



HAL
open science

Génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques en melanges, une classe majeure de polluants atmosphériques

Camille Genies

► **To cite this version:**

Camille Genies. Génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques en melanges, une classe majeure de polluants atmosphériques. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT : 2013GRENV053 . tel-01561073

HAL Id: tel-01561073

<https://theses.hal.science/tel-01561073>

Submitted on 12 Jul 2017

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

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

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Chimie Biologie**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Camille GENIES

Thèse dirigée par **Thierry DOUKI**
codirigée par **Anne MAITRE**

préparée au sein du **Laboratoire Lésions des Acides
Nucléiques**
dans l'**École Doctorale Chimie Sciences du Vivant**

Génotoxicité des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques en mélanges, une classe majeure de polluants atmosphériques

Thèse soutenue publiquement le **18 novembre 2013**
devant le jury composé de :

Pr Eric PEYRIN,
Université Joseph Fourier Grenoble, Président du jury
Dr Valérie FESSARD
ANSES Fougères, Rapporteur
Dr Thierry BURGEOT
IFREMER Nantes, Rapporteur
Dr Farida AKCHA
IFREMER Nantes, Examineur
Dr Hélène DESQUEYROUX
ADEME Paris, Membre
Dr Thierry DOUKI
CEA Grenoble, Directeur de thèse
Pr Anne MAITRE
Université Joseph Fourier Grenoble, Directeur de thèse



A ma mère,

« Est-ce qu'il ne fait pas trop froid là-bas, est-ce que tu sais les fleurs sur le toit de toi, est-ce que tu sais pour l'arbre que l'on va devoir couper, est-ce que tu sais pour le vent qui agite les volets de la cuisine et secoue ton ombre sur le carrelage ?

Maintenant il fait tout le temps nuit sur toi. [...]

Il y a bien des souvenirs, mais quelqu'un les a électrofilés et connectés à nos cils, dès qu'on y pense on a les yeux qui brûlent.

Maintenant qu'il fait tout le temps nuit sur toi. »

M. Malzieu

« Vers l'infini et au-delà »

Buzz l'Eclair

Remerciements

En premier lieu, je souhaite remercier chaleureusement les membres du jury, Eric Peyrin, Hélène Desqueyroux, Valérie Fessard, Thierry Burgeot et Farida Akcha pour avoir accept e d'évaluer ce travail ainsi que pour les corrections et les remarques qui ont fa onn e ce manuscrit.

La thèse représente un travail de longue haleine sem e d'embuches et de joies, mais il s'agit surtout d'un travail d'équipe et je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce projet.

Mes premiers remerciements vont à Thierry Douki, le nouveau chef du SCIB mais surtout mon directeur de thèse. Thierry, dans un premier temps, je tiens à te remercier pour m'avo r donn e ma chance, malgré un parcours un peu atypique. Ces trois ans de thèse à tes côtés ont été un réel plaisir ! Il est vrai que tu as un certain côté Dark Vador, comme tu le revendiques, mais aussi un peu de Yoda, pas le côté vert et rid e bien sûr, mais le côté bienveillant et  rudite. Merci pour la foule de choses que tu m'as apprises, pour tes conseils, ton expertise scientifique mais aussi ta gentillesse, ton humour et ton soutien tout au long de cette thèse, en particulier pour les derniers mois jalonn es de divers rebondissements plus ou moins difficiles. Je n'y serai indubitablement jamais arrivée sans toi, merci pour tout !

Je souhaite ensuite remercier Anne Maître pour la co-direction de cette thèse. Merci Anne, pour tes conseils tout au long de ce travail, pour ton expertise et ta vision plus extérieure du sujet qui m'a souvent permis de prendre du recul. Merci également pour toutes nos discussions scientifiques ou non.

Merci également aux membres du Comité de Suivi de Thèse, Hélène Desqueyroux, ingénieur Ademe et Alain Devaux, ingénieur de recherche à l'INRA ENTPE, pour leurs pr ecieus conseils et leur intérêt pour ce travail.

Je voudrais remercier pour nos discussions, leur expertise et leur apport dans des domaines souvent inconnus pour moi :

- Pascale Grud e, pour son aide sur les nombreuses questions que je me suis pos es sur les S9, microsomes et autres supersomes
- Alain Devaux et Aude Kienzler, pour la mise en place des mesures d'activités EROD
- Robert Debuchy, pour son expertise en RT-qPCR
- Damien Barbeau, pour sa contribution dans le choix des mélanges
- Sylvette Liaudy, pour ses nombreux conseils bibliographiques et méthodologiques, mais aussi pour les corrections apportées à la bibliographie de ce manuscrit.

Du côté des expérimentateurs, mes remerciements vont en premier lieu à Emmanuel Lefèbvre pour m'avo r formée aux différentes techniques, toujours avec patience et bonne humeur, et pour toute sa contribution à ce travail qui ne fût pas de tout repos.

Un énorme merci également aux super stagiaires, Marianne Chopard-Lallier et Amandine Jullien, pour leur travail et leur enthousiasme pour ce projet mais aussi pour leur grande sympathie et leur personnalité attachante, chacune dans son style.

Enfin, merci aux autres « petites mains magiques » qui ont apporté leur aide : Izabel Bérard, Aude Wack, Marie Marquès, David Béal, Anne Forestier et Michel Ragnot. Cela a vraiment été un bonheur de travailler avec vous !

La thèse est également jalonnée de démarches et parfois de soucis administratifs. Je remercie pour cette partie, qui m'échappe un peu (beaucoup), Zohra Termache, la Wonder Woman des secrétaires, toujours à l'écoute, disponible et de très bon conseil. Au delà de cela, Zohra, je te remercie pour ton amitié, ton soutien tout au long de cette thèse, en particulier dans cette dernière année particulièrement difficile, et pour nos franches rigolades.

J'exprime tous mes remerciements à cette fabuleuse équipe du LAN sans aucune exception. Sans vous, ces trois ans auraient été bien mornes et vous êtes la cause d'un énorme pincement au cœur quand je pense à mon départ prochain de Grenoble.

Tout d'abord, un merci chaleureux aux « supers chefs », Jean-Luc, Didier, Marie, Jean et Walid. L'excellente ambiance au LAN couplée à un haut niveau scientifique est en grande partie de votre fait. Merci pour tous vos conseils scientifiques ou non, votre gentillesse, votre bonne humeur et votre humour décapant, en particulier lors des mythiques, et bien sûr célèbres, pauses café (oui, y compris du vendredi !).

Un merci particulier à Sylvie pour nos échanges pas uniquement scientifiques mais aussi d'idées, de culture, d'art et de lectures. Bonne chance à ton nouveau bébé, LXRepair !

Quand je pense au LAN, je pense évidemment à l'incontournable et merveilleuse Christine que je remercie pour son amitié, son rire communicatif et tous les moments que nous avons partagés. Je pense aussi au malicieux, espiègle et « séries-vore » Sylvain avec ses blagues dont j'avoue ne pas avoir été trop victime. Merci Sylvain, d'avoir accepté la lourde tâche de t'occuper de notre ami commun rose ! Dadou, merci pour toutes nos discussions, pour ton écoute et pour avoir répondu à toutes mes questions, excessivement nombreuses, en culture cellulaire et pour avoir gardé mes cellules pendant les vacances.

Un grand merci aux anciens thésards du LAN, en particulier les sœurs jumelles Vivianne de la Forêt. Anne, merci pour tout, pour ton amitié, nos longues discussions, nos rires et parfois larmes pour les soirées, les trajets, les virées et tous les moments passés ensemble. Vivi, ma coloc de bureau. Je te remercie également pour tout, pour tous les moments que l'on a passé et bien sûr que l'on va passer ensemble et pour toutes nos conversations, toujours sans critiquer et avec beaucoup de cohérence. Merci également pour ton aide pour mon faux mais surtout pour mon vrai sujet de thèse, tu as toujours su me remettre sur le droit chemin !

Je tiens également à remercier mes copains de galère, la super promo des thésards 2010. D'abord Mr « si toi ça va, moi ça va » alias Momo de la Douki team, merci pour ces trois ans à tes côtés au cours desquels on a bien rigolé et beaucoup échangé sur plein de sujets différents. Merci également pour tes « sauvetages API 3000 » et les séances de chirurgies à cœur ouvert de l'HPLC ou du spectro. Merci Guillaume pour ta bonne humeur, ton humour à toute épreuve, pour toutes les différentes soirées et pour ton expertise œnologique. Merci Ewa pour ta gentillesse, ton soutien et toutes les discussions et moments passés ensemble. Enfin, un merci infini à la petite, mais de caractère, Laetitia, merci pour le soutien et pour tout (trop long à énumérer)... Let's boo boo !

Bonne chance aux prochains génialissimes doctorants, Stéphanie, Aurélie, Mathilde, Paul et Marie.

Un merci chaleureux pour les copines de brunch et de sorties Ikéa Aurélie, Lucie, Nadège, Amandine and co.

Merci enfin à tout les autres qui ont croisé ma route au LAN, qui m'ont apporté tant de choses et qui ont également été, pour certains, complices des soirées LAN (Izabel, Ghazi, Camille, Ivannah, Aude, Tim, Céline, Sophie, Rym, Morgane, Marisa, Mathilde...).

Je souhaite remercier toute l'équipe EPSP en particulier, Aurore, Sylvette, Frank, Sylvie, Damien, Pascal et la pétillante Delphine pour avoir accueilli avec gentillesse et beaucoup de sympathie la « sans bureau » que j'étais, pour les derniers mois de thèse.

Je tiens aussi à remercier mes amis montalbanais et toulousains qui se sont pas mal éparpillés mais qui, malgré la distance, ont toujours été à l'écoute, sont toujours au RDV pour me faire rire mais surtout qui ont réussi à me supporter et je m'excuse pour les avoir un peu (il ne faut pas exagérer quand même) négligés pendant ces trois ans. Merci notamment à Caro, Audrey, Mathias, Vincent, Cécile et Clémence. Un immense merci à Thomas, petit toi, pour nos discussions, ton humour, ton recul sur la vie, tes conseils toujours avisés et les « remonte toi la jupe boule et vas-y », merci tout simplement d'être là pour moi à tout moment.

Je souhaite également remercier toute ma famille qui n'a cessé de me soutenir et de m'encourager notamment mes grands-parents, Cathy, Michelle, Pierre et Jean-Sébastien. Je tiens à adresser un merci particulier à Gene qui a représenté un soutien incroyable de tous les instants par ces messages, mails, attentions et les créations de Stéphanie la bricole.

Enfin, mes derniers remerciements vont à mes parents. Je vous remercie de m'avoir soutenue tout au long de mon chemin de vie autant dans les joies et les victoires que dans les peines, les hésitations et, parfois, les découragements. Sans vous, je ne serai pas qui je suis et je vous remercie pour m'avoir toujours permis de n'en faire qu'à ma tête (de mule, j'en suis consciente...).

Sommaire

Table des illustrations	11
Liste des abréviations	17
Avant-propos.....	19
Chapitre 1 -Introduction bibliographique	25
I. Introduction générale sur les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) 25	
1. Généralités.....	25
1.1. Formation et propriétés physico-chimiques	25
1.2. Devenir dans l'environnement.....	26
1.3. Sources d'exposition aux HAP atmosphériques	27
1.3.1. Population générale	27
1.3.2. Exposition professionnelle.....	29
1.4. Toxicocinétique des HAP	30
2. Toxicité et cancérogénicité des HAP	32
3. Evaluation du risque et problématique des mélanges : approche par les facteurs d'équivalents toxiques (FET)	35
II. Métabolisme des HAP	38
1. Biotransformation des HAP : Phase I.....	40
1.1. Voie des diol-époxydes.....	40
1.2. Voie des o-quinones.....	45
1.3. Voie du radical cation.....	47
2. Biotransformation des HAP : Phase II	48
2.1. Les UDP-Glucuronyl-Transférases (UGT)	49
2.2. Les Sulfotransférases (SULT)	49
2.3. Les glutathion-S-transférases (GST).....	49
2.4. La NAD(P)H quinone oxydoreductase 1 (NQO1)	51
3. Efflux des HAP : phase III.....	51
4. Induction des gènes du métabolisme par les HAP	51
5. Susceptibilités génétiques liés aux enzymes impliquées dans la métabolisation	54
III. Les dommages à l'ADN	56
1. Les adduits	57
1.1. Les adduits du B[a]P.....	58
1.1.1. Adduits de la voie des diols époxydes	58
1.1.2. Adduits de la voie du radical cation	59
1.1.3. Adduits de la voie des o-quinones	60
1.1.4. Rendement relatif des adduits <i>in vivo</i>	61
1.2. Les adduits d'autres HAP.....	63
2. Stress oxydant et lésions à l'ADN	64
3. Quantification des lésions de l'ADN	67
3.1. Méthode des comètes.....	68
3.2. Cassures double brin : test γ H2AX	69
3.3. Analyse des Adduits à l'ADN	71
3.4. Pertinence de la mesure des adduits et du stress oxydant en santé humaine.....	74
IV. Conséquences biologiques des lésions à l'ADN	76
1. Réparation	77
1.1. La réparation des adduits : voie NER	77
1.2. La réparation de dommages oxydatifs : Voie BER.....	79
1.3. La réparation des cassures double-brin	82
2. Mort cellulaire par apoptose	82
3. Cancérogénèse.....	83
3.1. Mécanisme général de cancérogénèse.....	83
3.2. Les HAP dans le processus de cancérogénèse.....	85

3.2.1. HAP et initiation : la formation de lésions à l'ADN, événement clé dans la mutagénicité.....	85
3.2.1.1. La mutagénicité des adduits stables.....	86
3.2.1.2. La mutagénicité des adduits dépurinants.....	87
3.2.1.3. Mutations engendrées par les adduits le B[a]P dans les proto-oncogènes.....	87
3.2.1.4. La mutagénicité des dommages oxydatifs.....	88
3.3. HAP et promotion.....	89
3.4. Cancérogénicité des mélanges de HAP en laboratoire.....	90
V. Objectifs de la thèse.....	91
Chapitre 2 -Matériels et Méthodes.....	97
I. HAP commerciaux.....	97
1. Préparation des solutions mères et des mélanges synthétiques.....	97
2. Dosage des HAP.....	97
II. Culture cellulaire.....	98
1. Lignées cellulaires et produits de culture cellulaire.....	98
2. Traitements.....	99
3. Récolte des cellules après exposition.....	99
III. Mortalité cellulaire.....	99
IV. Analyse du métabolisme.....	100
1. Expression des gènes : RT-qPCR.....	100
1.1. Extraction d'ARN.....	100
1.2. Reverse transcription.....	101
1.3. Design et validation des amorces.....	101
1.4. Mesure de l'expression relative des gènes d'intérêt.....	103
2. Mesure des activités enzymatiques.....	104
2.1. Activité Ethoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD).....	104
2.2. Activité des Gluthation-S-Transférases (GST).....	105
V. Analyse de la génotoxicité des HAP.....	105
1. Extraction de l'ADN cellulaire.....	105
1.1. Digestion de l'ADN cellulaire.....	106
1.2. Analyse HPLC-MS/MS.....	106
1.2.1. Solvants.....	106
1.2.2. Analyse des adduits diol-époxydes.....	107
1.2.2.1. Les adduits BPDE-N ² -dGuo du B[a]P.....	107
1.2.2.2. Les adduits des dérivés diols époxydes d'autres HAP sur la dGuo.....	108
1.2.3. Recherche des adduits stables des quinones.....	109
2. Mesure des dommages oxydatifs : méthode des comètes.....	110
VI. Analyse statistique des résultats.....	111
Chapitre 3 - . Effet du B[a]P sur les lignées cellulaires représentatives d'organes cibles.....	115
I. Cytotoxicité du B[a]P.....	117
II. Génotoxicité du B[a]P sur les lignées A549, T24 et HepG2.....	118
1. Formation des adduits BPDE-N ² -dGuo.....	118
1.1. Analyse des adduits BPDE-N ² -dGuo par HPLC-spectrométrie de masse en tandem.....	118
1.2. Formation des adduits BPDE-N ² -dGuo en fonction de la concentration en B[a]P.....	120
1.3. Cinétique de formation des adduits BPDE-N ² -dGuo.....	122
2. Lésions oxydatives à l'ADN induites par le B[a]P.....	123
2.1. Formation des lésions oxydatives en fonction de la concentration en B[a]P.....	123
2.2. Cinétique de formation des cassures.....	125
2.3. Adduits vs cassures.....	126
III. Comparaison de la métabolisation du B[a]P dans les 3 lignées cellulaires.....	127
1. Mise au point de l'évaluation du métabolisme des HAP.....	127
2. Comparaison de l'expression des gènes à l'état basal.....	131
3. Métabolisation du B[a]P dans les 3 lignées cellulaires.....	132
3.1. Le B[a]P et les enzymes de phase I.....	132

3.1.1.	Effet de la concentration en B[a]P.....	132
3.1.1.1.	Modulation de l'expression des gènes.....	132
3.1.2.	Impact du B[a]P sur l'activité enzymatique.....	134
3.1.3.	Effet de la durée d'exposition.....	135
3.1.3.1.	Expression des gènes.....	135
3.1.3.2.	Activité EROD.....	136
3.2.	Le B[a]P et les Glutathion-S-transférases (GST), enzymes de phase II.....	137
3.2.1.	Modulation de l'expression des gènes.....	137
3.2.2.	Activité GST.....	139
3.3.	Expression d'AKR1C1 et MRP4.....	140
3.4.	Absorption du B[a]P dans les cellules.....	141
IV.	Conclusions et discussion sur l'effet du B[a]P dans les 3 lignées étudiées.....	142
1.	Faible génotoxicité du B[a]P dans la lignée de vessie T24.....	142
2.	La lignée A549, un bon modèle de cellules pulmonaires.....	145
3.	Faible contribution du stress oxydant et des adduits dépurinants dans la génotoxicité du B[a]P.....	149
Chapitre 4 -Effet d'autres HAP particuliers ou gazeux sur la lignée pulmonaire A549.....		
I.	Cytotoxicité d'autres HAP sur les lignées HepG2 et A549.....	155
II.	Métabolisme des HAP.....	156
1.	Modulation de l'expression des gènes.....	156
2.	Modulation de l'activité EROD.....	157
III.	Mise au point du dosage de nouveaux biomarqueurs de génotoxicité.....	158
1.	Métabolisation <i>in vitro</i> des HAP.....	158
1.1.	La fraction subcellulaire S9.....	160
1.2.	Les microsomes.....	163
1.3.	Les HepG2 comme système de métabolisation <i>in vitro</i>	165
2.	Recherche des adduits des diol-époxydes et triol époxydes sur la dGuo.....	166
3.	Recherche des adduits des diol-époxydes-dGuo identifiés dans la lignée HepG2...169	169
4.	Recherche et dosage des adduits des diol-époxydes-dGuo dans les A549.....	171
5.	Mise au point et recherche des adduits des quinones.....	172
IV.	Discussion : adduits à l'ADN de HAP purs autres que le B[a]P.....	173
Chapitre 5 -Impact de mélanges synthétiques sur la lignée A549.....		
I.	Métabolisme et génotoxicité de mélanges binaires de HAP.....	181
1.	Cytotoxicité des mélanges binaires.....	181
2.	Mesure de l'EROD induite par les mélanges binaires.....	182
3.	Modulation de la formation des adduits BPDE-N ² -dGuo du B[a]P par d'autres HAP en mélange binaires équimolaires.....	183
3.1.	Formation des adduits Diol Epoxydes dans la lignée A549.....	183
3.2.	Effet dose des mélanges équimolaires pour le B[b]F et le B[k]F.....	185
3.3.	Modulation de la formation des adduits BPDE-N ² -dGuo à des concentrations constantes en B[a]P et croissantes en B[b]F et B[k]F.....	186
II.	Effet de mélanges reconstitués de 12 HAP sur la lignée A549.....	188
1.	Choix des mélanges de HAP.....	188
2.	Cytotoxicité des mélanges.....	189
3.	Modulation de l'induction des gènes de phase I par les mélanges.....	190
3.1.	Effet de la dose.....	190
3.2.	Cinétique d'expression des gènes de métabolisation après exposition aux mélanges..	192
4.	Mesure de l'EROD induite par les mélanges.....	194
5.	Analyse des adduits générés par les mélanges.....	194
III.	Conclusions et discussion : HAP en mélanges, loin de l'additivité.....	196
1.	Modulation de la génotoxicité du B[a]P par d'autres HAP.....	196
1.1.	Compétition au niveau des CYP450 :.....	198
1.2.	Inhibition de l'activité des CYP450 :.....	198
1.3.	Détoxification plus importante par les enzymes de phase II :.....	199

1.4. Répression d'AhR par AhRR :	199
1.5. Voie des o-quinones et protéines d'efflux :.....	200
2. Effet de mélanges complexes	200
Chapitre 6 -Discussion générale et perspectives	207
Valorisation scientifique	213
Références bibliographiques.....	217

Table des illustrations

Liste des figures :

Figure 1 : Les HAP, de l'exposition au cancer.....	20
Figure 2 : Structure chimique des 16 HAP classés prioritaires par l'US EPA.....	26
Figure 3 : Répartition des émissions de HAP atmosphériques par secteur d'activité pour la France en 2010.....	28
Figure 4 : Répartition du nombre de salariés exposés aux HAP par type d'exposition pour la France	29
Figure 5 : Schéma de bioactivation des HAP	39
Figure 6 : Schéma général simplifié de métabolisation des HAP	40
Figure 7 : Cycle catalytique du CYP450.....	41
Figure 8 : Caractéristiques structurales des HAP pris préférentiellement en charge par les CYP450	42
Figure 9 : Voie des diol-époxydes.....	44
Figure 10 : Voie des o-quinones	47
Figure 11 : Formation du radical cation du B[a]P	48
Figure 12 : Principales réactions de phase II catalysées par les UGT, les SULT et les GST	50
Figure 13 : Schéma simplifié de l'induction du CYP1A1 par le B[a]P via AhR.....	53
Figure 14 : Lien entre métabolisme des HAP et dommage de l'ADN.....	56
Figure 15 : Formation d'adduits stables et dépurinants du BPDE sur la dGuo.....	57
Figure 16 : Principaux adduits à l'ADN du BPDE.....	59
Figure 17 : Principaux adduits à l'ADN avec le radical cation du B[a]P.....	60
Figure 18 : Adduits à l'ADN générés par la B[a]P-7,8-quinone	61
Figure 19 : Mécanisme de formation des cassures	65
Figure 20 : Mécanisme d'oxydation de bases : exemple de la dGuo	66
Figure 21 : Hypothèse d'induction d'ERO par les o-quinones au niveau du noyau	67
Figure 22 : Principe de la méthode des comètes	69
Figure 23 : Mesure des adduits des HAP par HPLC-MS/MS	74
Figure 24 : Conséquences biologiques des dommages à l'ADN	77
Figure 25 : Mécanisme du NER	78
Figure 26 : Mécanisme du BER	81
Figure 27 : Intervention des HAP dans le processus de cancérogénèse.....	83
Figure 28 : Cytotoxicité du B[a]P à des concentrations allant jusqu'à 5 µM dans les lignées HepG2, A549 et T24 exposées 14h par le test MTT.....	117
Figure 29 : Chromatogrammes obtenus en HPLC-MS/MS après injection de 200 fmol de standard BPDE- <i>N</i> ² -dGuo en MS/MS (A) ou d'un mélange de 10 nmol de dGuo et 10 nmol de Thd en UV (B)	119
Figure 30 : Fragmentation de l'adduit BPDE- <i>N</i> ² -dGuo	119
Figure 31 : Chromatogramme obtenu après injection d'ADN issu des cellules HepG2 exposées à 1 µM de B[a]P pendant 14h pour 2,3 BPDE- <i>N</i> ² -dGuo/10 ⁶ bases normales. ..	120
Figure 32 : Mesure des adduits BPDE- <i>N</i> ² -dGuo dans les lignées HepG2, A549 et T24 exposées 14h à des concentrations croissantes de B[a]P de 0,2 à 5 µM	121
Figure 33 : Formation des adduits BPDE- <i>N</i> ² -dGuo dans les A549 exposées 14h à des faibles concentrations de 0,1 à 2 µM.....	121
Figure 34 : Cinétique de formation des adduits BPDE- <i>N</i> ² -dGuo dans les A549, T24 et HepG2 exposées de 30 minutes à 24h à 0,2 µM de B[a]P	122

Figure 35 : Effet de la concentration en B[a]P sur la cinétique de formation des adduits BPDE- <i>N</i> ² -dGuo dans les cellules A549 incubées de 30 min à 24h avec des doses de B[a]P de 0,2 à 5 µM.....	123
Figure 36 : Niveaux des dommages oxydatifs mesurés par la méthode des comètes calibrée dans les HepG2, A549 et T24 exposées à 0,2 et 2 µM de B[a]P pendant 14h	125
Figure 37 : Cinétique de formation des cassures mesurées par la méthode des comètes dans sa version standard non calibrée dans les cellules incubées de 30 minutes à 24h avec 0,2 µM de B[a]P	126
Figure 38 : Comparaison de la formation des adduits BPDE, des cassures induites et de la 8-oxodGuo induite mesurées respectivement par HPLC-MS et Comètes-Fpg calibré avec R _γ dans les cellules A549 et HepG2 exposées 14h à 2µM de B[a]P	126
Figure 39 : Préparation des différentes fractions subcellulaires par centrifugations différentielles de culots cellulaires	128
Figure 40 : Ratio d'expression des différents gènes des enzymes de phase I à l'état basal dans A549 et T24 par rapport à HepG2 mesuré par RT-qPCR.....	131
Figure 41 : Expression des gènes du CYP1A1 et CYP1B1 dans les lignées HepG2 et A549 exposées 14h à des concentrations croissantes de B[a]P de 0,2 à 5 µM	133
Figure 42 : Modulation des gènes des enzymes de métabolisation de phase I dans la lignée T24 exposée 14h à des concentrations croissantes de B[a]P de 0,2 à 5 µM	134
Figure 43 : Cinétique de modulation de l'expression des CYP1A1 et 1B1 dans les HepG2 et A549 incubées de 30 min à 24h avec 0,2 µM de B[a]P	135
Figure 44 : Cinétique d'activité EROD pmol/min/mg de protéines pour les A549 et HepG2 exposées à 0,2 ou 2 µM de B[a]P pour une durée de 1h à 48h	137
Figure 45 : Modulation de l'expression des GSTA1 et P1 dans A549, T24 et HepG2 exposées à des concentrations croissantes de B[a]P de 0,2 µM à 5 µM	138
Figure 46 : Variation de l'activité GST (µmol/min/mg de protéines) au cours du temps dans les HepG2 et les A549 incubées de 2 à 48h avec 0,2 µM de B[a]P.....	139
Figure 47 : Ratio d'expression d'AKR 1C1 et MRP4 mesuré par RT-qPCR à l'état basal dans les A549 par rapport à HepG2.....	140
Figure 48 : Modulation de l'expression d'AKR1C1 et MRP4 dans les A549 et HepG2 exposées 14h à des concentrations croissantes de B[a]P de 0,2 à 5 µM	141
Figure 49 : Dosage des adduits BPDE- <i>N</i> ² -dGuo par HPLC-MS/MS dans les lignées cellulaires A549, T24 et HepG2 exposées 1h à 0,1 µM de (±)-anti-BPDE	142
Figure 50 : Cytotoxicité des différents HAP dans les HepG2 (A) et les A549 (B) exposées à des concentrations croissantes de 0,2 à 5 µM pendant 14h	156
Figure 51 : Modulation de l'expression des gènes des isoformes 1A1 et 1B1 des cytochromes P450 pour les HAP purs à 0,2 µM pendant 2 heures par rapport au témoin DMSO 0,5%	157
Figure 52 : Mesure de l'activité EROD (pmol/min/mg de protéines) induite par les 13 HAP d'étude dans la lignée A549 exposée 24h à 0,2 ou 2 µM de HAP	158
Figure 53 : Principe général de la stratégie mise en place pour la production des adduits des HAP via le S9 comme système de métabolisation in vitro à l'aide du B[a]P comme composé modèle.	159
Figure 54 : Production d'adduits BPDE- <i>N</i> ² -dGuo/10 ⁶ nucléotides mesurée en HPLC-MS/MS mode MRM pour la métabolisation in vitro par 500 µg de S9 de foie de rats pendant 4h en présence de 3,3 mM de G6P et 1,3 mM de NADP et 0,4 U de G6PDH dans un tampon phosphate à pH 7,4 (100 mM) et 0,2 µM de B[a]P.	161
Figure 55 : Cinétique de formation des adduits BPDE- <i>N</i> ² -dGuo par 500 µg de S9 de foie de rats en présence de 3,3 mM de G6P et 1,3 mM de NADP et 0,4 U de G6PDH dans un tampon phosphate à pH 7,4 (100 mM), 1,3 mM de B[a]P et 1 mg d'ADN	162

Figure 56 : Cinétique de formation des adduits BPDE-N ² -dGuo par 500 µg de microsomes de foie de rats en présence de 3,3 mM de G6P et 1,3 mM de NADP et 0,4 U de G6PDH dans un tampon phosphate à pH 7,4 (100 mM), 1,3 mM de B[a]P et 1 mg d'ADN.....	164
Figure 57 : Mesure des adduits BPDE-N ² -dGuo dans les cellules HepG2 exposées à 20, 50 ou 100 µM pendant 24h.....	166
Figure 58 : Chromatogrammes obtenus en MS/MS pour les adduits diol-époxydes-dGuo du B[a]P, B[b]F, B[k]F, B[j]F, B[a]A, Chrys et D[a,h]A via la métabolisation in vitro par les microsomes de foie de rats.....	168
Figure 59 : Chromatogrammes obtenus en MS/MS pour les adduits diol-époxydes-dGuo du B[a]P, B[b]F, B[k]F, B[j]F, B[a]A, Chrys et D[a,h]A dans la lignée HepG2 exposées 24h à 20 µM de chaque HAP.....	170
Figure 60 : Analyse des adduits diol-époxyde-dGuo par HPLC-MS/MS dans les HepG2 exposées aux différents HAP à 20 µM pendant 24h.....	171
Figure 61 : formation des adduits diol-époxyde-dGuo par HPLC-MS/MS dans les A549 exposées 16h à des concentrations croissantes des différents HAP de 0,1 à 5 µM.....	172
Figure 62 : Cytotoxicité des mélanges binaires B[a]P/HAPx à 1 µM mesurée par le test MTT dans les cellules A549 et HepG2 exposées 14h.....	182
Figure 63 : Mesure de l'activité EROD (pmol/min/mg de protéines) induite par les mélanges binaires de HAP B[a]P + HAPx (1 µM/1 µM) dans la lignée A549 pour une durée d'exposition de 24h.....	182
Figure 64 : Adduits BPDE induits par le B[a]P en mélange binaire équimolaire à 1 µM avec d'autres HAP dans la lignée A549 pour une durée d'exposition de 14h.....	184
Figure 65 : Adduits BPDE induits par le B[a]P en mélange binaire équimolaire à 0,2 µM avec d'autres HAP dans la lignée A549 pour une durée d'exposition de 14h.....	185
Figure 66 : Modulation de la formation des adduits BPDE en fonction de la concentration du mélange binaire B[a]P / B[b]F ou B[a]P / B[k]F de 0,2 à 5 µM dans les A549 et les HepG2 exposées 14h.....	186
Figure 67 : Modulation de la formation des adduits BPDE en fonction de la concentration en B[b]F ou B[k]F de 0,2 à 8 µM dans des mélanges binaires avec 1 µM le B[a]P dans les A549 et les HepG2 exposées 14h.....	187
Figure 68 : Abondances relatives des 12 HAP particuliers d'intérêt dans les 5 mélanges Silicium, Bois, Garage, Urbain et Cigarette mesurées par HPLC-Fluo.....	189
Figure 69 : Cytotoxicité des 5 mélanges synthétiques de HAP dans les cellules A549 exposées 14h à des concentrations totales en HAP croissantes de 0,2 à 5 µM mesurée à l'aide du test MTT.....	190
Figure 70 : Modulation de l'expression des gènes des isoformes CYP1A1 et 1B1 du cytochrome P450 par rapport au témoin DMSO dans les A549 exposées pendant 2 heures à des concentrations totales en HAP croissantes et de B[a]P pur de 0,2 à 5 µM.....	191
Figure 71 : Modulation de l'expression des gènes CYP1A1 et 1B1 par rapport au témoin DMSO dans les A549 exposées de 30 minutes 16h aux mélanges et au B[a]P seul à 0,2 µM traitées par des mélanges de HAP à 0,2 µM.....	193
Figure 72 : Mesure de l'activité EROD (pmol/min/mg de protéines) induite par les mélanges synthétiques de HAP à 2 µM et le B[a]P à 0,2 µM dans la lignée A549 pour une durée d'exposition de 24h.....	194
Figure 73 : Mesure des adduits Diol Epoxyde-dGuo par HPLC-MS/MS dans les A549 exposées 14h à 0,2 µM total en HAP pour les 5 mélanges d'étude et 0,02 µM de B[a]P.	195
Figure 74 : Mesure des adduits Diol Epoxyde-dGuo par HPLC-MS/MS dans les A549 exposées 14h à 2 µM total en HAP pour les 5 mélanges d'étude et 0,2 µM de B[a]P.....	196

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Concentrations moyennes des HAP en ng/m ³ en Europe sur différents sites .	28
Tableau 2 : DL 50 mesurées après des expositions aiguës au B[a]P.....	32
Tableau 3 : Classification de plusieurs HAP par le CIRC et l'UE.....	34
Tableau 4 : Classification de plusieurs mélanges ou secteurs d'activités émettant des HAP par le CIRC et l'UE	34
Tableau 5 : Incidence des cancers bronchopulmonaires et de la vessie dans différents secteurs industriels avec RR le risque relatif.....	35
Tableau 6 : Principales tables de facteurs d'équivalents toxiques	38
Tableau 7 : Localisation et substrats des isoformes principales du CYP450 impliquées dans le métabolisme des HAP	43
Tableau 8 : Synthèse bibliographique sur les adduits des différents HAP d'intérêt pour ce travail.....	64
Tableau 9 : Incidence de tumeurs de la peau chez des souris ICR/Ha après application cutanée de B[a]P ou de mélanges binaire B[a]P/autre HAP	91
Tableau 10 : Séquences et caractéristiques des amorces utilisées pour les expériences de qPCR en temps réel	102
Tableau 11 : Transitions suivies correspondant à la perte du sucre (m/z 116) par les adduits potentiels o-quinone-dGuo ou dAde des différents HAP d'intérêt en spectrométrie de masse en tandem en mode d'ionisation positive.....	109
Tableau 12 : Ratio d'expression des différents gènes des enzymes de phase II à l'état basal dans A549 et T24 par rapport à HepG2 mesuré par RT-qPCR. Toutes les valeurs sont significatives (p< 0,05) par rapport à HepG2	132
Tableau 13 : Modulation de l'expression de gènes d'enzyme de métabolisation pour la phase dans les HepG2 et A549 incubées avec 0,2 à 5 µM de B[a]P pendant 14h avec * une différence statistiquement significative (p<0,05) par rapport au témoin DMSO de la lignée concernée.....	133
Tableau 14 : Mesure de l'activité EROD en pmol/min/mg de protéines dans les A549 et les HepG2 exposées respectivement 48h et 24h à des concentrations croissantes en B[a]P de 0,2 à 5 µM.....	134
Tableau 15 : Cinétique de modulation de l'expression des isoformes 1A2 et 3A4 deCYP450 ainsi que de l'EH dans les HepG2 et A549 incubées de 30 min à 24h avec 0,2 µM de B[a]P	136
Tableau 16 : Cinétique de modulation de l'expression des GST A1 et P1 dans les HepG2 et A549 incubées de 30 min à 24h avec 0,2 µM de B[a]P	138
Tableau 17 : Mesure de l'activité GST en µmol/min/mg de protéines dans les lignées HepG2 et A549 exposées pendant 14h à des doses de 0,2 à 5 µM de B[a]P	139
Tableau 18 : Gamme de concentration en B[a]P pour la métabolisation in vitro par 500 µg de S9 de foie de rats pendant 4h en présence de 3,3 mM de G6P et 1,3 mM de NADP et 0,4 U de G6PDH dans un tampon phosphate à pH 7,4 (100 mM). 0,2 µM est la dose de B[a]P utilisé initialement	161
Tableau 19 : Tests d'optimisation du rendement de production des adduits BPDE en jouant sur les concentrations des acteurs du système de génération du NADPH. Le protocole de base correspond à la réaction de 500 µg de S9 de foie de rats en présence de 3,3 mM de G6P et 1,3 mM de NADP et 0,4 U de G6PDH dans un tampon phosphate à pH 7,4 (100 mM) et 1 mg d'ADN sur 1,3 mM de B[a]P	163
Tableau 20 : Optimisations apportées au protocole de métabolisation in vitro avec en A l'effet de la concentration en B[a]P, en B l'effet de la concentration en microsomes et en C l'effet de la concentration des différents acteurs du système de génération du NADPH..	165

Tableau 21 : Fragmentations recherchées par spectrométrie de masse en tandem en mode MRM pour les adduits des diol et triol époxydes avec la dGuo après métabolisation in vitro de HAP par des microsomes de foie de rat.....	167
Tableau 22 : Transitions recherchées par spectrométrie de masse en tandem en mode MRM pour les adduits diol-époxydes-dGuo identifiés après métabolisation in vitro de HAP par des microsomes de foie de rat	167
Tableau 23 : Transitions suivies correspondant à la perte du sucre (m/z 116) par les adduits potentiels o-quinone-dGuo ou dAde des différents HAP d'intérêt en spectrométrie de masse en tandem	173

Liste des abréviations

1-OHP : 1-hydroxypyrene	CYP450 : enzyme de la famille des monooxygénases à cytochromes P450
3-OHB[a]P : 3-hydroxybenzo[a]pyrene	D[a,h]A : Dibenzo[a,h]Anthracène
8-oxodGuo : 8-oxo-7,8-dihydro-2'déoxyguanosine	dAdo : désoxyadénosine
Ade : Adénine	DB[a,l]P : Dibenzo[a,l]pyrene
ADN : Acide Désoxyribonucléique	dCyd : désoxycytidine
AhR : Aryl hydrocarbon Receptor	DD : Dihydrodiol Déshydrogénase
AhRR : Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor	DE : Diol-époxyde
AKR : Aldo Kéto Reductase	dGua : désoxyguanosine
ARE : Elément de Réponse aux Anti-oxydants	DL 50 : Dose létale 50
ARNm : Acide Ribonucléique messenger	DMSO : Diméthyl Sulfoxyde
Arnt : Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator	EFSA : Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
B[a]A : Benzo[a]Anthracène	EH : Epoxyde Hydrolase
B[a]P : Benzo[a]Pyrène	ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
B[b]F : Benzo[b]Fluoranthène	EROD : Ethoxyrésosufurine O-deethylase
B[e]P : Benzo[e]Pyrène	FET : Facteur d'Equivalence Toxique
B[g,h,i]P : Benzo[g,h,i]Pérylène	FISH : Fluorescence In Situ Hybridation
B[j]F : Benzo[j]Fluoranthène	Flua : Fluoranthène
B[k]F : Benzo[k]Fluoranthène	Fpg : Formamidopyrimidine glycosylase
BaP_{Teq} : B[a]P équivalent toxique	G6P : Glucose-6-Phosphate
BER : Réparation par Excision de Base	G6PDH : Glucose-6-Phosphate déshydrogénase
BPDE : 7,8-Dihydro-7,8-dihydroxybenzo[a]pyrene 9,10-oxyde = Benzo[a]pyrene diol-époxyde	GC-MS : Chromatographie Gazeuse Couplée à la Spectrométrie de Masse
CALUX : Chemically Activated LUciferase Gene Expression	GGR : Global genome repair
CDNB : 1-chloro-2,4-dinitrobenzene	GST : Gluthation-S-transférase
Chrys : Chrysène	Gua : Guanine
CI 50 : Concentration inhibitrice 50	HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer : IARC en anglais	HPLC-MS/MS : Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la Spectrométrie de masse en tandem
CITEPA : Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique	HPRT : Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase
CL 50 : Concentration létale 50	HR : Recombinaison Homologue
Ct : Cycle seuil	INERIS : Institut National de l'Environnement industriel et des Risques
	INPES : Institut National pour la Prévention et l'Education pour la Santé

IP: Indéno[1,2,3,cd]Pyrène
MRP : Multi-drug Resistance Protein
MTT: 3-[4,5-diméthyl-thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltétrazolium bromide
NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
Naph : Naphtalène
NER: Réparation par Excision de Nucléotides
NHJE : Jointure Non Homologue des Extrémités
NQO1 : NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1
Nrf2 : NF-E2-related factor 2
OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique
PM : Matière Particulaire
POP : Polluant Organique Persistant
PUBEC : Porcine Urinary Blader Epithelial Cells
Pyr : Pyrène
qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction
RR : Risque Relatif
RT : Reverse Transcription
Site AP : Site apurinique, apyrimidique
SULT : Sulfotransférase
TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
TCR : Transcription couplée à la réparation
TK : Thymidine Kinase
UDP : Uridine Diphosphate
UE : Union Européenne
UGT : UDP-glucuronyl transférase
US EPA : United States Environmental Protection Agency
XPRT : Xanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase
XRE : Xenobiotic Responsive Element

Avant-propos

A travers les différentes révolutions industrielles et les avancées technologiques, l'Homme a profondément bouleversé son environnement en générant de nombreux polluants en plus ou moins grande quantité. L'air a en particulier été concerné. Or, l'air est un élément indispensable à la vie pour l'organisme et nous en respirons en moyenne 15 m³/jour soit près de 20 kg. On conçoit donc aisément que les atmosphères polluées sont des vecteurs majeurs d'exposition aux composés chimiques de toute nature relargués dans l'environnement.

