphere — a critical review *Science of the total environment* 1984;32 (2):103-32.
- Nisbet I, Lagoy P. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regul Toxicol Pharmacol* 1992;16(3):290-300.
- Oesch F. Mammalian epoxide hydrolases: inducible enzymes catalysing the inactivation of carcinogenic and cytotoxic metabolites derived from aromatic and olefinic compounds. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 1973 May;3(5):305-40.
- Osborne MR, Harvey RG, Brookes P. The reaction of trans-7,8-dihydroxy-anti-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene with DNA involves attack at the N7-position of guanine moieties. *Chem Biol Interact* 1978 Jan;20(1):123-30.
- Papageorgopoulou A, Manoli E, Touloumi E, Samara C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air of Greek towns in relation to other atmospheric pollutants. *Chemosphere* 1999 Dec;39(13):2183-99.
- Pastorelli R, Guanci M, Cerri A, Negri E, La Vecchia C, Fumagalli F, et al. Impact of inherited polymorphisms in glutathione S-transferase M1, microsomal epoxide hydrolase, cytochrome P450 enzymes on DNA, and blood protein adducts of benzo(a)pyrene-diolepoxide. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998 Aug;7(8):703-9.
- Patton WP, Chakravarthy U, Davies RJ, Archer DB. Comet assay of UV-induced DNA damage in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999 Dec;40(13):3268-75.
- Penning TM, Burczynski ME, Hung CF, McCoull KD, Palackal NT, Tsuruda LS. Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chem Res Toxicol* 1999 Jan;12(1):1-18.
- Penning TM, Ohnishi ST, Ohnishi T, Harvey RG. Generation of reactive oxygen species during the enzymatic oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiols catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. *Chem Res Toxicol* 1996 Jan-Feb;9(1):84-92.
- Peter Guengerich F, Chun YJ, Kim D, Gillam EM, Shimada T. Cytochrome P450 1B1: a target for inhibition in anticarcinogenesis strategies. *Mutat Res* 2003 Feb-Mar;523-524:173-82.
- Pierce R, Katz M. Chromatographic isolation and spectral analysis of polycyclic quinones Application to air pollution analysis. *Environ Sci Technol* 1976;10(1):45-51.
- Pitts JN, Jr., Lokensgard DM, Ripley PS, KA VANC, L VANV, Shaffer SD, et al. "Atmospheric" Epoxidation of Benzo[a]pyrene by Ozone: Formation of the Metabolite Benzo[a]pyrene-4,5-Oxide. *Science (New York, NY)* 1980 Dec 19;210(4476):1347-9.

- Pitts JN, Jr., Van Cauwenberghe KA, Grosjean D, Schmid JP, Fitz DR, Belser WL, et al. Atmospheric reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons: facile formation of mutagenic nitro derivatives. *Science (New York, NY)* 1978 Nov 3;202(4367):515-9.
- Pouget J-P, Douki T, Richard M-J, Cadet J. DNA damage induced in cells by gamma and UVA radiations as measured by HPLC/GC-MS, HPLC-EC and comet assay. *Chemical Research in Toxicology* 2000;13:541-9.
- Prevedouros K, Brorstrom-Lunden E, C JH, Jones KC, Lee RG, Sweetman AJ. Seasonal and long-term trends in atmospheric PAH concentrations: evidence and implications. *Environ Pollut* 2004;128(1-2):17-27.
- Prochaska HJ, De Long MJ, Talalay P. On the mechanisms of induction of cancer-protective enzymes: a unifying proposal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985 Dec;82(23):8232-6.
- Prough RA, Burke MD, Mayer RT. Direct fluorometric methods for measuring mixed function oxidase activity. *Methods in enzymology* 1978;52:372-7.
- Pushparajah DS, Umachandran M, Nazir T, Plant KE, Plant N, Lewis DF, et al. Up-regulation of CYP1A/B in rat lung and liver, and human liver precision-cut slices by a series of polycyclic aromatic hydrocarbons; association with the Ah locus and importance of molecular size. *Toxicol In Vitro* 2008 Feb;22(1):128-45.
- Qu SX, Stacey NH. Formation and persistence of DNA adducts in different target tissues of rats after multiple administration of benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis* 1996 Jan;17(1):53-9.
- Radjendirane V, Jaiswal AK. Antioxidant response element-mediated 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induction of human NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression. *Biochemical pharmacology* 1999 Nov 15;58(10):1649-55.
- Randerath K, Reddy MV, Gupta RC. 32P-labeling test for DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981 Oct;78(10):6126-9.
- Rogge W, Hildemann L, Mazurek M, Cass G, Simoneit B. Sources of fine organic aerosol. II: Noncatalyst and catalyst-equipped automobiles and heavy-duty diesel trucks. *Environ Sci Technol* 1993;27(4):636-51.
- Ross J, Nelson G, Kligerman A, Erexson G, Bryant M, Earley K, et al. Formation and persistence of novel benzo(a)pyrene adducts in rat lung, liver, and peripheral blood lymphocyte DNA. *Cancer Res* 1990 Aug 15;50(16):5088-94.
- Rossi C, Poli P, Buschini A, Cassoni F, Cattani S, DeMunari E. Comparative investigations among meteorological conditions, air chemical-physical pollutants and airborne particulate mutagenicity: a long-term study (1990-1994) from a northern Italian town. *Chemosphere* 1995 May;30(10):1829-45.
- Safe S. Limitations of the toxic equivalency factor approach for risk assessment of TCDD and related compounds. *Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis* 1997;17(4-5):285-304.
- Salama SA, Sierra-Torres CH, Oh HY, Hamada FA, Au WW. Variant metabolizing gene alleles determine the genotoxicity of benzo[a]pyrene. *Environmental and molecular mutagenesis* 2001;37(1):17-26.
- Salas VM, Burchiel SW. Apoptosis in Daudi human B cells in response to benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998 Aug;151(2):367-76.
- Saldivar SJ, Wang Y, Zhao H, Shao L, Lin J, Spitz MR, et al. An association between a NQO1 genetic polymorphism and risk of lung cancer. *Mutat Res* 2005 Apr 4;582(1-2):71-8.