La notion de nocivité de la pollution atmosphérique est intensivement étudiée depuis les années 50 et a été grandement diffusée par les médias si bien qu'aujourd'hui, d'après une enquête réalisée dans le cadre du programme de recherche inter-organisme Primequal pour une meilleure qualité de l'air, 87 % des Français interrogés associent pollution et cancer. La question de la relation entre la qualité de l'atmosphère et la santé est en voie de devenir un des enjeux majeurs de notre société. Le législateur a même proposé une définition de la pollution de l'air dans la loi de 1996 sur l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie : « l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, dans l'atmosphère et les espaces clos, de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influencer sur les changements climatiques, à détériorer les biens et matériels et à provoquer des nuisances olfactives excessives ».

Nous sommes exposés de façon chronique à des mélanges extrêmement complexes de polluants ce qui rend l'évaluation du risque très difficile. On peut classer ces impuretés aériennes en quatre classes typiques : les particules, les impuretés aériennes vivantes (bactéries, pollens, champignons...), les gaz inorganiques (CO, NO_x...) et les pollutions chimiques par des composés organiques dont les COV (Composés Organiques Volatils) et les polluants organiques persistants (POP). Ces POP sont définis par 4 propriétés : leur toxicité, leur persistance dans l'environnement, leur bioaccumulation le long de la chaîne alimentaire et leur transport sur de longues distances. Plusieurs dizaines de familles de molécules organiques répondent à ces critères. Le protocole d'Aarhus signé en juin 1998 et la convention de Stockholm signée en mai 2001 ont établi une première liste nominative de POPs : les dioxines, les furannes, les Polychlorobiphényles (PCB), les Héchlorocyclohexanes (HCH), les Héchlorobenzènes (HCB) et les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP).

Les HAP sont des produits de combustion incomplète de la matière organique. Ils sont ainsi émis par le chauffage au bois, les véhicules automobiles ainsi que par la combustion de charbon ou de produits pétroliers. Ils font l'objet de nombreuses recherches de par leur caractère ubiquitaire mais surtout de par leur toxicité avérée qui les classe dans la liste des

polluants prioritaires de l'Environmental Protection Agency aux Etats-Unis. La population générale n'est que rarement exposée à de très fortes concentrations de HAP. Cependant, l'exposition aux HAP en milieu professionnel est clairement associée avec des cancers du poumon, de la vessie et de la peau. Des études en laboratoire ont permis au CIRC (Centre International de Recherche sur le Cancer) de les classer en fonction de leur cancérogénicité. Parmi eux, le Benzo[a]pyrène est considéré comme le plus cancérigène. Il importe donc de se poser la question de l'effet d'une exposition chronique même limitée aux HAP sur la population.

Les nombreuses études déjà menées sur les HAP et en particulier le B[a]P ont permis de comprendre que ces composés n'étaient toxiques et génotoxiques qu'après bioactivation par le métabolisme cellulaire. Deux voies d'endommagement du génome sont proposées : la création d'adduits covalents entre ADN et métabolite, et l'induction d'un stress oxydant. Bien que les cellules possèdent des systèmes de réparation, ces dommages peuvent être convertis en mutations et déclencher le processus de cancérisation.

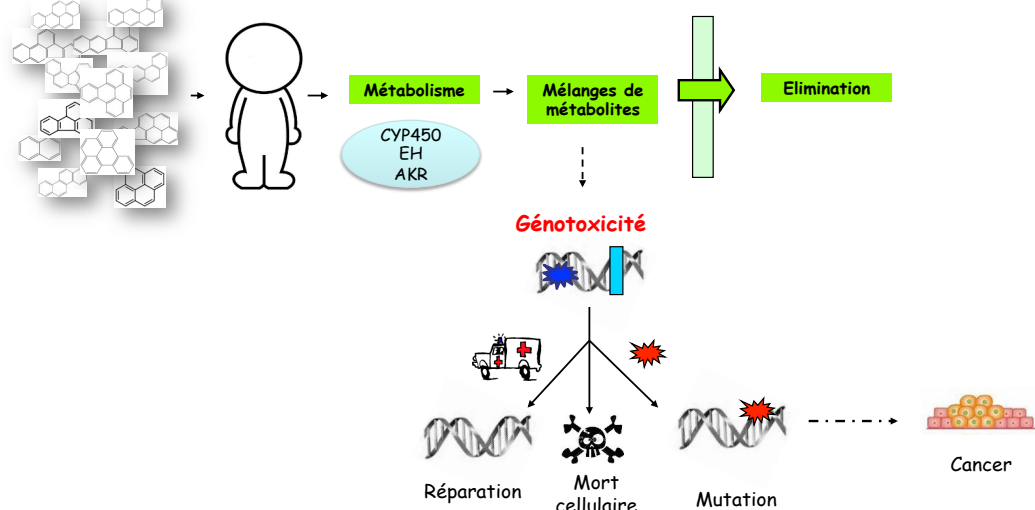


Figure 1 : Les HAP, de l'exposition au cancer

Malgré de nombreuses connaissances sur la toxicité du B[a]P, il manque encore beaucoup de données sur le métabolisme et la génotoxicité des autres HAP. De plus, l'exposition aux HAP implique des mélanges complexes de plus d'une centaine de composés qui empruntent pour la plupart les mêmes voies métaboliques. L'effet combiné de ces molécules en termes de génotoxicité et les interactions au niveau du métabolisme sont aujourd'hui encore très peu caractérisés. Ce sont pourtant des données extrêmement importantes pour l'évaluation du risque. Ce travail de thèse s'inscrit dans cette démarche d'obtention de données nouvelles sur des HAP moins étudiés que le B[a]P ou sur des mélanges. Nous avons privilégié une approche *in vitro*, les études animales étant actuellement rendues complexes par la réglementation et ne permettant pas d'étudier un grand nombre de conditions d'exposition.

Ce travail a été réalisé au Laboratoire « Lésions des Acides Nucléique » (LAN) du CEA de Grenoble, spécialisé dans la détection et la quantification de dommages à l'ADN, en collaboration avec l'équipe d'Environnement et Prédiction de la Santé des Populations (EPSP) du CHU de Grenoble qui possède une expertise dans l'analyse des HAP atmosphériques et le dosage de leurs métabolites urinaires. Ce projet a été rendu possible par un cofinancement ADEME/CEA et un soutien de la région Rhône-Alpes.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une synthèse bibliographique qui vise, après quelques informations générales sur les HAP, à mieux comprendre le processus pouvant aboutir à la formation de cancer par les HAP. Les objectifs de la thèse seront ensuite définis. Dans une seconde partie seront exposées les méthodes utilisées pour atteindre ces objectifs. Enfin, les résultats obtenus au cours de ce travail seront présentés et discutés en trois grandes parties : B[a]P sur trois modèles cellulaires, effet d'une série de HAP pur, et réponse cellulaire aux mélanges de HAP. Enfin, nous concluons et proposerons quelques perspectives à ce travail.

CHAPITRE 1

ETAT DES CONNAISSANCES

Chapitre 1 - Introduction bibliographique

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) constituent donc une classe majeure de Polluants Organiques Persistants (United Nations Economic Commission for Europe, 1998) dont les effets nocifs sur la santé humaine sont avérés (IARC, 2010, INERIS, 2012 Janvier, WHO, 1998). Présents à la fois dans l'atmosphère polluée des villes, en milieu industriel ou dans l'alimentation, ils sont ubiquitaires et toujours émis en mélanges complexes dont la composition est étroitement liée à la source d'émission. Les conséquences sanitaires des HAP sont telles que 16 d'entre eux ont été catalogués prioritaires par l'USEPA (United States Environmental Protection Agency) dès 1984 (Figure 2-(USEPA, 1984)). Parmi eux, on retrouve le Benzo[a]pyrène qui est classé cancérigène, mutagène et reprotoxique (INRS, 2012). Dans les pages qui suivent, nous nous appliquerons à résumer les très nombreuses données disponibles sur la toxicité et la génotoxicité des HAP et de leurs mélanges. Nous tenterons également de mettre en évidence les besoins de données nouvelles pour mieux cerner les conséquences de l'exposition aux HAP.

I. Introduction générale sur les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

1. Généralités

1.1. Formation et propriétés physico-chimiques

Les HAP sont des composés organiques neutres et apolaires constitués de 2 à n cycles benzéniques fusionnés entre eux et ont pour origine la combustion incomplète de matière organique (pyrolyse et pyrosynthèse) ou la distillation des dérivés de la houille ou du pétrole (IARC, 2010, INERIS, 2005, WHO, 1998, Luch, 2004). Le naphthalène (Naph), constitué de 2 cycles, est le HAP le plus simple et le coronène comprenant 7 cycles est un des plus complexes. Dans l'atmosphère, les HAP de faible poids moléculaire (2-3 cycles) sont sous forme gazeuse alors que ceux de poids moléculaire élevé (5-6 cycles) sont

adsorbés sur des particules fines, généralement entre 0,1 et 3 μm de diamètre en raison de leur hydrophobicité et de leur faible volatilité. Enfin, les HAP de poids moléculaire intermédiaire (4 cycles) vont être répartis entre les deux phases (INERIS, 2005).

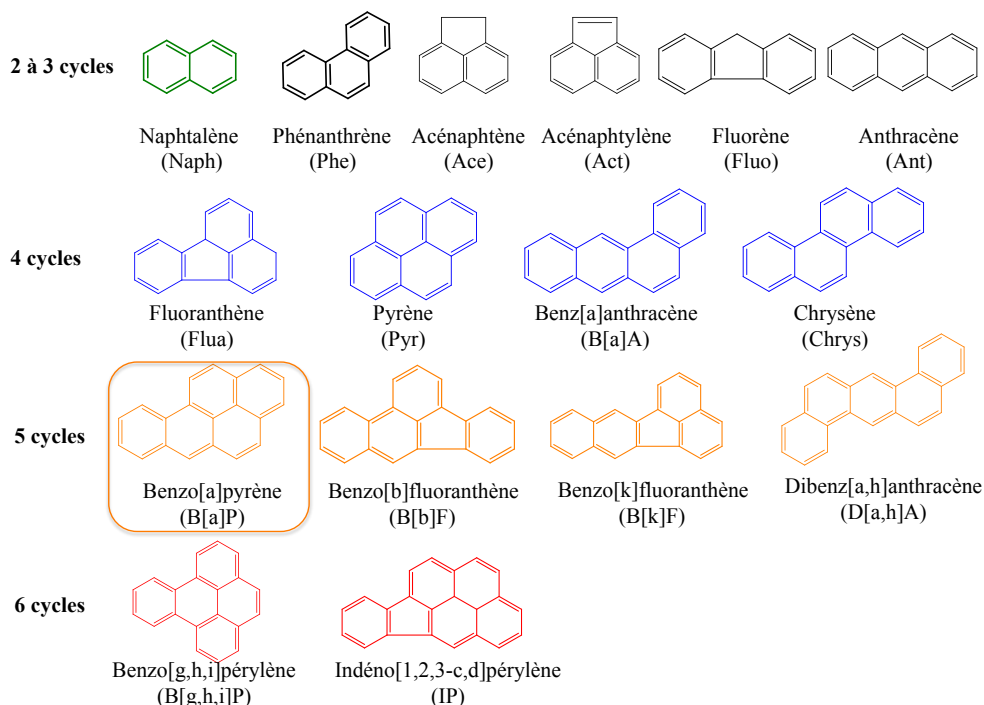


Figure 2 : Structure chimique des 16 HAP classés prioritaires par l'US EPA

1.2. Devenir dans l'environnement

La durée de vie des HAP dans l'air est variable en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. Les HAP présents dans la phase gazeuse ont globalement des durées de vie inférieures à une journée alors que ceux absorbés sur des particules peuvent persister jusqu'à plusieurs semaines et être transportés sur de longues distances en fonction de la taille et de la nature des particules. Mackay *et al* estiment à 17h le temps de demi-vie du Naph contre 4 à 13 jours pour les HAP particulaires tels que le B[a]A, le B[a]P ou le Chrys (Mackay, 2006). De par leur réactivité chimique, les HAP peuvent réagir avec les polluants atmosphériques comme les oxydes d'azote, les composés soufrés, l'ozone en formant ainsi des quinones ou encore avec les UV par un phénomène de photooxydation (Atkinson, 1994, Pozzoli, 2004, Vione, 2004). Les molécules issues de ces réactions sont parfois plus nocives que les composés parents. Leur persistance dans l'environnement est toutefois à

nuancer par rapport à d'autres POP, notamment les polychlorobiphényles (PCB), de par leur sensibilité à la dégradation photochimique. Enfin, le dépôt atmosphérique va entraîner la dispersion de toutes ces substances sur le sol, la végétation et dans l'eau. Les HAP sont peu solubles dans l'eau et possèdent une grande affinité pour les particules solides, ils vont donc être très présents dans les sédiments. Plus le poids moléculaire des HAP augmente, plus ils sont persistants dans le milieu et plus ils sont solubles dans les tissus gras des organismes vivants et peuvent être bioaccumulés en particulier par les organismes aquatiques de 10 à 10 000 fois selon les espèces (EFSA, 2008) en fonction des capacités de biotransformation de l'espèce et de son positionnement dans la chaîne trophique. En effet, chez les moules et les huîtres, le risque d'accumulation jusqu'à de fortes concentrations est élevé alors que chez les vertébrés (poissons et mammifères), le système enzymatique permet d'éliminer ou de dégrader les HAP et de ne pas les accumuler.

1.3. Sources d'exposition aux HAP atmosphériques

1.3.1. Population générale

- **L'air :**

Pour un non fumeur, l'absorption quotidienne de HAP est estimée à 0,207 µg par l'air (EFSA, 2008). L'origine de ces composés peut être naturelle par les feux de forêts ou les volcans mais elle est de façon incontestable majoritairement anthropique. Les sources d'émissions sont variées et comprennent notamment les fumées d'échappement, les émissions industrielles ou domestiques (IARC, 2010, WHO, 1998, Khalili, 1995, Ravindra, 2008). Le niveau d'émission des HAP en France est estimé à 20,6 tonnes pour l'année 2011 (CITEPA, 2012 Avril). Cette valeur tient compte uniquement de la somme du B[a]P, du B[b]F, du B[k]F et de l'IP. La majorité des émissions provient des secteurs résidentiel et tertiaire et est liée essentiellement au chauffage urbain et individuel (bois, charbon et fuel). On trouve ensuite la contribution du transport routier qui constitue une source mobile importante liée en particulier aux véhicules diesels (Figure 3). Enfin, bien que la contribution des industries est faible (2 %), les industries utilisant les dérivés de la houille ou du pétrole peuvent émettre localement des niveaux d'HAP de l'ordre du µg/m³.

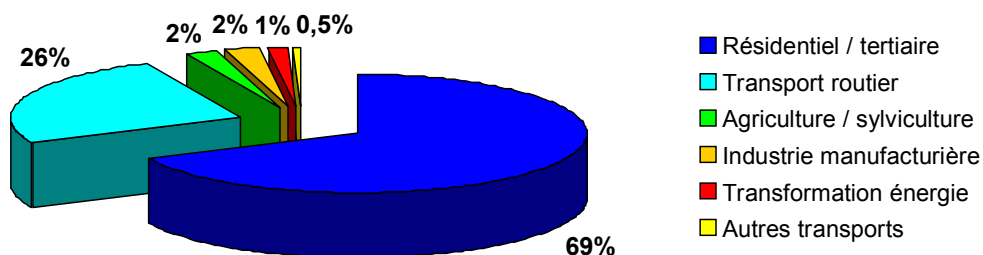


Figure 3 : Répartition des émissions de HAP atmosphériques par secteur d'activité pour la France en 2010 (CITEPA, 2012 Avril)

Le tableau ci-dessous recense quelques exemples de niveau de HAP mesurés dans l'atmosphère.

HAP	Bruit de fond	Site rural	urbain	trafic	industriel
Ace	0,01	0,3-2,6			98
Act	0,01				
Ant	0	0,04-15		0,2-0,6	1,1
B[a]A	0,00-0,02	0,01-0,9		0,6-4,2	0,37-42
B[a]P	0,02	0,02-2,8	0,4-2	0,7-3,1	0,5-39
B[e]P	0,01-0,02	0,18-1,1	0,2-2,1	0,9-3,7	0,65-80
B[b]F	0,00-0,01	0,04-0,6			0,3-34
B[g,h,i]P	0,01	0,15-1,0	0,5-2,8	1-4,7	0,7-52
B[j]F					
B[k]F		0,04-0,32	0,2-1		0,3-17
Chrys		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
D[a,h]A	0	0,02-1,1	0,06-0,3	0,1-0,4	0,05-7,5
Flua	0,14	0,04-7,4			42
Fluo	0,2-0,4	0,3-46		9,9-16,7	
IP	0,02-0,04	0,04-0,21	0,3-2,1	1,3-2,6	0,4-37
Naph	1-2,5	0,3-10			88
Phe	0,1-0,3	0,42-150			16
Pyr	0,08	0,1-6,1	0,24-1,2	9,2-15	75

Tableau 1: Concentrations moyennes des HAP en ng/m³ en Europe sur différents sites [Source : Ambient Air Pollution by PAH– Position Paper – July 27th 2001 – EC]

La composition en HAP est très différente en fonction du site et de la/des source(s) d'émission. Les niveaux en HAP mesurés en milieu industriel sont beaucoup plus importants que pour les autres milieux environnementaux.

- **Le tabac :**

La France comptait en 2010 plus de 16 millions de fumeurs avec 10 milliards de cigarettes fumées par an d'après l'INPES (Institut National de Prévention et d'Education pour la

Santé). Le tabagisme représente 90 % de l'absorption totale des HAP chez le fumeur avec 10 à 40 ng de B[a]P par cigarette. (Ding, 2006, Ding, 2008, IARC, 2010).

- **L'alimentation :**

L'alimentation constitue une source supplémentaire de HAP. Pour un non fumeur, l'absorption quotidienne de HAP est estimée à 1,6 µg par l'alimentation, 0,207 µg par l'air et 0,027 µg par l'eau (EFSA, 2008).

1.3.2. Exposition professionnelle

En milieu industriel, les HAP sont produits par la combustion incomplète de matières organiques, des distillats du pétrole mais surtout des dérivés du charbon (IARC, 2010, INERIS, 2005, WHO, 1998, Luch, 2004). Les niveaux de HAP mesurés dans ces industries sont 10 à 10 000 fois plus importants que ceux auxquels la population générale est exposée (Hemon - Delsaux, 2004). L'exposition individuelle des personnels est cependant modulée par le port d'équipements de protection.

Le ministère du travail recense 1,6 millions de salariés exposés aux HAP en France pour 2003 dont 45 % via les gaz d'échappement diesel (voir Figure 4 (Ministère de l'Emploi, Juillet 2005)) mais les niveaux sont très variables en fonction des secteurs.

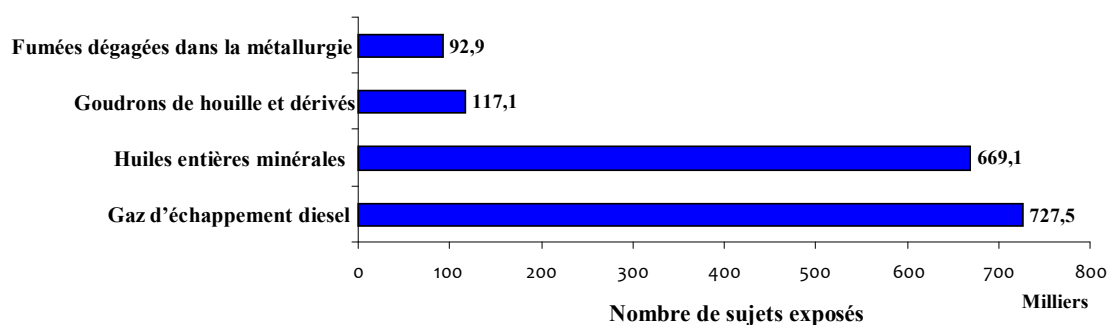


Figure 4 : Répartition du nombre de salariés exposés aux HAP par type d'exposition pour la France (Ministère de l'emploi, Juillet 2005)

De façon générale, les niveaux d'exposition professionnelle au B[a]P peuvent être classés comme suit (Hemon - Delsaux, 2004) :

- Exposition très élevée au B[a]P (supérieure à $3 \mu\text{g}/\text{m}^3$) : cokeries produisant du coke à partir de la houille utilisée notamment en sidérurgie dans les fonderies de fer et les aciéries, la production d'électrodes de carbone à partir de brai
- Exposition élevée au B[a]P (entre 3 et $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$) : production d'aluminium et de silicium
- Exposition moyenne au B[a]P (entre $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ et $50 \text{ ng}/\text{m}^3$) : fonderies (Cu, Zn, laiton), garages et isolation de toitures (asphalte)
- Exposition faible au B[a]P (entre 1 et $50 \text{ ng}/\text{m}^3$) : émissions diesels, tunnels, déchets, revêtements routiers et imprégnation du bois par la créosote obtenue à partir de goudron de houille.

1.4. *Toxico-cinétique des HAP*

L'absorption des HAP dans l'organisme va être étroitement liée à la nature des mélanges donc à la source ainsi qu'à la taille et la composition des particules sur lesquelles vont être adsorbés les HAP de haut poids moléculaire. Les voies d'expositions sont multiples puisqu'elles impliquent le système digestif lors de l'ingestion de nourriture contaminée, le tractus respiratoire par l'inhalation de polluants gazeux et particulaires et la peau, essentiellement en environnement professionnel, par contact direct lors de la manipulation de produits contenant des HAP ou indirect par retombée de poussières et contact avec des vêtements souillés. Il n'existe qu'extrêmement peu de données sur la toxicocinétique des mélanges, les données disponibles étant essentiellement constituées par des études animales avec exposition à du B[a]P radiomarqué (Gerde, 1993a, Gerde, 1993b, Gerde, 2001, Ingram, 1995, Mitchell, 1982, Mitchell, 1983, Moir, 1998).

L'exposition aux HAP implique donc 3 voies d'absorption majeures :

- **Absorption pulmonaire :**

L'absorption pulmonaire est rapide et va être étroitement conditionnée par la pression de vapeur saturante des HAP présents dans le mélange, donc par la répartition entre phase gazeuse et particulaire, ainsi que par la composition des mélanges. De plus, la taille des

particules sur lesquelles les HAP sont adsorbés va être déterminante à la fois pour la localisation du dépôt au niveau de l'arbre pulmonaire et le taux d'absorption. Les HAP adsorbés sur des particules $> 0,1 \mu\text{M}$ se déposent dans la partie trachéobronchique ou dans les voies respiratoires supérieures. Les particules sont transportées par clairance-mucociliaire plus haut dans l'arbre bronchique et avalées, avant d'être redirigées ainsi vers le tractus intestinal (Sun, 1982). Néanmoins, 70 à 80 % des HAP sont adsorbés sur des particules ultrafines ($< 0,1 \mu\text{M}$) et vont facilement atteindre le poumon profond de par leur faible granulométrie (DeMaio, 1966, Sheu, 1997). De plus, la cinétique d'absorption des composés n'est pas homogène au sein de l'épithélium pulmonaire. Ces différences seraient en partie dues à l'épaisseur de l'épithélium et du mucus. En effet, alors que les temps de demi-vie des HAP au niveau de l'épithélium bronchique sont de quelques heures, l'absorption est beaucoup plus rapide au niveau alvéolaire (quelques minutes) où l'épithélium est plus fin (Dahl, 1991, Gerde, 1993a, Gerde, 1993b, Gerde, 2001)

- **Absorption digestive :**

Les HAP sont absorbés rapidement par le tractus gastro-intestinal soit via une diffusion simple à travers des membranes cellulaires soit associés avec les composés lipidiques présents dans l'alimentation (O'Neill, 1991). Le niveau d'absorption intestinale dépend du caractère lipophile des composés, de la sécrétion de la bile par le foie et de la recirculation entéro-hépatique (Modica, 1983, O'Neill, 1991, Rahman, 1986). Plus la lipophilicité du HAP est forte et son poids moléculaires élevé, plus l'absorption est importante.

- **Absorption cutanée :**

L'absorption cutanée est mise en évidence essentiellement en milieu professionnel notamment par la détection de niveaux élevés de métabolites urinaires des HAP chez des salariés de cokeries. Ils exposés majoritairement par voie cutanée par contact direct ou indirect avec des matières souillées (VanRooij, 1993). Les études animales menées sur des rats exposés de façon cutanée à des HAP purs montrent que la peau exerce un rôle de réservoir pour certains de ces composés lipophiles. L'absorption cutanée du pyrène se déroule en deux phases : une phase d'absorption rapide de quelques heures puis une phase plus lente de relargage allant jusqu'à 3 jours après exposition (Payan, 2009).

Différentes études sur des rats traités avec du B[a]P tritié montrent que les HAP absorbés sont distribués rapidement dans la plupart des organes et tissus à différents niveaux selon la

voie d'absorption. Mitchell *et al* ont ainsi observé de la radioactivité dans le système respiratoire, les reins, le foie et en plus faible quantité dans le cerveau, les testicules et la rate chez des rats exposés par inhalation à du B[a]P (Mitchell, 1983). Après une exposition par voie orale, le B[a]P est détecté dans le foie, les poumons ou les reins (Miller, 2001). Enfin, une application d'huile minérale sur la peau de souris conduit à la formation d'adduits à l'ADN au niveau des poumons (Ingram, 1995). Le terme « adduit » désigne un dommage de l'ADN résultant de la fixation covalente d'un xénobiotique sur l'ADN. Les tissus adipeux constituent un site de stockage des HAP (IARC, 2010). Dans les cellules, ils traversent facilement la membrane plasmique grâce à leur lipophilie. Un suivi de la partition du B[a]P dans la cellule par spectroscopie de fluorescence montre qu'après quelques minutes il est localisé dans la membrane plasmique, le réticulum endoplasmique et l'enveloppe nucléaire puis s'accumule dans le noyau, les mitochondries et les lysosomes (Barhoumi, 2011, Barhoumi, 2000). Après métabolisation, les métabolites sont excrétés principalement dans les fèces et dans une moindre mesure dans l'urine.

2. Toxicité et cancérogénicité des HAP

Une exposition respiratoire ou cutanée à de fortes doses de HAP peut être à l'origine d'irritations pulmonaires, cutanées et oculaires mais surtout de phototoxicité associée à une exposition cutanée (IARC, 2010, WHO, 1998).

Néanmoins, la toxicité aiguë des HAP reste modérée comme le montre le tableau qui présente la dose létale 50 (DL50) du B[a]P, mesurée à 48h, en laboratoire chez l'animal pour différentes voies d'administration. Elle correspond à la dose pour laquelle on observe une mortalité de 50 %.

Espèce	Voie d'administration	DL50
Souris	orale	> 1600 mg/kg
Souris	Intrapéritonéale	250 mg/kg
Rat	Sous-cutanée	50 mg/kg

Tableau 2 : DL 50 mesurées après des expositions aiguës au B[a]P (Ineris, 2006)

Si les HAP ont des effets nocifs sur la reproduction, l'immunité et le métabolisme hépatique, c'est leur cancérogénicité en cas d'exposition chronique qui en fait la conséquence sanitaire la plus inquiétante. Le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) et l'Union Européenne (UE) ont classé les HAP, des mélanges et des

activités professionnelles en fonction de leur cancérogénicité sur la base de données épidémiologiques et d'études *in vivo* chez l'animal, en particulier de toxicité chronique ou sub-chronique, ou *in vitro* (Tableaux 3 et 4). Seule la classification de l'UE revêt un caractère réglementaire dans le cadre de l'exposition en milieu professionnel en France.

- **Classification du CIRC (IARC, 2012 (update on 06 Novembre 2012)) :**
 - **Groupe 1 :** L'agent ou le mélange est cancérigène pour l'homme (aussi appelé cancérogène certain ou avéré). Les preuves sont suffisantes sur la cancérogénicité chez l'homme.
 - **Groupe 2 :**
 - **2A :** L'agent ou le mélange est probablement cancérogène pour l'homme. Les indications sont limitées chez l'homme mais suffisantes chez l'animal.
 - **2B :** L'agent ou le mélange est peut-être cancérogène pour l'homme. Les indications sont insuffisantes chez l'homme mais suffisantes chez l'animal.
 - **Groupe 3 :** L'agent ou le mélange est inclassable quant à sa cancérogénicité pour l'homme. Les données sont insuffisantes chez l'homme et limitées voire insuffisantes chez l'animal.
 - **Groupe 4 :** L'agent ou le mélange n'est probablement pas cancérogène. Les études ne révèlent pas de cancérogénicité chez l'homme ou l'animal de laboratoire.

- **Classification de l'UE (INRS, 2012) :**

Actuellement deux systèmes coexistent, la classification issue de la directive européenne 67/548/CEE va être peu à peu remplacée par le nouveau système dit CLP pour "Classification Labelling and Packaging" issu du règlement Européen 1272/2008 CE modifié qui prendra complètement effet en juin 2015.

- **Catégorie 1A (anciennement 1) :** substances et mélanges que l'on sait être cancérogènes pour l'homme (données humaines).
- **Catégorie 1B (anciennement 2) :** substances devant être assimilées à des substances cancérogènes pour l'homme (données surtout animales).

- **Catégorie 2 (anciennement 3) :** substances préoccupantes pour l'homme en raison d'effets cancérogènes possibles (preuves insuffisantes ou pas d'effets tumorigènes suffisants pour entraîner le classement dans la catégorie 2).

	IARC	UE
HAP		
Benzo[a]pyrène	1	1B
Dibenzo[a,h]anthracène	2A	1B
Benzo[b]fluoranthène	2B	1B
Benzo[k]fluoranthène	2B	1B
Benzo[j]fluoranthène	2B	1B
Benzo[a]anthracène	2B	1B
Naphtalène	2B	2
Chrysène	2B	1B
Indeno[1,2,3-cd]pyrène	2B	-
Benzo[e]pyrène	3	1B
Fluoranthène	3	-
Pyrène	3	-
Benzo[g,h,i]pérylène	3	-

Tableau 3 : Classification de plusieurs HAP par le CIRC (IARC, 2012 (update on 06 Novembre 2012)) et l'UE (système CLP)

	IARC	UE
Mélanges et secteurs d'activités		
Fumée de cigarette	1	-
Emissions diesel	1	2
Production d'aluminium et cokerie	1	1A
Huiles minérales et de schiste	1	1A
Goudron de houille	1	1A
Brai de houille	1	1B
Fonderies fer et acier	1	-
Suies	1	-
Gazéification du charbon	1	-
Combustion de biomasse (surtout bois)	2A	-
Fabrication d'électrode de carbone	2A	-
Créosotes	2A	1B
Raffinage du pétrole	2A	-
Emissions essence	2B	1B
Bitumes (goudronnage des routes)	2B	-

Tableau 4 : Classification de plusieurs mélanges ou secteurs d'activités émettant des HAP par le CIRC (IARC, 2012 (update on 06 Novembre 2012)) et l'UE (système CLP) (INRS, 2012)

Des études épidémiologiques ont montré une corrélation entre des niveaux élevés d'exposition professionnelle aux HAP et la survenue de cancer du poumon, de la peau et de la vessie dans différents secteurs d'activités (Tableau 5) notamment les cokeries ou les industries d'aluminium (Bosetti, 2007, Cogliano, 2011, Mastrangelo, 1996). La peau, la vessie et le poumon constituent donc les organes cibles des HAP.

Secteur	RR poolé [95%IC]
Cancers bronchopulmonaires	
Gazéification du charbon	2,29 [1,98-2,64]
Production de coke	1,58 [1,47-1,69]
Etanchéité toitures	1,51 [1,28-1,78]
Fonderies de fer et d'acier	1,40 [1,32-1,49]
Noir de carbone	1,30 [1,06-1,59]
Cancers de la vessie	
Gazéification du charbon	2,39 [1,36-4,21]
Fonderies de fer et d'acier	1,29 [1,06-1,57]
Production d'aluminium	1,29 [1,12-1,49]

Tableau 5 : Incidence des cancers bronchopulmonaires et de la vessie dans différents secteurs industriels avec RR le risque relatif (Bosetti, 2007).

En France, ces types de cancer sont reconnus comme maladies professionnelles en lien avec des expositions à des dérivés du pétrole, aux goudrons, huiles et brais de houille, et aux suies de combustion du charbon.

3. Evaluation du risque et problématique des mélanges : approche par les facteurs d'équivalents toxiques (FET)

Le risque lié à l'exposition à la pollution chimique est extrêmement délicat à évaluer. Deux raisons principales expliquent cela. Tout d'abord l'exposition est très difficile à caractériser de par la complexité intrinsèque et la variété des mélanges ainsi les limites des techniques d'analyses actuelles. De plus, les connaissances toxicologiques portent pour 95 % sur des composés étudiés individuellement (Groten, 2000). L'utilisation d'un indice global pour évaluer le potentiel toxique de mélanges de HAP a été proposée dans les années 80.

L'approche la plus utilisée est l'approche par substance utilisant des facteurs d'équivalents toxiques.

Différents accidents sanitaires, notamment l'explosion d'une usine de trichlorophénol à Seveso, ont poussé la communauté scientifique internationale à développer un outil d'évaluation de risque pour les PCDD/F (polychlorodibenzo-p-dioxines/furanes) en 1977. Cet outil a ensuite été étendu aux HAP et à d'autres composés, notamment les toxines marines, et repose sur l'utilisation de Facteur d'Equivalence Toxique (FET).

Les FET sont des coefficients de pondération qui expriment la toxicité relative de chaque substance (appelée congénère) de manière individuelle par rapport à la substance de référence de la famille. Ces coefficients de pondération se fondent sur les similarités structurales entre les molécules et l'hypothèse d'un mécanisme d'action commun.

Ils prennent des valeurs de 0 à 1 et correspondent à une valeur de toxicité relative par rapport à la toxicité du composé de référence, le Benzo[a]pyrène, fixée à 1. La toxicité d'un mélange de HAP va être calculée en additionnant la concentration de chaque HAP pondérée par son FET et exprimée par la quantité en équivalent toxique de B[a]P soit $[\mathbf{BaP}]_{eq} = \sum_i (\mathbf{FET}_i \times \mathbf{C}_i)$ où \mathbf{FET}_i et \mathbf{C}_i sont la concentration du HAP_i contenu dans le mélange.

Les FET sont attribués sur la base des effets toxiques des HAP et des données scientifiques disponibles utilisées notamment par le CIRC pour classer les composés en fonction de leur cancérogénicité. Ainsi, le D[a,h]A classé cancérigène probable 2A a avec un FET de 1 dans la table de l'INERIS du fait de sa forte toxicité similaire à celle du B[a]P. Les HAP classés cancérigènes possibles 2B ont un FET plus faible de 0,1 pour la plupart des HAP et de 0,01 pour le Chrys. Enfin, pour les HAP classés 3 donc pour lesquels les données sont insuffisantes pour le classement, les FET attribués sont généralement de 0,001 à l'exception du B[g,h,i]P avec un FET de 0,01. Le B[a]Peq est préférentiellement calculé à partir des HAP classés cancérigènes à cause de l'incertitude lié au manque de données pour le groupe 3.

Ce concept permet d'évaluer le poids de chaque substance dans la toxicité globale du mélange et sa grande facilité d'utilisation en fait un outil de régulation et d'orientation politique. Néanmoins son application reste limitée en raison de différents facteurs inhérents à la quantité comme à la qualité de l'information scientifique:

- **Incertitudes liées à l'extrapolation des données scientifiques :**

Pour la définition des FET, les données *in vivo* d'exposition chronique sont privilégiées en premier lieu, suivies par les données d'exposition subaiguë et enfin aiguë (Safe, 1997). Les informations biochimiques permettent de confirmer les valeurs de potentiel toxique dérivé des études *in vivo*. Toutefois, la grande majorité des travaux porte sur des expositions aiguës chez l'animal à court terme et la mesure des affinités de liaison à AhR sur des cellules en culture. L'extrapolation de ces recherches de l'animal à l'homme, des fortes doses aux faibles doses ou des effets aigus aux effets chroniques est très délicate et constitue une grande source d'incertitudes.

- **Comportement des molécules dans les mélanges :**

L'hypothèse sous-tendant le concept des FET est l'additivité des effets. En effet, cette approche ne tient pas compte des interactions pouvant exister en termes d'induction et d'inhibition d'effet entre HAP mais aussi avec d'autres composés au sein des mélanges. La modulation de la génotoxicité du B[a]P a été démontrée pour différents composés. On observe une inhibition de la toxicité du B[a]P en présence de B[k]F (Tarantini, 2011b) alors qu'un effet de synergie a été mis en évidence avec le B[b]F (Tarantini, 2011b) et des pesticides organophosphorés (Hreljac, 2009)

- **L'absence de consensus sur les valeurs des FET :**

Plusieurs tables de FET ont été établies par différents auteurs (Tableau 6) mais aucune n'a fait l'objet d'un consensus international et tous les HAP ne sont pas représentés faute de données toxicologiques. La plus utilisée est celle proposée par Nisbet et Lagoy en 1992 (Nisbet, 1992) notamment très proche des valeurs proposées par l'INERIS en 2003 (INERIS, 2003 Novembre).

L'utilisation de cette approche peut donc conduire à une sous-estimation ou une surestimation du risque et revêt une valeur d'approximation plutôt que de prédiction.

Composé	Nisbet et LaGoy (Nisbet, 1992)	Ineris 2003 (INERIS, 2003 Novembre)	USEPA (USEPA, 1984, USEPA, 1993)	Larsen et Larsen (Larsen, 1998)	Malcom et Dobson (Malcolm, 1994)
Acénaphène	0,001	0,001	0	-	0,001
Acénaphthylène	0,001	0,001	0	0,3	0,001
Anthracène	0,01	0,01	0	0,0005	0,01
Benz[a]anthracène	0,1	0,1	0,1	0,005	0,1
Benzo[a]pyrène	1	1	1	1	1
Benzo[b]fluoranthène	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Benzo[e]pyrène	-	-	-	0,002	0,01
Benzo[g,h,i]perylène	0,01	0,01	0	0,02	0,01
Benzo[j]fluoranthène	-	-	-	0,05	0,1
Benzo[k]fluoranthène	0,1	0,1	0,01	0,05	0,1
Chrysène	0,01	0,01	0,001	0,05	0,01
Coronène	0,001	0,001	-	-	0,001
Cyclopenta[c,d]pyrène	0,1	0,1	-	0,02	0,1
Dibenz[a,c]anthracène	0,1	0,1	-	-	0,1
Dibenz[a,h]anthracène	5	1	1	1,1	1
Fluoranthène	0,001	0,001	0	0,05	0,001
Fluorène	0,001	0,001	0	-	0,001
Indéno[1,2,3 cd]pyrène	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Naphtalène	0,001	0,001	0	-	0,001
Phénanthrène	0,001	0,001	0	0,0005	0,001
Pyrène	0,001	0,001	0	0,001	0,001

Tableau 6 : Principales tables de facteurs d'équivalents toxiques

II. Métabolisme des HAP

Les HAP représentent des xénobiotiques pour la cellule qui va déclencher une série d'activités enzymatiques afin de rendre ces composés à l'origine lipophiles plus hydrophiles pour faciliter leur élimination. Cette métabolisation se déroule principalement en deux phases. La phase I dite de fonctionnalisation se déroule dans le réticulum

endoplasmique et met en jeu des réactions d'oxydation principalement catalysées par les monooxygénases à cytochrome P450 (CYP450). La phase II dite de conjugaison correspond à l'addition d'un groupement hydrophile sur le métabolite précédemment formé sous l'action de différentes enzymes, les transférases, classées en fonction du groupement qu'elles conjuguent au métabolite initial (glutathion, acide glucuronique, sulfates...). Les métabolites ainsi formés sont éliminés de la cellule par l'intermédiaire de protéines d'efflux au cours de la phase III. Dans le cas des HAP, les composés parents ne sont pas impliqués dans la toxicité mais leur métabolites de phase I sont très réactifs et peuvent notamment interagir avec les différentes macromolécules de la cellule dont l'ADN (Figure 5). Les HAP font, à ce titre, partie de la famille des progénotoxiques et des procancérigènes. Leurs propriétés génotoxiques, mutagènes et cancérigènes sont donc indissociables de leur métabolisation.

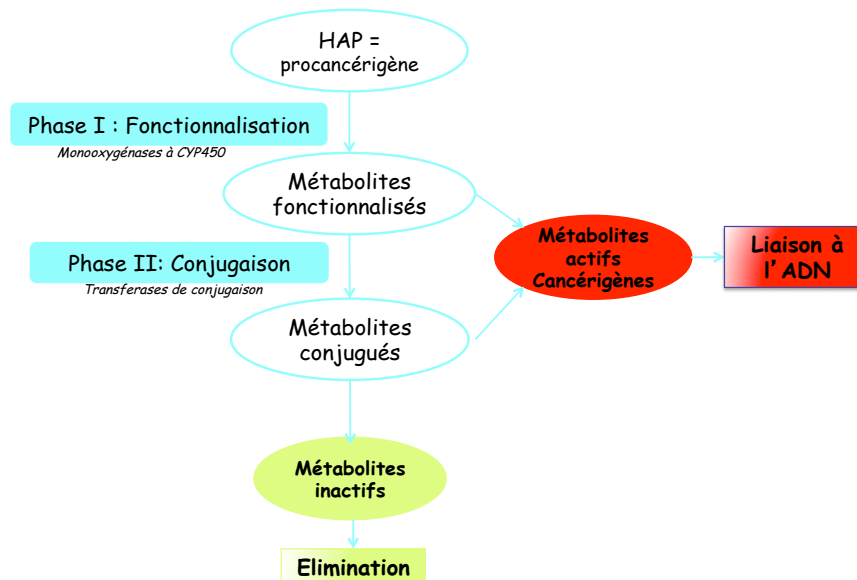


Figure 5 : Schéma de bioactivation des HAP

De façon générale, comme indiqué dans la Figure 6, 3 voies de métabolisation des HAP coexistent dans la cellule : la voie des diol-époxydes, la voie du radical cation et la voie des *o*-quinones.

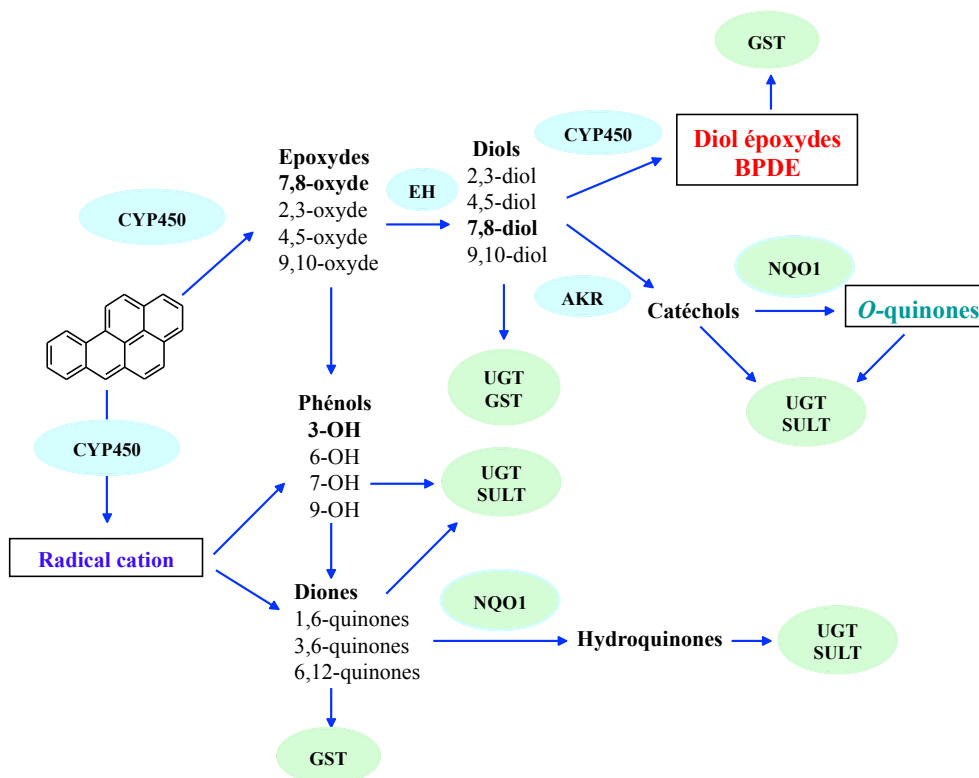


Figure 6 : Schéma général simplifié de métabolisation des HAP avec pour la phase I CYP450 le cytochrome P450, EH l'époxyde hydrolase, AKR les aldocéto-réductases et pour les réactions de phase II UGT la UDP-glucuronyl transférase, SULT Sulfotransférases, GST Glutathion-S-transférases et NQO1 la NAD(P)H oxydoréductase.

1. Biotransformation des HAP : Phase I

1.1. Voie des diol-époxydes

Enzymes impliquées :

- **Enzymes d'oxydation, les mono-oxygénases à cytochrome P450 (CYP450) :**

Les cytochromes P450 constituent une grande famille d'hémoprotéines monomériques présentes dans tous les tissus sauf les muscles, les os et les globules rouges. Elles sont localisées au niveau du réticulum endoplasmique des cellules. Leur nom provient de leur absorption préférentielle à 450 nm et le « P » de l'identification d'un pigment jaune orangé dans des fractions microsomales hépatiques de rat et de cochon, correspondant à l'hème

des protéines. Cette classe d'enzymes de phase I est la plus importante dans le métabolisme des xénobiotiques avec une contribution, évaluée *in vitro*, de 75 %. Elles catalysent principalement des réactions de monooxygénation suivant un cycle catalytique complexe, présenté Figure 7, aboutissant à la réaction suivante : $\text{RH} + \text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{ROH} + \text{H}_2\text{O}$ (Guengerich, 2008, Zanger, 2013).

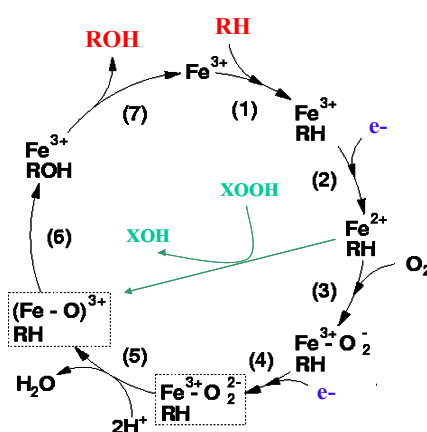


Figure 7 : Cycle catalytique du CYP450. (1) liaison du substrat, (2) réduction du Fe^{3+} par un électron provenant de NAD(P)H, (3) liaison à l'oxygène, (4) seconde réduction, (5) clivage de l' O_2 , (6) l'atome d'oxygène du complexe $(\text{Fe}-\text{O})^{3+}$ est transféré au substrat transformant ainsi le substrat en ROH, (7) relargage du produit et retour du site actif à l'état initial

Ce cycle catalytique nécessite la présence d'un cofacteur donneur d'électron, le NAD(P)H, et d'un donneur d'oxygène comme des peroxydes (XOOH) transformés en dérivés hydroxylés (XOH).

Parmi les 57 isoformes recensées, 5 réalisent à elles seules 95 % des réactions d'oxydation. Elles sont nommées en fonction de leur famille (CYP1- 51) puis de leur sous-famille (CYPA-E) puis des isoenzymes (CYPX1-10). Plus spécifiquement, les enzymes responsables du métabolisme oxydatif des HAP sont les CYP1A1 et 1B1 puis de façon plus modeste les CYP1A2 et 3A4 (Guengerich, 2008, Zanger, 2013).

L'expression des différentes isoformes est très variable selon les organes (Tableau 4). A l'état basal, les CYP1A2 et 3A4 sont préférentiellement exprimées dans le foie alors que les formes 1A1 et 1B1 ont plutôt une localisation extra-hépatique (IARC, 2010, Shimada, 2006a, Shimada, 2004). Dans la plupart des tissus, à l'exception du foie et du tractus intestinal, la forme 1B1 est détectée en plus grande quantité que la forme 1A1. Le profil d'induction des isoformes est donc régulé différemment en fonction du type cellulaire dans

les différents organes (Shimada, 2003), reflétant en cela en partie les différences d'expression du récepteur des hydrocarbures aromatiques AhR. Le CYP1A1 est le CYP le plus inductible par les HAP. Une de ces spécificités est de pouvoir époxyder les diols issus de tous les HAP (Shimada, 2004). Enfin, bien qu'il existe une forte similarité de substrats pour 1A1 et 1B1, l'efficacité de transformation va être différente selon la nature des HAP ou des métabolites (Shimada, 2006a). Le CYP1B1 catalyse, par exemple, de façon plus efficace que la forme 1A1 l'oxydation du 9,10-diol-B[b]F. Les isoformes 1A2 et 3A4, quant à elles, réalisent l'activation des HAP et de leurs métabolites avec des taux beaucoup plus faibles (Luch, 2004, Shimada, 2004, Xue, 2005). La forme 3A4 interviendrait uniquement pour certains HAP comme le D[a,h]A et le CYP1A2 pourrait être impliqué dans la protection contre le stress oxydant chez la souris (Shertzer, 2004, Xue, 2005).

Il faut noter que tous les HAP pourraient ne pas être pris en charge par les CYP450. En effet, des conditions structurales particulières sont requises pour la métabolisation. De façon générale, les HAP doivent présenter des structures avec une région baie, comme le B[a]P ou une région fjord qui facilitent les réactions d'oxydation (Figure 8). Ces régions correspondent à une zone structurée en anneau complexe formée par un anneau benzoangulaire et saturé fusionné avec un anneau aromatique (Baird, 2005).

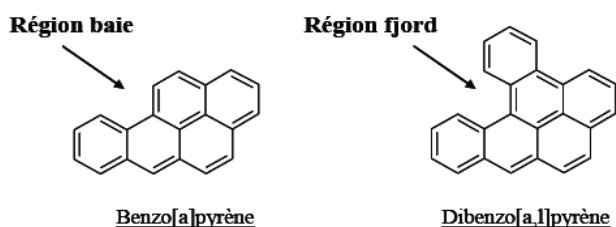


Figure 8 : Caractéristiques structurales des HAP pris préférentiellement en charge par les CYP450

CYP	HAPs et métabolites substrats (non exhaustif)	Localisation
1A1	Benz[<i>a</i>]anthracène-3,4-diol Benzo[<i>g</i>]chrysène + 11,12-diol et dérivés Benzo[<i>b</i>]fluoranthène-9,10-diol Benzo[<i>a</i>]pyrène + 7,8-diol et dérivés Cyclopenta[<i>cd</i>]pyrène Dibenzo[<i>a,l</i>]pyrène Dibenzo[<i>a,l</i>]pyrène-11,12-diol 5-Methylchrysène 5-Methylchrysène-1,2-diol	Extra-hépatique : poumons, cerveau, peau, colon, œsophage, estomac, intestin grêle, lymphocytes, cœur, glandes mammaires et surrénales, utérus, ovaire, pancréas, thymus, prostate Foie
1B1	Benzo[<i>g</i>]chrysène-11,12-diol Benzo[<i>b</i>]fluoranthène-9,10-diol Benzo[<i>a</i>]pyrène + 7,8-diol et dérivés Dibenzo[<i>a,l</i>]pyrène Dibenzo[<i>a,l</i>]pyrène-11,12-diol 5-Methylchrysène-1,2-diol	Extra-hépatique : poumons, œsophage, estomac, colon, reins, utérus, testicules, glandes mammaires et surrénales, rate, prostate, cerveau, thymus, ovaires
1A2	Benz[<i>a</i>]anthracène-3,4-diol Benzo[<i>g</i>]chrysène-11,12-diol Benzo[<i>b</i>]fluoranthène-9,10-diol Benzo[<i>a</i>]pyrène-7,8-diol Cyclopenta[<i>cd</i>]pyrène Dibenz[<i>a,h</i>]anthracène Dibenzo[<i>a,l</i>]pyrène + 11,12-diol et dérivés 5-Methylchrysène-1,2-diol	Foie
3A4	Cyclopenta[<i>c,d</i>]pyrène Dibenz[<i>a,h</i>]anthracène Dibenzo[<i>a,l</i>]pyrène 5-Methylchrysène	Foie Extra-hépatique : tractus gastro-intestinal, poumons, reins, cerveau, placenta, lymphocyte.

Tableau 7 : Localisation et substrats des isoformes principales du CYP450 impliquées dans le métabolisme des HAP (Hukkanen, 2000, Hukkanen, 2002, IARC, 2012 (update on 06 Novembre 2012), WHO, 1998, Luch, 2004, Shimada, 2006a, Shimada, 2004, Xue, 2005)

- **Enzymes d'hydrolyse, l'époxyde hydrolase (EH) :**

Cette enzyme de la famille des hydrolases à feuillet $\alpha\beta$ existe principalement sous 2 formes chez l'homme : soluble et microsomale (Morisseau, 2005, Shimada, 2006a, Xue, 2005). La forme microsomale, localisée dans le réticulum endoplasmique, catalyse la transformation de l'époxyde primaire en diol lors de la métabolisation des HAP. Elle est exprimée dans la plupart des tissus de l'organisme avec une plus grande concentration au niveau du foie que dans les poumons (Hassett, 1994). Une induction du gène codant pour l'EH et une modulation de l'activité différente selon les HAP a été mise en évidence dans des tranches de foie de rat ou humain (Pushparajah, 2008b). Ainsi, le Flua et le D[*a,h*]A et le B[*a*]P augmentent l'activité de l'EH alors que le B[*b*]F ne module ni l'activité ni le niveau de protéine dans des tranches de foie humain. Toutefois, le B[*a*]P induit de façon

faible l'EH dont les niveaux de transcrits restent stables quelle que soit la concentration jusqu'à 10 μM (Arand, 2005).

Réactions métaboliques :

La conversion en diol-époxydes est une des voies métaboliques les plus importantes pour de nombreux HAP. Pour le B[a]P, la première étape correspond à la mono-oxydation d'une double liaison catalysée par les enzymes du cytochrome P450 (CYP450) aboutissant à la formation d'arène-oxydes (ou dihydro-époxydes) instables : 1,2-, 2,3-, 4,5-, 7,8- et 9,10-époxyde-B[a]P (Figure 9). L'Époxyde Hydrolase (EH) hydrolyse alors ces composés pour produire majoritairement le 7,8-dihydrodiol-B[a]P. Enfin, par l'action des CYP450, une nouvelle oxydation du 7,8-dihydrodiol-B[a]P au niveau de la double liaison adjacente à la fonction diol va générer un diol-époxyde-B[a]P ou 7,8-dihydro-7,8-dihydroxy-Benzo[a]pyrène-9,10-oxyde (BPDE). Le BPDE est extrêmement réactif et est considéré comme le cancérigène ultime du B[a]P (Luch, 2004, Xue, 2005).

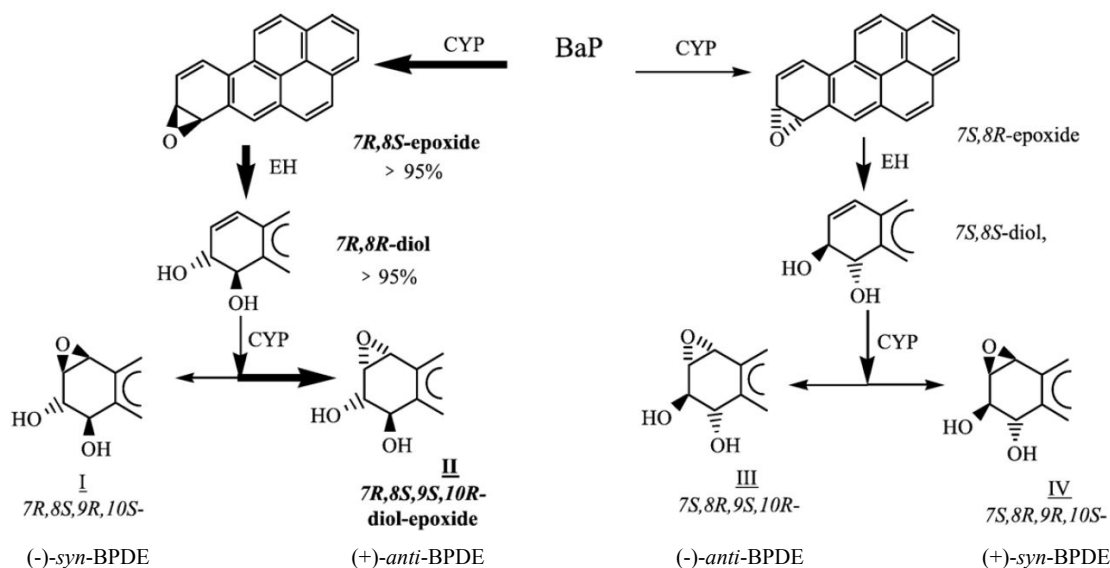


Figure 9 : Voie des diol-époxydes, d'après Xue *et al* (Xue, 2005)

Ces dérivés diol-époxydes se forment avec une grande stéréo-sélectivité due aux CYP450. Dans le cas du B[a]P, l'époxydation du 7,8-dihydrodiol peut conduire en principe à la formation de 4 isomères du BPDE (Figure 9) : une paire de diastéréoisomères (*syn* et *anti*) possédant chacun 2 énantiomères (+ et -). Pourtant, la métabolisation par des microsomes

de foie de rat entraîne la forme quasi-exclusive de l'époxyde 7R,8S ensuite hydrolysé préférentiellement en 7R, 8R diol puis finalement en (+)-anti-BPDE (7R, 8S, 9S, 10R). Le CYP1A1 présente la plus grande stéréosélectivité (Luch, 2004, Xue, 2005).

1.2. Voie des *o*-quinones

Enzymes impliquées :

Les premières étapes de formation des *o*-quinones sont communes à celle de la voie des diol-époxydes jusqu'à la génération du 7,8-dihydrodiol-B[a]P. Les **CYP450** et l'**EH** sont donc également impliquées dans cette voie de transformation du B[a]P.

- **Les Aldocéto-réductases (AKR) :**

Les AKR aussi nommées Dihydrodiol Deshydrogénases (DD) catalysent la transformation des HAP trans-dihydrodiols en catéchols qui sont transformés en quinones par des cycles d'oxydo-réduction. Ces enzymes cytosoliques qui appartiennent à la superfamille des oxydoréductases monomériques NAD(P)(H) dépendantes. Cinq isoformes sont impliquées dans le métabolisme des HAP : AKR1A1 ainsi que les AKR1C1-C4. Elles sont détectées dans la majorité des tissus à l'exception de AKR1C4 qui est spécifique au foie (Palackal, 2002, Penning, 2004, Xue, 2005, Zhang, 2012).

L'isoforme 1A1 transforme stéréospécifiquement la forme (-)7R,8R-dihydrodiol-B[a]P avec la meilleure efficacité contrairement aux 1C qui réalisent l'oxydation des 2 stéréoisomères (Zhang, 2012). Néanmoins, l'isoforme 1A1 est très faiblement exprimée dans les cellules bronchoalvéolaires ce qui implique que cette enzyme ne soit pas critique dans la réduction des *o*-quinones dans le poumon (Burczynski, 1998, Burczynski, 1999).

L'efficacité des isoformes des AKR1C1-C3 dépend de la nature des HAP : pour la conversion du dihydrodiol-B[a]P la forme C2 est la plus efficace alors que pour le 1,2-diol-naphtalène, c'est la forme C1 (Burczynski, 1998, Burczynski, 1999, Palackal, 2002). Dans la lignée alvéolaire A549, les AKR1C sont beaucoup plus exprimées que la 1A1 suggérant l'importance de ces isoformes dans la voie des *o*-quinones pour le poumon (Zhang, 2012). Enfin, il a été récemment démontré qu'AKR1C1 pouvait être induite par les HAP via la liaison à AhR et par les espèces réactives de l'oxygène (Burczynski, 2000).

Il faut mentionner que des quinones sont produites de façon non enzymatique. En effet, les époxydes générés par actions des CYP peuvent former des phénols par réarrangement (1-OH, 3-OH, 7-OH ou 9-OH-B[a]P) qui sont transformés en diones par auto-oxydation (1,6-, 3,6- et 6,12-dione-B[a]P).

Réactions métaboliques :

Après la formation du *trans*-dihydrodiol, suite à la première oxydation par le CYP450 du B[a]P, se met en place une compétition entre les monooxygénases-CYP450 dépendantes pour la voie des diol-époxydes et les dihydrodiols déshydrogénases de la voie des *o*-quinones. La nature et la quantité des métabolites produits dépendent donc du niveau d'expression des enzymes des deux voies et de l'état redox de la cellule (Jiang, 2005, Quinn, 2008, Zhang, 2012).

Dans le cas du B[a]P (Figure 10), les dihydrodiols déshydrogénases (DD) qui font partie de la superfamille des AKR catalysent l'oxydation, NAD(P)⁺ dépendante, du *trans*-7,8-dihydrodiol-B[a]P en catéchol, le B[a]P-7,8-catéchol. Ce composé très instable va subir deux oxydations mono-électroniques successives. La première oxydation génère un radical anion semiquinone et la seconde aboutit à la formation de la *o*-quinone ou 7,8-dione-B[a]P. Ces composés peuvent être par la suite reconvertis en catéchol en présence de NADPH cellulaire (Luch, 2004, Penning, 2004, Xue, 2005), induisant un cycle catalytique de production d'espèces réactives de l'oxygène.

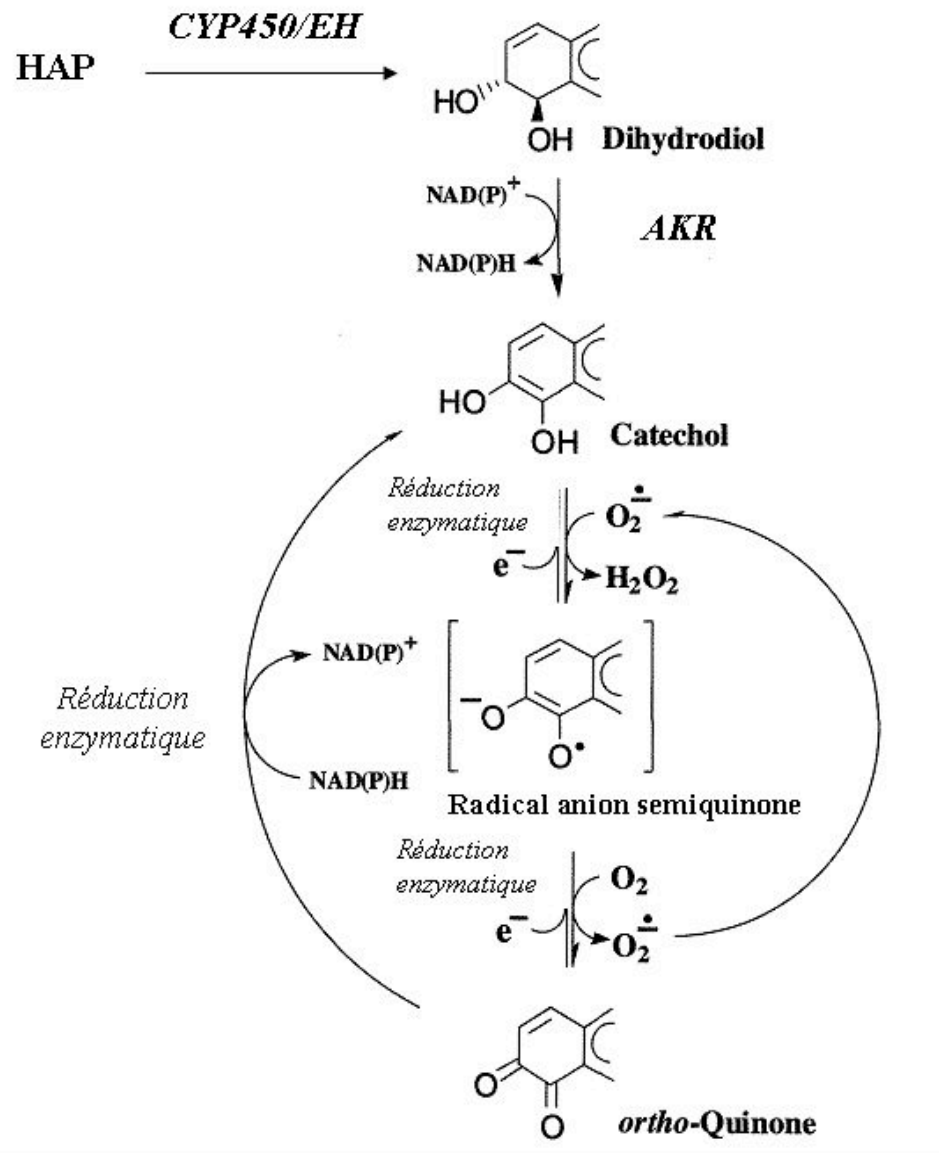


Figure 10 : Voie des *o*-quinones, adapté de Luch A. (Luch, 2004).

1.3. Voie du radical cation

Enzymes impliquées :

Les **CYP450** sont également impliqués dans cette troisième voie de biotransformation. L'oxydation catalysée est une oxydation à un électron à l'inverse des réactions métaboliques présentées précédemment qui mettaient en jeu des réactions d'oxydation à deux électrons.

Réactions métaboliques :

Cette troisième voie conduit à la formation d'un radical cation généré par une oxydation à un électron sur le carbone le plus électrophile du HAP sous l'action des CYP450 (Figure 11). Les conclusions de différentes études montrent que la formation du carbocation serait favorisée par un potentiel d'ionisation faible des HAP ($PI < 7,35 \text{ eV}$) qui permet l'arrachement d'un électron conduisant à la formation d'un radical cation relativement stable. Le PI du B[a]P est de $7,23 \text{ eV}$ (Cavalieri, 1992, Luch, 2004).

Cette voie serait également impliquée dans la formation de différents phénols du B[a]P comme le 6-OH-B[a]P, conduisant ensuite aux 1,6-, 3,6- et 6,12-diones (IARC, 2010).

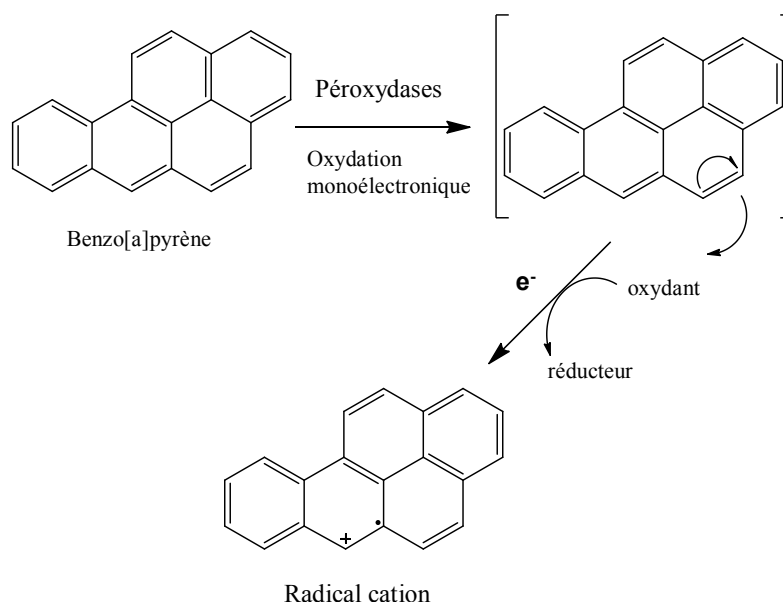


Figure 11 : Formation du radical cation du B[a]P (charge localisée en C6) – Adaptée de Xue *et al* (Xue, 2005)

2. Biotransformation des HAP : Phase II

Les réactions de phase II correspondent à des conjugaisons avec des groupements hydrophiles catalysées principalement par les Glutathion-S-Transférases (GST), les UDP-Glucuronyl-Transférases (UGT), les Sulfotransférases (SULT) ou la NAD(P)H Quinone Oxydoréductase 1 (NQO1) décrites si dessous.

2.1. *Les UDP-Glucuronyl-Transférases (UGT)*

Les UGT sont situées dans le réticulum endoplasmique et catalysent des réactions de glucuronidation, c'est-à-dire la conjugaison entre les métabolites et l'UDP-glucuronate (Figure 12.A). Leurs substrats préférentiels sont les dihydrodiols. La principale famille d'UGT impliquée dans la détoxification des HAP chez les mammifères est celle des isoformes de UGT1A. Leur affinité pour le 7,8-dihydroxy-7,8-dihydro-B[a]P varie dans l'ordre suivant : UGT1A10 > UGT1A9 > UGT1A1 > UGT1A7 (Shimada, 2006a, Xue, 2005).

Les UGT sont également impliquées dans la détoxification des phénols et diphénols issus des quinones. La conjugaison de 3,6-dione-B[a]P est préférentiellement catalysée par l'isoforme UGT 1A7 (Grove, 2000).

2.2. *Les Sulfotransférases (SULT)*

Les SULT sont des enzymes cytosoliques impliquées dans la détoxification des HAP par sulfonation des métabolites (Figure 12.B). Six classes de SULT sont en particulier exprimées chez l'homme et sont nommées en fonction de la nature du composé qu'elles prennent en charge. La sulfonation des métabolites des HAP est prise en charge par les phénol-SULT, en particulier la SULT1A1, et les hydroxy-SULT (Shimada, 2006a, Xue, 2005). Les phénols, dihydrodiols et quinones sont des substrats des SULT. Le 7,8-dihydrodiol-B[a]P semble être un substrat très faible pour les SULT chez les mammifères (Glatt, 2000).

2.3. *Les Glutathion-S-Transférases (GST)*

Cette superfamille d'enzymes catalyse la conjugaison du glutathion (GSH) avec les métabolites électrophiles en particulier les époxydes et diol-époxydes faisant ainsi de ces enzymes des acteurs importants dans la détoxification des HAP (Figure 12.C). La conjugaison avec le glutathion par les glutathion transférases (GST) est considérée comme la principale voie de détoxification du BPDE. Le BPDE peut également s'hydrolyser de

façon spontanée en tétraols, le 7,8,9,10-tetrahydroxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrène, excrétés après sulfo ou glucurono-conjugaison de la même façon que les dihydrodiols et les phénols.

Il existe 8 classes de GST parmi lesquelles 3 interviennent dans la métabolisation des HAP chez les vertébrés supérieurs : α (GST A1), π (GST P1) et μ (GSTM1). Elles sont détectées dans la plupart des tissus en quantité différentes : l'isoforme A1 présente une localisation plutôt hépatique alors que la P1 est plutôt extra-hépatique. Le rôle des isoformes est variable en fonction de la nature des HAP et des tissus. En ce qui concerne la conjugaison de GSH au BPDE, la P1 serait la plus efficace suivie de la M1 puis de la forme A1 (Dreij, 2002, Jernstrom, 1989, Jernstrom, 1996, Shimada, 2006a, Sundberg, 2002, Sundberg, 1998, Xue, 2005).

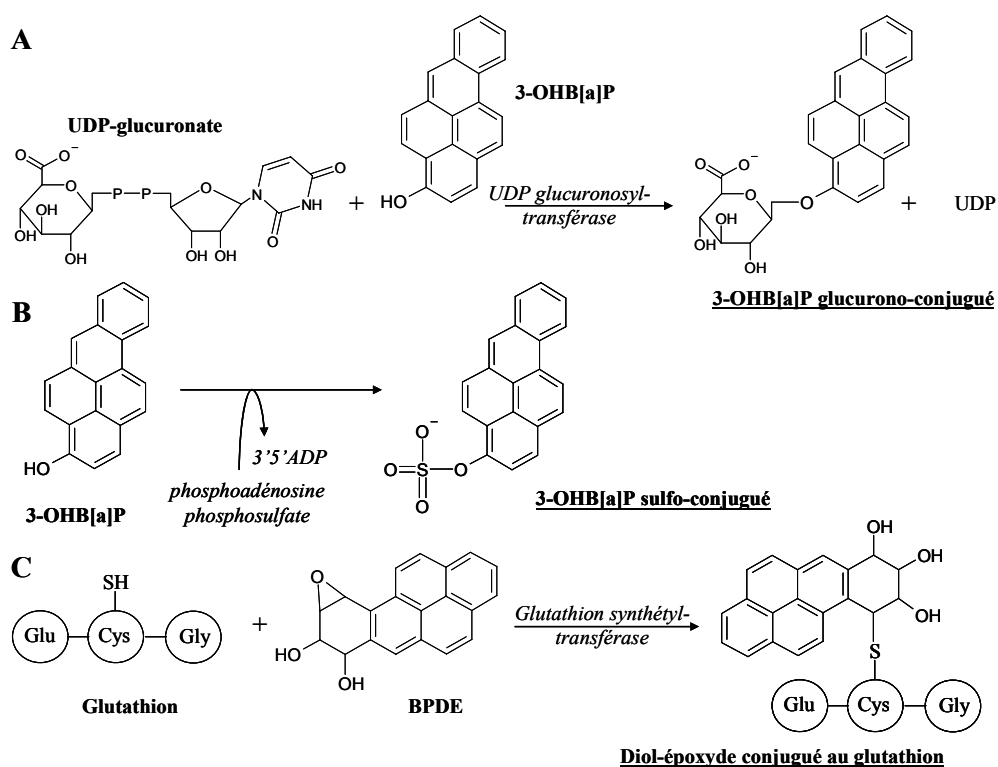


Figure 12 : Principales réactions de phase II catalysées par les UGT (A), les SULT (B) et les GST (C)

2.4. *La NAD(P)H quinone oxydoreductase I (NQO1)*

La NQO1 ou DT-diaphorase appartient à la famille des oxydoréductases, elle catalyse la réduction à 2 électrons des 1,6-, 3,6- et 6,12- diones en hydroquinones correspondantes inactives en présence de NAD(P)H.

Les hydroquinones peuvent être à leur tour éliminées sous forme de sulfo ou glucurono-conjugués (IARC, 2010, WHO, 1998, Srivastava, 1999, Xue, 2005).

Les conjugués sont ensuite soit directement excrétés par la bile dans les fécès soit transportés vers les reins où ils sont encore modifiés. Par exemple, la transformation enzymatique des conjugués au GSH conduit à la formation de dérivés d'acide mercapturique grâce à l'action concertée de trois enzymes : la γ -glutamyltransférase, la dipeptidase et la β -lyase.

3. Efflux des HAP : phase III

Les MRP (MultiDrug Resistance Proteins) sont des protéines d'efflux et font partie de la famille des transporteurs ABC. Ces transporteurs trans-membranaires ont pour rôle d'éliminer les métabolites hors de la cellule et existent sous 9 isoformes MRP1-9. Ils sont présents à différents niveaux dans la plupart des tissus à l'exception de la MRP2 qui est essentiellement hépatique. MRP1 et 2 possèdent une grande fenêtre de spécificité pour les conjugués HAP-GSH notamment ceux des diol-époxydes comme les conjugués BPDE-GSH (Gelhaus, 2012, Nagayoshi, 2004, Schinkel, 2003, Srivastava, 1999). Le transporteur MRP4 serait quant à lui impliqué dans l'efflux des dihydrodiols du B[a]P et dans la protection contre les adduits (Gelhaus, 2012, Schinkel, 2003, Srivastava, 2002).

4. Induction des gènes du métabolisme par les HAP

Les HAP sont à la fois des substrats pour les enzymes de phase I et II mais aussi des inducteurs des gènes codant pour ces enzymes majoritairement via la liaison au récepteur Ah (AhR).

- **Localisation du récepteur :**

Le récepteur AhR est présent de façon ubiquitaire dans les tissus et cellules de l'organisme à des niveaux variables. La plus forte densité est retrouvée dans les poumons, les reins, le foie ou le thymus chez l'homme (Puga, 2009).

- **Ligands :**

Les HAP représentent de bons ligands pour AhR de par leur planarité et leur aromaticité. Néanmoins, l'affinité des différents HAP pour AhR va dépendre fortement de leur taille et de leur géométrie en particulier du ratio aire/profondeur² qui constitue un index de planarité. Une bonne corrélation est observée entre le rapport longueur/largeur et l'induction du CYP1A1. Le Naph à 2 cycles et les HAP à 3 ou 4 cycles comme le pyrène ou l'anthracène sont de mauvais inducteurs du CYP1A1 de par leur faible affinité pour AhR. A l'inverse, les HAP à 5 cycles sont de bons ligands d'AhR mais avec des affinités plus ou moins importantes en fonction de leur forme. Ainsi, le B[e]P présente une plus faible affinité que le B[a]P pour AhR en raison d'un ratio longueur/largeur plus petit et induit moins le CYP1A1. Le D[a,h]A et le B[b]F sont eux de meilleurs ligands avec un index de planarité plus important (Genter, 2006, Machala, 2001, Murahashi, 2007, Pushparajah, 2008a).

- **Régulation des gènes :**

AhR est une protéine de la famille des bHLH/PAS (basic Helix-Loop-Helix/Per-Arnt-Sim) des régulateurs hétérodimériques de transcription. Elle est présente à l'état dormant dans le cytoplasme des cellules en complexe avec 2 protéines chaperonnes, Hsp90 (Heat shock protein), qui interagissent elles-mêmes avec les protéines p23 et XAP2 (Immunophilin-like protein hepatitis B virus X-associated protein 2). La fixation d'un ligand active le complexe, AhR se dissocie des Hsp90 ce qui expose sa Séquence de Localisation Nucléaire du récepteur (NLS). Le complexe HAP-AhR est transloqué dans le noyau et forme alors un hétérodimère avec Arnt. AhR-Arnt reconnaît des séquences consensus dites XRE (Xenobiotic Response Elements) et active la transcription des gènes cibles du métabolisme des enzymes de phase I i.e. CYP 1A1 (Figure 13), CYP 1B1, 1A2 et AKR,

des enzymes de phase II comme les GST, les UGT ou l’NQO1 et des protéines d’efflux MRP1, MRP2 et MRP4 (IARC, 2010, Janosek, 2006, Nebert, 2004, Nebert, 2000, Puga, 2009).

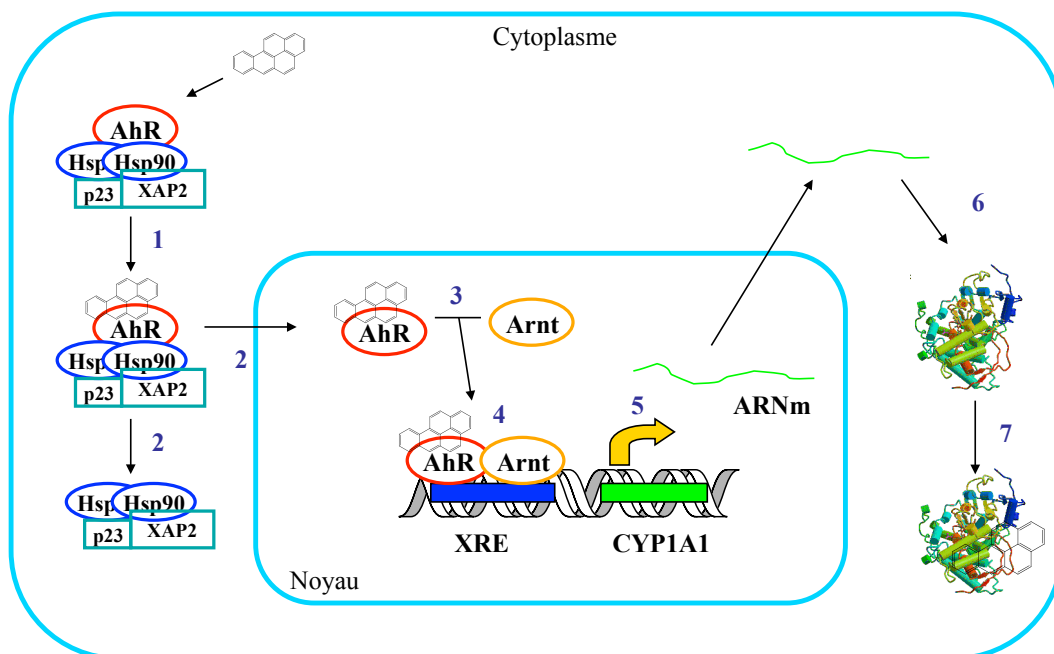


Figure 13 : Schéma simplifié de l’induction du CYP1A1 par le B[a]P : 1- liaison B[a]P-AhR, 2- dissociation d’AhR des Hsp90 et translocation du complexe AhR-B[a]P dans le noyau, 3- dimérisation d’AhR avec Arnt, 4- fixation du complexe au niveau de l’élément de réponse aux xénobiotiques XRE, 5- activation du gène du CYP1A1 et transcription, 6- traduction, 7- métabolisation du B[a]P par le CYP1A1

L’induction de gènes via AhR n’est pas uniquement médiée par les HAP mais aussi leurs métabolites. Il a récemment été mis en évidence que les *o*-quinones issues notamment du B[a]P, du B[a]A et du Chrys pouvaient réguler l’expression des gènes pour les enzymes du métabolisme (Bekki, 2012, Burczynski, 2000, Spink, 2008).

Il est de plus admis que l’induction des gènes de phase II par AhR pouvait être indirecte via l’activation du gène Nrf2 (NF-E2-related factor 2), impliqué dans la protection contre le stress oxydant. Nrf2 constitue un gène cible d’AhR et peut être également activé indirectement par les espèces réactives de l’oxygène générées lors de la métabolisation. Ce facteur de transcription reconnaît des éléments de réponse aux antioxydants ARE dans certains gènes de phase II (NQO1, GSTA2 et EH) (Kohle, 2007).

Le mécanisme d’inhibition de ces gènes est plus incertain. Plusieurs études suggèrent la présence d’éléments de réponse négative (NRE) en amont du CYP1A1 humain mais aussi

chez le rat et la souris. Néanmoins, la séquence XRE semble jouer un rôle à la fois dans l'induction et dans l'inhibition de la transcription des gènes du métabolisme (Nebert, 2000). L'inhibition d'AhR pourrait impliquer la protéine AhRR (AhR Repressor) via une compétition pour la liaison à Arnt (Mimura, 1999).