- Sayer J, Chadha A, Agarwal S, Yeh H, Yagi H, Jerina D. Covalent nucleoside adducts of benzo[a]pyrene 7,8-diol 9,10-epoxides: structural reinvestigation and characterization of a novel adenosine adduct on the ribose moiety. *J Org Chem* 1991;56 (1):20-9.
- Schneider K, Roller M, Kalberlah F, Schuhmacher-Wolz U. Cancer risk assessment for oral exposure to PAH mixtures. *J Appl Toxicol* 2002 Jan-Feb;22(1):73-83.
- Scientific committee on food. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons – Occurrence in foods, dietary exposure and health effects: European Commission health and consumer protection directorate-general 2002 4 December 2002 Contract No.: SCF/CS/CNTM/PAH/29 ADD1 Final.
- Sevastyanova O, Binkova B, Topinka J, Sram RJ, Kalina I, Popov T, et al. In vitro genotoxicity of PAH mixtures and organic extract from urban air particles part II: human cell lines. *Mutat Res* 2007 Jul 1;620(1-2):123-34.
- Shah P, Jogani V, Bagchi T, Misra A. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnology progress* 2006 Jan-Feb;22(1):186-98.
- Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J* 2001 Nov 15;360(Pt 1):1-16.
- Shen YM, Troxel AB, Vedantam S, Penning TM, Field J. Comparison of p53 mutations induced by PAH o-quinones with those caused by anti-benzo[a]pyrene diol epoxide in vitro: role of reactive oxygen and biological selection. *Chem Res Toxicol* 2006 Nov;19(11):1441-50.
- Sheu HL, Lee WJ, Lin SJ, Fang GC, Chang HC, You WC. Particle-bound PAH content in ambient air. *Environ Pollut* 1997;96(3):369-82.
- Shimada T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet* 2006 Aug;21(4):257-76.
- Shimada T, El-Bayoumy K, Upadhyaya P, Sutter TR, Guengerich FP, Yamazaki H. Inhibition of human cytochrome P450-catalyzed oxidations of xenobiotics and procarcinogens by synthetic organoselenium compounds. *Cancer Res* 1997 Nov 1;57(21):4757-64.
- Shimada T, Fujii-Kuriyama Y. Metabolic activation of PAH to carcinogens by cyt P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci* 2004;95(1):1-6.
- Shimada T, Guengerich FP. Inhibition of human cytochrome P450 1A1-, 1A2-, and 1B1-mediated activation of procarcinogens to genotoxic metabolites by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem Res Toxicol* 2006 Feb;19(2):288-94.
- Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H, Amin S, Hecht SS, Guengerich FP, et al. Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res* 1996 Jul 1;56(13):2979-84.
- Shimada T, Inoue K, Suzuki Y, Kawai T, Azuma E, Nakajima T, et al. Arylhydrocarbon receptor-dependent induction of liver and lung cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in genetically engineered C57BL/6J mice. *Carcinogenesis* 2002 Jul;23(7):1199-207.
- Shimada T, Martin MV, Pruess Schwartz D, Marnett LJ, Guengerich FP. Roles of Individual Human Cytochrome P-450 Enzymes in the Bioactivation of Benzo(a)pyrene, 7,8-Dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene, and Other Dihydrodiol Derivatives of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Cancer Research* 1989;49:6304-12.
- Shimada T, Murayama N, Okada K, Funae Y, Yamazaki H, Guengerich FP. Different mechanisms for inhibition of human cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem Res Toxicol* 2007 Mar;20(3):489-96.
- Shimada T, Oda Y, Gillam EM, Guengerich FP, Inoue K. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons and other procarcinogens by cytochromes P450 1A1 and P450