Enfin, différentes équipes ont évoqué la participation directe ou indirecte d'autres récepteurs dans la régulation de certains de ces gènes. Par exemple, alors que les HAP de 5 cycles ou plus, notamment le B[a]P, provoqueraient l'activation du CYP1A2 via AhR, ceux de 3 ou 4 cycles comme le pyrène induiraient la transcription de ce gène par l'intermédiaire du récepteur CAR (Constitutive Androstane Receptor) (Lee, 2007).

5. Susceptibilités génétiques liés aux enzymes impliquées dans la métabolisation

Des polymorphismes génétiques ont été mis en évidence pour toutes les enzymes principales de métabolisation des HAP : CYP1A1, 1B1, 1A2, 3A4, EH, NQO1 et les différentes isoformes des AKR, SULT, UGT et GST (IARC, 2010, Luch, 2004, Xue, 2005). Ces polymorphismes n'ont pas tous d'influence sur les fonctions des enzymes. Néanmoins, certains peuvent aboutir à une altération de l'expression et de l'activité catalytique de l'enzyme voire à une augmentation de la capacité de métabolisation. Toutes les combinaisons possibles de polymorphismes vont conditionner la susceptibilité de chaque individu face aux xénobiotiques. De nombreuses études ont tenté de mettre en évidence des corrélations entre certains polymorphismes et l'incidence de cancer. Ces études épidémiologiques sont souvent très complexes à interpréter et délicates à comparer y compris pour les mêmes polymorphismes et le même type de cancer. En effet, les données obtenues sont influencées par de nombreux facteurs comme l'âge, le sexe, les conditions physiologiques ou pathologiques et l'exposition aux mélanges complexes de polluants atmosphériques qui est très variable. De plus, il existe des différences dans les polymorphismes génétiques ou leur combinaison en fonction de l'origine ethnique des individus.

Parmi les 11 allèles recensés pour le CYP1A1, 4 sont soupçonnés d'avoir une influence sur la susceptibilité aux cancers. CYP1A1*2 augmenterait la survenue d'adénocarcinomes pulmonaires chez les fumeurs japonais (Nakachi, 1993). Cependant, la prévalence de ces polymorphismes est faible dans la population caucasienne et aucun lien n'a été clairement établi entre les différents allèles et l'incidence du cancer du poumon pour les différentes ethnies (Xue, 2005).

Au niveau de l'EH, 2 variants alléliques ont été mis en évidence. EH3 porte une mutation (TC) sur l'exon 3. Cette mutation entraîne une diminution de 40 % de l'activité catalytique de l'enzyme qui a pour conséquence une diminution du niveau d'adduits BPDE à l'ADN après exposition au B[a]P (Pastorelli, 1998). Une autre mutation au niveau de l'exon 4 (EH4) est, quant à elle, associée à une augmentation de l'activité enzymatique (25%) par rapport à l'enzyme sauvage (Hassett, 1994).

De nombreuses études se sont intéressées aux polymorphismes des GST, en particulier les formes GSTM3, M1 et T1. Parmi ces enzymes, la GSTM1 n'est exprimée que chez la moitié des individus caucasiens de par une délétion homozygote du gène (Seidegard, 1997). Cette délétion est corrélée avec une augmentation du risque de cancer du poumon et de la vessie (Engel, 2002, McWilliams, 1995). De plus, certains travaux ont suggéré que les homozygoties pour les variants des gènes de la GSTP1 (GSTP1*B et *C) augmenteraient les risques de cancer de vessie par trois, ainsi que ceux du poumon et des voies aérodigestives supérieures (Harries, 1997, Matthias, 1998, Ryberg, 1997).

D'autres variants alléliques ont été associés avec différents degrés de certitude à une incidence accrue du cancer de poumon comme NQO1*2, SULT1A1*2, AKR1C3*Gln5His, CYP1B1*2 (Luch, 2004).

Compte tenu de la variété dans l'expression des enzymes du métabolisme, différentes équipes ont analysé les combinaisons de polymorphismes afin d'améliorer l'estimation du risque de survenue de cancers. Des combinaisons entre CYP1A1*2 (A et B) et l'absence de GSTM1 chez des individus homozygotes sont associées avec une prévalence du cancer du poumon (Hayashi, 1992). En accord avec cette observation, une plus forte inductibilité du CYP1A1 a été détectée avec une délétion de la GSTM1 dans des cellules en culture (Vaury, 1995).

III. Les dommages à l'ADN

Nous venons de voir la grande diversité de métabolites réactifs issus de la biotransformation des HAP (diol-époxydes, radicaux cations, quinone). Ces composés peuvent créer des liaisons covalentes avec les bases de l'ADN, générant des adduits. Le lien entre métabolisation et formation d'adduits est montré par la baisse du taux de ces derniers dans des modèles biologique déficients en une activité métabolique ou l'autre (Gelhaus, 2011, Shimada, 2006a, Srivastava, 2002, Sundberg, 2002). Par ailleurs, des espèces réactives de l'oxygène peuvent être produites, soit comme sous produits des enzymes comme les CYP450, soit par des métabolites aux propriétés redox. Ce sont ainsi de nombreuses voies d'endommagement de l'ADN (Figure 14) qui ont été proposées pour expliquer l'induction de mutations et l'initiation du processus de cancérisation par les HAP.

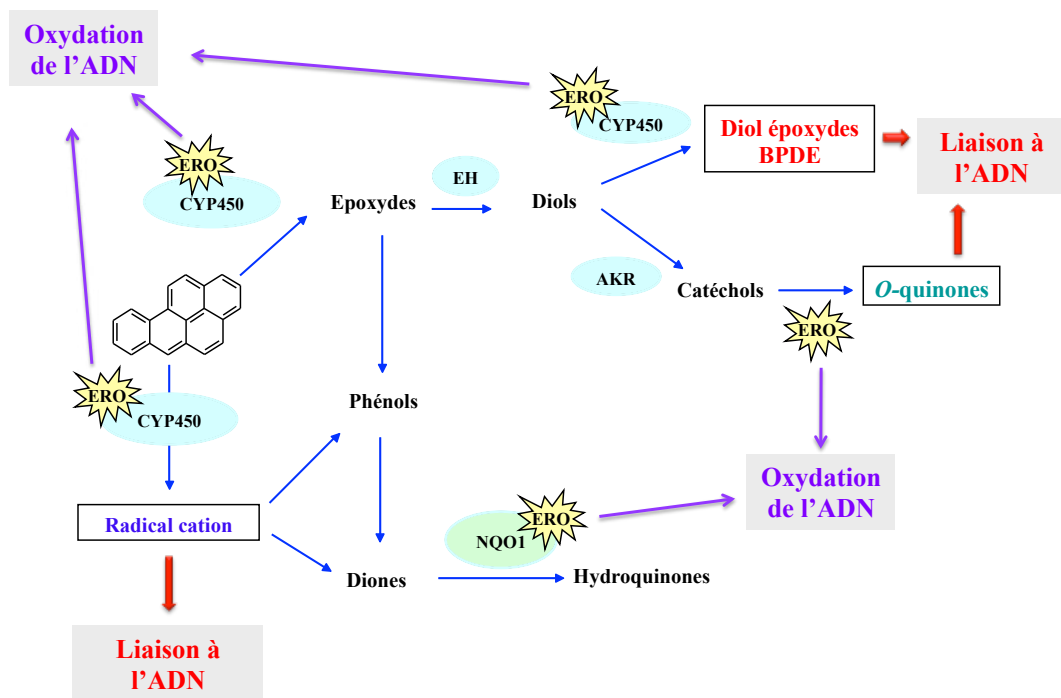


Figure 14 : lien entre métabolisme des HAP et dommage de l'ADN

1. Les adduits

Le terme « adduit » désigne un dommage de l'ADN résultant de la fixation covalente d'un xénobiotique ou d'un de ses métabolites sur une base nucléique, voire le phosphate. En ce qui concerne les HAP, ce sont les métabolites réactifs électrophiles formés au cours de la métabolisation qui vont interagir avec les centres nucléophiles présents au niveau des différentes bases de l'ADN. De manière générale, les centres nucléophiles les plus importants pour les désoxyribonucléosides puriques sont situés en N^2 , O^5 , N3, N7 et C8 pour la désoxyguanosine (dGuo) et en N^6 , N3, et N7 pour la désoxyadénosine (dAdo). Seule la désoxycytidine (dCyd) présente un site nucléophile réactif en N^4 pour les nucléosides pyrimidiques même si certains agents se fixent en O^4 de la thymine. Par ailleurs, la localisation de la liaison formée entre le métabolite et le nucléoside conditionne la stabilité chimique des adduits. En effet, les adduits générés en position N^2 du groupement exocyclique de la dGuo ou en N^6 de la dAdo sont stables et ne pourront être éliminés que par l'action des enzymes de réparation. A l'inverse, la formation d'adduits instables dits dépurinants entraînent la rupture de la liaison N-glycosidique conduisant à la formation d'un site abasique et à la libération des N-alkylguanines ou adénines correspondantes. C'est le cas des adduits formés en N7 et C8 de la dGuo et en N7 de la dAdo qui génèrent la formation de R-N7- ou R-C8-Gua et de R-N7-Ade après dépurination avec R étant le métabolite. Un exemple sur la formation d'un adduit stable en N^2 et la dépurination d'un adduit instable en N7 de la dGuo avec le BPDE est présenté Figure 15.

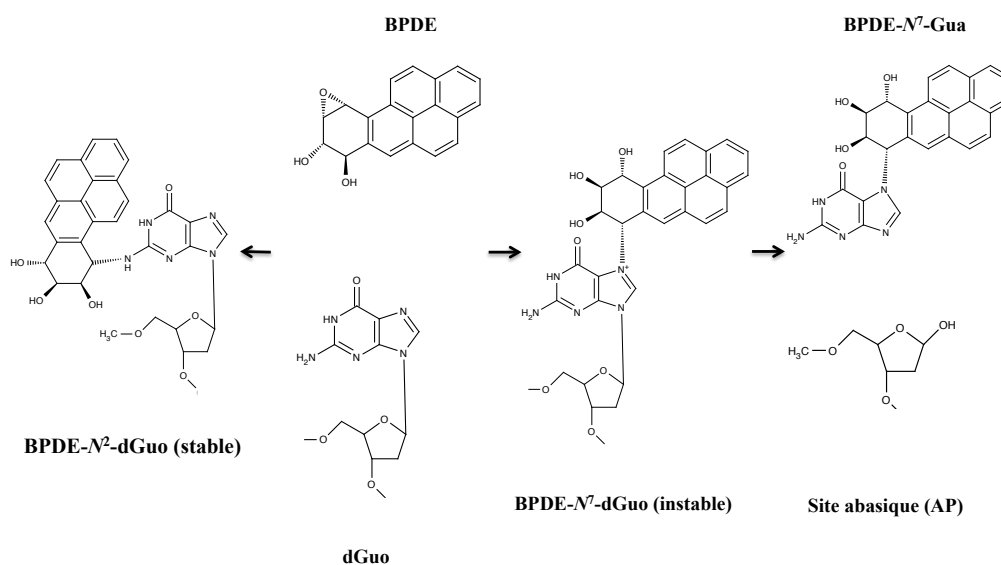


Figure 15 : Formation d'adduits stable (en N^2) et dépurinant (en N7) du BPDE sur la dGuo

1.1. Les adduits du B[a]P

1.1.1. Adduits de la voie des diols époxydes

Les adduits du BPDE, présentés Figure 16, se forment principalement en N^2 de la dGuo et N^6 de la dAdo. Le BPDE se lie également dans une moindre mesure avec la dCyd en N^4 et en N7 de la Gua. L'adduit BPDE-N7-dGuo n'est pas stable et correspond à un adduit dépurinant. De plus, il existe 4 isomères du BPDE qui peuvent chacun générer deux adduits, *cis* ou *trans*, en fonction de l'ouverture de l'époxyde lors de la liaison avec l'ADN. Le (+)-*anti*-BPDE est le plus réactif, le plus mutagène dans les cellules de mammifères et, chez la souris, le plus tumorigène des 4 isomères (IARC, 2010, Luch, 1999). L'adduit formé majoritairement *in vivo* correspond au BPDE- N^2 -dGuo. Cet adduit résulte de la liaison covalente du (+)-7R,8S-dihydroxy-9S,10R-époxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrène en C10 avec l'azote N^2 de dGuo (Geacintov, 1984, Jeffrey, 1977). La formation de cet adduit semble être dépendante de la séquence de bases dans laquelle se trouve la dGuo. Des études sur la liaison du BPDE à des oligonucléotides ont mis en évidence une formation plus importante des adduits BPDE- N^2 -dGuo lorsque la dGuo est entourée de dCyd ou en présence de séquences riches en GC (Funk, 1997, Marsch, 1994, Osborne, 1990).

L'adduit BPDE- N^2 -dGuo a été mis en évidence à la fois *in vitro* après métabolisation, dans des cellules en culture métaboliquement compétentes, dans des explants humain de bronches, mais aussi *in vivo* dans la peau de souris après exposition cutanée, dans les poumons, le foie et les lymphocytes après (IARC, 2010).

La persistance de ces adduits dans l'organisme dépend de l'organe touché, leur demi-vie dans les poumons est de l'ordre de 22 à 25 jours alors que dans le foie elle est de 9 à 13 jours (Qu, 1996, Ross, 1990).

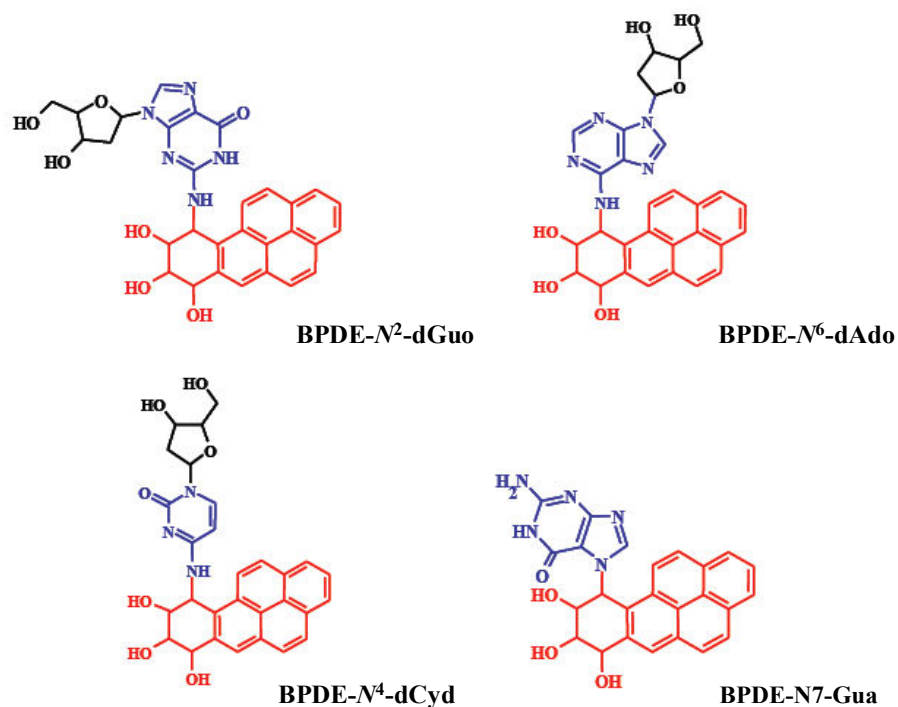


Figure 16 : Principaux adduits à l'ADN du BPDE

1.1.2. Adduits de la voie du radical cation

Ce carbocation radicalaire, par nature très électrophile, va interagir avec des macromolécules nucléophiles comme l'ADN pour former des adduits (Cavalieri, 1985, Cavalieri, 1988, Cavalieri, 1992).

Les conclusions de différentes études montrent que certaines caractéristiques des HAP favoriseraient la réactivité vis-à-vis de l'ADN (Cavalieri, 1992, Luch, 2004) :

- 1) La localisation des charges va augmenter l'efficacité de liaison avec l'ADN. Le carbone qui va prendre la charge positive lors de l'oxydation mono-électronique est celui avec la plus forte densité électronique. Dans le cas du B[a]P, il s'agit du C6.
- 2) Une conformation géométrique optimale va favoriser les liens covalents avec l'ADN.

De par la faible durée de vie du radical cation du B[a]P, ses adduits ne peuvent être formés que lorsqu'il est produit à proximité de l'ADN. Les adduits du radical cation ont été tout

d'abord synthétisés *in vitro* avant leur recherche *in vivo*. Le radical cation peut être obtenu au laboratoire via une oxydation monoélectronique par électrochimie et les adduits sont produits en présence des désoxyribonucléosides. Les adduits obtenus sont de deux types : les adduits dépurinants B[a]P-N7-Gua, B[a]P-C8-Gua, B[a]P-N7-Ade, et des adduits stables B[a]P-N²-dGuo et B[a]P-N3-dGuo (Figure 17) (Cavaliere, 1988, RamaKrishna, 1992, Xue, 2005). Aucun adduit issu de la réaction avec la dCyd ou la dThd n'a été isolé.

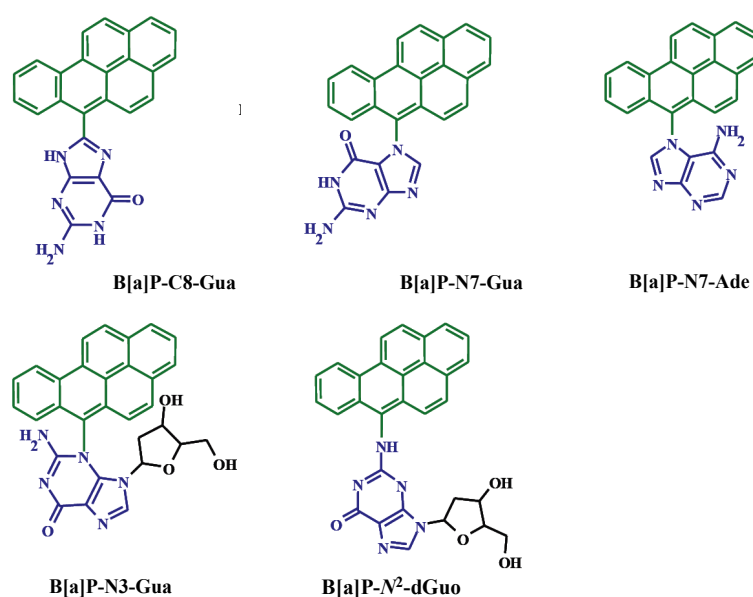


Figure 17 : Principaux adduits à l'ADN avec le radical cation du B[a]P

1.1.3. Adduits de la voie des *o*-quinones

La 7,8-dione-B[a]P peut se fixer sur l'ADN. *In vitro*, se forment principalement des adduits dépurinants en position N7 et C8 de la dGuo mais aussi en N7, C8, N3 de la dAdo. De plus, les *o*-quinones peuvent réagir avec les groupes amino de la dGuo en position N² ou en position N⁶ de la dAdo pour former des adduits stables. Les adduits majoritaires formés *in vitro* (Balu, 2004) ou dans la lignée pulmonaire humaine A549 (Huang, 2013, Huang, 2012) à la suite d'une exposition à la 7,8-dione-B[a]P sont présentées Figure 18 et correspondent à des adduits stables. Extrêmement peu d'études *in vivo* sont disponibles. Après une administration intra-péritonéale de B[a]P-*o*-quinone à des rats, aucun adduit n'a pu être détecté dans le foie, les poumons et les leucocytes 72h après le traitement (Balu,

2004). La détection *in vitro* et non *in vivo* pourrait provenir d'une part de la faible quantité de ces adduits *in vivo* mais aussi des capacités de réparation plus importantes *in vivo*.

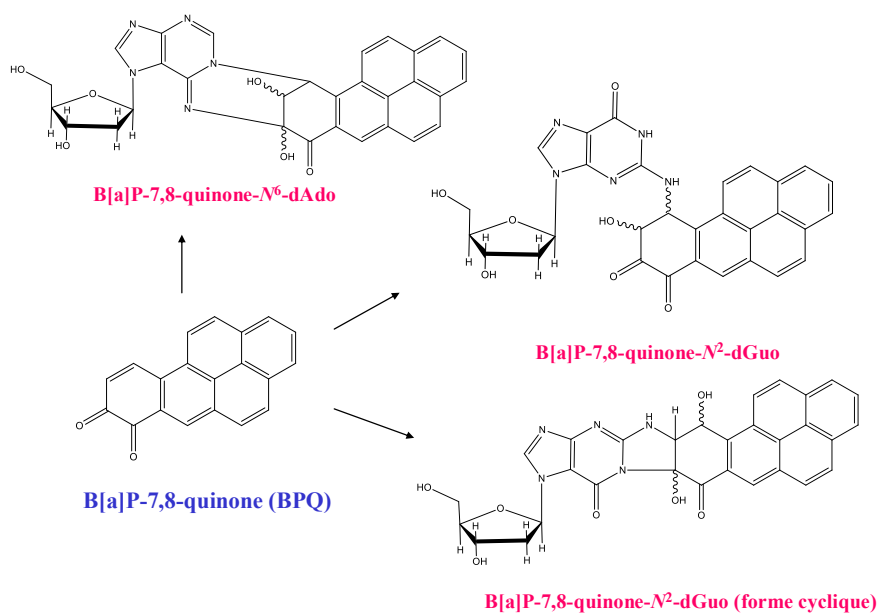


Figure 18 : Adduits à l'ADN générés par la B[a]P-7,8-quinone (Balu, 2004, Huang, 2013, Huang, 2012)

1.1.4. Rendement relatif des adduits *in vivo*

Les deux voies considérées majoritaires *in vivo* dans la formation d'adduits sont la voie du radical cation et la voie des diols époxyde. La génotoxicité de la voie des o-quinones serait essentiellement liée à la génération de stress oxydant au cours des cycles redox (Penning, 1996, Xue, 2005).

Tout d'abord, la contribution relative de ces deux voies en termes d'adduits a été déterminée dans la peau de souris traitée avec 200 nmol de B[a]P tritié pendant 4h (Rogan, 1993, Chen, 1996). Les adduits dépurinants sont extraits de la peau par la procédure Soxhlet pendant 48 h puis dosés par comptage de la radioactivité par HPLC et identifiés par FLNS spectroscopie de fluorescence induite par laser (FLNS). Les adduits stables sont quant à eux analysés par post-marquage au ³²P après extraction de l'ADN. Les résultats obtenus montrent que 71 % des adduits sont dépurinants avec 34 % de B[a]P-6-C8-Gua, 10 % de B[a]P-6-N7-Gua, 22 % de B[a]P-6-N7-Ade, 3 % de BPDE-10-N7-Ade et 2% de BPDE-10-N7-Gua. Les adduits stables représentent quant à eux 29 % des adduits totaux avec 23 % d'adduits BPDE-10-N²-dGuo et 6 % d'adduits stables non identifiés. La voie

du radical cation semble former des adduits instables dans des proportions importantes. Ces adduits sont majoritairement dépurinants car les adduits stables de cette voie pourraient correspondre au maximum aux 6 % d'adduits stables non identifiés. De plus, les adduits stables majoritaires sont les adduits BPDE-10- N^2 -dGuo issus de la voie du BPDE. Cet adduit a également été identifié comme prédominant à hauteur de 64 % des adduits stables dans la glande mammaire de rat 24 h après une injection de 200 nmol de B[a]P. Par ailleurs, seulement deux adduits dépurinants ont été mis en évidence dans ce tissu, les adduits B[a]P-6-C8-Gua et B[a]P-6-N7-Ade (Tudorovic, 1997). Il faut cependant noter les conditions drastiques d'extraction des adduits instables et aussi le fait que les adduits instables de l'ARN contribuent aux mesures peuvent expliquer en partie ces résultats.

Les tissus pulmonaires ont également fait l'objet d'une étude d'identification et de dosage des adduits du B[a]P sur 5 souris exposées à de faibles doses d'environ 50 µg/g, soit 1 mg par souris, par injection intrapéritonéale (Banasiewicz, 2004). L'électrophorèse capillaire avec détection par FLNS et l'HPLC-spectrométrie de masse en tandem ont été utilisées pour doser et caractériser les différents adduits. Sur les 5 souris exposés, l'adduit stable majoritaire est l'adduit BPDE- N^2 -dGuo. Les adduits stables détectés sont le BPDE-10- N^2 -dGuo et l'adduit du 9-OH-B[a]P-4,5-oxyde. Pour 4 souris sur 5, aucun adduit dépurinant n'a été détecté dans les tissus pulmonaires 2 à 3 jours après le traitement. Les adduits stables représentent donc la totalité des adduits produits avec de 86 à 91 % d'adduit BPDE-10- N^2 -dGuo et 9 à 16 % d'adduits du 9-OH-B[a]P-4,5-oxyde. Un seul adduit dépuriné, le B[a]P-6-N7-Gua, a été détecté uniquement dans les tissus pulmonaires d'une seule souris à raison de 73 % des adduits totaux.

Plus récemment, les travaux de Marie *et al* dans les lignées cellulaires humaines HaCat, lignée de kératinocytes, et HepG2, lignées d'hépatocytes, traitées respectivement de 100 à 400 µM et de 1 à 50 µM de B[a]P pendant 24h n'ont pas mis en évidence d'adduits dépurinants issus de la voie du radical cation. Deux adduits stables ont été identifiés dans les HepG2, le BPDE- N^2 -dGuo qui est l'adduit majoritaire quelle que soit la dose d'étude et l'adduit BPDE- N^6 -dAdo. Ce dernier n'a pas été mis en évidence dans les cellules HaCat (Marie, 2007).

Les travaux de Tarantini *et al* montrent que le B[a]P génère en moyenne 100 fois plus d'adduits BPDE- N^2 -dGuo que de cassures dans les cellules HepG2 exposées 14h à des doses de 0 à 20 µM. Ces cassures, mesurées par la méthode des comètes en conditions

alcalines, sont des cassures franches générées par les ERO mais aussi des sites abasiques issus de la dépurination des adduits. Les adduits ainsi formés sont donc en grande majorité le BPDE- N^2 -dGuo, les adduits dépurinants ne représenteraient au plus qu' 1 % des adduits totaux (Tarantini, 2009). Il faut noter qu'aux temps courts, de moins de 2 h, le niveau de cassures est supérieur à celui des adduits avant que ce dernier n'augmente rapidement.

Le même type d'étude réalisée sur la lignée MCF-7 exposée à 1 ou 2 μ M de B[a]P pendant 4h montre que les sites abasiques semblent être prédominants (Kuljukka-Rabb, 2001). A l'inverse pour une exposition de 24h, les adduits stables représentent 70 % des lésions.

En conclusion, la voie du radical cation générerait des adduits dépurinés alors que la voie du BPDE induirait des adduits stables avec l'adduit BPDE- N^2 -dGuo. Il semblerait également que, pour des durées d'exposition supérieures à 4h, cet adduit stable soit majoritaire. Cet effet du temps d'exposition peut s'expliquer par la nécessité de l'induction de la réponse métabolique pour produire le diol-époxyde ou un phénomène de saturation.

1.2. Les adduits d'autres HAP

Alors que les études sur le B[a]P, son métabolisme et les adduits qui en sont issus, sont nombreuses, il n'existe que peu de données sur le métabolisme des autres HAP et son lien avec la formation d'adduits à l'ADN. Le Tableau 8 présente une synthèse des adduits répertoriés dans la littérature. De façon générale, les travaux réalisés impliquent l'utilisation de microsomes et/ou le post-marquage au P^{32} . D'après la littérature, les adduits majoritairement formés semblent correspondre aux adduits issus des diol-époxydes et leur caractérisation montre une liaison majoritaire avec la dGuo (J. R. Babson, 1986, John R. Babson, 1986, Brusick, 2008a, Brusick, 2008b, Carberry, 1989, Carberry, 1988, Carmichael, 1993, Cheh, 1993, Cooper, 1980a, Cooper, 1980b, Fuchs, 1993a, Fuchs, 1993b, Glatt, 1993, Gorelick, 1989, Hall, 1988, Hecht, 1995, Hemminki, 1980, Hodgson, 1983, Hughes, 1993, IARC, 2010, WHO, 1998, Kim, 2000, King, 1994, LaVoie, 1982a, LaVoie, 1994, LaVoie, 1980a, LaVoie, 1980b, LaVoie, 1982b, Lecoq, 1991a, Lecoq, 1991b, Lecoq, 1991c, Marshall, 1993, Mass, 1996, Mlcoch, 1993, Nesnow, 1994, Nordqvist, 1981, Osborne, 1987, Pfau, 1992, Phillips, 1986, Platt, 2008a, Platt, 2005, Platt,

2008b, Rice, 1985, Rice, 1986, Ross, 1992, Ross, 1995, Saeed, 2009, Wang, 1995, Weston, 1990, Weyand, 1993, Weyand, 1988, Weyand, 1987, Wilson, 1996).

HAP	Métabolite ultime hypothétique dans la cancérogénèse	Adduits caractérisés	Références
D[a,h]A	3,4-diol-1,2-oxyde 3,4 : 10,11-bisdiol-1,2-oxyde	3,4-diol-1,2-oxyde-dGuo 3,4-diol-1,2-oxyde-dAde 3,4 : 10,11-bisdiol-1,2-oxyde-dGuo 3,4 : 10,11-bisdiol-1,2-oxyde-dAde	(IARC, 2010, IPCS, 1998, Carmichael, 1993, Fuchs, 1993a et b, Lecoq 1991b, Nesnow, 1994, Mloch, 1993)
B[b]F	9,10-diol-1,2-oxyde 5,6 : 9,10-bisdiol-1,2-oxyde	5-hydroxy-9,10-diol-11,12-oxyde-dGuo	(IARC, 2010, IPCS, 1998, LaVoie, 1982)
B[k]F	8,9-diol-10,11-oxyde	1 adduit majoritaire détecté	(IARC, 2010, IPCS, 1998, King, 1994, LaVoie, 1980, 1982)
B[j]F	9,10-diol-11,12-oxyde 4,5-diol-6,6a-oxyde	Détecté 4,5-diol-6,6-oxyde-dGuo	(IARC, 2010, IPCS, 1998, LaVoie, 1980, 1982, 1994)
B[a]A	3,4-diol-1,2-oxyde 8,9-diol-10,11-oxyde	3,4-diol-1,2-oxyde-dGuo 8,9-diol-10,11-oxyde-dGuo	(IARC, 2010, IPCS, 1998, Carberry, 1989, 1988, Cheh, 1993, Cooper 1980a et b, Hemminki, 1980, King, 1994)
B[e]P	9,10-diol-11,12-oxyde 9,10-époxy-11,12-dihydro 9,10,11,12- tetrahydro	Réaction avec dGuo	(IPCS, 1998, Nordqvist, 1981)
B[g,h,i]P	3,4-diol-3,4-oxyde ?	Détecté ?	(IPCS, 1998, Hughes, 1993, Platt, 2005, 2008)
IP	?	1 adduit non identifié ?	(IPCS, 1998, Rice, 1985, 1986)
Chrys	1,2-diol-3,4-oxyde	Détecté	(IARC, 2010, IPCS, 1998, Glatt, 1993, Hall, 1988, Hodgson, 1983)
Flua	2,3-diol-1,10-oxyde	2,3-diol-1,10-oxyde-dGuo	(IPCS, 1998, Babson, 1986a et b, Gorelick, 1989, Hecht, 1995, Wang, 1995, Wessel, 2012)
Naph	1,2-quinone 1,4-quinone 1,2-dihydroxy (1,2-DHN) 1,2-dihydrodiols (1,2-DDN)	Adduits dépurinants : 1,2-DHN-4N3-dAde 1,2-DHN-4N7-dGua 1,2-Naphtoquinone-4N7-dGua + adduits stables des 1,2- et 1,4-Naphtoquinones	(IPCS, 1998, Brusick, 2008a et b, Saeed, 2009, Wilson, 1996)

Tableau 8 : Synthèse bibliographique sur les adduits des différents HAP d'intérêt pour ce travail

2. Stress oxydant et lésions à l'ADN

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) sont produites par réduction partielle de l'oxygène. Elles sont naturellement présentes dans l'organisme à des concentrations pouvant être prises en charge par les défenses antioxydantes de la cellule. Au cours du métabolisme des HAP, le cycle redox des *o*-quinones et, dans une moindre mesure,

l'activité catalytique des CYP450 peuvent induire des quantités trop importantes d'ERO pour être prises en charge par les mécanismes de protection de la cellule, générant ainsi un stress oxydant (Burdick, 2003, Luch, 2004, Xue, 2005). Les ERO, composés instables et réactifs, entraînent dans l'ADN la formation de cassures simple et double brins ainsi que des modifications au niveau des purines, des pyrimidines ou du 2-désoxyribose. Il existe différents types d'ERO. L'oxygène singulet 1O_2 est associé à des mécanismes de photosensibilisation en présence de rayonnements UV (Douki, 2008, Gao, 2005, Zhang, 2004) et n'oxyde que la guanine. L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sont formés au cours du cycle catalytique des *o*-quinones. H_2O_2 est faiblement réactif mais sa capacité de diffusion, notamment à travers les membranes cellulaires, est importante. H_2O_2 est par contre à l'origine de la formation du très réactif radical hydroxyle $\bullet OH$ par les réactions d'Haber Weiss ($O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \rightarrow \bullet OH + O_2 + ^-OH$) ou de Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow \bullet OH + Fe^{3+} + ^-OH$). Ce radical $\bullet OH$ est le plus impliqué dans la formation des cassures de brin d'ADN et l'oxydation des bases (Cadet, 1997, Cadet, 1999, Cadet, 2003).

- Formation des cassures :

L'arrachement d'un hydrogène sur le 2-désoxyribose par le radical hydroxyle est à l'origine des cassures de brins. Par exemple, l'attaque en position 4' conduit à un radical peroxyde intermédiaire et au départ de la base (Figure 19). Ce radical évolue vers une fragmentation du sucre (Burrows, 1998).

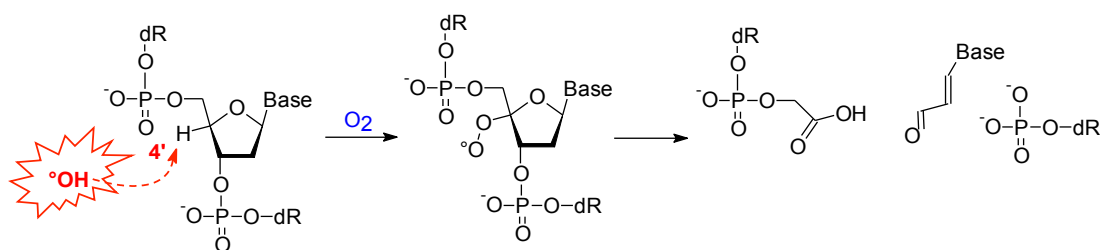


Figure 19 : Mécanisme de formation des cassures

- Oxydation de bases :

L'attaque du $\bullet OH$ en position C8 de la dGuo entraîne la formation d'un radical 8-hydroxy-7,8-dihydroguanyl qui peut soit être converti en 8-oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosine (8-oxodGuo) par oxydation ou en 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine

(FapydGuo) par réduction à 1 électron (Figure 20). La 8-oxodGuo est très communément utilisée comme biomarqueur du stress oxydant et peut induire des transversions G→T dans l'ADN. Par ailleurs, $\bullet\text{OH}$ réagit avec toutes les bases de l'ADN entraînant la formation de nombreuses bases modifiées tels que les diols de thymine ou d'uracile, la 5-hydroxycytosine ou encore la 8-oxo-7,8-dihydroadénine (Cadet, 1999).

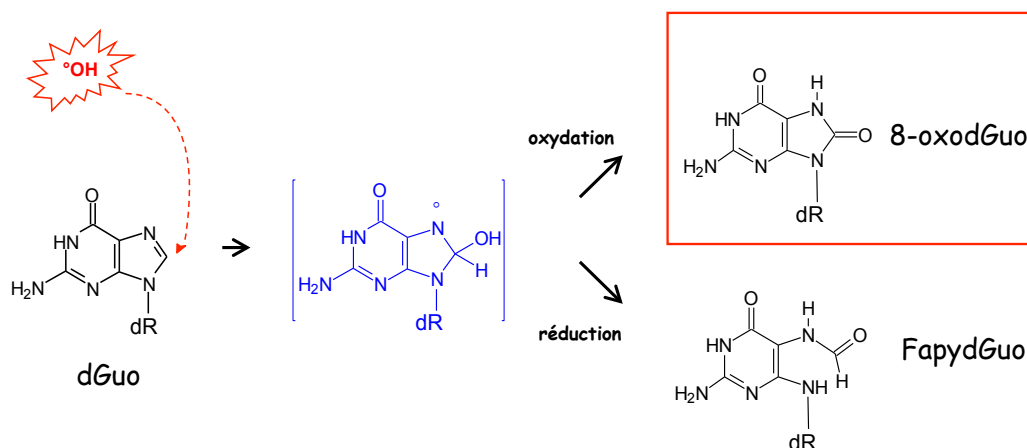


Figure 20 : Mécanisme d'oxydation de bases : exemple de la dGuo

- Stress oxydant et *o*-quinones:

Les niveaux de production d'ERO vont être différents suivants les HAP. La voie des *o*-quinones représente la plus forte source d'ERO via la transformation des *trans*-dihydrodiols en *o*-quinones mais aussi par les HAP-quinones elles mêmes via les cycles redox. Des analyses *in vitro* ont montré que la 1,2-dione-naphtalène générait plus de 8-oxodGuo suivie de la 3,4-dione-B[a]A et enfin de la 7,8-dione-B[a]P (Xue, 2005). Or, pour exercer ces propriétés oxydatives sur l'ADN, les *o*-quinones doivent pénétrer le noyau des cellules (Figure 21). D'une part, ces diones pourraient diffuser de façon passive à travers la membrane nucléaire et générer des ERO dans le noyau. D'autre part, AhR pourrait avoir un rôle de transporteur des quinones dans le compartiment nucléaire. En effet, comme vu précédemment, les *o*-quinones constituent de bons ligands à AhR et induisent l'expression du CYP1A1. Une diminution du taux de 8-oxodGuo est détectée dans des cellules de poumons H358 traitées par la 7,8-dione-B[a]P en présence d'inhibiteur ou d'antagoniste d'AhR (Park, 2009, Park, 2008).

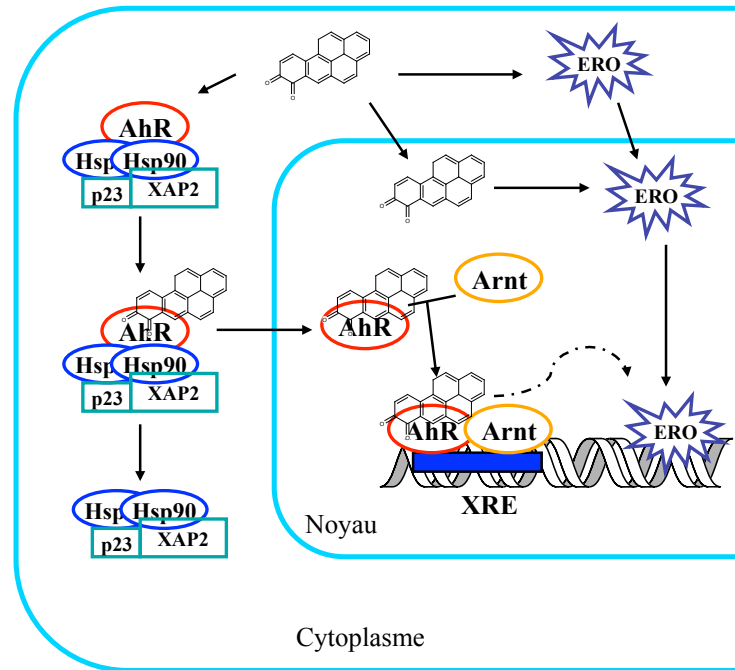


Figure 21 : Hypothèse d'induction d'ERO par les *o*-quinones au niveau du noyau (d'après Park *et al*, 2009) (Park, 2009)

3. Quantification des lésions de l'ADN

La génotoxicité d'une substance se définit par sa capacité à altérer le matériel génétique de la cellule. Ces altérations peuvent concerner la structure primaire de l'ADN. La méthode des comètes permet de mesurer les cassures simple et double brin de l'ADN et le test γ H2AX uniquement les cassures double brin alors que l'HPLC-MS/MS et le post-marquage au ^{32}P permettent l'analyse des bases modifiées après extraction et hydrolyse de l'ADN. Les bases modifiées peuvent également être quantifiées de manière indirecte par les activités des enzymes de réparation. D'autres tests permettent de quantifier des événements plus avants dans la réponse cellulaire au génotoxique : comptage des aberrations chromosomiques, quantification des micronoyaux pour les substances clastogènes (cassure de chromosomes) ou aneugènes (perte de chromosome) ; test d'Ames dans les bactéries ou HPRT dans les cellules eucaryotes pour l'induction de mutations géniques. Dans la suite de ce chapitre, nous nous concentrerons sur la quantification des lésions primaires de l'ADN.

3.1. Méthode des comètes

La méthode des comètes (Single Cell Gel Electrophoresis Assay) a été développée à la fin des années 80 par l'équipe du Pr Singh (Singh, 1988). Dans les conditions alcalines du test, il est possible de mesurer les cassures simple et double brin, les sites alcali-labiles qui peuvent être issus de la perte d'adduits dépurinants (sites abasiques) ou encore la fragmentation de l'ADN due à l'apoptose cellulaire. Il a été également proposé que cette technique puisse permettre de visualiser des intermédiaires de réparation.