- 1B1 allelic variants and other human cytochromes P450 in *Salmonella typhimurium* NM2009. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2001 Sep;29(9):1176-82.
- Shimada T, Sugie A, Shindo M, Nakajima T, Azuma E, Hashimoto M, et al. Tissue-specific induction of cytochromes P450 1A1 and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in engineered C57BL/6J mice of arylhydrocarbon receptor gene. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003 Feb 15;187(1):1-10.
- Shimada T, Yamazaki H, Foroozesh M, Hopkins NE, Alworth WL, Guengerich FP. Selectivity of polycyclic inhibitors for human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1. *Chem Res Toxicol* 1998 Sep;11(9):1048-56.
- Simcik M, Eisenreich S, Liou P. Source apportionment and source/sink relationships of PAHs in the coastal atmosphere of Chicago and Lake Michigan *Atmospheric Environment* 1999;33 (30):5071-9.
- Singh NP, Mc Coy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175(1):184-91.
- Singh R, Sram RJ, Binkova B, Kalina I, Popov TA, Georgieva T, et al. The relationship between biomarkers of oxidative DNA damage, polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts, antioxidant status and genetic susceptibility following exposure to environmental air pollution in humans. *Mutat Res* 2007 Jul 1;620(1-2):83-92.
- Skarek M, Janosek J, Cupr P, Kohoutek J, Novotna-Rychetska A, Holoubek I. Evaluation of genotoxic and non-genotoxic effects of organic air pollution using in vitro bioassays. *Environment international* 2007 Oct;33(7):859-66.
- Skupinska K, Misiewicz I, Kasprzycka-Guttman T. A comparison of the concentration-effect relationships of PAHs on CYP1A induction in HepG2 and Mcf7 cells. *Arch Toxicol* 2006.
- Skupinska K, Misiewicz I, Kasprzycka-Guttman T. A comparison of the concentration-effect relationships of PAHs on CYP1A induction in HepG2 and Mcf7 cells. *Archives of toxicology* 2007 Mar;81(3):183-200.
- Smith D, Harrison RM. Concentrations, trends and vehicle source profile of polynuclear aromatic hydrocarbons in the U.K atmosphere. *Atmospheric Environment* 1996;30 (14):2513-25.
- Smithgall TE, Harvey RG, Penning TM. Spectroscopic identification of ortho-quinones as the products of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol oxidation catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. A potential route of proximate carcinogen metabolism. *J Biol Chem* 1988 Feb 5;263(4):1814-20.
- Solhaug A, Ovrebo S, Mollerup S, Lag M, Schwarze PE, Nesnow S, et al. Role of cell signaling in B[a]P-induced apoptosis: characterization of unspecific effects of cell signaling inhibitors and apoptotic effects of B[a]P metabolites. *Chem Biol Interact* 2005 Jan 15;151(2):101-19.
- Solhaug A, Refsnes M, Lag M, Schwarze PE, Husoy T, Holme JA. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce both apoptotic and anti-apoptotic signals in Hepa1c1c7 cells. *Carcinogenesis* 2004 May;25(5):809-19.
- Spink DC, Wu SJ, Spink BC, Hussain MM, Vakharia DD, Pentecost BT, et al. Induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo(k)fluoranthene and benzo(a)pyrene in T-47D human breast cancer cells: roles of PAH interactions and PAH metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 2008 Feb 1;226(3):213-24.
- Srivastava SK, Hu X, Xia H, Awasthi S, Amin S, Singh SV. Metabolic fate of glutathione conjugate of benzo[a]pyrene-(7R,8S)-diol (9S,10R)-epoxide in human liver. *Archives of biochemistry and biophysics* 1999 Nov 15;371(2):340-4.