La méthode des Comètes est basée sur une électrophorèse sur microgel d'agarose en milieu alcalin. Les cellules étudiées sont incluses dans un gel d'agarose et un traitement avec des détergents et des sels aboutit à la destruction des membranes et à l'extraction des protéines nucléaires. L'ADN est alors sous une forme super-enroulée de nucléoïde. Après un traitement permettant son déroulement, l'ADN est soumis à un champ électrophorétique et de par sa charge négative va migrer vers le pôle positif du champ d'électrophorèse. Les noyaux intacts vont peu migrer du fait de leur haut poids moléculaire et vont donc former une sphère compacte. À l'inverse, l'ADN endommagé par des cassures va prendre l'aspect d'une comète avec l'ADN intact sous forme de sphère dans la tête de la comète et les extrémités migrant dans la queue de la comète (Figure 22). Le marquage de l'ADN après électrophorèse s'effectue avec du bromure d'éthidium (BET). Des logiciels associés à des systèmes vidéo et couplés à des microscopes à fluorescence permettent de déterminer une valeur qualitative du taux de cassures, exprimée en pourcentage, en analysant la translation de la fluorescence de la tête de la comète vers sa queue. Le « % Tail DNA » ou « % ADN dans la queue » est le paramètre le plus pertinent et le plus utilisé, il correspond au pourcentage d'ADN dans la queue de la comète en tenant compte à la fois de l'intensité de la queue mais aussi de la tête de la comète.

Ce test a par la suite été adapté afin de pouvoir spécifiquement mesurer certaines lésions oxydatives. Ces versions de la méthode des comètes incluent une étape de digestion avec des glycosylases spécifiques impliquées dans la réparation de l'ADN qui vont convertir les bases modifiées en cassures simple brin. Ainsi, l'utilisation de la Fpg (formamido-pyrimidine glycosylase) va permettre de mesurer les purines oxydées (8-oxodGuo notamment) et les formamido pyrimidines (Fapy-dGuo, Fapy-dAdo). La digestion avec OGG1, Endo III ou T4 Endo V permet d'analyser respectivement la 8-oxodGuo, les

pyrimidines oxydées et les dimères cyclobutane de pyrimidines.

Cette technique est simple, rapide et nécessite très peu de cellules. Cependant, elle ne fournit qu'une information relative de quantification du nombre de dommages. Une calibration du test est possible par comparaison avec une irradiation des cellules aux rayons γ . De façon pratique, les cellules irradiées sont ajoutées à l'essai dans le bac d'électrophorèse avec les autres conditions permettant ainsi de construire une droite d'étalonnage. En effet, il est établi qu'une irradiation des cellules à 1 Gy génère 0,14 cassures pour 10^6 nucléotides (1000 cassures / cellules) ce qui va permettre d'associer un nombre de cassures à un % tail DNA donné (Ahnström, 1981, Goodhead, 1989, Pouget, 2000). La calibration de la méthode des comètes est assez rare dans les études de génotoxicité classique car elle nécessite de disposer d'un irradiateur aux rayons γ relativement coûteux. La sensibilité du test est de l'ordre de 1 cassure pour 10^8 bases. La limite majeure de ce test réside dans son manque de spécificité et l'absence d'informations chimiques sur la nature des dommages mesurés. L'utilisation des versions modifiées de Comètes permet d'améliorer cette spécificité. De plus, des interférences sont possibles en cas de formation de pontages ou d'adduits volumineux pouvant ralentir la migration de l'ADN et entraîner une sous-estimation des dommages.

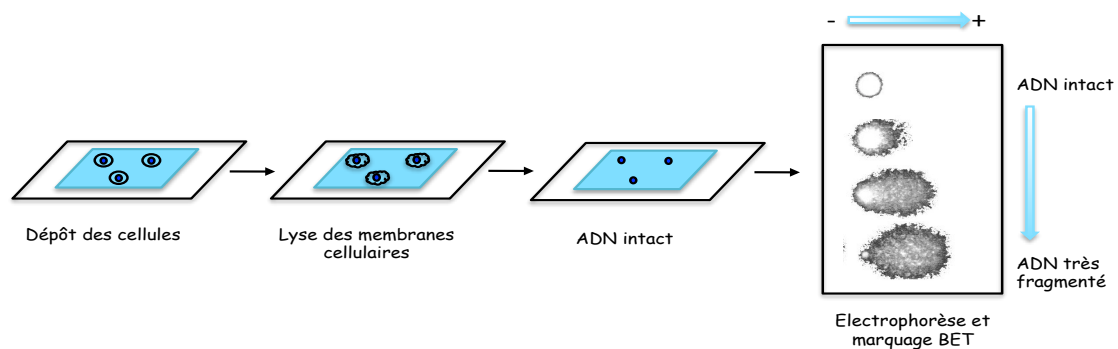


Figure 22 : Principe de la méthode des comètes

3.2. Cassures double brin : test γ H2AX

Un nouveau test de génotoxicité basé sur la détection de la phosphorylation de l'histone H2AX notée γ H2AX s'est largement développé ces dernières années. Il existe 5 familles d'histones 1, 2A, 2B, 3 et 4. De la famille 2A, l'histone 2AX (H2AX) est impliquée dans la

reconnaissance des cassures double brin. Elle est très rapidement phosphorylée (γ H2AX) au niveau de la sérine 139 en réponse à une cassure double brin de l'ADN (Rogakou, 1998). La phosphorylation d'H2AX est réalisée par des kinases de la famille des PI3K (Phosphatidyl Inositol 3 Related Kinase) dont certaines sont impliquées, chez les mammifères, dans la réparation des cassures double brin comme la DNA-PK (DNA-Dependant Protein Kinase). Bien que la fonction précise de la phosphorylation ne soit pas totalement élucidée, elle joue un rôle central dans la réponse cellulaire à la suite de l'induction de cassures double brin en permettant le recrutement de facteurs impliqués dans la réparation de ces cassures. Le recrutement des protéines impliquées dans la réparation entraîne, au niveau de la cassure, la formation de foyers de réparation ou foci dans lesquels γ H2AX constitue une protéine de structure qui permet à la fois l'assemblage et le maintien de la machinerie de réparation (Bassing, 2004). La quantification des foci avec γ H2AX permet de déterminer le taux de cassures double brin car il a été démontré qu'un focus γ H2AX correspond à une cassure double brin pour des niveaux inférieurs à 100-150 cassures (Rogakou, 1998). La détection des γ H2AX est basée sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal spécifique et peut être suivie par différentes méthodes pour le dosage. Les plus utilisées sont les méthodes d'immunofluorescence pour lesquelles l'anticorps est détecté *in cellulo* soit de manière directe par couplage de l'anticorps à un fluorophore soit reconnu de manière indirecte par le biais d'un anticorps secondaire. Les foci γ H2AX marqués peuvent être quantifiés de façon directe à l'aide d'un microscope à fluorescence couplé à un logiciel de comptage automatique (Jugan, 2012). La méthode cell-ELISA (Cell Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) repose sur la détection des γ H2AX par le biais d'un anticorps secondaire couplé à une peroxydase qui transforme un substrat en un produit quantifiable par spectrophotométrie (Redon, 2011). L'absorbance va donc être proportionnelle à la quantité de foci. Une variante de ce test consiste en l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé à un fluorophore dans l'infrarouge (Audebert, 2012). Enfin, la cytométrie en flux permet de détecter la fluorescence par noyau cellulaire grâce à un laser. Néanmoins, cette méthode entraîne la destruction des cellules dans le procédé (Smart, 2011).

L'utilisation du test γ H2AX comme biomarqueur des cassures double brin s'est répandu dans différents domaines comme l'inflammation chronique, la recherche clinique (Redon, 2010), la biodosimétrie des radiations ou pour la chimiothérapie (Beels, 2009, Sak, 2007) ainsi que la mesure de la génotoxicité de xénobiotiques environnementaux (Audebert, 2011, Audebert, 2012, Mondal, 2010). Sur les nombreux composés testés, la méthode

γ H2AX est considérée à la fois spécifique et sensible dans l'évaluation de la génotoxicité. Néanmoins, différentes discordances dans les résultats de génotoxicité indiquent que ce test n'est pas adapté aux molécules chimiques cytotoxiques ou exerçant leurs effets toxiques par génération de stress oxydant qui représente cependant un mécanisme de génotoxicité indirect important (Smart, 2011). En effet, la formation des foci γ H2AX semble être indépendante de la production d'ERO (Toyooka, 2012). De plus, même si les foci γ H2AX indiquent la présence de cassures double brin dans une grande majorité des cas, il existe quelques exceptions pour lesquelles des foci γ H2AX sont observés en absence de dommage (Pospelova, 2009, Soutoglou, 2008) ou sont absents en présence de cassures double brin pour des concentrations salines importantes par exemple (Dmitrieva, 2008). A noter que les foci γ H2AX peuvent être des réponses indirectes et tardives à la présence de lésions encombrantes comme l'effondrement des fourches de réplication ou des intermédiaires de réparation mais aussi une réponse à l'initiation de l'apoptose (Cleaver, 2012).

3.3. *Analyse des adduits à l'ADN*

- ***Post-marquage au phosphore 32***

La version initiale de cette méthode de post-marquage au phosphore 32 (^{32}P) a été mise au point par Randerath *et al* en 1981 (Randerath, 1981) et est très largement utilisée depuis pour l'analyse des adduits générés entre autres par les HAP. Après extraction et purification, l'ADN est hydrolysé en désoxyribonucléosides 3'-monophosphate par un mélange de deux enzymes : une endonucléase (nucléase de Staphylocoque) et une exonucléase (Phosphodiesterase de rate). Une étape d'enrichissement à l'aide de la nucléase P1 permet de sélectionner les adduits en éliminant les nucléotides normaux. Son activité 3' phosphatasique entraîne une coupure sélective des phosphates en 3' des nucléotides normaux car la configuration structurale de l'adduit et l'encombrement stérique protège sa liaison phosphate. Les adduits sont ensuite marqués par la polynucléotide kinase T4 en présence de γ - ^{32}P ATP. Cette enzyme va transférer le phosphate radioactif en position 5' du nucléotide. Ainsi, seuls les adduits sont marqués, les nucléosides normaux ne pouvant pas être phosphorylés, ils n'interfèrent donc pas sur le marquage. Les adduits sont ensuite séparés des nucléosides normaux par chromatographie sur couche mince bidirectionnelle. Enfin, la séparation analytique des adduits est effectuée

sur une plaque de couche mince par chromatographie échangeuse d'anions. Le dosage des adduits est alors réalisé par autoradiographie des plaques et comptage de radioactivité. Cette méthode est très sensible et permet d'atteindre des limites de détection de l'ordre d'une lésion pour 10^9 nucléotides normaux. Elle est considérée comme la méthode la plus sensible dans l'analyse des adduits. Néanmoins, son inconvénient majeur, en dehors de l'utilisation de quantités massives de ^{32}P , est son manque de spécificité qui ne permet pas de tirer des conclusions définitives sur la nature des dommages. En effet, même lorsque les standards d'adduits sont disponibles, le manque de résolution de la chromatographie sur couche mince rend difficile la discrimination des différents adduits et peut conduire à une sur-estimation de la quantification (De Kok, 2002). De plus, Arif *et al* ont également montré que les conditions chromatographiques pouvaient induire des erreurs d'identification (Arif, 2006). Enfin, la quantification peut être également biaisée par des réactions enzymatiques incomplètes qui conduisent à une sous-estimation de la quantité d'adduits.

- ***La chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS)***

Un spectromètre de masse est un système d'analyse qui permet de séparer les molécules après ionisation en fonction du rapport masse/charge (m/z). Il est composé de 3 parties distinctes : une source d'ionisation, un analyseur et un détecteur. Il existe différents types de spectromètres de masse se distinguant par leur source d'ionisation ou leur analyseur. Le système décrit dans ce paragraphe correspond à celui utilisé au cours de ce travail c'est-à-dire un spectromètre de masse composé d'une source d'ionisation électrospray et d'un analyseur triple quadripolaire. L'analyse est réalisée en ligne après une séparation chromatographique par HPLC. Les analytes sont convertis en ions positifs ou négatifs selon le mode choisi. En sortie d'HPLC, l'éluant HPLC contenant les analytes est dirigé dans un capillaire à pression atmosphérique et nébulisées sous forme de microgouttelettes sous l'effet d'un courant d'azote. Le solvant est évaporé par action d'un courant d'azote chaud et les gouttes sont polarisées dans un champ électrique de forte intensité (4 à 5000 V). Le phénomène de désorption de champ due à l'augmentation à la fois de l'évaporation du solvant et du champ électrique entraîne la migration des ions à la surface des microgouttelettes et l'éclatement de ces dernières. Les molécules sont ainsi ionisées et placées en phase gazeuse en une étape. Les ions sont ensuite dirigés vers l'analyseur dans le premier quadripôle (Q1) où il peut y avoir une première sélection des ions en fonction de

leur m/z avant entrée dans le second quadripôle (Q2). Dans ce Q2, aussi nommé cellule de collision, les ions sélectionnés dans le Q1 sont fragmentés par collision avec un gaz inerte puis les fragments gagnent le dernier quadripôle (Q3). Ce dernier permet de sélectionner les ions fils issus de la fragmentation. Un quadripôle est en fait constitué de 4 cylindres en opposition de champ dans lesquels un champ oscillant et un champ fixe se superposent. En fonction des conditions de champ appliquées les ions sélectionnés par rapport à leur m/z adoptent une trajectoire sinusoïdale, les autres étant perdus dans le quadripôle. Enfin, le détecteur transforme les courants d'ions en courant électrique qui apparaît sous forme de spectre de masse ou de chromatogramme. L'analyseur peut être utilisé selon 4 modes : precursor ion scan, fragmentation, MRM (Multiple Reaction Monitoring) ou perte de neutre (Figure 23).

- **Le mode fragmentation** permet de réaliser le spectre de fragmentation d'une molécule et d'en déterminer les fragments spécifiques. Le Q1 sélectionne uniquement l'ion pseudo-moléculaire de la molécule d'intérêt et le Q3 analyse tous les ions fils.
- **Le mode Precursor ion scan** permet d'identifier les ions parents qui produisent spécifiquement un ion fils donné. Le Q1 effectue un balayage des m/z pour l'ensemble des ions parents et le Q3 analyse spécifiquement l'ion fils d'intérêt.
- **Le mode MRM** correspond au mode utilisé pour réaliser les dosages. L'ion parent et ses fragmentations spécifiques sont connues. Le Q1 ne sélectionne que l'ion parent et le Q3 les ions fils à m/z déterminé. Ce mode est très spécifique et très sensible. Il est utilisé dans ce travail pour le dosage des adduits BPDE- N^2 -dGuo avec une sensibilité de l'ordre du fmol (Marie, 2008).
- **Le mode perte de neutre** permet quand à lui d'effectuer un screening de molécules de structures inconnues appartenant à la même famille perdant la même partie neutre pendant la fragmentation. Le Q1 et le Q3 réalisent tous les deux un balayage en m/z avec un décalage correspondant à la masse de ce fragment neutre. Par exemple, le fragment neutre 116 issu de la perte de 2'-désoxyribose est utilisé en mode positif pour détecter de nouveaux nucléosides modifiés. Ce fragment est neutre d'où l'appellation de perte de neutre. Ce mode est très intéressant pour rechercher les adduits formés après métabolisation des HAP parents néanmoins sa sensibilité est inférieure à celle du mode MRM.

Comme le ^{32}P , l'analyse par HPLC-MS/MS nécessite l'extraction de l'ADN et son hydrolyse en monomères. La plupart des méthodes utilisent des enzymes pour libérer les nucléosides. Des hydrolyses acides peuvent être utilisées pour travailler sur les bases.

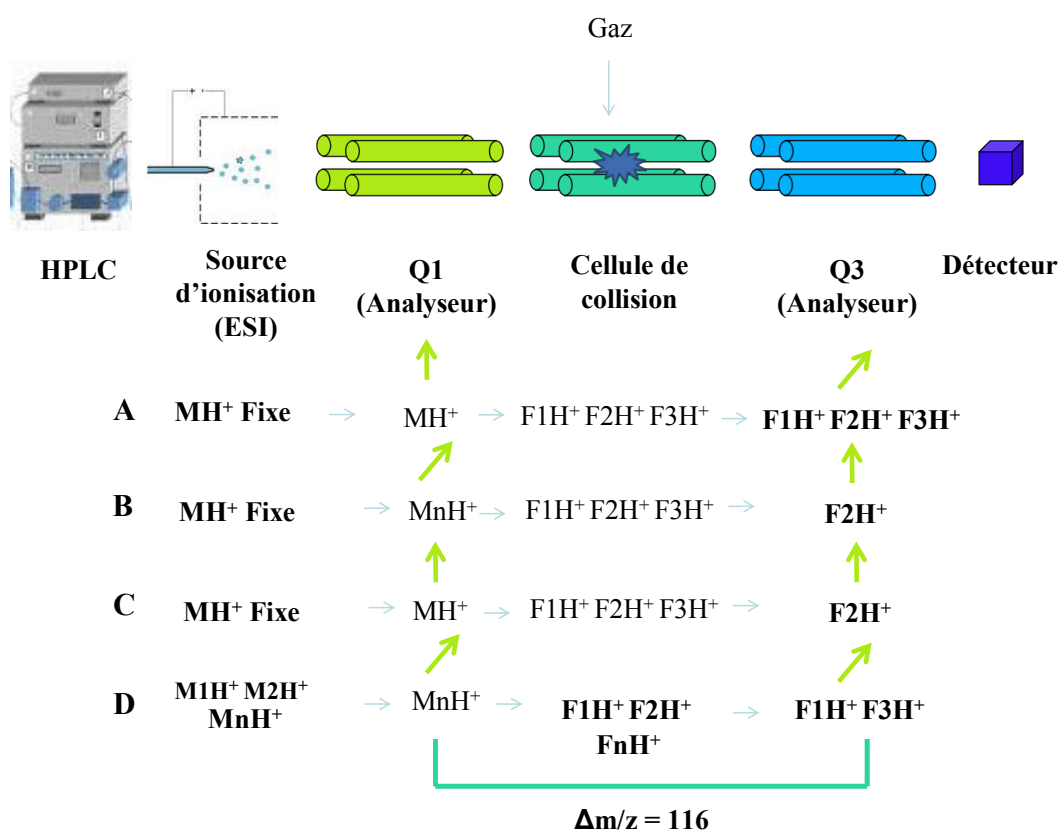


Figure 23 : Mesure des adduits des HAP par HPLC-MS/MS avec (A) le mode fragmentation, (B) le mode precursor ion scan, (C) le mode MRM et (D) perte de neutre

3.4. Pertinence de la mesure des adduits et du stress oxydant en santé humaine

Le grand intérêt de la mesure des adduits par rapport à d'autres marqueurs de génotoxicité est qu'ils portent le toxique lié de façon covalente. Cette mesure apporte donc des indications très spécifiques sur le rôle de diverses substances dans les pathologies humaines. La structure des adduits permet de retracer de façon spécifique le composé responsable de la génotoxicité. La mesure des lésions primaires à l'ADN permet de mieux comprendre le mécanisme d'action des HAP et leur rôle dans l'initiation du processus de

cancérogénèse en particulier au niveau des organes cibles. En effet, les adduits représentent à la fois de bons marqueurs de cancérogénèse et de bons dosimètres moléculaires.

Le dosage des adduits à l'ADN peut être réalisé dans différents tissus chez l'Homme mais les organes cibles sont difficilement accessibles pour des mesures pour des raisons pratiques et éthiques. Les tissus pulmonaires peuvent être analysés lors d'une intervention chirurgicale après la survenue d'un cancer du poumon. Chez les fumeurs atteints de cancer de poumon, le taux d'adduits BPDE dans les cellules bronchiques non tumorales serait en corrélation avec la consommation de tabac (Gyorffy, 2004). De façon générale, la mesure des adduits s'effectue dans les cellules sanguines. L'analyse des adduits BPDE par post-marquage au ^{32}P chez des sujets atteints du cancer de poumon montre que les taux d'adduits sont plus élevés que pour les témoins chez les fumeurs (83 %) (Veglia, 2003). Les sujets fumeurs présentent également plus d'adduits dans les tissus tumoraux périphériques qu'au niveau de la tumeur elle-même. Ils développent également 1,7 à 2,4 fois plus d'adduits que des non fumeurs atteints d'un cancer du poumon (Gyorffy, 2004). Certains adduits, comme le B[a]P-N7-dGuo, peuvent être mesurés dans l'urine suite à leur dépurination, cependant la proportion retrouvée dans les urines est extrêmement faible et les quantités sont bien souvent sous la limite de détection (Rogan, 1990).

De plus, les adduits de l'ADN sont considérés comme des biomarqueurs de dose efficace ou génotoxique car leur mesure prend en compte les différents facteurs d'exposition, de métabolisation et de réparation. De plus, leurs propriétés d'initiation de la cancérogénèse, qui seront exposées dans la suite de cette introduction, en font des biomarqueurs de choix. En effet, les adduits à l'ADN pourraient être prédictifs de la survenue de cancer. Une étude a été menée par Tang *et al* (Tang, 2001) sur 22 000 médecins suivis pendant 13 ans. A l'entrée dans la cohorte, un prélèvement sanguin et un dosage des adduits par post-marquage a été réalisé. 13 ans plus tard, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre taux d'adduits en début d'étude et apparition de cancer chez les non-fumeurs ou les ex-fumeurs. Néanmoins, pour les sujets fumeurs ayant la même consommation tabagique, ceux présentant les taux d'adduits les plus élevés au début de l'étude ont un risque 3 fois plus élevé de développer un cancer 13 ans plus tard. La prédictivité de la mesure d'adduits dans la survenue des cancers est donc vérifiée chez certains types de sujets.

Néanmoins, les mesures d'adduits dans les leucocytes sanguins démontrent une faible corrélation avec l'exposition aux HAP (Brandt, 2003).

Les quelques informations disponibles sur un rôle du stress oxydant sur la génotoxicité des HAP chez l'Homme sont liées à des mesures de bases oxydées dans les urines de

populations exposées (Loft, 1993). La corrélation avec les doses de HAP en absence de contribution d'autres polluants reste difficile à estimer. A l'inverse, de nombreuses études se sont intéressées à l'induction de cassures détectées par la méthode des comètes dans des études *in vitro*. C'est en particulier le cas pour l'étude de l'effet de prélèvements atmosphériques réels (Binkova, 2004, Gabelova, 2004). L'absence de comparaison avec le taux d'adduits ne permet cependant pas de conclure sur les voies génotoxiques majoritaires. La combinaison d'analyse par la méthode des comètes calibrée et de mesures des adduits BPDE- N^2 -dGuo HPLC-MS/MS a permis de montrer que l'exposition d'hépatocytes HepG2 à des mélanges à forte teneur en HAP induisait peu de cassures mais potentialisait les adduits alors que des mélanges plus hétérogènes inhibait la formation d'adduits en induisant un fort stress oxydant (Tarantini, 2011a).

IV. Conséquences biologiques des lésions à l'ADN

Le cycle des cellules en prolifération est composé de 4 étapes successives (Kaufmann, 1996) : la phase G1 de croissance, la phase S de réplication de l'ADN, la phase G2 de préparation à la division cellulaire et la phase M (Mitose) de division cellulaire. Afin d'éviter les conséquences néfastes des différentes lésions à l'ADN (adduits, cassures simple ou double brin, oxydation de bases), des points de contrôles du cycle cellulaire au niveau des transitions G1/S, G2/M et pendant la phase M permettent de ralentir ou de stopper la progression de la cellule dans le cycle pour répondre à la formation des lésions. Tout d'abord, si les dommages sont trop importants la cellule cesse de se diviser pour entrer en apoptose. En cas de dommages moins nombreux, il y a une pause au niveau du cycle cellulaire et l'activation de la réparation de l'ADN (Agarwal, 1995) ou si ces dommages sont plus minimes, les systèmes de réparation corrigeront l'erreur sans pour autant impliquer l'arrêt du cycle cellulaire (Petrini, 2000). L'absence de réparation ou une réparation fautive peut entraîner, après duplication de l'ADN, l'apparition d'une mutation qui constitue la première étape de la cancérogénèse (Figure 24). La protéine p53 joue un rôle central sur les conséquences biologiques à l'issue d'un dommage. En effet, elle est au centre des défenses cellulaires contre les dommages à l'ADN par son implication à la fois dans le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose ou encore la réparation de l'ADN principalement comme facteur de transcription pour les protéines impliquées (Harris, 2005, Meek, 2004).

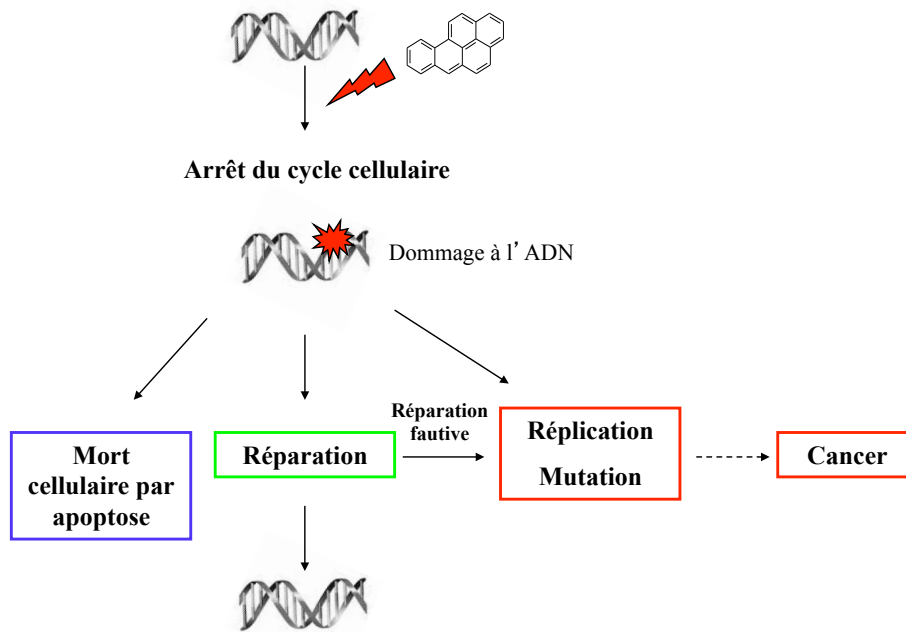


Figure 24 : Conséquences biologiques des dommages à l'ADN

1. Réparation

La réparation de l'ADN comporte de nombreux systèmes enzymatiques visant à éliminer la partie endommagée du génome et de restaurer la séquence initiale. Différentes activités sont impliquées selon la nature du dommage à traiter.

1.1. La réparation des adduits : voie NER

La réparation par excision de nucléotides (NER) prend principalement en charge les dommages importants et volumineux comme les adduits qui provoquent des distorsions structurales de l'ADN (De Boer, 2000, Hoeijmakers, 2001, Nospikel, 2009). La reconnaissance de la lésion peut se faire suivant deux voies. La première concerne la réparation prioritaire des gènes transcrits par réparation couplée à la transcription (RCT). La seconde voie de Réparation Globale du génome (RGG) est plus lente et permet la réparation de lésions dans la totalité du génome qu'il s'agisse de zones codantes ou non. Dans la voie RGG, le complexe XPC-hHR23B détecte une interruption d'appariement induite par le dommage. En effet, la distorsion tridimensionnelle de la structure de la

double hélice provoquée par la lésion engendre la rupture de liaisons hydrogènes. Une fois mobilisé, le complexe XPC-hHR23B effectue une ouverture partielle de la double hélice. La voie RCT va être impliquée dans la réparation des lésions bloquantes au niveau de la transcription. Le blocage de l'élongation par l'ARN pol III constitue un signal de recrutement pour les protéines CS (A et B) et XBA2 qui vont entraîner l'hyperphosphorylation de l'ARN pol III. Cette étape va provoquer l'élimination de la machinerie de transcription. A partir de cette étape, les deux systèmes RGG et RCT utilisent les mêmes processus, et tout d'abord le recrutement de différentes protéines parmi lesquelles les hélicases XPB et XPD, deux sous-unités du facteur de transcription TFIIH qui vont permettre la séparation des deux brins par le déroulement. Des endonucléases viennent se placer de part et d'autre de la lésion : XPG en 3' et le complexe ERCC1/XPF/XPA en 5'. XPA et RPA viennent stabiliser le complexe. Tout ceci conduit à l'excision d'un brin de 25 à 30 paires de bases autour de la lésion suivie de la resynthèse de la zone manquante par les ADN polymérasés puis d'une ligation réalisée par la ligase I.

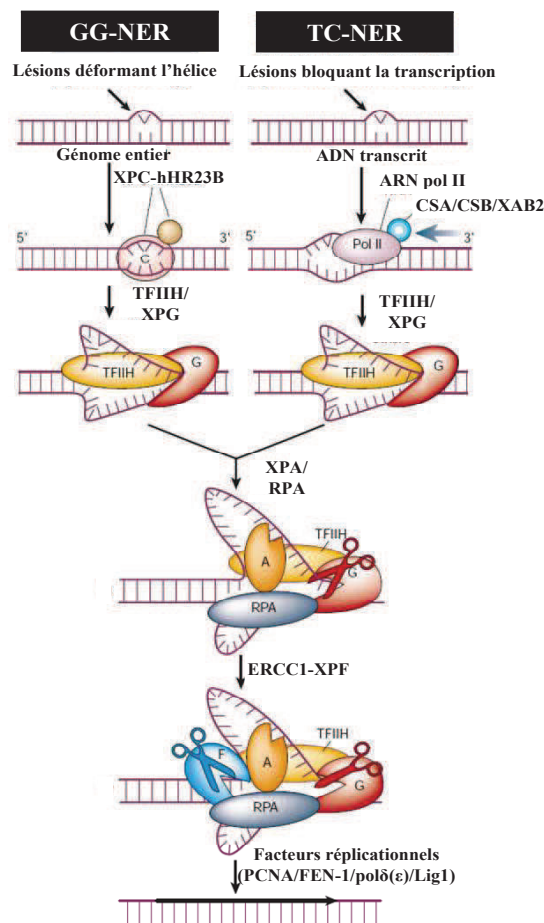


Figure 25 : Mécanisme du NER (adaptée d'Hoeijmakers, 2001)

Des études *in vivo* et *in vitro* ont montré que les adduits du B[a]P sont réparés par la voie NER. La vitesse de réparation des adduits BPDE a été étudiée *in vitro* dans différentes lignées cellulaires. Dans les HepG2, environ 60 % des adduits BPDE- N^2 -dGuo sont éliminés 48h après 24h d'exposition à 10 μ M de B[a]P (Marie, 2008) et 45% des adduits sont réparés en 8 h dans les A549 traitées avec 50 nM de (+)-anti-BPDE pendant 2h (Schwerdtle, 2003). Enfin il a été montré que ces mêmes adduits sont réparés deux fois moins rapidement sur le brin non-transcrit que sur le brin transcrit (Dreij, 2005).

En ce qui concerne les autres HAP, Braithwaite *et al* ont montré que la voie principale de réparation des adduits des diol-époxydes du B[a]A, du B[b]F et du chrysène correspond également à la voie NER (Braithwaite, 1998).

Enfin, le taux de réparation par la voie NER serait fonction de la nature des HAP et de leur capacité de blocage de la transcription. Plusieurs études ont suggéré que les adduits diol-époxydes avec une région baie sont mieux éliminés que ceux avec une région fjord (Dreij, 2005, Lagerqvist, 2011, Zhong, 2010). De par leur planarité et leur rigidité, les adduits baie-diol-époxydes induisent une distorsion importante de la double hélice et sont mieux reconnus par la machinerie NER. A l'inverse, les adduits-fjord diol-époxydes sont plus flexibles, s'intercalent plus facilement dans l'ADN et génèrent moins de stress sur le squelette de la double hélice, ils sont donc moins ou pas reconnus par le NER.

1.2. La réparation de dommages oxydatifs : Voie BER

La réparation par excision de base constitue la voie de réparation des bases oxydées de l'ADN, telle que la 8-oxodGuo, des cassures simples brins, de petites altérations chimiques des bases comme des méthylations ou des désaminations, ainsi que des sites abasiques dits AP (apurique/apirimidique). Dans le cas d'une exposition au B[a]P, cette voie est donc impliquée à travers la formation des lésions oxydatives ou de la dépurination de certains adduits. Ce type de réparation est constitué de quatre étapes successives : l'excision de la lésion, l'élimination d'un site abasique, la resynthèse et la ligation (Hoeijmakers, 2001, Wallace, 1994).

Tout d'abord, l'excision du dommage se déroule en deux étapes. Elle est initiée par l'action d'ADN-*N*-glycosylases, spécifiques à chaque type de lésion, qui vont générer un

site abasique. Une hydrolyse de la liaison phosphodiester en 5' du site AP permet ensuite l'incision du brin d'ADN. Il existe deux types de *N*-glycosylases. Les glycosylases monofonctionnelles ne vont catalyser que l'étape d'excision de la base endommagée alors que les glycosylases bi-fonctionnelles réalisent à la fois l'excision de la base et le clivage du brin d'ADN.

Les glycosylases monofonctionnelles catalysent le clivage de la liaison *N*-glycosidique entre la base et le sucre. Le site abasique ainsi généré est pris en charge par APE1, l'endonucléase spécifique des sites abasiques. Cette enzyme clive le brin d'ADN en hydrolysant la liaison phosphodiester en 5' du site AP. Les glycosylases bi-fonctionnelles sont capables de réaliser ces deux étapes par le biais d'une β -élimination ou d'une β , δ -élimination qui permet à la fois le relargage de la base et la formation d'un interstice (Hegde, 2008).

Les extrémités entourant l'interstice, généré après l'excision de la lésion, ne sont pas compatibles avec l'activité des ADN polymérases chargées de la resynthèse du brin. En fonction de la nature des extrémités générées, différentes enzymes peuvent intervenir telles que l'aprataxine (APTX), APE1 ou encore la polynucléotide-kinase (PNK) (Dianov, 2013).

Les ERO provoquent également des cassures simple brin de part et d'autre desquelles les extrémités générées vont être de différente nature et incompatibles avec l'action des ligases. La poly(ADP-ribose) polymérase PARP1 reconnaît la lésion et met en place une signalisation permettant le recrutement de différentes enzymes qui vont nettoyer les extrémités entourant la cassure. APE1 va par exemple prendre en charge les résidus 3'-phosphoglycoaldéhydes et PNK les résidus 3'-OH (Hoeijmakers, 2001).

Il existe ensuite deux mécanismes de resynthèse (Hegde, 2008) :

- Une voie de resynthèse courte ne fait intervenir que l'ADN polymérase β . La pol β associée à XRCC1 incorpore le nucléotide manquant à l'extrémité 3' de la coupure et le complexe ADN ligase III-XRCC1 catalyse la formation de la liaison phosphodiester manquante. La réparation des 8-oxodGuo par OGG1 impliquerait principalement cette voie.
- Une voie de resynthèse dite longue qui fait intervenir les ADN polymérases δ et ϵ . La pol β insère le premier nucléotide puis est retirée par le PCNA (Proliferating

Cell Nuclear Antigen) et remplacée par la pol δ et la pol ϵ . Le complexe pol δ -pol ϵ -PCNA synthétise 5 à 7 nucléotides entraînant le soulèvement de quelques nucléotides sur le brin endommagé. Cette structure, appelée flap, est excisée par FEN1, une flap endonucléase. La ligation est réalisée par le complexe ADN ligase I-XRCC.

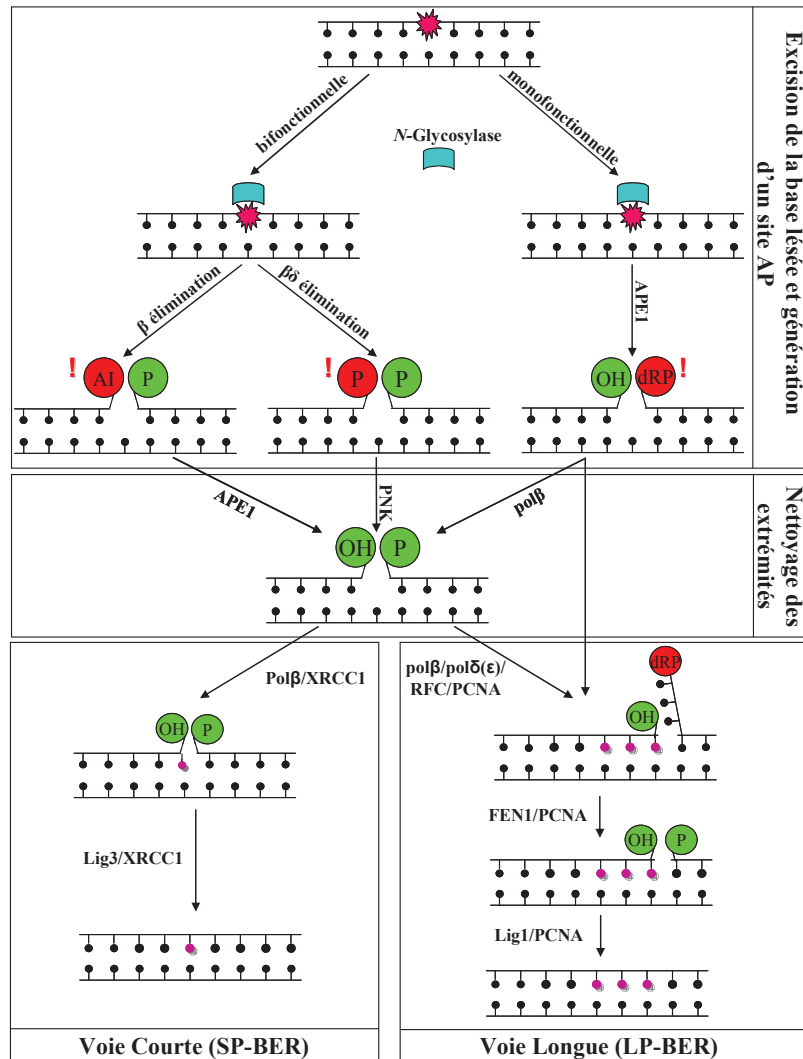


Figure 26 : Mécanisme du BER (AI : aldéhyde insaturé ; P : phosphate ; dRP : déoxyribose phosphate. Adapté de Hegde *et al*, 2008

La voie BER serait impliquée dans la réparation des sites abasiques AP (apuriques/apirimidiques) générés par le *trans*-8,9-dihydrodiol-10,11-époxyde-B[a]A et le *trans*-1,2-dihydrodiol-3,4-époxyde-Chrys (Braithwaite, 1998).

1.3. La réparation des cassures double-brin

Deux mécanismes de réparation des cassures double-brin de l'ADN coexistent dans la cellule : la recombinaison homologue (RH) et la suture non homologue des extrémités (NHEJ) (Shrivastav, 2008).

La recombinaison homologue repose sur la réparation fidèle du brin à partir d'un modèle constitué soit par le chromosome homologue soit par la chromatide sœur. Ce processus met en jeu plus d'une dizaine de protéines. Après la génération d'extrémités compatibles en 3' avec le mécanisme par le complexe RMN (Rad50/MRE11/NBS1), un filament nucléo-protéique RAD51 est créé au niveau de la cassure. RAD51 recherche alors une séquence homologue et un entremêlement croisé des brins permet de reconstituer un double-brin intact qui sert de modèle pour l'ADN polymérase.

A l'inverse de la recombinaison homologue, la réparation par suture (NHEJ) est peu fidèle car elle n'utilise pas de modèle mais repose sur la ligation des extrémités de la cassure double-brin. Ce processus peut donc entraîner une perte de matériel génétique au niveau de la coupure. Tout d'abord, les protéines KU70 et KU80 se fixent de part et d'autre de la cassure afin de protéger les extrémités d'une éventuelle dégradation et de permettre le recrutement d'ADN kinases. Enfin, la ligation est catalysée par XRCC4 et la ligase IV.

Les conditions privilégiant l'une ou l'autre voie sont peu connues mais impliqueraient l'avancement de la cellule dans le cycle cellulaire.

Des études dans des lignées cellulaires déficientes en RH ou NHEJ ont montré que les cassures double brin induites par le BPDE étaient préférentiellement réparées par la SNHE puis la RH dans une moindre mesure (Meschini, 2008).

2. Mort cellulaire par apoptose

L'apoptose est la mort volontaire et programmée des cellules. Elle intervient notamment après la survenue de dommages sur l'ADN qui pourraient rendre la cellule cancéreuse ou

dysfonctionnelle. De façon générale, ce processus actif débute par la contraction cellulaire suivie d'une condensation de la chromatine. L'ADN et le noyau se fragmentent alors et un bourgeonnement cellulaire se met en place aboutissant à la formation de corps apoptotiques. Ces structures sont finalement éliminées par phagocytose sans processus inflammatoire.

Le B[a]P et certains de ses métabolites comme le 7,8-diol et le BPDE induisent l'apoptose dans les lignées cellulaires humaines de foie HepG2, HeLa, mammaire MCF-7, de fibroblastes pulmonaires MRC-5 (Chen, 2005, Chen, 2003, IARC, 2010, Ogba, 2005). Des études sur la lignée embryonnaire murine Hepa1c1c7 ont montré que ce phénomène, lié à l'accumulation de p53 dans les cellules, serait AhR-dépendant pour le 7,8-diol (Ko, 2004). Cependant, le B[a]P et le 7,8 diol-B[a]P induiraient également des signaux anti apoptotiques (Solhaug, 2005).