- Staal YC, Hebels DG, van Herwijnen MH, Gottschalk RW, van Schooten FJ, van Delft JH. Binary PAH mixtures cause additive or antagonistic effects on gene expression but synergistic effects on DNA adduct formation. *Carcinogenesis* 2007 Dec;28(12):2632-40.
- Sterling K, Raha A, Bresnick E. Induction of CYP1A1 gene expression in mouse hepatoma cells by benzo[e]pyrene, a ligand of the 4S polycyclic hydrocarbon-binding protein. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994 Sep;128(1):18-24.
- Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free radical biology & medicine* 1995 Feb;18(2):321-36.
- Strickland P, Kang D. Urinary 1-hydroxypyrene and other PAH metabolites as biomarkers of exposure to environmental PAH in air particulate matter. *Toxicology letters* 1999 Sep 5;108(2-3):191-9.
- Swenberg JA, La DK, Scheller NA, Wu KY. Dose-response relationships for carcinogens. *Toxicology letters* 1995 Dec;82-83:751-6.
- Szczeklik A, Szczeklik J, Galuszka Z, Musial J, Kolarzyk E, Targosz D. Humoral immunosuppression in men exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and related carcinogens in polluted environments. *Environmental health perspectives* 1994 Mar;102(3):302-4.
- Tebbens BD, Thomas JF, Mukai M. Fate of arenes incorporated with airborne soot. *American Industrial Hygiene Association journal* 1966 Sep-Oct;27(5):415-22.
- Thorslund T, Farrer D. Development of relative potency estimated for PAHs and hydrocarbon combustion product fractions compared to benzo(a)pyrene and their use in carcinogenic risk assessments. Washington DC: U.S. Environmental Protection Agency 1991.
- Tice RR, Andrews PW, Hirai O, Singh NP. The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. *Adv Exp Med Biol* 1991;283:157-64.
- Till M, Riebinger D, Schmitz H, Schrenk D. Potency of various polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of CYP1A1 in rat hepatocyte cultures. *Chem Biol Interact* 1999;17(2):135-50.
- Tokiwa H, Sera N, Nakashima A, Nakashima K, Nakanishi Y, Shigematu N. Mutagenic and carcinogenic significance and the possible induction of lung cancer by nitro aromatic hydrocarbons in particulate pollutants. *Environmental health perspectives* 1994 Oct;102 Suppl 4:107-10.
- Topinka J, Schwarz LR, Wiebel FJ, Cerna M, Wolff T. genotoxicity of urban air pollutants in the Czech Republic Part 2. *Mutat Res* 2000;469:83-93.
- Topinka J, Marvanova S, Vondracek J, Sevastyanova O, Novakova Z, Krcmar P, et al. DNA adducts formation and induction of apoptosis in rat liver epithelial 'stem-like' cells exposed to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat Res* 2008 Feb 1;638(1-2):122-32.
- Tsai PJ, Shieh HY, Lee WJ, Chen HL, Shih TS. Urinary 1-hydroxypyrene as a biomarker of internal dose of polycyclic aromatic hydrocarbons in carbon black workers. *The Annals of occupational hygiene* 2002 Mar;46(2):229-35.
- Uhl M, Helma C, Knasmuller S. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells. *Mutat Res* 2000 Jul 10;468(2):213-25.
- Unwin J, Cocker J, Scobbie E, Chambers H. An assessment of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in the UK. *The Annals of occupational hygiene* 2006 Jun;50(4):395-403.