3. Cancérogénèse

3.1. Mécanisme général de cancérogénèse

La formation d'un cancer repose sur le paradigme multi-étapes : initiation, promotion et progression (Figure 27).

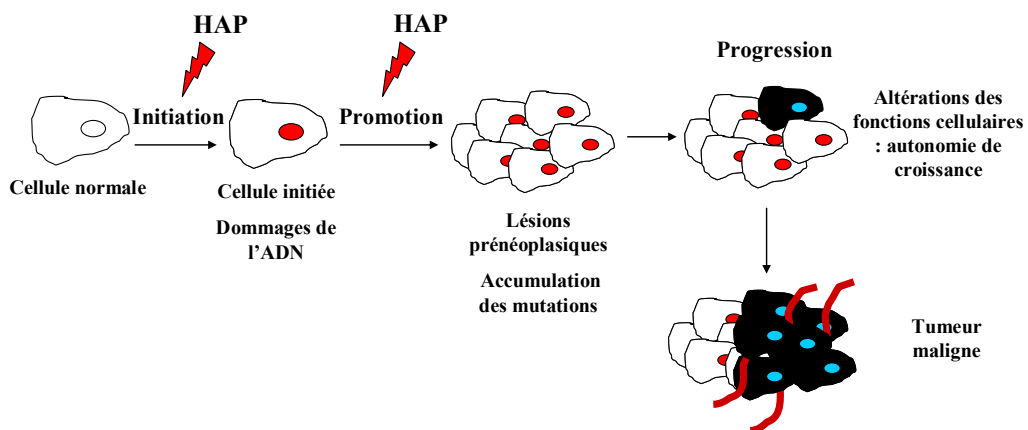


Figure 27 : Intervention des HAP dans le processus de cancérogénèse

- Initiation :

La prolifération cellulaire repose sur une régulation subtile entre les gènes qui vont donner des signaux de division, les gènes de prolifération ou proto-oncogènes, et les gènes d'anti-prolifération ou gènes suppresseurs de tumeurs qui permettent de ralentir la division cellulaire. L'initiation constitue la première étape de la cancérogénèse et ne concerne qu'une seule cellule dans laquelle une lésion est induite dans son ADN par l'action de substances génotoxiques. Si cette lésion n'est pas prise en charge par les systèmes de réparation ou est réparée de façon fautive, il peut en résulter une mutation qui va être transmise aux cellules filles lors du cycle cellulaire suivant. La plupart des mutations n'ont pas de conséquence car elles sont situées dans des régions non-codantes de l'ADN ou sont silencieuses et n'entraînent pas de modification de la protéine codée. Néanmoins lorsque ces mutations se produisent sur des proto-oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur, il en résulte une transformation cellulaire.

Les proto-oncogènes codent pour des protéines anti-apoptotiques, des facteurs de croissance, des protéines activatrices de facteurs de transcription, des récepteurs membranaires ou encore des facteurs de régulation du cycle cellulaire contrôlant le passage de la phase G1 à la phase S. En temps normal l'activation de ces gènes est régulée par des signaux extérieurs. Lorsqu'ils sont mutés et deviennent des oncogènes, leur activation devient indépendante de tout contrôle et les protéines codées par ces gènes sont générées de façon anarchique. Par exemple, le gène H-ras sous sa forme normale stimule la multiplication cellulaire uniquement après réception d'un signal de prolifération. Sous sa forme mutée, il code pour une protéine qui stimule la multiplication cellulaire indépendamment de tout signal (Appel, 1990) ce qui va entraîner une production très importante de protéines.

Les gènes suppresseurs de tumeurs contrôlent la croissance et la différenciation cellulaire en s'opposant aux oncogènes et constituent une protection contre la transformation tumorale de la cellule. Il existe deux types de gènes suppresseurs de tumeurs : les gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité du génome comme MMR, BRCA1, ATM et les gènes qui contrôlent la prolifération et la survie cellulaire tels que Rb, p21 et p53. La protéine p53 a un rôle majeur dans la réponse aux lésions à l'ADN et dans le contrôle du cycle cellulaire. En réponse à des dommages à l'ADN, elle va induire l'arrêt du cycle cellulaire pour laisser le temps aux systèmes de réparation d'éliminer la lésion et si celle-ci n'est pas réparée, p53 peut entraîner la cellule vers l'apoptose (Harris, 2005, Irigaray,

2010, Meek, 2004).

- Promotion et progression :

Sous l'action d'agents promoteurs, la cellule initiée va se multiplier de façon clonale provoquant ainsi une accumulation des mutations. Les cellules pré-néoplasiques deviennent alors néoplasiques entraînant la formation de dysplasie et de cancer *in situ*. Alors que la phase de promotion est réversible, la phase de progression est irréversible. Les cellules tumorales sont immortelles, résistantes à l'apoptose et se divisent de façon anarchique et autonome. De plus, elles ont une capacité d'invasion tissulaire et de diffusion métastatique entraînant ainsi la formation de tumeur dans d'autres tissus que le tissu d'origine. Enfin, elles peuvent induire une angiogenèse qui correspond à la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins permettant la croissance des tumeurs malignes et des métastases.

3.2. *Les HAP dans le processus de cancérogénèse*

Les HAP représentent des cancérigènes complets. En effet, un certain nombre d'entre eux ont à la fois un rôle dans l'initiation et dans la promotion.

3.2.1. *HAP et initiation : la formation de lésions à l'ADN, événement clé dans la mutagenicité*

Les mutations géniques engendrées par les HAP et de leurs métabolites a été intensivement étudiée *in vitro* à l'aide du test d'Ames (OCDE, 1997a) puis le développement de tests sur cultures cellulaires de mammifères d'origine animale ou humaine comme les tests HPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase) et ses dérivées les tests XPRT (Xanthine-guanine phosphoribosyl transférase) et TK (Thymidine Kinase) (OCDE, 1997b). Certaines méthodes permettent d'étudier des mutations génique au niveau de certains locus chez des rongeurs ou sur des marqueurs spécifiques chez des animaux transgéniques ou des bactéries (De Vries, 1997).

3.2.1.1. La mutagénicité des adduits stables

Des études *in vitro* ont montré que certains adduits des HAP, en particulier ceux possédant une région fjord, éludent la machinerie de réparation du NER (Lagerqvist, 2011, Zhang, 2002). Ces adduits non éliminés peuvent provoquer un blocage au niveau de la fourche de réplication. Deux voies se mettent alors en place : la recombinaison homologue ou la synthèse translésionnelle. Il a été démontré que la première était à l'origine d'aberrations chromosomiques. La seconde implique 4 polymérases de la famille Y : pol η , pol κ , pol ι et Rev1 et est impliquée dans la génération de mutations. En effet, les polymérases placent des nucléotides qui ne sont pas forcément ceux de la séquence initiale, au niveau de la lésion, dans le but de poursuivre la réplication de l'ADN. La fidélité de ces enzymes est variable et dépend du type de lésion. La réplication fautive des adduits entraîne majoritairement l'apparition de mutations ponctuelles dans le génome en particulier des transversions qui correspondent à des substitutions d'une purine par une pyrimidine ou inversement. Dans le cas des adduits du B[a]P, pol η et pol κ seraient les seules en cause (Zhang, 2002). Seules ces deux enzymes ont démontré *in vitro* la capacité de synthétiser de l'ADN au niveau des adduits du BPDE sur la dGuo et la dAdo sans toutefois présenter les mêmes activités. Il semblerait que pol κ soit entièrement bloquée par les adduits du BPDE sur la dAdo mais insère de façon dominante une cytosine en face des adduits (\pm)-*anti/trans*-BPDE-dGuo assurant ainsi une réplication exacte des adduits. Pol η entraîne une réplication fautive des adduits BPDE-dGuo et de l'adduit (-)-*trans*-BPDE-dAdo mais une synthèse plutôt fidèle des adduits (+)-*trans*-BPDE-dAdo. De plus, il a également été montré *in vitro* que cette enzyme insère de façon majoritaire une dAdo en face des adduits (\pm)-*trans/anti*-BPDE-dGuo. Elle serait ensuite bloquée un nucléotide après la lésion et pol κ poursuivrait alors la synthèse (Zhang, 2002).

Pour conclure, l'adduit stable préférentiellement formé *in vivo* par le B[a]P étant le BPDE- N^2 -dGuo, la majorité des mutations issues de la réplication fautive de cet adduit implique l'appariement d'une dAdo face à dGuo par pol η à l'origine de mutations sous forme de transversions G \rightarrow T (IARC, 2010, Luch, 2004).

3.2.1.2. *La mutagenicité des adduits dépurinants*

De la même façon que les adduits stables, la formation d'adduits dépurinants à l'ADN peut être à l'origine de mutations. Ces mutations vont être dues à une mauvaise réplication au niveau des sites abasiques engendrés par ce type d'adduits. Ces sites abasiques entraînent des distorsions locales au niveau de l'ADN et peuvent gêner l'activité des ADN et ARN polymérases et donc à la fois la réplication et la transcription. Néanmoins, les ADN polymérases peuvent détecter la présence de ces sites abasiques et effectuer la lecture de l'ADN mais insèrent une base qui n'est pas toujours complémentaire de la base d'origine par manque d'information. Chaque site abasique peut donc être à l'origine d'une mutation ponctuelle de substitution (Zhou, 1993). A la suite de la perte de la Gua issue des adduits dépurinants du B[a]P sur la dGuo, les ADN polymérases insèrent, dans les cellules de mammifères, en face de la lésion de façon préférentielle A (41 %) > T (37 %) > C (22 %) (Gentil, 1992). Les mutations induites par les adduits dépurinés du B[a]P sur la dGuo sont donc des mutations ponctuelles $G \rightarrow T$ et $G \rightarrow A$ lorsque A et T sont respectivement insérés en face de la G manquante.

3.2.1.3. *Mutations engendrées par les adduits du B[a]P dans les proto-oncogènes*

L'adduit stable préférentiellement formé *in vivo* par le B[a]P étant le BPDE- N^2 -dGuo, la majorité des mutations induites par cet HAP implique la dGuo sous forme de transversions $G \rightarrow T$ (IARC, 2010, Luch, 2004). De telles mutations ont été détectées au niveau du proto-oncogène *K-ras* et du gène suppresseur de tumeur p53. Dans les cellules bronchiques NHBE (Normal Human Bronchial Epithelia) exposées à 2 μ M de BPDE, les adduits sont préférentiellement formés au niveau des codons 12 en position 1 puis 14 de *K-ras* dans l'ADN génomique (Feng, 2002). Les mutations $G \rightarrow T$ constituent jusqu'à 57 % des mutations totales du codon 12 dans les adénocarcinomes du poumon chez l'homme (Husgafvel-Pursiainen, 1995). En ce qui concerne p53, les travaux de Smith *et al* sur les cellules bronchiques humaines BEAS-2B ont montré que les adduits du B[a]P et d'autres HAP se trouvaient majoritairement sur les codons 157, 158, 245, 248 et 273 (Smith, 2000).

De plus, après un traitement au BPDE, les transversions $G \rightarrow T$ sur les codons 157, 248 et 249 augmentent de façon dose-dépendante dans ces mêmes cellules. De façon intéressante, ces hotspots de mutations sont retrouvés dans le cancer du poumon lié à la cigarette (Denissenko, 1998, Denissenko, 1996, Pfeifer, 1998). 50% des mutations observées sur le gène *K-ras* ont lieu sur le codon 12 en position 1 qui correspond également à la localisation préférentielle des adduits BPDE dans les NHBE (Feng, 2002, Kelley, 2002). La fréquence des transversions $G \rightarrow T$ sur p53 dans ces cancers est plus importante sur les codons 157, 248 et 273 et semble augmenter en fonction de la consommation de cigarettes (Pfeifer, 2003). De plus, 90% des mutations se situent sur le brin non transcrit du gène, ce qui pourrait être expliqué par la réparation plus lente des adduits BPDE sur le brin non transcrit de p53 (Denissenko, 1998, Denissenko, 1996, Pfeifer, 1998). Toutes ces données soulèvent l'importance des HAP dans l'étiologie des cancers du poumon chez les fumeurs.

Peu d'études ont étudié la part des adduits dépurinants dans la survenue de mutations au niveau de p53 ou des oncogènes *ras*. Après un traitement au B[a]P, les altérations génétiques dans le gène *H-ras* de tumeurs bénignes de peau de souris, sont des mutations par substitution $GGA \rightarrow GTA$ (25 %), $GGC \rightarrow GTC$ (50-54 %) et $CAA \rightarrow CTA$ (15-20 %) au niveau des codons 12, 13 et 61 de ce gène. Les travaux sur plusieurs HAP (B[a]P, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene soit le DMBA dibenzo[a,l]pyrene soit le DB[a,l]P) par Chakravarti *et al* ont montré une corrélation entre la formation de leurs adduits dépurinants et les mutations H-ras. Ainsi pour le B[a]P, les adduits B[a]P-C8-Gua et B[a]P-N7-Gua ont été associés à des mutations $G \rightarrow T$ et les adduits B[a]P-N7-Ade seraient à l'origine de mutations $A \rightarrow T$ (Chakravarti, 1995).

3.2.1.4. La mutagénicité des dommages oxydatifs

Parmi les dommages oxydatifs, la présence de bases oxydées dans l'ADN peut entraîner, si celles-ci sont mal réparées, l'apparition de mutations (Azqueta, 2009). L'absence de réparation de la 8-oxodGuo peut induire un mésappariement de l'adénine avec la 8-oxodGuo, générant des mutations par substitution $G \rightarrow T$ et $A \rightarrow C$. Ce type de mutations correspond au profil mutationnel de la 8-oxodGuo observé dans les gènes p53 et *K-ras*. L'induction de ces mutations a été démontrée de façon indirecte *in vivo* chez le rat (Higinbotham, 1992). Les travaux de Wang *et al* sur des tumeurs de poumons et de foies

de rats ont montré que le niveau basal de 8-oxodGuo est particulièrement élevé par rapport aux tissus sains. Par ailleurs, il a été proposé que l'oxydation de la thymine peut entraîner des transversions A : T → G : C. Les sites abasiques issus de l'action des ERO peuvent également être à l'origine de mutations de la même façon que ceux issus de la dépurination des adduits à l'ADN (Wang, 1995).

Une étude sur la levure réalisée en 2006 a par ailleurs suggéré que les dommages oxydatifs issus de la voie des *o*-quinones par la formation de 8-oxodGuo pourraient être à l'origine de transversions G→T sur p53 de façon plus importante que les adduits du BPDE. En effet, la formation de 8-oxodGuo induirait de façon prépondérante des transversions G→T alors que les adduits du BPDE seraient à l'origine de transversions G→C en conditions oxydo-réductrices (Shen, 2006). Néanmoins, dans la lignée pulmonaire humaine A549 la B[a]P-*o*-quinone induit de façon prédominante des transitions A→G (T→C) après un traitement aigu (Penning, 2004).

3.3. HAP et promotion

Un promoteur efficace va à la fois stimuler la prolifération cellulaire de la cellule initiée et la protéger de l'apoptose. L'effet des HAP sur la prolifération cellulaire est controversé car certains articles montrent une stimulation de la prolifération cellulaire alors que d'autres mettent en évidence une diminution. Il semblerait néanmoins que le B[a]P provoque en fait un subtil mélange des deux en fonction de la concentration et du temps d'exposition. Il peut à la fois induire l'apoptose et la prolifération cellulaire en augmentant le pourcentage de cellules en phase S (IARC, 2010). Andrysik *et al* ont montré que le B[a]A et le B[b]F provoquaient également une augmentation du nombre de cellules en phase S (Andrysik, 2007). De plus, un changement dans la Communication Intercellulaire par les Jonctions Gap (CIJG) représente un des facteurs majeurs de la promotion et l'effet des composés sur la CIJG est souvent considéré comme un marqueur de la promotion. Ces jonctions correspondent en fait à des canaux constitués par des connexines qui connectent le cytoplasme d'une cellule aux cellules voisines. Il a été établi que la formation de ces jonctions inhibe la prolifération cellulaire et vice versa, l'inhibition de leur formation par des signaux de prolifération stimule la multiplication cellulaire. La CIJG aurait également un rôle important dans la propagation du signal d'apoptose aux cellules voisines. Certains HAP inhibent la CIJG de façon variable suivant leur structure, les HAP à 3 cycles

représentant les plus forts inhibiteurs. Le B[a]P, le B[a]A et le DB[ah]A constitueraient également de bon inhibiteurs, à l'inverse du B[e]P. En diminuant la communication cellulaire, ces HAP stimulent la prolifération et inhibent l'apoptose. Ce phénomène impliquerait davantage les composés parents que leurs métabolites. Les niveaux de CYP450 étant moindres dans les cellules tumorales que dans les cellules normales, l'accumulation des HAP non métabolisés augmenterait de façon conséquente leur capacité de promotion (Blaha, 2002, Sharovskaya, 2006).

Différentes travaux ont également proposé que les ERO aient également un rôle dans le processus de promotion de par une dérégulation des voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, la différenciation ou l'apoptose (Franco, 2008, Mates, 2008).

3.4. Cancérogénicité des mélanges de HAP en laboratoire

Des travaux ont étudié *in vivo* les propriétés cancérigènes des mélanges à travers différentes voies d'exposition mais extrêmement peu par inhalation du fait de la complexité des expérimentations à mettre en place.

De nombreuses études se sont intéressées à l'effet cutané de mélanges. Par exemple, l'effet de mélanges binaires a notamment été étudié chez des souris ICR/Ha exposées de façon chronique par application dermique 3 fois par semaine pendant 368 ou 440 jours. Les résultats sur l'incidence de la formation de carcinomes ou de papillomes, tumeurs bénignes à la surface de la peau, sont présentés Tableau 9. Quelle que soit la durée du traitement, le B[e]P, le Pyr et le Flua augmentent l'incidence des tumeurs par rapport au B[a]P seul. La dose du HAP ajouté au B[a]P semble jouer un rôle important dans la cancérogénèse des mélanges binaires.

Compound	Papilloma	Squamous-cell carcinoma
B[a]P (368 days)	14/50 (28%)	10/50 (20%)
B[a]P + 4 µg pyrene (368 days)	12/50 (24%)	6/50 (12%)
B[a]P + 12 µg pyrene (368 days)	25/50 (50%)*	20/50 (40%)*
B[a]P + 7 µg benzo[g,h,i]perylene (368 days)	19/50 (38%)	10/50 (20%)
B[a]P + 21 µg benzo[g,h,i]perylene (368 days)	20/50 (40%)	18/50 (36%)
B[a]P + 5 µg B[e]P (368 days)	24/50 (50%)	9/50 (18%)
B[a]P + 15 µg B[e]P (368 days)	33/50 (66%)*	27/50 (54%)*
B[a]P (440 days)	16/50 (32%)	12/50 (24%)
B[a]P + 40 µg pyrene (440 days)	35/50 (70%)*	26/50 (52%)*
B[a]P + 40 µg fluoranthene (440 days)	39/50 (78%)*	37/50 (74%)*

From Van Duuren & Goldschmidt (1976)

B[a]P, benzo[a]pyrene; B[e]P, benzo[e]pyrene; PAH, polycyclic aromatic hydrocarbon

*Significantly different from benzo[a]pyrene alone at 368 or 440 days

Tableau 9 : Incidence de tumeurs de la peau chez des souris ICR/Ha après application cutanée de B[a]P ou de mélanges binaires B[a]P/autre HAP

Les travaux s'étant intéressés à la cancérogénicité après l'inhalation sont plus rares. Ainsi, Heinrich *et al*, ont étudié *in vivo* la cancérogénicité de mélanges environnementaux contenant de fortes proportions de HAP administrés par inhalation (Heinrich 1986a b, 1989, 1994) sur différentes espèces animales. La plus récente d'entre elles a été réalisée sur un groupe de 72 femelles de rats Wistar exposées à un aérosol de condensation de brai de goudron de houille, généré par chauffage à 750 °C et refroidi à 12 °C, 17h par jour pendant 5 jours par semaine pendant 43 ou 86 semaines à des concentrations de 1,1 et 2,6 mg/m³ correspondant à 20 et 50 µg/m³ de B[a]P. L'incidence de cancer de poumons était de 4 % et de 33 % chez les rattes exposées pendant 43 semaines à 1,1 et 2,6 mg/m³ et de 39 % et 97 % pour ces mêmes doses pour une durée d'exposition de 86 semaines alors qu'aucune tumeur du poumon n'est apparue chez les animaux contrôles.

V. Objectifs de la thèse

Comme nous l'avons vu dans cette introduction, les HAP sont présents de façon ubiquitaire dans l'environnement à des niveaux particulièrement élevés en milieu industriel. Les études épidémiologiques ont permis de démontrer leur toxicité et leur implication dans la survenue de cancers notamment au niveau de la vessie et des poumons. Leur toxicité et leur ubiquité font donc de l'impact des HAP un véritable enjeu de santé publique. Par ailleurs, les HAP sont toujours émis en mélanges d'une centaine de composés en proportion variable en fonction de la source d'émission. Leur métabolisation

par les cellules de l'organisme via des voies communes va conduire à la génération d'un mélange très complexe de métabolites dont certains vont exercer une action génotoxique sur l'ADN, soit par alkylation et la formation des adduits soit par la génération d'un stress oxydant. Alors que la génotoxicité du B[a]P a fait l'objet de nombreuses études, il existe beaucoup moins de données sur celle des autres HAP et encore moins des mélanges complexes. Néanmoins, les populations sont toujours exposées à des mélanges dont les composés peuvent exercer entre eux des effets additifs, potentialisateurs ou inhibiteurs. De plus, peu d'études se sont intéressées à la compréhension des mécanismes qui relient la composition des mélanges complexes et leurs effets génotoxiques.

Dans ce contexte, l'objectif général du présent travail est de fournir des informations mécanistiques sur la génotoxicité et la métabolisation de mélanges de HAP.

Les questions scientifiques sous-jacentes à cet objectif final peuvent se diviser en trois grands axes :

- L'effet génotoxique de HAP tels que le B[a]P est-il différent suivant les organes et quelle est la part du stress oxydant par rapport à la formation d'adduits ?
- Comment sont métabolisés d'autres HAP que le B[a]P pour lesquels peu de données sont disponibles dans la littérature et quel est leur effet génotoxique ?
- Quel est l'effet génotoxique des HAP en mélanges et quelles sont les interactions mises en jeu entre les différents composés du mélange ?

Pour répondre à ces différentes questions, la démarche suivie dans mon projet de thèse s'est articulée autour de trois grandes parties :

1) Le B[a]P comme HAP modèle : identification des voies des principales de génotoxicité dans des modèles cellulaires représentatifs d'organes cibles

Les travaux précédemment réalisés au laboratoire sur la thématique des HAP portaient sur la lignée humaine d'hépatocytes HepG2 dont l'intérêt principal réside dans ses fortes capacités métaboliques. Néanmoins, le foie ne constitue pas un organe cible des HAP à l'inverse de la vessie et du poumon. Afin d'obtenir des données sur l'effet des HAP dans

ces organes cibles, notre choix s'est porté sur les lignées humaines T24 dérivée d'un carcinome d'épithélium de vessie et A549 issue d'un adénocarcinome de poumon. Le B[a]P a été utilisé comme composé modèle afin, d'une part, d'évaluer les capacités métaboliques des différentes lignées et, d'autre part, d'y déterminer les différences en termes de génotoxicité du B[a]P, notamment les parts relatives du stress oxydant, mesuré par la méthode des comètes, et de la formation d'adduits analysés par HPLC-MS/MS. Le métabolisme est évalué à travers l'expression génique des isoformes 1A1, 1B1, 1A2, 3A4 du CYP450, de l'EH et des GST (A1 et P1) mais aussi à travers l'activité enzymatique du CYP540 par l'activité EROD et des GST par la méthode au 1-Chloro-2,4-DinitroBenzène (CDNB).

2) Métabolisme et adduits d'autres HAP que le B[a]P dans les cellules pulmonaires

Afin d'apporter de nouvelles données sur le mécanisme d'action d'autres HAP, la démarche mise en place pour le B[a]P a été étendue à 12 autres HAP choisis sur la base de leur toxicité, leur abondance ou leur pertinence comme traceurs de sources. Un premier enjeu de cette partie du travail est de fournir de nouveaux biomarqueurs de génotoxicité pour les HAP génotoxiques et de mettre au point une méthode d'analyse par HPLC-spectrométrie de masse en tandem afin d'étudier la formation de leurs adduits respectifs. Le second objectif était la comparaison de la réponse métabolique des cellules aux différents HAP.

3) Effets génotoxiques et mode d'action de mélanges synthétiques de HAP : étude des interactions entre les HAP au sein d'un mélange

Afin d'étudier le mode d'action des HAP en mélanges et les interactions entre HAP dans les cellules pulmonaires, nous avons tout d'abord analysé la modulation de la toxicité du B[a]P en mélanges binaires. Une attention particulière a été portée au B[b]F et au B[k]F qui modulent de façon opposée la formation des adduits BPDE- N^2 -dGuo dans la lignée HepG2. En effet, des travaux précédents avaient montré que le B[b]F potentialise fortement la formation des adduits du B[a]P, alors que le B[k]F l'inhibe. Dans une dernière partie, nous avons examiné la métabolisation et l'effet génotoxique de fractions HAP reconstituées de mélanges environnementaux de composition variée : la fumée de cigarette, les émissions de poêles à bois, l'atmosphère d'une usine de production de silicium, une

atmosphère urbaine et un mélange correspondant aux émissions de moteurs de véhicules légers. Le but de l'utilisation de ces mélanges est de mieux comprendre les interactions qui peuvent exister entre les HAP au sein des mélanges notamment en faisant le lien entre métabolisation, génotoxicité et composition de ces mélanges.

L'ensemble de ces travaux nous a permis d'obtenir des informations biochimiques intéressantes sur la réponse des différents types cellulaires. Ils ont aussi et surtout permis de confirmer le manque d'additivité des effets des HAP et en cela remis en cause l'approche TEF utilisée en évaluation du risque d'exposition aux mélanges.

CHAPITRE 2

MATERIELS ET METHODES

Chapitre 2 - Matériels et Méthodes

I. HAP commerciaux

1. Préparation des solutions mères et des mélanges synthétiques

Le Benzo[a]pyrène (B[a]P), le Benzo[e]pyrène (B[e]P), le Benzo[b]fluoranthène (B[b]F), le Benzo[k]fluoranthène (B[k]F), le Benz[a]anthracène (B[a]A), le Dibenz[a,h]anthracène (DB[ah]A), le Benzo[g,h,i]pérylène (B[ghi]P), l'Indéno[1,2,3-*cd*]pyrène (IP), le Chrysène (Chrys), le Pyrène (Pyr), le Fluoranthène (Flua) et le Naphtalène (Naph) proviennent de Sigma. Le Benzo[j]fluoranthène (B[j]F) est fourni par VWR International. Toutes ces poudres sont solubilisées dans du DMSO (Sigma) à une concentration de 20 mM et conservées à -20°C. Ces solutions mères sont utilisées directement pour la préparation des différents mélanges synthétiques ou diluées dans du milieu de culture. Ces solutions mères ainsi que les mélanges reconstitués sont ensuite dosés par HPLC-Fluorescence.

2. Dosage des HAP

Après deux dilutions successives des échantillons au 1/200, les HAP sont dosés sur un système HPLC (Waters Model 2690/5) équipé d'un détecteur de fluorescence multi longueurs d'onde (Waters 2475). La séparation chromatographique est effectuée sur une colonne analytique HAP-C18 (PAH C18 150 mm × 3 mm, 5 µm) provenant de chez Waters avec un gradient d'acétonitrile de 30 à 100 % pendant 23 min dans de l'eau suivi d'une étape isocratique de 5 minutes avec 100 % d'acétonitrile. Le débit est fixé à 500 µL/min et la température du four à colonne est fixée à 32 °C. Les longueurs d'ondes (excitation/émission) utilisées pour les différents HAP sont les suivantes :

- Naph : 276/323 nm
- Flua : 285/450 nm

- Pyr : 333/390 nm
- B[a]A et Chrysène : 265/380 nm
- B[e]P et B[b]F: 295/425 nm
- B[k]F, B[a]P, D[a,h]A et B[g,h,i]P : 296/405 nm
- B[j]F et IP : 302/500 nm

Tous ces HAP sont dosés par calibration externe avec une gamme pour les fortes concentrations de 2,36 à 120,48 ng/ml et une gamme pour les faibles concentrations de 0,39 à 10 ng/ml. La limite de détection est de 0,1 ng/mL pour le Flua, le B[a]A, le Chrys, le B[e]P, le B[j]F, le B[b]F, le B[k]F, le D[a,h]A, le B[g,h,i]P et l'IP, de 0,3 ng/mL pour le Naph et 0,05 ng/mL pour le Pyr et le B[a]P.

II. Culture cellulaire

Les produits de culture cellulaire (milieux, trypsine, PBS, collagène...) proviennent de Life Technologies (Saint Aubin, France) à l'exception des consommables (flasques, tubes...) provenant de chez Dutcher (Brumath, France)

1. Lignées cellulaires et produits de culture cellulaire

La lignée cellulaire HepG2 (ATCC HB-8065), issue d'un hépatocarcinome humain, provient de la banque américaine ATCC (American Type Culture Collection). Les cellules sont cultivées dans un milieu DMEM (Dubelco's Modified Eagle Medium) après un coating préalable des flasques avec du collagène de type I (Rat tail – Life technologies) dilué au 1/50 dans un mélange stérile NaOH 1N / PBS / eau (2,5/10/87,5 %). Les T24, lignée humaine dérivée d'un carcinome de vessie (CLS 300352) ainsi que la lignée A549 (CLS 300 114) provenant d'un adénocarcinome pulmonaire proviennent de la société CLS (Cell Lines Service, Eppelheim – Allemagne). Le milieu de culture des T24 est le Mc Coy's 5A Medium et les A549 sont cultivées dans du milieu DMEM F12. Tous les milieux de culture sont supplémentés avec 10 % de sérum fœtal de veau (SVF), 1 % d'acides aminés non essentiels, 1 % de L-Glutamine et des antibiotiques (pénicilline 0,01 U/mL, streptomycine 0,01 µg/mL). Les différentes lignées cellulaires sont repiquées 2 fois par semaine au 1/6 pour les HepG2 et au 1/10 pour les A549 et T24 dans des flasques 75 cm².

2. Traitements

Les HAP commerciaux sont dissouts dans du milieu de traitement sans SVF avec une proportion maximale de 0,5% de DMSO. Pour chaque expérience, on inclut un témoin négatif constitué par des cellules traitées avec du DMSO à 0.5% dans du milieu de traitement. L'exposition des cellules se fait à 37 °C sous 5 % de CO₂.

3. Récolte des cellules après exposition

A la fin de l'incubation, le milieu de traitement est retiré et les cellules sont rincées deux fois avec du PBS. Elles sont ensuite récoltées après incubation avec de la trypsine-EDTA pendant 2 minutes à 37°C avec 5 % de CO₂ pour les T24 et A549 et de la trypsine 10 X pendant 10 minutes pour les HepG2 également à 37°C sous 5% de CO₂. L'action de la trypsine est stoppée par ajout de PBS supplémenté avec 10 % de SVF et les cellules sont centrifugées 5 minutes à 1400 rpm (Megafuge 1.0R, Heraeus, ThermoScientific). Après deux lavages successifs au PBS, les culots cellulaires secs sont soit repris dans du PBS (10⁶ cellules/mL) pour la méthode des comètes soit stockés à -80°C pour les extractions d'ADN ou d'ARN.

III. Mortalité cellulaire

La cytotoxicité des HAP et des mélanges est caractérisée en utilisant le test MTT de mesure de viabilité cellulaire. Le MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma) est un sel de tétrazolium jaune, métabolisé en formazan par les chaînes respiratoires mitochondriales des cellules vivantes. La formation de ce composé violet, analysable en spectrophotométrie, va donc être proportionnelle à la viabilité cellulaire.

Les différentes lignées cellulaires sontensemencées dans des plaques 96 puits transparentes à raison de 10 000 cellules par puits 24h avant le traitement. Les HepG2 sont cultivées sur des plaques 96 puits préalablement coatées avec du collagène. Les cellules sont alors incubées 14h dans les différentes conditions d'exposition. Le témoin négatif utilisé correspond à une incubation des cellules dans une solution à 0,5 % de DMSO. Le

milieu de traitement est ensuite retiré et remplacé par 200 μL de milieu complet. Après incubation 1h à 37°C (5% de CO_2), 20 μL d'une solution de MTT à 5mg/mL dans du PBS avec Ca^{2+} et Mg^{2+} est ajoutée dans chaque puits et les cellules sont à nouveau placées 1h à 37°C. Deux rinçages successifs sont effectués avec du PBS, 200 μL de DMSO sont alors ajoutés dans chaque puits et la plaque est agitée 10 min à l'obscurité. Enfin, l'absorbance à 570 nm est déterminée sur un spectrophotomètre équipé d'un lecteur de plaque (Spectra Max M2, Molecular Devices). La viabilité cellulaire est exprimée en pourcentage par rapport au témoin DMSO. Le MTT et le PBS avec Ca^{2+} et Mg^{2+} proviennent de Sigma.

IV. Analyse du métabolisme

1. Expression des gènes : RT-qPCR

1.1. Extraction d'ARN

L'extraction des ARN est réalisée à l'aide du kit GenElute mammalian total RNA miniprep kit (Sigma) en suivant le protocole du fournisseur. Les culots secs sont resuspendus dans du tampon de lyse (1% de 2-mercaptoéthanol) afin de lyser les cellules. Le lysat est ensuite placé sur une colonne de filtration centrifugée à 16000g pendant 2 minutes. Un volume d'éthanol à 70% est alors ajouté à l'éluat, transféré après homogénéisation sur une colonne de fixation. Après une centrifugation à 16000g pendant 30 secondes, les acides nucléiques fixés sur la colonne sont rincés par ajout d'une première solution de lavage et la colonne est centrifugée une nouvelle fois. Afin d'éviter les contaminations par de l'ADN génomique, 80 μL de DNase I (10 μL d'enzymes + 70 μL de tampon RDD) sont ajoutés sur chaque colonne ensuite incubée 15 minutes à température ambiante. L'enzyme est alors éliminée par 3 rinçages successifs suivis d'une centrifugation à 16000 g pendant 30 secondes : le premier avec la solution de lavage 1 et les deux autres à l'aide de la solution de lavage 2 contenant 80 % d'éthanol. Les ARN sont ensuite recueillis par deux éluions consécutives avec 50 μL de solution d'éluion puis dosés à l'aide d'un Nanodrop 1000 à 260 nm. La pureté des ARN est également vérifiée à 280 nm pour les contaminations avec

des protéines et à 230 pour d'éventuelles contaminations avec des solvants ou des sels qui pourraient inhiber les réactions de PCR. Les rapports 260/280 et 260/230 doivent être respectivement compris entre 1,7 et 2,1 ou 1,8 et 2,2 pour une pureté acceptable.

1.2. Reverse transcription

L'ARN est reverse transcrit à l'aide du kit Superscript II Reverse Transcriptase (Sigma) en suivant les recommandations du fournisseur. Succinctement, 2 µg d'ARN sont ajoutés à 100 ng d'amorces aléatoires (Proméga) et 10 mM d'un mix de dNTP puis incubés à 70°C pendant 5 minutes. Les échantillons sont alors rapidement placés dans la glace et brièvement centrifugés. Après addition d'un tampon 5 X, 0,1 M de DTT et 45 U d'un inhibiteur de ribonucléases (Sigma), le mélange est placé à 25°C pendant 2 minutes. La reverse transcriptase (200 U) est jointe au mélange ensuite préincubé à 25°C pendant 10 minutes puis à 42 °C pendant 50 minutes. L'action de l'enzyme est arrêtée par un chauffage à 70°C pendant 15 minutes.

1.3. Design et validation des amorces

La conception des amorces s'effectue à partir des séquences NM (ARNm) sur le site de NCBI (National Center for Biotechnology Information) associés aux gènes d'intérêt et par l'intermédiaire du logiciel en ligne Primer3 (<http://primer3.wi.mit.edu/>). Elles sont ensuite synthétisées par le fournisseur Eurogentec (Tableau 20).

Gène	N° d'accès Genbank	Amorce Forward	Amorce Reverse	Taille de l'amplicon (pb)
GAPDH	NM_002046.4	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	TTGATTTGGAGGGATCTCG	238
S18	NM_022551.2	AACGTCTGCCCTATCAACTTT	TGGATGTGGTAGCCGTTTCT	117
CycloA	NM_021130.3	TTCATCTGCACTGCCAAGAC	TCGAGTTGTCCACAGTCAGC	158
CycloB	NM_000942.4	GCAAGATCGAGGTGGAGAAG	CTGTGGAATGTGAGGGGAGT	171
CYP1A1	NM_000499.3	CTTGGACCTCTTGGAGCTG	CGAAGGAAGAGTGTCCGGAAG	212
CYP1B1	NM_000104.3	GACCCCCAGTCTCAATCTCA	CTCCCACTCGAGTCTCTTGG	152
CYP1A2	NM_000761.3	GGACAGCACTTCCCTGAGAG	GTCCCGGACACTGTTCTTGT	231
CYP3A4	NM_017460.5	GCCTACAGCATGGATGTGAT	CGAGGCGACTTTCTTTCATC	250
EPH	NM_000120.3	CAGAGGCATCCTCCAAGAAG	GCAGGAGGGTCAGGGTAGAG	219
GSTA1	NM_145740.3	CGGTGACAGCGTTTAACAAA	GCACTTGCTGGAACATCAAA	247
GSTP1	NM_000852.3	ACCTCCGCTGCAAATACATC	GGCTAGGACCTCATGGATCA	206
AKR1C1	NM_001353.5	AGATTGCAGATGGCAGTGTG	TCACCTTCTCACCTGGCTTT	183
MRP4	NM_005845.3	GTTGCAAGGGTCTGGGATA	GCTGTGTCAAAGCCACAGA	225

Gènes de référence

Tableau 10 : Séquences et caractéristiques des amorces utilisées pour les expériences de qPCR en temps réel

L'efficacité des amorces est testée sur de l'ADNc d'HepG2 (20 ng/μL) dilué séquentiellement dix fois dans de l'eau RNase free (Life technologies) et déposé en triplicat sur une plaque PCR de 96 puits (qPCR 96-well plate non skirted high profile – Eurogentec). Un témoin négatif sans ADNc est ajouté sur la plaque. Un mélange constitué de 12,5 μL de MasterMix (MESA Blue qPCR Mastermix for SYBR Assay Low ROX – Eurogentec) contenant la Taq polymérase et le SYBR Green, 2,5 μL de l'amorce sens à 2 μM, 2,5 μL de l'amorce anti-sens à 2 μM et 2,5 μL d'eau RNase free. La plaque est recouverte d'un film optique et centrifugée 3 min à 1000 rpm (Centrifuge 5810R, Eppendorf). La PCR quantitative en temps réel est ensuite réalisée sur un thermocycleur Stratagène Mx3005P sous le contrôle du logiciel MxPro (Agilent Technologies) avec le profil thermique suivant :

- **Segment 1 (1 cycle) :** 5 minutes à 95°C
- **Segment 2 (40 cycles) :**
 - 15 secondes à 95°C
 - 20 secondes à 55°C
 - 40 secondes à 72 °C
- **Segment 3 (1 cycle) :**
 - 1 minute à 95°C
 - 30 secondes à 55°C
 - 30 secondes à 95°C

Le premier segment permet d'activer la Taq polymérase, le second correspond à l'amplification proprement dite en 3 étapes : hybridation, dissociation et synthèse. Une lecture de fluorescence s'effectue à chaque cycle au moment de l'hybridation pour former la courbe d'amplification. Les cycles seuils (Ct) sont obtenus à 32,5 % de la phase exponentielle. Enfin, une courbe de dissociation est construite dans le dernier segment par lecture de fluorescence à chaque point entre 55 et 95 °C afin de vérifier si l'amplification est spécifique. L'efficacité des amorces est calculée par MxPro et doit être comprise entre 95 et 105 %.

1.4. Mesure de l'expression relative des gènes d'intérêt

Tout d'abord, la mesure de l'expression des gènes par qPCR nécessite l'utilisation de gènes de référence dits « gènes de ménage » dont l'expression est stable quelle que soit la condition de traitement des cellules. Les cyclophilines A et B, S18 (protéine ribosomale) et GAPDH (Glyceraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase) ont été testés sur les lignées A549, HepG2 et T24 pour toutes les conditions d'exposition de la même façon que pour l'efficacité des amorces exceptée la concentration en ADNc qui est constante (4ng/μL). Deux gènes de référence, communs aux trois lignées, ont été choisis à l'aide de la macro BestKeeper (Excel Bestkeeper© version 1 – (Pfaffl, 2004)) par établissement des corrélations de Pearson. La stabilité de la régulation des gènes de référence est vérifiée à chaque PCR.

La quantification relative de l'expression des gènes d'intérêts entre les différentes conditions est calculée par la macro REST-2009 (Relative Expression Software Tool - (Pfaffl, 2002)). Cette dernière détermine le facteur d'expression par rapport à la condition de contrôle, le témoin DMSO, par comparaison des Ct selon la méthode des $\Delta\Delta Ct$. Les expériences sont réalisées en triplicats biologiques et duplicats techniques.

2. Mesure des activités enzymatiques

2.1. *Activité Ethoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD)*

L'activité des CYP450, principalement de l'isoforme 1A1 est déterminée pour la mesure de l'activité EROD. De par leur activité éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD), les CYP1A1 transforment l'éthoxyrésorufine en résorufine qui est un composé fluorescent. Les cellules A549 et HepG2 sontensemencées 24h avant traitement dans des plaques 96 puits noires à fond noir à raison de 50000 cellules par puits en laissant les deux dernières colonnes, ainsi que les puits sur les bords, vides. Après traitement avec les différentes solutions d'HAP, le milieu de traitement est retiré et les puits sont rincés deux fois avec du PBS afin de bien retirer les HAP et les métabolites résiduels. Une gamme de résorufine (Sigma) de 0 à 0,3 μM est réalisée dans du milieu de culture DMEM sans SVF et déposée en duplicat dans les deux dernières colonnes. 100 μL d'une solution d'éthoxyrésorufine (Sigma) à 2 μM dans du milieu de culture DMEM (sans SVF) sont ajoutés dans chaque puits à l'exception des puits de la gamme. La plaque est alors recouverte d'aluminium et placée 15 minutes exactement à 37 °C sous 5% de CO_2 . La fluorescence est ensuite lue à 590 nm avec 535 nm comme longueur d'excitation. Le contenu des plaques est vidé sur du papier absorbant et après deux rinçages au PBS, les plaques sont placées à -80°C pendant au moins 45 minutes. Les protéines sont ensuite dosées par le test à la fluorescamine comme décrit par Lorenzen *et al* (Lorenzen, 1993). La fluorescamine (4-phenyl-spiro-[furan-2(3H), 1'-phthalan]-3,3'-dione - Sigma) réagit avec les amines primaires des protéines et forme un complexe fluorescent. La BSA (Bovine Serum Albumine) est utilisée comme témoin pour effectuer une gamme de 0 à 500 $\mu\text{g/mL}$. La gamme est déposée dans les colonnes sans cellules. Après ajout de 100 μL de PBS, 50 μL d'une solution de fluorescamine (Sigma) à 0,3 mg/mL dans de l'acétone est dispensée dans chaque puits. Enfin, les plaques sont incubées à l'obscurité à température ambiante et la fluorescence est analysée à 470 nm avec 380 nm comme longueur d'onde d'excitation. L'activité EROD est exprimée en pmol de résorufine/min/mg de protéines.

2.2. *Activité des Glutathion-S-Transférases (GST)*

Après récolte, les cellules sont lysées en utilisant le Cell lytic M Cell lysis agent (Sigma) avec un cocktail inhibiteur des protéases (Protease Inhibitor Cocktail – Roche). Les échantillons sont centrifugés une première fois à 2000 g et 4°C pendant 10 minutes puis 20 minutes à 20 000 g. L'activité des GST (Glutathion-S- Transférases) cytosoliques est alors mesurée dans les surnageants en utilisant la méthode de Habig *et al* (Habig, 1974) adaptée à des dosages en plaques 96 puits. Le 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB – Sigma) va être transformé par les GST en présence de GSH en conjugué GSH-CDNB (S(2,4)-dinitrophénylglutathion) analysable à 340 nm. Le milieu réactionnel contient 6 mM de GSH (Sigma) et 1 mM de CDBN dans du tampon phosphate (pH 7,4 100 mM). Après addition de 25 µL d'extrait cellulaire dilué (1/4 ou 1/10), l'apparition du complexe GSH-CDNB est suivie pendant 5 minutes dans un spectrofluorimètre équipé d'un lecteur de plaque (Spectra Max M2, Molecular Devices). La concentration en protéines des différents surnageants est évaluée par la méthode de l'acide bicinchonique à l'aide du kit MicroBC Assay Protein Quantification (Interchim, Montluçon, France) en suivant les recommandations du fournisseur. Le principe de ce dosage colorimétrique repose sur la capacité des protéines à réduire le Cu²⁺ en ion Cu⁺ en milieu alcalin. Le sel de sodium de l'acide bicinchonique réagit alors avec les ions Cu⁺ formés en formant un complexe de couleur pourpre analysable à 562 nm. Les résultats sont exprimés en µmol de produit/minute/mg de protéines. La gamme étalon est réalisée avec une solution de BSA.

V. Analyse de la génotoxicité des HAP

1. Extraction de l'ADN cellulaire

Les ribonucléases A et T1 ainsi que les différents constituants des tampons proviennent de chez Sigma. La protéase est fournie par Qiagen.

Les culots cellulaires secs sont repris dans 750 µL de tampon de lyse A composé de sucrose 320 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 10 mM, déféroxamine 0,1 mM et Triton 1 % (pH 7,5). Après la lyse des membranes plasmiques avec un vortex, les échantillons sont centrifugés 5 minutes à 1500 g. Cette étape est répétée une seconde fois sur les culots nucléaires et 300 µL de tampon de lyse B (EDTA-Na₂ 5 mM, Tris HCl 5 mM,

déféroxamine 0,15 mM, pH 8) avec 18 μ L de SDS 10 % sont ajoutés aux culots. La mise en suspension au vortex est suivie de l'addition de 1,5 μ L de RNase A (100mg/mL) avec 3,5 μ L de RNase T1 (1U/ μ L) puis d'une incubation de 15 minutes à 50°C. Les protéines sont alors hydrolysées par ajout de 15 μ L de protéase (20 mg/mL) suivi d'1h d'incubation à 37 °C. L'ADN est précipité par addition de 2 volumes d'une solution de NaI (7,6 M NaI, 40 mM Tris, 20 mM EDTA-Na₂ et 0,3 mM déféroxamine, pH 8) et 3.3 volumes d'isopropanol absolu. Les échantillons sont alors centrifugés à 5000 g pendant 5 minutes. Les culots d'ADN subissent ensuite deux lavages successifs, le premier avec 500 μ L d'isopropanol 40 % et le second avec de l'éthanol 70 %, tout deux suivis d'une centrifugation à 5000 g pendant 5 minutes. Enfin, l'ADN est repris dans 50 μ L d'une solution aqueuse de déféroxamine pour éviter l'oxydation et stocké à -20°C avant hydrolyse.

1.1. Digestion de l'ADN cellulaire

La nucléase P1 (de *Penicillium citrinum*), la phosphodiesterase II, la DNase II, la phosphatase alcaline et la Phosphodiesterase I proviennent de chez Sigma. La digestion de l'ADN en nucléosides se déroule en deux étapes. Tout d'abord un mélange d'enzymes contenant 0,05 U de phosphodiesterase II, 0,5 U de DNase II et 0,5 U de nucléase P1 dans un tampon MNSPDE (200 mM d'acide succinique, 100 mM CaCl₂, pH 6) est ajouté aux échantillons alors incubés 2h à 37°C. L'ADN est une nouvelle fois placé 2h à 37°C après ajout d'un second mélange constitué de 0,05 U de phosphodiesterase I et de 2 U de phosphatase alcaline dans un tampon 10 X (500 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8). La réaction est neutralisée par l'ajout de 3,5 μ L d'HCl (0,1 N). Après centrifugation à 5000 g pendant 5 minutes, l'ADN hydrolysé est transféré dans des vials puis lyophilisé et enfin repris dans 50 μ L d'un mélange méthanol/eau à 50/50 pour analyse HPLC-spectrométrie de masse en tandem.

1.2. Analyse HPLC-MS/MS

1.2.1. Solvants

L'acétonitrile et le méthanol sont de qualité analytique et proviennent de VWR et Sigma respectivement. Le formiate d'ammonium à 2 mM est préparé à partir d'une solution mère

de 1 mM à pH 6 préparée avec de l'acide formique pur et de d'hydroxyde d'ammonium 28 % puis filtré sur membrane.

1.2.2. Analyse des adduits diol-époxydes

1.2.2.1. Les adduits BPDE- N^2 -dGuo du B[a]P

La synthèse des adduits BPDE a été réalisée par action de 50 μ L d'une solution de (\pm)-*anti*-BPDE à 7,6 M (National Cancer Institute, Bethesda, MD) sur 1 mg d'ADN de thymus de veau (Sigma). Après hydrolyse de l'ADN, les adduits BPDE- N^2 -dGuo ont été purifiés sur un système HPLC-collecteur de fractions (Gilson FC 204 Fraction Collector) équipé d'un détecteur UV (Merck L-400). Les solutions ainsi purifiées ont été ensuite dosés par HPLC-MS/MS à l'aide d'une solution d'adduits BPDE- N^2 -dGuo calibrée par spectroscopie UV ($\epsilon_{\text{BPDE}} = 41000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 279 nm).

Le dosage des adduits BPDE- N^2 -dGuo par calibration externe dans les divers échantillons a été réalisé par HPLC-MS/MS comme décrit par Tarantini *et al* (Tarantini, 2009). Le système se compose d'une chaîne de chromatographie liquide haute performance (HPLC 1100 Agilent) équipée d'un détecteur à barrettes de diodes et couplée à un spectromètre de masse en tandem (API 3000, SCIEX). La séparation HPLC est réalisée sur une colonne de silice greffée en phase inverse C18 (150 \times 2 mm ID C18 reverse phase Uptisphere ODB column - Interchim, Montluçon, France) avec un gradient d'acétonitrile de 0 à 100 % dans du formiate d'ammonium à 2mM. Dans ces conditions, le temps de rétention des adduits BPDE- N^2 -dGuo est de 21 minutes. Le dosage des adduits est effectué par spectrométrie de masse en tandem en mode MRM avec une ionisation positive par électrospray. Ce mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) permet de suivre plusieurs fragmentations spécifiques : m/z 570 \rightarrow 454, 570 \rightarrow 285 and 570 \rightarrow 257. Simultanément au dosage des adduits, la quantification des nucléosides non modifiés est réalisée par UV à l'aide du détecteur à barrette de diodes réglé à 260, 280 et 300 nm. Pour les deux types d'analytes, une calibration externe basée sur l'injection de standards de concentration connue permet d'exprimer les résultats en nombre d'adduits BPDE- N^2 -dGuo/ 10^6 bases normales. La limite de quantification de cette technique est 1 adduit BPDE- N^2 -dGuo/ 10^7 bases normales pour 100 μ g d'ADN.

1.2.2.2. Les adduits des dérivés diols époxydes d'autres HAP sur la dGuo

Les microsomes, l'ADN de thymus de veau, le NADP (β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), le Glucose-6-phosphate, la Glucose-6-phosphate déshydrogénase et les microsomes de foie de rat proviennent de Sigma. Les cassettes de dialyse (3,5K MWCO) sont fournies par Interchim.

Les solutions « standards » des adduits diol-époxydes du B[b]F, B[k]F, B[j]F, D[a,h]A, B[a]A et Chrys sont générées sur de l'ADN de thymus de veau après métabolisation des HAP par des microsomes de foie de rat. La métabolisation se fait en présence d'un système de génération de NADPH, formé par l'action de la glucose-6-phosphate déshydrogénase sur du glucose-6-phosphate en présence du cofacteur NADP. Le NADPH est nécessaire au bon fonctionnement des CYP450. Un milligramme d'ADN lyophilisé est repris dans 1 mL du tampon des microsomes composé de phosphate (KH_2PO_4) à 0,1 M pH 7,4, de 1,3 mM de NADP, de 3,3 mM de glucose-6-phosphate et de 3,3 mM de MgCl_2 . L'ajout de 0,4 U de glucose-6-phosphate déshydrogénase est suivi d'une incubation de 5 minutes à 37°C pour activer le système de génération de NADPH. Après addition de 500 μg de microsomes et incubation de 5 minutes à 37 °C, l'ajout de 10 mM du HAP d'intérêt marque le début de la réaction de métabolisation. Les différents échantillons sont incubés 6h à l'obscurité à 37°C puis dialysés sur la nuit et centrifugés à 5000 g pendant 5 minutes. L'ADN est ensuite précipité et un mélange de 3 μL de RNase A (100mg/mL) avec 7 μL de RNase T1 (1U/ μL) est ajouté aux échantillons suivi d'une incubation de 15 minutes à 50°C. Les protéines restantes sont éliminées sous l'action de 30 μL d'une protéase (20 mg/mL) pendant 1h à 37°C. Après hydrolyse de l'ADN comme indiqué en 5.1.2., les échantillons sont lyophilisés puis repris dans 100 μL d'un mélange MeOH/ H_2O (50/50) et enfin stockés à -20°C avant analyse en HPLC-MS/MS.

Le système utilisé pour l'analyse des adduits diol-époxydes- N^2 -dGuo est identique à celui présenté pour le dosage des adduits BPDE- N^2 -dGuo. La séparation HPLC est réalisée sur une colonne de silice greffée en phase inverse C18 haute densité (125 \times 2mm ID, Nucleodur® C18HTec 3 μm – Macherey-Nagel) avec une étape isocratique de 5 minutes à 5% d'acétonitrile dans 2mM de formiate d'ammonium suivie d'un gradient d'acétonitrile de 15 à 40% pendant 30 minutes. La détection des adduits est effectuée de la même façon que pour les adduits BPDE- N^2 -dGuo en mode MRM avec les fragmentations suivantes :

- BPDE, B[b]FDE, B[k]FDE et B[j]FDE-dGuo : m/z 570 → 454, m/z 570 → 285 et m/z 570 → 257
- D[a,h]ADE-dGuo : m/z 596 → 480, m/z 596 → 311 et m/z 596 → 283
- B[a]ADE et Chrys-DE-dGuo : m/z 546 → 430 et m/z 546 → 261

Les résultats sont exprimés en lésion/10⁶ bases normales à l'aide d'une « calibration » externe avec le standard des adduits BPDE-N²-dGuo.

1.2.3. Recherche des adduits stables des quinones

La mesure des adduits stables des quinones a également été réalisée par HPLC-MS/MS. Les conditions analytiques sont identiques à celles présentées pour le dosage des adduits diol-époxyde-dGuo des différents HAP. Les transitions suivies en MRM sont présentées Tableau 11.

HAPs	Masse HAPs	Adduit quinone-dGuo [M + H] ⁺ → [M - 116+H] ⁺ (m/z)	Adduit triol quinone-dAde [M + H] ⁺ → [M - 116+H] (m/z)
B[a]P, B[e]P, B[b]F, B[k]F, B[j]F	252	566 → 450	550 → 434
B[a]A, Chrys	228	542 → 426	526 → 410
B[g,h,i]P, IP	276	590 → 474	574 → 458
D[a,h]A	278	592 → 476	576 → 460
Flua, Pyr	202	516 → 400	500 → 384
Naph	128	442 → 326	426 → 310

Tableau 11 : Transitions suivies correspondant à la perte du sucre (m/z 116) par les adduits potentiels o-quinone-dGuo ou dAde des différents HAP d'intérêt en spectrométrie de masse en tandem en mode d'ionisation positive

2. Mesure des dommages oxydatifs : méthode des comètes

L'agarose low-melt, l'agarose, le bromure d'éthidium et les différents constituants des tampons proviennent de Sigma.

Les cassures simple ou double brin ainsi que les sites alcali-labiles sont dosés par la méthode des comètes (Single Cell Gel Electrophoresis Assay).

Les cellules sont suspendues dans de l'agarose low-melt (0,6 %) et déposées sur des lames de verre à raison de 15000 cellules par lame en triplicat. Ces lames ont préalablement été recouvertes avec 1% d'agarose. La lyse cellulaire s'effectue par immersion des lames dans un tampon de lyse (2,5 M NaCl, 0,5 M Na₂-EDTA, 10 mM Tris, 1 % Sodium lauryl sulfate, 1 % Triton X-100 et 10 % DMSO, pH 10) pendant 4h à l'obscurité. Après 3 lavages successifs dans du tampon de neutralisation (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,4), les lames sont placées dans la cuve d'électrophorèse 30 minutes dans une solution alcaline (300 mM NaOH, 1 mM Na₂-EDTA, pH 13). Cette étape de débobinage de l'ADN est suivie d'une migration électrophorétique de 30 minutes à 25 V (300 mA). Les lames sont ensuite rincées 3 fois 5 minutes dans le tampon de neutralisation (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,4) et l'ADN est révélé par ajout de 50 µL d'une solution de BET (20 µg/mL). Certains échantillons ont également été incubés avec de la Formamidopyrimidine-DNA-*N*-glycosylase (Fpg) afin de doser le taux de purines oxydées. Après l'étape de lyse, les lames sont incubées 45 minutes à 37°C dans le tampon de l'enzyme (0,1 M KCl, 0,5 mM EDTA-Na₂ et 0,04 M Tris-HCl, pH 8) en présence de 0,17 µg de Fpg et traitées de façon identique au protocole classique également en triplicat. Pour les deux versions, les lames sont analysées à l'aide d'un microscope à fluorescence couplé à un ordinateur équipé du logiciel Comet Assay IV (Perceptive Instrument, Haverhill UK), 50 comètes sont sélectionnées au hasard sur chaque lame. Le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète (% tail DNA) est calculé pour chaque comète par le logiciel en tenant compte à la fois de la longueur de la queue mais aussi des intensités de fluorescence et la médiane est utilisée pour l'analyse des résultats. Le % tail DNA est une valeur relative reflétant une proportion mais pas un nombre de cassures. Afin de pouvoir comparer la quantité d'adduits avec celle des lésions oxydatives, nous avons réalisé une calibration du test. Pour cela, certaines lames ont été irradiées par des rayons γ émis par une source de ⁶⁰Co à raison de 2 Gy, le % tail DNA obtenu correspondant à 2000 cassures par cellules. En effet, il a été

démontré qu'une irradiation des cellules à 1Gy aboutit à la formation de 1000 cassures par cellules (0,14 cassures pour 10^6 nucléotides) (Ahnström, 1981, Goodhead, 1989, Pouget, 2000).

VI. Analyse statistique des résultats

Pour la RT-qPCR, chaque mesure a été réalisée en duplicat technique et en triplicat biologique. Les valeurs ont été utilisées par la suite si la différence de Ct des réplicats techniques était inférieure à 0,5 Ct. Les moyennes des différentes conditions ont été comparées deux à deux par le test non paramétrique de Mann-Whiney-Wilcoxon.

Pour les autres techniques analytiques, chaque mesure a été réalisée en triplicat et les expériences sont reproduites au moins deux fois. Les valeurs présentées sur les différentes figures et tableaux correspondent à la moyenne des différentes expériences indépendantes \pm l'écart-type à cette moyenne. Du fait des faibles effectifs et l'absence de normalité dans la distribution des paramètres mesurés (test de Kolmogorov-Smirnov), l'analyse statistique est effectuée à l'aide du test U non-paramétrique de Mann-Whitney-Wilcoxon qui permet de comparer les moyennes obtenues pour chaque réplicat. Ce test a été utilisé pour l'ensemble des techniques utilisées soit le MTT, les tests d'activités enzymatiques, la mesure des adduits et la mesure des cassures par la méthode des comètes.

Les données ont été analysées en utilisant le logiciel Minitab 16 (Minitab SARL, Paris, France). Tous les résultats ont été exprimés en moyenne \pm l'erreur standard.

CHAPITRE 3

EFFET DU B[A]P SEUL SUR DES LIGNEES CELLULAIRES REPRESENTATIVES D'ORGANES CIBLES

Chapitre 3 - Effet du B[a]P sur les lignées cellulaires représentatives d'organes cibles

Comme nous l'avons vu dans l'introduction bibliographique, de nombreuses questions restent posées sur l'effet des HAP, notamment lorsqu'ils sont en mélange. Les études les plus informatives sont sans doute celles impliquant des modèles animaux mais de nombreuses contraintes pratiques, financières et réglementaires en limitent l'accès. En particulier, le souhait d'encadrer les pratiques liées à l'expérimentation animale a amené à l'introduction dans la réglementation de la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) qui impose de réduire le nombre d'animaux en expérimentation, d'optimiser la méthodologie mais surtout de remplacer l'expérimentation animale à chaque fois que cela est possible par des méthodes *in vitro* ou *in silico* (Balls, 1994, Festing, 2007). Dans le cadre de cette politique de réduction de l'expérimentation animale, l'utilisation de différents modèles alternatifs s'est fortement développée en toxicologie.

Une première possibilité est l'utilisation de coupes ou tranches d'organes. Elles constituent des modèles intéressants car elles permettent de conserver le contact entre cellules, la multiplicité des types cellulaires de l'organe présents *in vivo* et les capacités métaboliques du tissu dont elles sont issues. Elles sont cependant d'une durée de vie très limitée et l'accès à du matériel humain est difficile notamment pour des raisons éthiques (Brandon, 2003).

La seconde catégorie de modèle consiste en des cellules en culture. Celles-ci peuvent être primaires, c'est-à-dire prélevées directement d'organes, ou issues de lignées.

- Cultures primaires :

Les cultures primaires sont obtenues directement à partir de prélèvements biologiques ou chirurgicaux soit par culture d'explants dans du milieu de culture soit par dissociation enzymatique créant ainsi une suspension de cellules individuelles. L'avantage de ce type de culture est que les cellules sont très proches des caractéristiques observées *in vivo* notamment en termes de métabolisation. Cependant, leur utilisation est limitée par leur polymorphisme qui entraîne une forte variabilité mais aussi par l'accès aux prélèvements, leur fragilité et leur durée de vie limitée (Brandon, 2003).

- Lignées cellulaires :

Il s'agit en général de cellules cancéreuses, cellules prélevées au départ sur une tumeur, ou de cellules rendues immortelles par exemple par transformation avec un virus comme le SV40 (Simian Virus) et l'EBV (Epstein Barr Virus) ou par mutation du gène p53 impliqué dans la prolifération cellulaire. Les modifications génétiques de ces lignées les éloignent de la réalité physiologique par rapport aux cultures primaires. Cependant, du fait de leur facilité de culture, leur division rapide et leur durée de vie importante, elles sont très couramment utilisées (Donato, 2008) et permettent d'avoir des lignées humaines à partir de différents tissus. Les lignées humaines les plus employées dans le cadre de l'étude de la métabolisation et de la toxicité des HAP sont :

- Les cellules MCF-7 : dérivées d'un adénocarcinome mammaire.
- Les cellules Caco-2 : utilisées comme modèle de cellules intestinales.
- Les cellules HEL (Human Embryonic Lung fibroblast) : cellules normales de fibroblastes de poumon d'embryon humain.
- Les cellules A549 : issues d'adénocarcinome d'épithélium pulmonaire. Elles possèdent certaines caractéristiques de pneumocytes de type II et expriment des enzymes du métabolisme de phase I notamment les CYP1A1, 1B1 et 2B6 et les GST de phase II (Hukkanen, 2000).
- Les cellules BEAS-2B : cellules immortalisées dérivées d'un épithélium bronchique normal.
- Les cellules HepG2 : isolées à partir d'un hépatoblastome. Ces hépatocytes expriment de nombreuses enzymes de métabolisme de phase I (CYP1A1, 1A2, 3A4, 2B, 2E1) et II (GST, SULT, UGT...) (Wilkening, 2003). Cette lignée est très utilisée pour étudier la métabolisation des pro-génotoxiques.
- T24 : lignée humaine dérivée d'un carcinome de vessie qui exprime AhR et le CYP1A1 (Ishida, 2010)

Du fait du nombre important de cellules pouvant être obtenu, ce sont vers des lignées que nous nous sommes dirigés pour ce travail. Les organes cibles étant les poumons et la vessie, nous avons sélectionné plus particulièrement les A549 et les T24. Nous avons également utilisées comme référence de lignée aux bonnes capacités de métabolisation des HAP, les hépatocytes HepG2.

I. Cytotoxicité du B[a]P

Préalablement à l'évaluation de l'impact du B[a]P en termes de génotoxicité ou de métabolisation, il convient d'évaluer la cytotoxicité de ce composé dans les trois lignées cellulaires d'étude, A549, HepG2 et T24, afin de déterminer les concentrations de travail qui altèrent le moins possible la viabilité cellulaire. Dans un premier temps la cytotoxicité du B[a]P a été évaluée dans les différentes lignées cellulaires à l'aide du test MTT. Les A549, les T24 et les HepG2 ont été exposées 14h à des concentrations croissantes de B[a]P de 0,2 à 5 μM . Ce temps d'incubation a été choisi à partir d'expériences de cinétique de formation des adduits BPDE précédemment réalisées au laboratoire sur la lignée HepG2. La formation d'adduits atteint un plateau après 14h d'exposition à 1 μM de B[a]P. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité par rapport à un témoin avec 0,5 % de DMSO. Ce pourcentage de DMSO a été choisi car il correspond au pourcentage maximum de DMSO utilisé comme solvant des HAP au cours de l'exposition des cellules. Des tests de cytotoxicité du DMSO seul sur les cellules en culture ont montré que cette concentration de DMSO n'avait pas d'effet sur la viabilité cellulaire. Il est par ailleurs intéressant de noter que le DMSO n'a pas d'effet sur les autres endpoints.

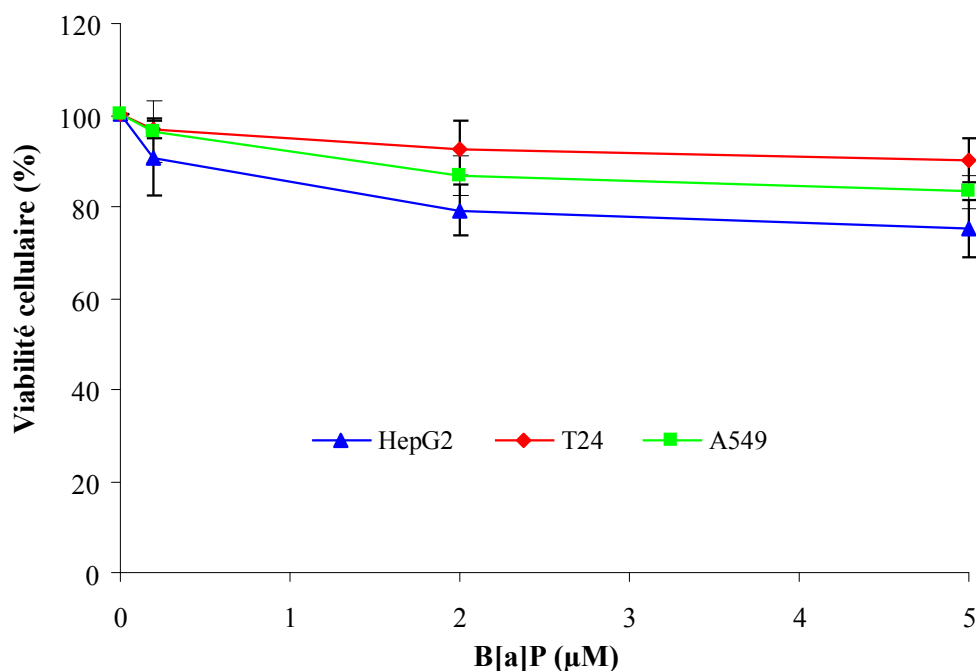


Figure 28 : Cytotoxicité du B[a]P à des concentrations allant jusqu'à 5 μM dans les lignées HepG2, A549 et T24 exposées 14h par le test MTT.

Les résultats, présentés Figure 28, montrent que la cytotoxicité du B[a]P est faible et similaire pour les trois lignées. Les doses de B[a]P choisies pour la suite du travail permettront d'avoir une viabilité cellulaire d'au moins 70 %.

II. Génotoxicité du B[a]P sur les lignées A549, T24 et HepG2

1. Formation des adduits BPDE- N^2 -dGuo

1.1. Analyse des adduits BPDE- N^2 -dGuo par HPLC-spectrométrie de masse en tandem

Nous avons choisi de centrer notre étude de la formation des adduits sur celui majoritaire issu de la voie des diol-époxydes : BPDE- N^2 -dGuo. En effet, comme discuté dans l'introduction, l'étude de la littérature indique que, sauf aux temps courts, les adduits stables sont largement majoritaires et que BPDE- N^2 -dGuo est le plus fréquent. De façon pratique, après récolte des cellules suite à l'exposition, l'ADN est extrait des culots cellulaires puis hydrolysé en monomères correspondant à un mélange de bases non modifiées et d'adduits. Cette solution de monomères est analysée par HPLC-MS/MS pour le dosage des adduits BPDE- N^2 -dGuo. Les nucléosides normaux sont également quantifiés en UV. La quantification est réalisée par calibration externe dans les deux cas à l'aide d'une gamme de standard dont le chromatogramme est présenté Figure 29.A.

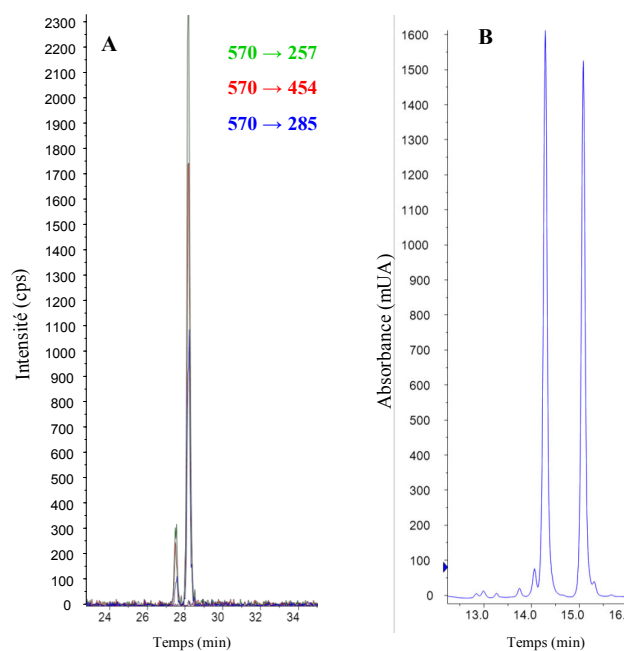


Figure 29 : Chromatogrammes obtenus en HPLC-MS/MS après injection de 200 fmol de standard BPDE- N^2 -dGuo en MS/MS (A) ou d'un mélange de 10 nmol de dGuo et 10 nmol de Thd en UV (B)

Le mode d'analyse utilisé en MS/MS est le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring), classiquement utilisé pour les dosages. Trois transitions correspondant à des fragmentations spécifiques de l'adduit BPDE- N^2 -dGuo (Figure 30) ont été sélectionnées pour la quantification. Un exemple de chromatogramme obtenu lors de la mesure des adduits dans les cellules HepG2 exposées à 1 μ M de B[a]P est présenté Figure 31.

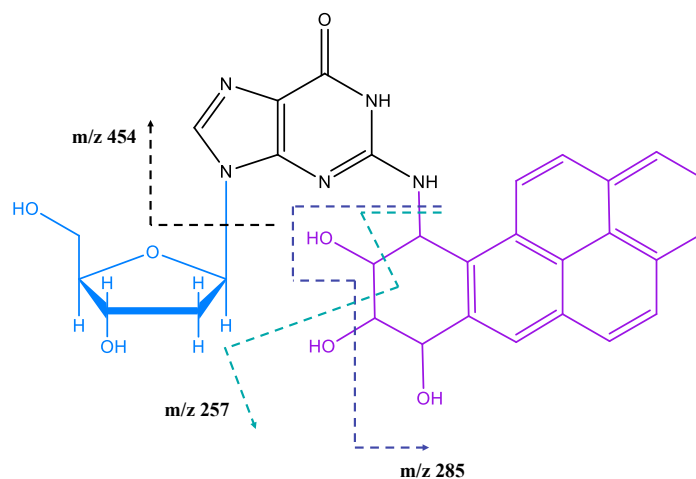


Figure 30 : Fragmentation de l'adduit BPDE- N^2 -dGuo

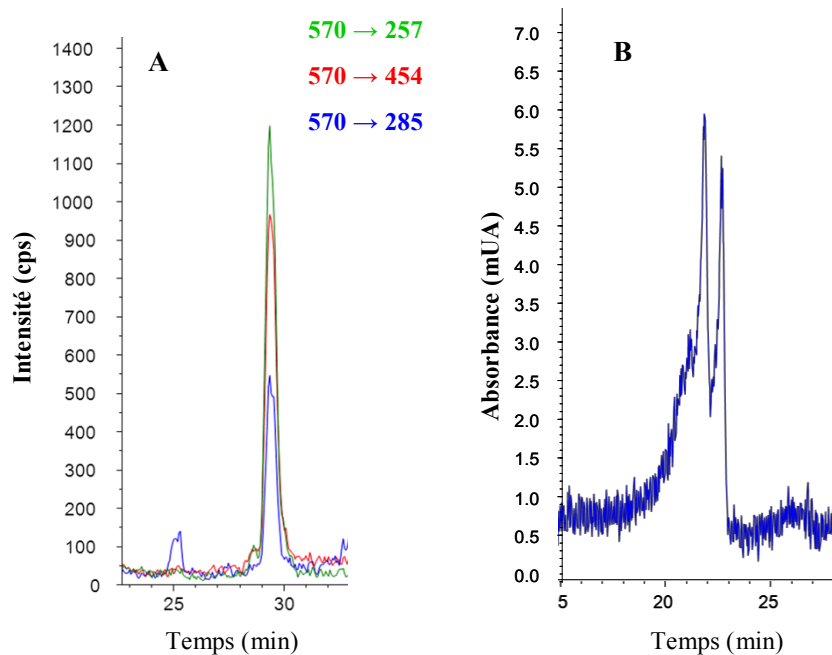


Figure 31 : Chromatogramme obtenu après injection d'ADN issu des cellules HepG2 exposées à 1 μM de B[a]P pendant 14h pour 2,3 BPDE- N^2 -dGuo/ 10^6 bases normales. La partie A correspond au chromatogramme de spectrométrie de masse utilisé pour l'analyse de l'adduit BPDE- N^2 -dGuo. La partie B correspond à l'analyse UV à 260 nm utilisée pour le dosage des bases non modifiées.

1.2. Formation des adduits BPDE- N^2 -dGuo en fonction de la concentration en B[a]P

Les niveaux d'adduits BPDE- N^2 -dGuo ont été mesurés après exposition à des concentrations croissantes en B[a]P de 0,2 à 5 μM pendant 14h dans les trois lignées cellulaires. Comme présenté Figure 32, l'effet de la concentration en B[a]P est très différent entre les trois lignées. Alors que dans la lignée d'hépatocytes HepG2 la formation des adduits est dose dépendante, dans la lignée pulmonaire A549, la génération des adduits suit une courbe en cloche avec un maximum atteint à 0,2 μM . De plus, à cette concentration, la quantité d'adduits BPDE formés est plus importante dans les A549 que les HepG2. Par contre, à la différence des deux autres lignées, aucun adduit n'est détecté dans la lignée de vessie T24 y compris lorsque la dose de B[a]P augmente jusqu'à 20 μM .

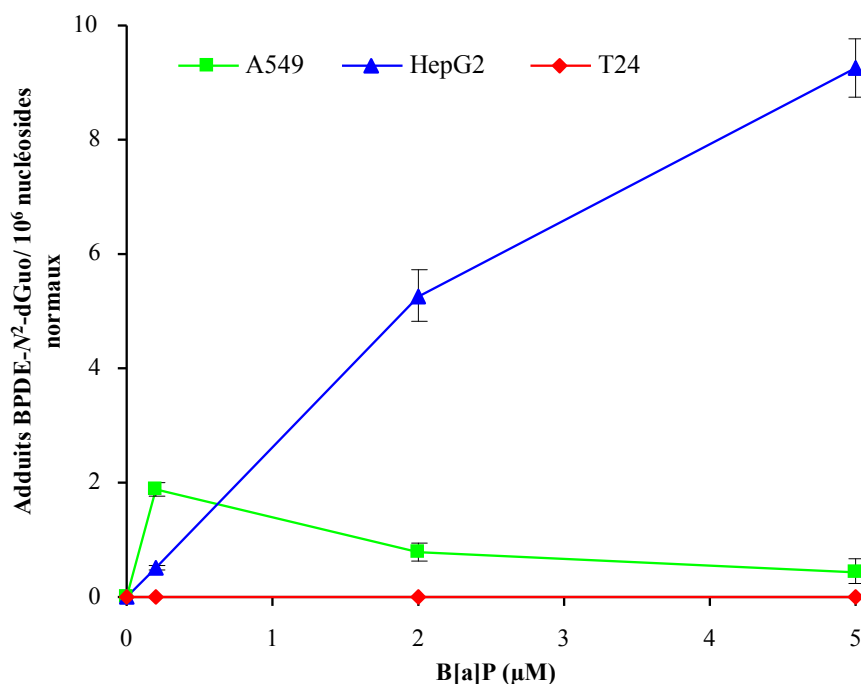


Figure 32 : Mesure des adduits BPDE- N^2 -dGuo dans les lignées HepG2, A549 et T24 exposées 14h à des concentrations croissantes de B[a]P de 0,2 à 5 μ M en triplicats

Afin de déterminer de façon plus fine la dose de B[a]P qui induit la quantité maximale d'adduits dans la lignée A549, une étude avec de plus faibles doses de 0,1 à 2 μ M a été réalisée (Figure 33). De la même façon, la formation des adduits suit une courbe en cloche avec un maximum du niveau d'adduits générés à 0,2 μ M de B[a]P.

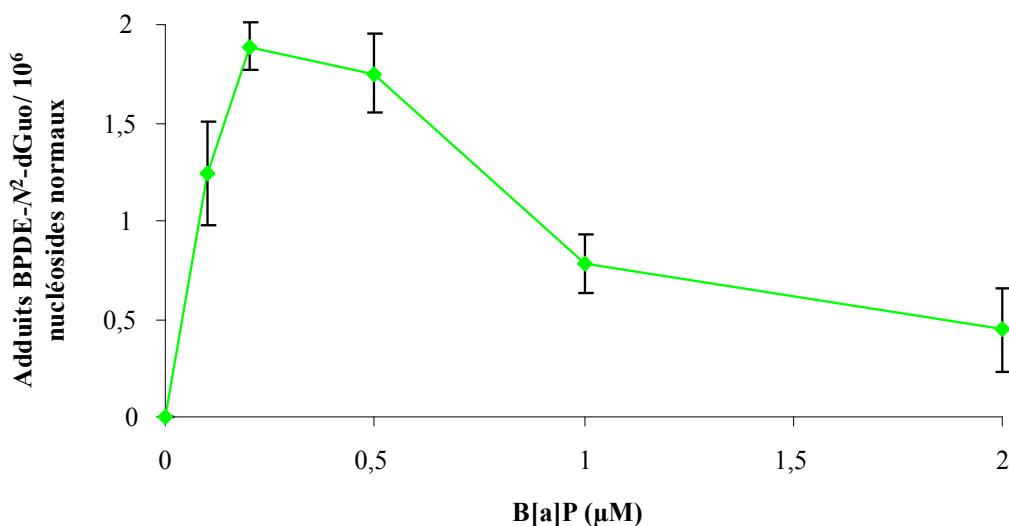


Figure 33 : Formation des adduits BPDE- N^2 -dGuo dans les A549 exposées 14h à des faibles concentrations de 0,1 à 2 μ M

1.3. Cinétique de formation des adduits BPDE- N^2 -dGuo

La cinétique de formation des adduits est présentée Figure 34. Les trois lignées cellulaires ont été incubées de 30 minutes à 24h avec 0,2 μ M de B[a]P correspondant à la concentration qui induit le maximum d'adduits dans la lignée pulmonaire A549. De la même façon que précédemment, les profils de cinétique obtenus sont très différents selon la lignée considérée. Dans les HepG2, après un temps de latence de 2h, le niveau d'adduits BPDE augmente jusqu'à 4h et atteint un plateau. A l'inverse, dans les A549 après un délai de 4h, la quantité d'adduits augmente de façon linéaire jusqu'à 24h. A partir de 8h les niveaux d'adduits dans les A549 sont supérieurs à ceux observés pour les HepG2. Enfin, aucun adduit BPDE- N^2 -dGuo n'est détecté dans la lignée de vessie T24 quelle que soit la durée d'exposition.

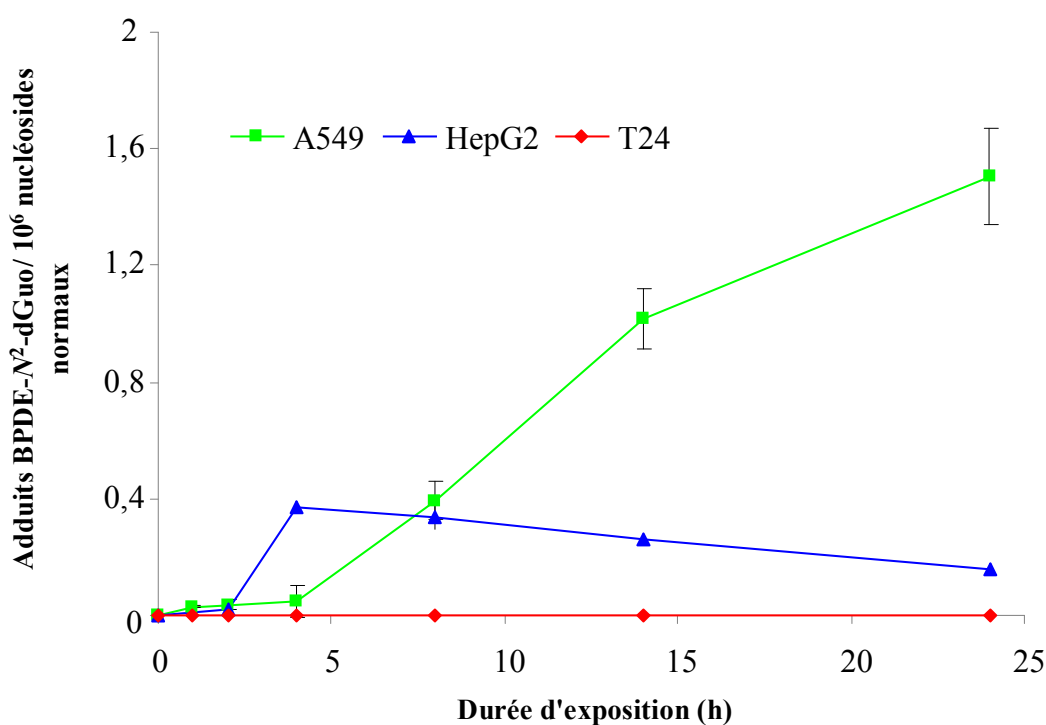


Figure 34 : Cinétique de formation des adduits BPDE- N^2 -dGuo dans les A549, T24 et HepG2 exposés de 30 minutes à 24h à 0,2 μ M de B[a]P

L'influence de la concentration en B[a]P sur la cinétique de formation des adduits BPDE- N^2 -dGuo dans la lignée pulmonaire A549 est présentée Figure 35. Quelle que soit la dose d'exposition, de 0,2 à 5 μ M, l'apparition des adduits est linéaire en fonction du temps jusqu'à 24h après une phase de latence de 4h. De plus, les niveaux d'adduits à 14 et 24 h

sont inversement proportionnels à la concentration en B[a]P. Ceci permet de confirmer les résultats obtenus sur l'effet dose en cloche du B[a]P dans ces cellules avec un maximum d'adduits générés à 0,2 μM .