- USEPA. Review and evaluation of the evidence for cancer associated with air pollution. Arlington: U.S. Environmental Protection Agency 1984 Contract No.: EPA-450/5-83-006R.
- USEPA. Provisional guidance for quantitative risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons. Cincinnati: United States Environmental Protection Agency 1993
- Vakharia DD, Liu N, Pause R, Fasco M, Bessette E, Zhang QY, et al. Effect of metals on polycyclic aromatic hydrocarbon induction of CYP1A1 and CYP1A2 in human hepatocyte cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001 Jan 15;170(2):93-103.
- Vakharia DD, Liu N, Pause R, Fasco M, Bessette E, Zhang QY, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon/metal mixtures: effect on PAH induction of CYP1A1 in human HEPG2 cells. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2001 Jul;29(7):999-1006.
- Valentin-Severin I, Le Hegarat L, Lhuguenot J, Le Bon A, Chagnon M. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutat Res* 2003;536(1-2):79-90.
- van Hoffen A, Balajee AS, van Zeeland AA, Mullenders LH. Nucleotide excision repair and its interplay with transcription. *Toxicology* 2003 Nov 15;193(1-2):79-90.
- Van Rooij JG, Van Lieshout EM, Bodelier-Bade MM, Jongeneelen FJ. Effect of the reduction of skin contamination on the internal dose of creosote workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Scandinavian journal of work, environment & health* 1993 Jun;19(3):200-7.
- van Schooten FJ, Hillebrand MJ, van Leeuwen FE, van Zandwijk N, Jansen HM, den Engelse L, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon--DNA adducts in white blood cells from lung cancer patients: no correlation with adduct levels in lung. *Carcinogenesis* 1992 Jun;13(6):987-93.
- VanRooij JG, Bodelier-Bade MM, Jongeneelen FJ. Estimation of individual dermal and respiratory uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons in 12 coke oven workers. *British journal of industrial medicine* 1993 Jul;50(7):623-32.
- Venugopal R, Jaiswal AK. Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* 1998 Dec 17;17(24):3145-56.
- Waller CL, McKinney JD. Three-dimensional quantitative structure-activity relationships of dioxins and dioxin-like compounds: model validation and Ah receptor characterization. *Chem Res Toxicol* 1995 Sep;8(6):847-58.
- Wilkening S, Stahl F, Bader A. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 2003 Aug;31(8):1035-42.
- Wolfe AR, Smith TJ, Meehan T. Benzo[a]pyrene diol epoxide forms covalent adducts with deoxycytidylic acid by alkylation at both exocyclic amino N(4) and ring imino N-3 positions. *Chem Res Toxicol* 2004 Apr;17(4):476-91.
- Xue W, Warshawsky D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005 Aug 1;206(1):73-93.
- Yang SK. Stereo selectivity of cytochrome P450 isozymes and epoxide hydrolase in the metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biochem Pharmacol* 1988;37:61-70.
- Yang Y, Griffiths WJ, Midtvedt T, Sjovald J, Rafter J, Gustafsson JA. Characterization of conjugated metabolites of benzo[a]pyrene in germ-free rat urine by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Chem Res Toxicol* 1999 Dec;12(12):1182-9.

- Yunker MB, Macdonald R, Vingarzan R, Mitchell RH, Goyette D, Sylvestre S. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition *Organic Geochemistry* 2002;33(4):489-515.
- Zaleski J, Bansal SK, Gessner T. Formation of glucuronide, sulphate and glutathione conjugates of benzo[a]pyrene metabolites in hepatocytes isolated from inbred strains of mice. *Carcinogenesis* 1983 Nov;4(11):1359-66.

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS AFFICHEES

Articles scientifiques :

Adeline Tarantini, Anne Maitre, Emmanuel Lefebvre, Marie Marquès, Caroline Marie, Jean-Luc Ravanat, and Thierry Douki

Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo[a]pyrene as a pure compound and in complex mixtures.

article accepté dans Mutation research Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis

Adeline Tarantini, Thierry Douki, Emmanuel Lefèbvre, Caroline Marie, Jean-Luc Ravanat, Anne Maître

Genotoxicity of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons mixtures: From artificial to realistic mixtures

Toxicol Lett. 2009. 189(suppl) 136-137

Abstracts of the 46th Congress of the European Societies of Toxicology

Marie C, Maître A, Douki T, Gateau M, Tarantini A, Guiraud P, Favier A, Ravanat JL.

Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo[a]pyrene DNA adducts J Appl Toxicol. 2008 Jul;28(5):579-90

Communications affichées :

- Journées de la recherche médicale – université Joseph Fourier, ufr de médecine – 20 et 21 avril 2007 : évaluation de la génotoxicité d'un mélange d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques prélevé en milieu industriel ou urbain.

Adeline Tarantini, Cyndie Picot, Pascale Guiraud, Anne Maître

- 38ème meeting de l'EEMS (european environmental mutagen society), Cavtat (Croatie) du 21 au 25 septembre 2008 : DNA damage assessed by Comet assay and HPLC-mass spectrometry in human cells exposed to Benzo[a]pyrene as a pure chemical or in environmental mixtures

Adeline Tarantini, Thierry Douki, Caroline Marie, Jean-Luc Ravanat , Carine Badouard, Anne Maître

- Journées de la recherche médicale – université Joseph Fourier, ufr de médecine – 4 avril 2008 : Evaluation de la génotoxicité des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques en mélange

Adeline Tarantini, Thierry Douki, Caroline Marie, Jean-Luc Ravanat, Emmanuel Lefèbvre , Anne Maître

-Journée annuelle du cluster environnement de la Région Rhône-Alpes- 13 mai 2008 :

Evaluation de la génotoxicité des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques en mélange

Adeline Tarantini, Thierry Douki, Caroline Marie, Jean-Luc Ravanat, Emmanuel Lefèbvre , Anne Maître

2^{ème} prix du meilleur poster

-Colloque francophone international « Les hydrocarbures aromatiques polycycliques, de la recherche à la prévention », 3 et 4 septembre 2008, Montréal : évaluation de la génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) en mélange

Adeline Tarantini, Thierry Douki, Caroline Marie, Jean-Luc Ravanat , Emmanuel Lefebvre, Carine Badouard, Anne Maître

- Journées de la recherche médicale – université Joseph Fourier, ufr de médecine – 24 et 25 avril 2009

- Journée annuelle du cluster environnement de la Région Rhône-Alpes- 11 mai 2008
génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques: des mélanges synthétiques aux mélanges réels

Adeline Tarantini, Thierry Douki, Caroline Marie, Jean-Luc Ravanat, Emmanuel Lefèbre , Anne Maître

-46ème congrès de la société européenne de toxicologie, Dresde du 13 au 16 septembre 2009 :
Genotoxicity of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) : from artificial to realistic mixtures.

Adeline Tarantini, Emmanuel Lefebvre, Caroline Marie, Jean-Luc Ravanat, Anne Maitre and Thierry Douki

Table des matières

<i>SOMMAIRE</i>	1
<i>LISTE DES ABREVIATIONS</i>	7
<i>CHAPITRE I- ETAT DES CONNAISSANCES</i>	11
<i>I. Généralités</i>	11
1. <i>Définition</i>	11
2. <i>Source d'exposition des populations aux HAP</i>	13
2.1 Exposition environnementale	13
2.1.1 L'alimentation	13
2.1.2 Tabagisme	14
2.1.3 L'atmosphère.....	14
2.1.4 Emission industrielle	15
2.2 Exposition professionnelle aux HAP	15
3. <i>Voie d'absorption et d'élimination des HAP</i>	16
3.1 Voies d'exposition	16
3.2 Voies d'absorption	17
3.3 Voies d'élimination	Erreur ! Signet non défini.
4. <i>Toxicité des HAP</i>	18
5. <i>Classification</i>	18
<i>II. Métabolisme et mécanisme d'action des HAP</i>	21
1. <i>Voies de métabolisation des HAP</i>	22
1.1 La voie des CYP	23
1.2 Voie d'oxydation mono-électronique par les peroxydases	24
1.3 Voie des quinones	25
2. <i>Les enzymes de la métabolisation</i>	26
2.1 Mécanismes d'induction des gènes de phase I et des gènes de phase II par les HAP ..	27
Les composés sulfo-conjugués, glucuro-conjugués et conjugués au glutathion sont les principaux produits résultant de la biotransformation du B[a]P dans des hépatocytes de rat (Zaleski 1983).	29
2.2 Les cytochromes P450	32
2.2.1 Définition	32
2.2.2 Expression et activité des CYP1	33
2.2.3 Induction et inhibition des CYP1A1 et CYP1B1	33
2.3 Epoxyde hydrolase EH	34
2.4 Glutathion-S-transférase (GST)	34
2.5 UDP-glucuronyl-transférases (UGT) et sulfotransférases (SULT)	35

2.6	Autres enzymes de phase II.....	35
3.	<i>Susceptibilité génétique aux HAP</i>	36
III.	<i>Des dommages de l'ADN au cancer</i>	38
1.	<i>Dommages à l'ADN induits par le BaP</i>	38
1.1	Adduits à l'ADN.....	38
1.1.1	Adduits de la voie du BPDE.....	38
1.1.2	Adduits de la voie du radical cation	39
1.1.3	Adduits de la voie des quinones	40
1.2	Espèces réactives de l'oxygène	41
2.	<i>Réparation et apoptose</i>	42
2.1	Réparation de l'ADN	42
2.1.1	La voie NER.....	42
2.1.2	La voie BER	43
2.1.3	Réparation des cassures.....	44
2.2	Apoptose.....	44
3.	<i>Mutagenèse et cancérogénèse</i>	44
4.	<i>Etudes in vitro de la génotoxicité des HAP</i>	48
4.1	Introduction sur les lignées cellulaires	48
4.2	Tests de génotoxicité et de mutagenicité	49
4.2.1	Test des comètes.....	50
4.2.2	Mesure des adduits BPDE à l'ADN	51
4.2.3	Test des micronoyaux.....	53
4.2.4	Test des aberrations chromosomiques.....	54
4.2.5	Test d'Ames	54
IV.	<i>Evaluation environnementale du risque lié à l'exposition aux HAP</i>	55
1.	<i>Surveillance atmosphérique</i>	57
1.1	Réglementation, méthodes de prélèvement et d'analyse	57
1.1.1	Environnement général	57
1.1.2	Milieu industriel	58
1.2	Concentrations atmosphériques en HAP	60
1.2.1	Environnement général	60
1.2.2	Milieu industriel	61
2.	<i>Surveillance biologique de l'exposition</i>	63
3.	<i>Problématique des mélanges : approches pour l'évaluation des risques pour la santé humaine</i>	64
3.1	Approche par les Facteurs d'Equivalence Toxique (FET).....	64
V.	<i>Présentation du sujet de thèse</i>	67
<i>CHAPITRE 2-ETUDE DES HAP PURS SUR LA LIGNEE HUMAINE HEPG2</i>		70
I.	<i>Effet du B[a]P seul sur les cellules HepG2</i>	70
1.	<i>Cytotoxicité du B[a]P</i>	70
2.	<i>Formation des cassures de l'ADN dans les cellules HepG2 exposées au B[a]P</i>	71

2.1	Cinétique de formation des cassures de l'ADN induites par l'exposition au B[a]P	71
2.2	Formation des cassures à l'ADN en fonction de la concentration en B[a]P	72
3.	<i>Formation des adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN dans les cellules HepG2 exposées au B[a]P</i>	73
3.1	Cinétique de formation des adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN induites par l'exposition des cellules à des concentrations de 0,25 et 8 µM de B[a]P	74
3.2	Formation des adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN en fonction de la concentration en B[a]P	76
4.	<i>Conclusion</i>	77
II.	<i>Effet d'autres HAP particulières sur les cellules HepG2</i>	77
1.	<i>Cytotoxicité de différents HAP particulières à 1 et 8 µM</i>	78
2.	<i>Cassures à l'ADN induites dans les cellules HepG2 exposées à différents HAP</i>	79
3.	<i>Conclusions</i>	80
 <i>CHAPITRE 3-ETUDE DE MELANGES SYNTHETIQUES D'HAP</i>		82
I.	<i>Modulation de la génotoxicité du B[a]P par les autres HAP en mélanges binaires en co-traitement</i>	82
1.	<i>Effet du B[a]P en mélange binaire équimolaire avec d'autres HAP particulières</i>	82
1.1	Cytotoxicité du B[a]P en mélange binaire	82
1.2	Cassures à l'ADN induites dans les cellules HepG2 exposées à du B[a]P en mélange binaire avec d'autres HAP	83
1.3	Formation des adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN dans les cellules HepG2 exposées à du B[a]P en mélange binaire avec d'autres HAP	84
2.	<i>Etude de l'effet du B[b]F et du B[k]F sur la génotoxicité du B[a]P</i>	87
2.1	Cinétique de formation des cassures à l'ADN induites par les mélanges binaires B[a]P+B[b]F et B[a]P+B[k]F	87
2.2	Cinétique de formation des adduits BPDE-N2-dGuo par le B[a]P seul ou en mélange avec du B[b]F ou du B[k]F	88
2.3	Formation des adduits BPDE-N2-dGuo par le B[a]P en présence de différentes concentrations de B[b]F et de B[k]F	88
3.	<i>Conclusion</i>	90
II.	<i>Modulation de la génotoxicité du B[a]P lors d'un prétraitement cellulaire par des HAP</i>	91
1.	<i>Effet d'un prétraitement par du B[a]P ou par les HAP purs sur la formation des dommages à l'ADN</i>	91
1.1	Effet d'un prétraitement par du B[a]P à 0,25 µM sur la cinétique de formation des cassures et des adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN induits par du B[a]P 8 µM	91
1.2	Effet d'un prétraitement par différents HAP sur la formation des adduits BPDE-N2-dGuo dans les cellules HepG2 exposées au B[a]P 8 µM	93

CHAPITRE 4-EVALUATION DE LA GENOTOXICITE DE MELANGES ATMOSPHERIQUES REELS D'HAP.....	95
I. Caractéristiques des échantillons atmosphériques environnementaux et industriels ..	95
1. Description des prélèvements.....	95
2. Concentrations en HAP	96
3. Présentation des expériences	99
II. Modulation de la génotoxicité du B[a]P par des mélanges atmosphériques	100
1. Profils en HAP des mélanges.....	100
2. Cytotoxicité du B[a]P et des mélanges.....	101
3. Etude des dommages à l'ADN induits dans les cellules HepG2 exposées aux mélanges environnementaux ou à la fraction d'HAP particulaires correspondante reconstituée	103
3.1 Mélanges atmosphériques environnementaux	103
3.1.1 Cassures à l'ADN dans les cellules HepG2 traitées avec du B[a]P pur ou par les mélanges environnementaux	103
3.1.2 Adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN dans les cellules HepG2 traitées avec du B[a]P pur ou par les mélanges environnementaux	105
3.2 Mélanges d'HAP reconstitués	106
3.2.1 Mesure des cassures et des adduits BPDE-N2-dGuo dans les cellules HepG2 exposées à la fraction d'HAP particulaire reconstituée des mélanges atmosphériques	106
4. Conclusions	108
III. Génotoxicité de mélanges atmosphériques.....	110
1. A concentration constante en B[a]P.....	110
1.1 Cassures à l'ADN dans les cellules HePG2 traitées avec différents mélanges contenant 0.04µM (10 ng/mL) de B[a]P en concentration finale.....	110
1.2 Adduits à l'ADN dans les cellules HePG2 traitées avec différents mélanges contenant 10 ng/mL de B[a]P en concentration finale.....	111
2. Génotoxicité de mélanges atmosphériques à volume d'air constant.....	112
2.1 Cassures à l'ADN dans les cellules HepG2 exposées à un même volume d'air	112
2.2 Adduits BPDE-N2-dGuo à l'ADN dans les cellules HepG2 exposées à un même volume d'air prélevé sur différents sites	114
 CHAPITRE 5- DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	116
1. Choix du modèle et des techniques d'analyse de la génotoxicité	117
2. Le B[a]P, une molécule génotoxique.....	118
3. Le B[a]P forme des adduits plutôt que des lésions oxydatives	119
4. Les HAP modulent la formation des adduits BPDE.....	121
5. Hypothèses mécanistiques.....	123
6. Dommages de l'ADN et mélanges réels.....	126
6.1 La composition en HAP comme signature de source.....	126

6.2	Génotoxicité des mélanges réels.....	129
6.3	Effet des mélanges réels sur le métabolisme	131
7.	<i>Vers une meilleure estimation des dangers liés à l'exposition à des mélanges réels .</i>	135
7.1	Le manque de pertinence de l'approche des facteurs d'équivalent toxiques	135
7.2	L'apport des tests in vitro	135
 <i>CHAPITRE 6-MATERIEL ET METHODE</i>		<i>143</i>
I.	<i>Prélèvements et analyse des échantillons atmosphériques</i>	<i>143</i>
1.	<i>Prélèvements atmosphériques.....</i>	<i>143</i>
1.1	Prélèvements en milieu industriels	143
1.2	Prélèvements environnementaux.....	143
2.	<i>Analyses quantitatives des HAP particulières.....</i>	<i>144</i>
II.	<i>HAP commerciaux</i>	<i>144</i>
III.	<i>Culture cellulaire.....</i>	<i>145</i>
1.	<i>Produits de culture et lignée cellulaire</i>	<i>145</i>
2.	<i>Traitement cellulaire</i>	<i>146</i>
3.	<i>Récolte des cellules.....</i>	<i>146</i>
IV.	<i>Tests de cytotoxicité.....</i>	<i>147</i>
1.	<i>Test du MTT.....</i>	<i>147</i>
2.	<i>Test de viabilité au bleu de trypan</i>	<i>147</i>
V.	<i>Tests de génotoxicité.....</i>	<i>148</i>
1.	<i>Test des comètes.....</i>	<i>148</i>
2.	<i>Dosage des adduits BPDE-N2-dGuo et de la 8-oxo-dGuo par HPLC/MS/MS</i>	<i>149</i>
2.1	Extraction et digestion de l'ADN.....	149
2.1.1	Extraction de l'ADN	149
2.1.2	Hydrolyse de l'ADN	150
2.2	Mesure des adduits par HPLC/MS/MS	150
2.2.1	Produits	150
2.2.2	Méthode.....	150
2.3	Mesure de la 8-oxodGuo.....	151
VI.	<i>Traitement des résultats</i>	<i>151</i>
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</i>		<i>153</i>
<i>PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS AFFICHEES.....</i>		<i>168</i>