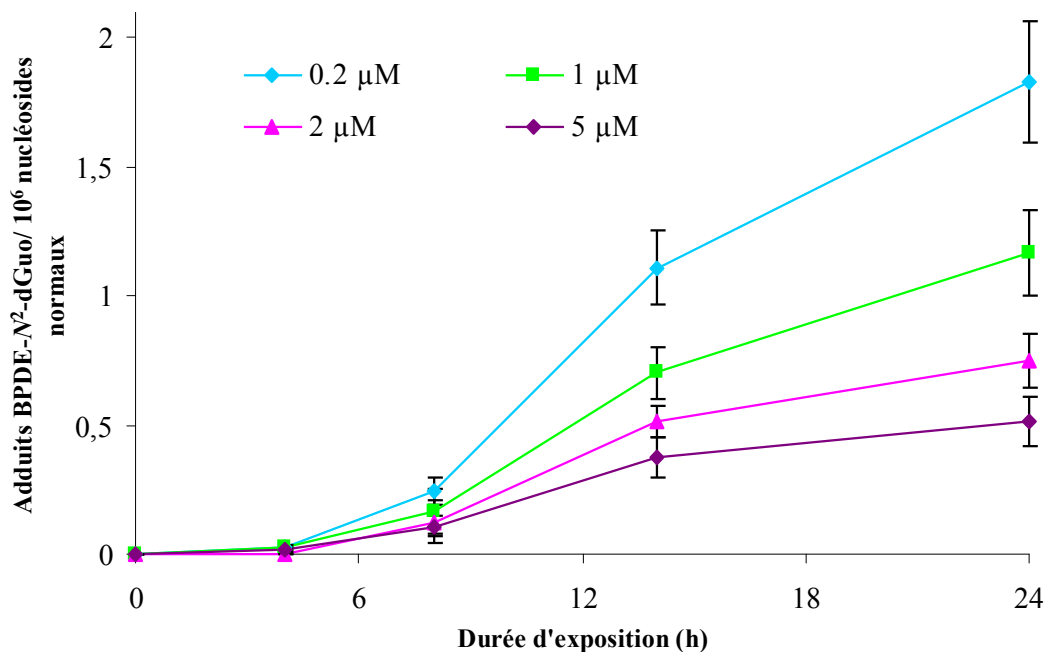


Figure 35 : Effet de la concentration en B[a]P sur la cinétique de formation des adduits BPDE-N²-dGuo dans les cellules A549 incubées de 30 min à 24h avec des doses de B[a]P de 0,2 à 5 μM

2. Lésions oxydatives à l'ADN induites par le B[a]P

Afin de vérifier que les différences observées entre les 3 lignées en termes d'adduits ne s'accompagnent pas d'une augmentation du stress oxydant qui constitue un mécanisme indirect de génotoxicité, les lésions oxydatives générées par une exposition au B[a]P ont été quantifiées par la méthode des comètes.

2.1. Formation des lésions oxydatives en fonction de la concentration en B[a]P

Dans une première série d'expériences, les dommages oxydatifs ont été analysés par la méthode des comètes calibré par les rayons γ dans les trois lignées cellulaires exposées 14h

à des concentrations croissantes de B[a]P de 0,2 à 5 μM en présence ou non de Fpg (Formamidopyrimidine glycosylase). D'une part, la calibration de l'essai permet de comparer la quantité d'adduits avec celle des lésions oxydatives. Pour cela, certaines lames ont été irradiées par des rayons γ appliqués à une dose de 2 Gy. Une irradiation à 1Gy entraînant la formation de 1000 cassures par cellules (Ahnström, 1981, Goodhead, 1989, Pouget, 2000), le % tail DNA obtenu correspond à 2000 cassures par cellule. D'autre part, l'utilisation de la Fpg permet de mesurer la présence de purines oxydées, principalement de 8-oxodGuo. En effet, la Fpg est une ADN-glycosylase qui reconnaît spécifiquement la 8-oxodGuo, générant ainsi des cassures supplémentaires de l'ADN. De la même façon que précédemment, les témoins correspondent à des cellules exposées à 0,5 % de DMSO pendant 14h avec ou sans Fpg.

Les niveaux de dommages obtenus, présentés Figure 36 sont similaires pour les 3 lignées étudiées avec un niveau plus important de 8-oxodGuo que de cassures. Dans les deux cas, l'induction de dommages par le B[a]P n'est significative qu'à partir de 2 μM avec en moyenne 0,1 cassures/ 10^6 bases et 0,3 de 8-oxodGuo/ 10^6 bases. Le nombre de cassures induites correspond à la différence entre le nombre total de cassures obtenues après traitement au B[a]P et le nombre de cassures initialement présentes au niveau du témoin DMSO. En ce qui concerne le nombre de 8-oxodGuo induites, l'utilisation de la Fpg entraîne une induction de cassures supplémentaires en présence de 8-oxodGuo. Le résultat global observé après exposition au B[a]P correspond à la somme des cassures et des 8-oxodGuo générées à l'état basal ainsi que des cassures et des 8-oxodGuo induites par le B[a]P. La quantité de 8-oxodGuo induites est obtenue par soustraction. Néanmoins, il est important de signaler que le tampon de la Fpg génère une légère mais significative augmentation des cassures de l'ordre de 0,03 cassures/ 10^6 bases.

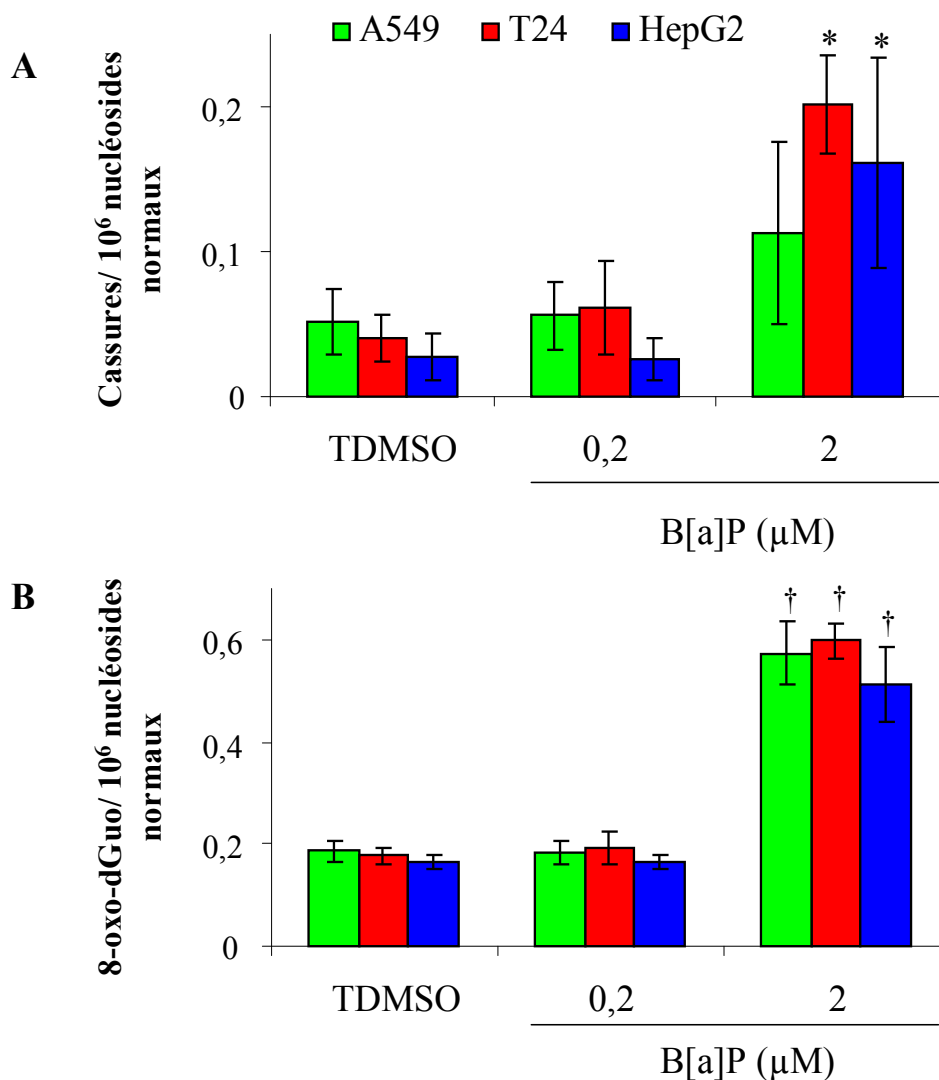


Figure 36 : Niveaux des dommages oxydatifs mesurés par la méthode des comètes calibrée dans les HepG2, A549 et T24 exposées à 0,2 et 2 μM de B[a]P pendant 14h. Le nombre de cassures (A) est mesuré à l'aide de la version standard de la méthode des comètes avec * une différence significative ($p < 0,05$) par rapport au témoin (TDMSO 0,5 %). Les niveaux de 8-oxodGuo sont obtenus après incubation des lames avec l'enzyme de réparation Fpg avec † une différence significative ($p < 0,05$) par rapport au témoin DMSO traité avec Fpg

2.2. Cinétique de formation des cassures

La cinétique de formation des cassures à l'ADN est également similaire dans les 3 lignées cellulaires exposées de 30 minutes à 24h à 0,2 μM de B[a]P (Figure 37). Une petite mais significative ($p < 0,05$) augmentation du taux de cassures par rapport au temps 0 est observée à 2h puis on observe un retour à l'état basal à 6h.

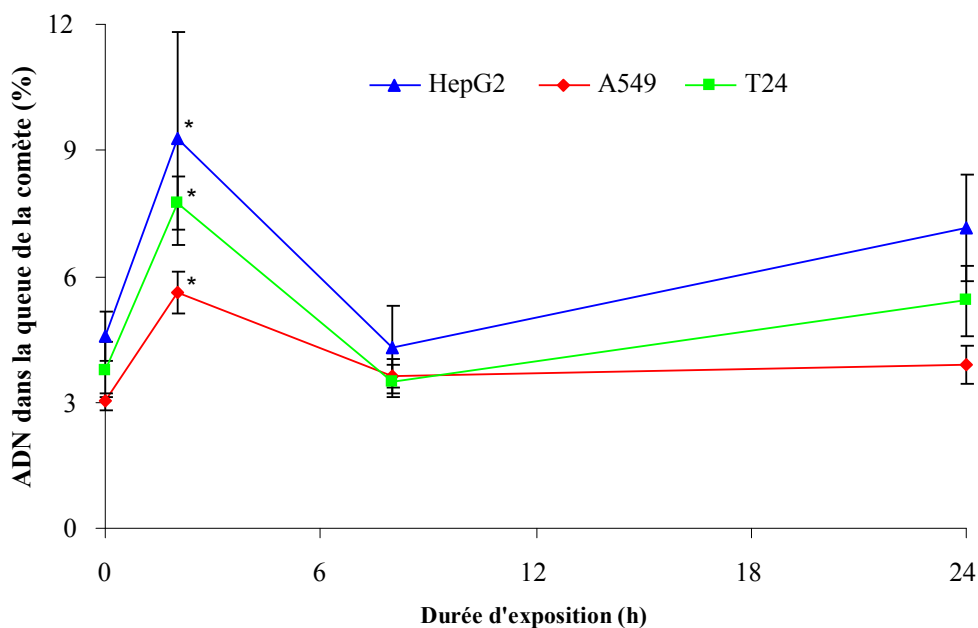


Figure 37 : Cinétique de formation des cassures mesurées par la méthode des comètes dans sa version standard non calibrée dans les cellules incubées de 30 minutes à 24h avec 0,2 µM de B[a]P. * : différence significative par rapport au temps 0 (p<0,05)

2.3. Adduits vs cassures

La comparaison entre les niveaux d'adduits, de cassures ou de 8-oxodGuo montre que les adduits sont formés de façon prépondérante pour les A549 et les HepG2 aux deux doses d'exposition (Figure 38).

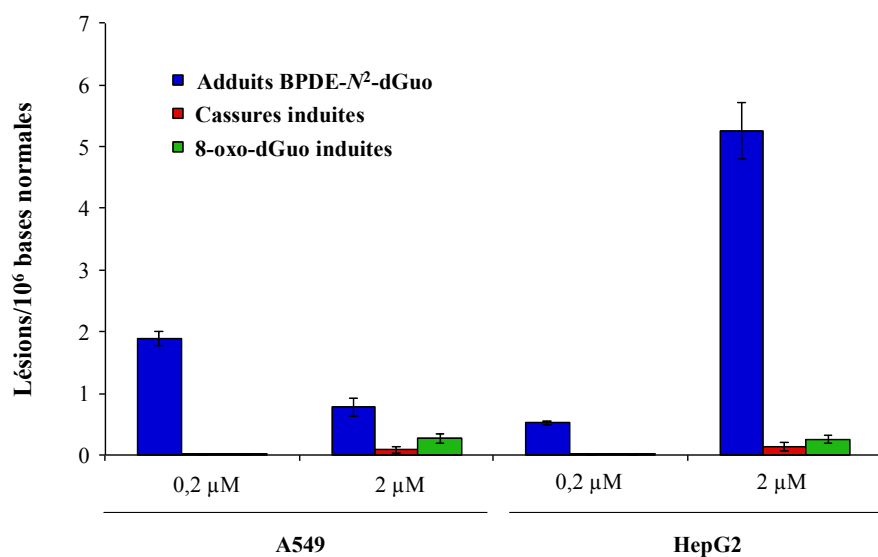


Figure 38 : Comparaison de la formation des adduits BPDE, des cassures induites et de la 8-oxodGuo induite mesurées respectivement par HPLC-MS et Comètes-Fpg calibré avec R γ dans les cellules A549 et HepG2 exposées 14h à 2µM de B[a]P

III. Comparaison de la métabolisation du B[a]P dans les 3 lignées cellulaires

Afin de mieux comprendre la différence de formation des adduits pour les trois lignées, nous avons analysé la métabolisation du B[a]P dans les A549, T24 et HepG2 à travers l'étude de la modulation de l'expression des gènes puis de l'activité enzymatique de ces cellules. Les gènes choisis correspondent, pour la phase I, aux isoformes des monooxygénases à CYP450 les plus impliquées dans le métabolisme des HAP c'est-à-dire les CYP1A1, 1B1, 1A2 et 3A4 ainsi que l'époxyde hydrolase (EH). En ce qui concerne la phase II du métabolisme, notre choix s'est porté sur les GST qui constituent les enzymes prédominantes de la détoxification du BPDE avec les formes A1 et P1. L'analyse de la modulation de l'induction des gènes par le B[a]P a été réalisée par RT-qPCR puis des mesures d'activité EROD et GST ont été conduites.

1. Mise au point de l'évaluation du métabolisme des HAP

Bien que d'utilisation courante dans de nombreuses équipes, la mesure de l'expression des gènes du métabolisme et d'importantes activités enzymatiques (EROD, GST) n'était pas en place au laboratoire. Nous avons donc adapté une série de protocoles pour mener à bien les expériences.

- Principe général des mesures d'activités

De façon générale, les tests d'activité des enzymes du métabolisme sont réalisés à partir de mesures spectrophotométriques ou fluorimétriques. Les enzymes présentes dans l'extrait cellulaire transforment le substrat en un composé absorbant ou fluorescent en présence ou non d'un co-facteur. La réaction est suivie sur quelques minutes afin de déterminer la quantité de produits formés par minute soit l'activité. Les modèles biologiques d'étude de ces tests peuvent être des lignées cellulaires ou des tranches d'organes mais sont principalement les fractions sub-cellulaires. Ces fractions sont obtenues après broyage tissulaire puis lyse cellulaire et centrifugation différentielle (Figure 39). La fraction S9 correspond au surnageant obtenu après une deuxième étape de centrifugation à 9000g et

contient les enzymes microsomaux et les enzymes cytosoliques solubles. Ce type de fraction permet une analyse globale du métabolisme et est particulièrement intéressante pour l'étude séquentielle phase I/phase II du métabolisme. Cette fraction représente un plus large panel d'enzymes mais peu concentrées avec des activités enzymatiques inférieures à celles des microsomes, pour les enzymes de phase I, ou des fractions cytosoliques, pour les enzymes de phase II. Les microsomes sont obtenus après centrifugation à 100 000g et regroupent les enzymes microsomaux. Les microsomes correspondent en fait à des vésicules du réticulum endoplasmique sur lesquelles sont fixées les enzymes. L'avantage des microsomes est que la concentration en enzymes microsomaux est plus importante que pour le S9. En revanche, ils ne peuvent pas être utilisés pour dresser un profil métabolique complet car ils ne contiennent pas les enzymes cytoplasmiques, essentiellement de phase II (Brandon, 2003). Enfin, les fractions cytosoliques ou S100 correspondent au surnageant restant après sédimentation des microsomes. Cette fraction est essentiellement composée d'enzymes de phase II : les N-acétyltransférases, les GST et les SULT (Jia, 2007). Dans tous les cas, la mesure de la concentration totale en protéines, généralement par dosage colorimétrique de Bradford, permet d'exprimer les résultats en activité ($\mu\text{mol}/\text{minute}$)/mg de protéines.

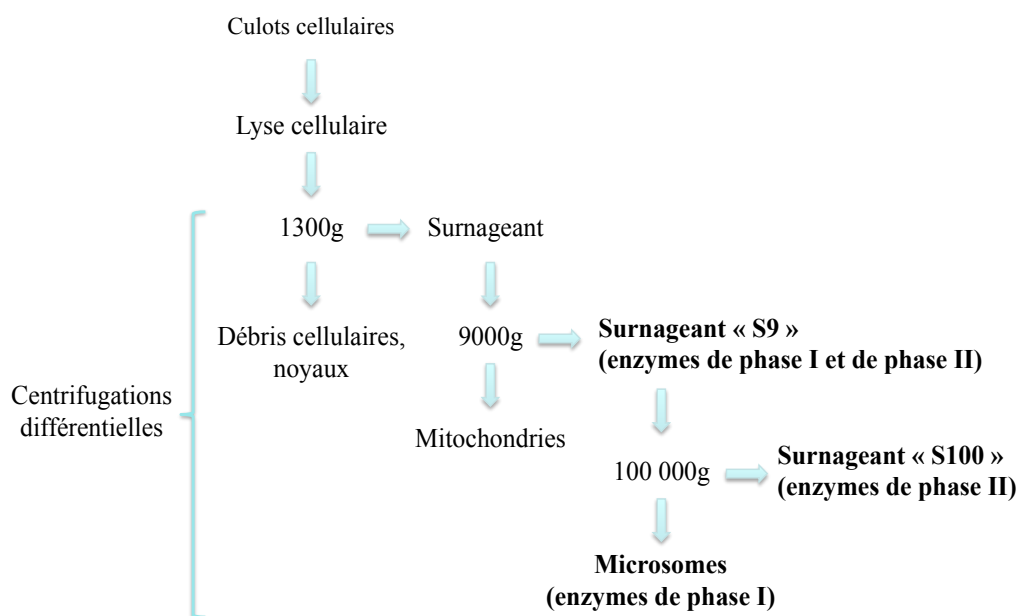


Figure 39 : Préparation des différentes fractions subcellulaires par centrifugations différentielles d'homogénats cellulaires

- Activité EROD

Le test dit EROD permet de quantifier l'activité de CYP450. Les formes 1A1, 1B1 et dans une moindre mesure 1A2 catalysent la transformation de l'éthoxyrésorufine (ETR) en résorufine de par leur activité éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) (Burke, 1974, Whyte, 2000). La résorufine est un composé fluorescent analysable à 590 nm avec une longueur d'onde d'excitation de 530 nm. Le même test peut être réalisé avec la MROD (Méthoxyrésorufin-O-dééthylase) pour le CYP 1A2.

De façon pratique, l'activité EROD peut être mesurée soit dans les cellules entières après exposition aux HAP soit dans des extraits tissulaires ou cellulaires (Billet, 2008, Bosveld, 2002, Burke, 1974, Kennedy, 2009, Kennedy, 1993, Kienzler, 2012, Kondraganti, 2002, Laville, 2004, Wessel, 2012, Wessel, 2010, Whyte, 2000). Les extraits sub-cellulaires utilisés doivent soit correspondre à du S9 soit aux fractions microsomales mais la présence d'un système de génération de NAD(P)H, co-facteur des CYP450, est nécessaire pour le bon fonctionnement des enzymes. La mesure de l'activité EROD sera plus sensible avec l'utilisation des microsomes car la concentration en CYP est plus importante.

La mesure de l'activité EROD a été délicate à mettre au point en raison des capacités métaboliques des A549 plus faibles que celle des HepG2. Différentes techniques ont été testées pour la mise au point de la mesure de l'activité EROD. Des essais de mesure ont été réalisés dans un premier temps dans les fractions S9 cellulaires préparées après récolte des cellules. Différentes quantités de cellules (d'environ 12 à 60 millions de cellules par condition d'exposition), ainsi que différents protocoles de préparation des S9 (lyse des cellules par congélation/décongélation, lyse mécanique, ultrasons) ont été testées. Plusieurs optimisations du protocole de mesure de l'activité EROD ont été mises en œuvre en faisant varier les différentes concentrations des constituants du système (ETR et système de génération), les temps de réaction et en réalisant des spectres d'excitation et d'émission pour l'ETR pour se placer aux longueurs d'onde optimales. Aucune activité n'a été détectée avec ces protocoles y compris dans les HepG2 exposées à de fortes concentrations de B[a]P. Les fractions microsomales ont été obtenues à partir des mêmes protocoles que pour les fractions S9 en ajoutant une étape d'ultracentrifugation supplémentaire d'une heure à 4°C et 100 000 g. Tous les tests d'optimisation identiques à ceux mis en œuvre pour les expériences avec les S9 ont permis de mesurer une activité EROD dans les

HepG2, néanmoins aucune activité n'a été détectée dans la lignée A549 après exposition au B[a]P. Dans un troisième temps, nous avons mis en place la mesure de l'EROD sur cellules entières à partir du protocole décrit par Kienzler *et al* (Kienzler, 2012). Différentes densités cellulaires de 5000 à 80 000 cellules par puits ont été testées sur des plaques noires à fond noir. Pour les A549, une activité EROD est détectée à partir de 40 000 cellules/puits puis celle-ci augmente avec la densité cellulaire jusqu'à 70 000 cellules/puits. Pour la suite des expériences, les cellules ont étéensemencées à 50 000 cellules/puits pour respecter la zone de linéarité dans la mesure des protéines avec le protocole de la fluorescamine qui permet de mesurer la concentration en protéines directement dans les puits de mesure de l'activité sur les cellules entières. Pour les autres paramètres, le protocole décrit a été suivi tel quel.

- L'activité des GST

L'activité GST est mesurée soit dans les fractions cytoplasmiques soit dans le S9 de cellules après exposition aux HAP. L'action des GST cytosoliques sur un mélange de GSH (glutathion) et de CDNB (1-chloro-2,4-dinitrobenzène) va aboutir à la formation d'un complexe GSH-CDNB analysable à 340 nm (Habig, 1974). D'autres substrats peuvent être utilisés pour cibler certaines isoformes : le 7-chloro-4-dinitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole pour lequel la conjugaison est catalysée essentiellement par la classe α et le 1,2-dichloro-4-nitrobenzène (DCNB), substrat préférentiel de la classe μ des GST. Nous avons choisi le CDNB car c'est un substrat non spécifique reconnu par les 3 classes de GST (μ , π et α), paramètre important quand des cellules d'origine différentes sont comparées.

- Expression génique

Pour étudier l'expression des gènes, nous avons eu recours à la RT-qPCR. Cette technique était déjà utilisée au laboratoire pour l'analyse de l'expression des gènes de réparation de l'ADN après un stress. Nous avons donc adapté ce protocole à l'analyse des gènes du métabolisme en concevant les couples d'amorces pour les gènes d'études et en sélectionnant au moins deux gènes de référence pertinents pour les 3 lignées et nos conditions d'exposition parmi les 4 disponibles au laboratoire c'est à dire cyclophilines A et B, GAPDH et S18. Les gènes sélectionnés pour les 3 lignées sont GAPDH et S18.

2. Comparaison de l'expression des gènes à l'état basal

Afin de comparer l'expression des différents gènes à l'état basal, une RT-qPCR a été réalisée sur les différents témoins des 3 lignées cellulaires. Les résultats, présentés Figure 40 et Tableau 12, correspondent à des ratios de niveaux d'ARNm par rapport à la lignée HepG2 qui n'est donc pas représentée sur le graphe. Les différentes isoformes des CYP sont plus exprimées dans la lignée d'hépatocytes HepG2 à l'exception du CYP1B1 largement prédominant dans la lignée pulmonaire A549 par rapport à HepG2 et T24. En absence d'induction par le B[a]P, la forme 1P1 de la GST est majoritaire dans les lignées A549 et T24 alors que la forme 1A1 est prédominante dans les hépatocytes. De plus, la lignée T24 présente un taux de GST1A1 très faible avec des Ct supérieurs à 36. A ces niveaux de Ct, l'analyse est soumise à l'effet Monte-Carlo qui limite l'amplification de fragments d'ADNc présents en petite quantité : plus la concentration d'un élément est faible, moins sa concentration après amplification est proche de la réalité. Ceci entraîne une dispersion des Ct et donc une quantification très peu précise. On considèrera pour la suite du travail que l'expression de la GST1A1 est trop faible dans la lignée T24 pour être mesurée.

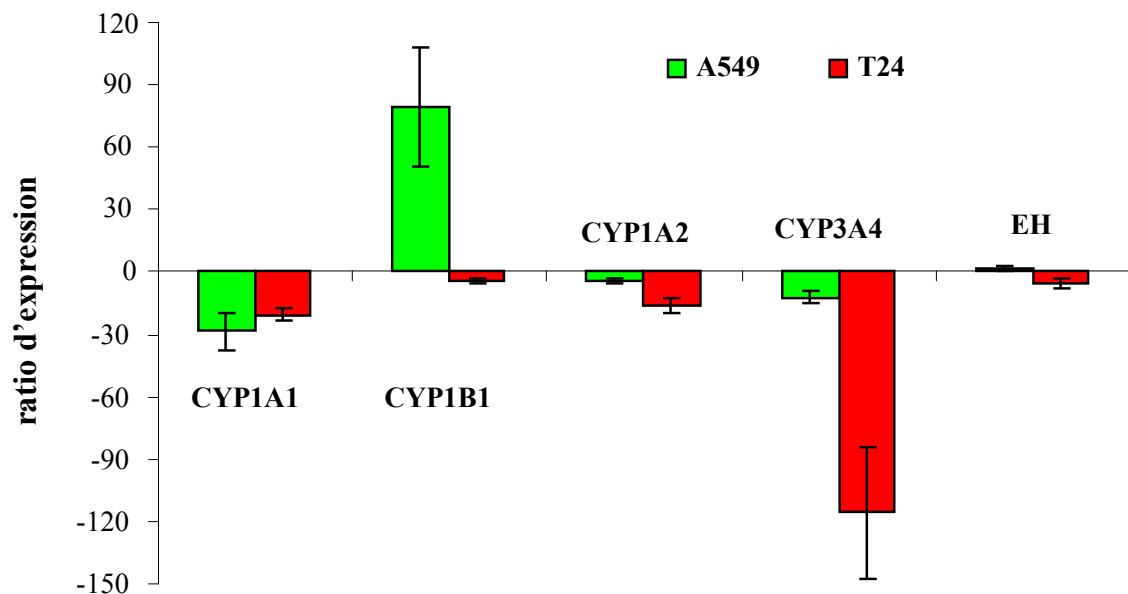


Figure 40 : Ratio d'expression des différents gènes des enzymes de phase I à l'état basal dans A549 et T24 par rapport à HepG2 mesuré par RT-qPCR. Toutes les valeurs sont significatives ($p < 0,05$) par rapport à HepG2

	GSTA1	GSTP1
A549	- 99 ± 28	1432 ± 168
T24	- 5002 ± 684	2062 ± 280

Tableau 12 : Ratio d'expression des différents gènes des enzymes de phase II à l'état basal dans A549 et T24 par rapport à HepG2 mesuré par RT-qPCR. Toutes les valeurs sont significatives (p< 0,05) par rapport à HepG2

3. Métabolisation du B[a]P dans les 3 lignées cellulaires

3.1. Le B[a]P et les enzymes de phase I

3.1.1. Effet de la concentration en B[a]P

3.1.1.1. Modulation de l'expression des gènes

Les résultats obtenus en PCR sont exprimés par rapport aux résultats obtenus pour un témoin avec 0,5 % de DMSO pour chaque lignée respectivement. Des valeurs supérieures à 1 indiquent une induction et des valeurs inférieures à 1 reflètent une inhibition de l'expression du gène par rapport au témoin.

L'exposition de 14h au B[a]P à des doses variant de 0,2 à 5 µM augmente considérablement le niveau d'ARNm du CYP1A1 pour A549 et HepG2 (Figure 41). Dans les deux lignées, le CYP1A1 est induit dès la plus faible concentration et de façon comparable à 2 µM avec une augmentation de 60 fois par rapport au témoin. Un plateau est ensuite observé pour les A549 alors que l'induction du CYP1A1 atteint un facteur de 200 par rapport au témoin pour les HepG2 à 5 µM. Dans la lignée A549, les niveaux de transcrits du CYP1B1 augmentent avec la concentration en B[a]P de façon significative dès 0,2 µM puis atteignent un plateau à 2 µM avec un facteur d'induction de l'ordre de 9 par rapport au témoin. A l'inverse, la surexpression du CYP1B1 dans les HepG2 est

observée uniquement après exposition à 5 μM de B[a]P. Par ailleurs, le B[a]P n'a que peu d'impact sur la modulation de l'expression d'autres isoformes du CYP450 (Tableau 13). Aucune sur-expression des différents gènes n'est mesurée dans les T24. On observe même une inhibition pour les isoformes 1B1 à 2 μM ainsi que 1A2 et 3A4 après exposition à 2 et 5 μM de B[a]P (Figure 42). Enfin, les niveaux de transcription de l'EH sont stables dans les trois lignées étudiées.

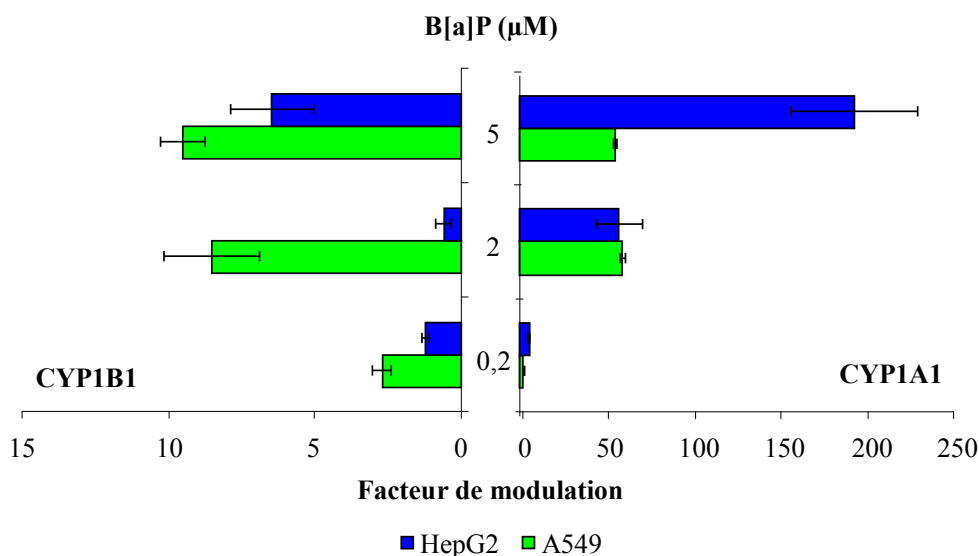


Figure 41 : Expression des gènes du CYP1A1 et CYP1B1 dans les lignées HepG2 et A549 exposées 14h à des concentrations croissantes de B[a]P de 0,2 à 5 μM . Les différences par rapport au témoin DMSO de la lignée concernée sont significatives ($p < 0,05$) à l'exception de la modulation du CYP1B1 à 0,2 et 5 μM dans les HepG2

B[a]P (μM)	HepG2			A549		
	CYP1A2	CYP3A4	EH	CYP1A2	CYP3A4	EH
0,2	3,25 \pm 0,34 *	1,61 \pm 0,15	0,86 \pm 0,10	2,41 \pm 1,34	1,21 \pm 0,10	0,68 \pm 0,34
2	3,77 \pm 0,63 *	1,14 \pm 0,11	0,77 \pm 0,22	2,64 \pm 0,78	1,29 \pm 0,05	0,77 \pm 0,22
5	4,79 \pm 1,45 *	2,18 \pm 0,82 *	1,05 \pm 0,04	2,23 \pm 0,85	2,75 \pm 0,48 *	0,80 \pm 0,19

Tableau 13 : Modulation de l'expression de gènes d'enzyme de métabolisation de la phase I dans les HepG2 et A549 incubées avec 0,2 à 5 μM de B[a]P pendant 14h avec * une différence statistiquement significative ($p < 0,05$) par rapport au témoin DMSO de la lignée concernée

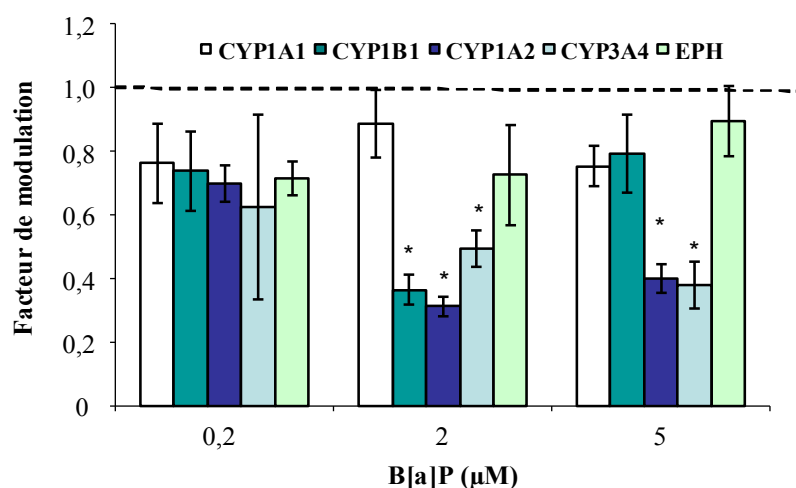


Figure 42 : Modulation des gènes des enzymes de métabolisation de phase I dans la lignée T24 exposée 14h à des concentrations croissantes de B[a]P de 0,2 à 5 μM. Les différences statistiquement significatives ($p < 0,05$) sont notées *

3.1.2. Impact du B[a]P sur l'activité enzymatique

Les temps d'incubation avec le B[a]P ont été choisis sur la base d'une étude de Billet *et al* (Billet, 2008) qui montrait que le maximum d'activité EROD était obtenu à 24h pour les microsomes de la lignée HepG2 et 48 h pour les A549. Ces mesures n'ont pas été réalisées sur les T24 au vue de l'absence d'induction de gènes. A 0,2 μM, l'activité EROD est similaire dans les deux lignées (Tableau 14). Pour des expositions à de plus fortes concentrations, celle-ci est extrêmement différente en fonction de la lignée. Alors que pour les HepG2, l'activité augmente de façon relativement linéaire jusqu'à 10 μM puis diminue à 20 μM. Dans les A549 l'activité EROD est considérablement plus faible. Elle augmente de façon faible mais significative ($p < 0,05$) entre 1 et 5 μM de B[a]P puis atteint un plateau jusqu'à 10 μM pour ensuite diminuer à 20 μM.

B[a]P (μM)	0	0,2	1	2	5	10	20
HepG2	0,00 ± 0,05	0,30 ± 0,11	1,27 ± 0,17	3,49 ± 0,61	7,25 ± 0,45	9,91 ± 0,58	5,48 ± 0,90
A549	0,00 ± 0,08	0,28 ± 0,08	0,28 ± 0,09	0,46 ± 0,11	0,59 ± 0,17	0,43 ± 0,08	0,24 ± 0,08

Tableau 14 : Mesure de l'activité EROD en pmol/min/mg de protéines dans les A549 et les HepG2 exposées respectivement 48h et 24h à des concentrations croissantes en B[a]P de 0,2 à 5 μM

3.1.3. Effet de la durée d'exposition

3.1.3.1. Expression des gènes

La cinétique de modulation de l'expression des gènes de phase I a été réalisée pour des durées d'exposition variant de 30 minutes à 24 heures. La dose de B[a]P sélectionnée (0,2 μ M) correspond à la concentration pour laquelle la quantité d'adduits BPDE- N^2 -dGuo est maximale pour A549. Devant l'absence de formation d'adduit et de variation dans l'expression des gènes en fonction de la dose à 14h, la lignée T24 n'a pas été incluse dans les études de cinétique. Pour les HepG2, le niveau d'ARNm du CYP1A1 augmente sensiblement avec la durée d'exposition jusqu'à 6h (facteur de modulation de 219 ± 18) puis chute après 14h d'incubation (Figure 43). Une induction, beaucoup plus modeste, est mesurée pour les CYP1B1 et 1A2, avec un maximum à 2h (facteur de 5) et 6h (facteur de 8) respectivement. Le B[a]P n'a peu d'impact sur les autres gènes, le CYP3A4 et l'EH. En ce qui concerne les A549, les niveaux maximum des ARNm de CYP1A1 et 1B1 sont atteints après 2h d'exposition. A ce temps d'incubation, l'induction du CYP1A1 est 4 fois plus faible et celle du CYP1B1 8 fois plus importante que celle maximale observée dans les HepG2. Enfin, aucune modulation significative n'est détectée pour les autres transcrits (Tableau 15) à l'exception d'un léger effet sur le CYP1A2 dans HepG2.

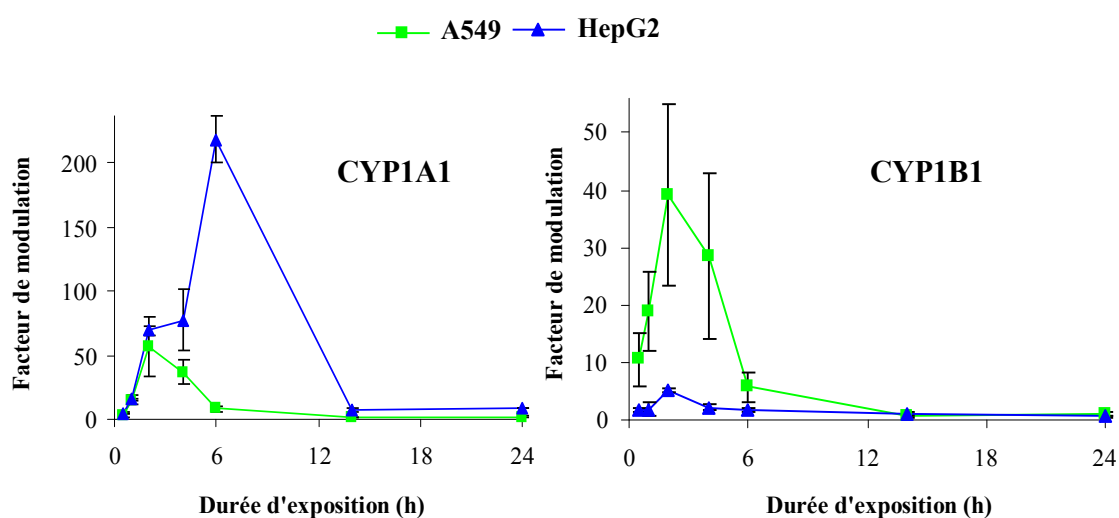


Figure 43 : Cinétique de modulation de l'expression des CYP1A1 et 1B1 dans les HepG2 et A549 incubées de 30 min à 24h avec 0,2 μ M de B[a]P. Toutes les données obtenues entre 30 min et 6h sont significatives ($p < 0,05$) par rapport au témoin DMSO de la lignée concernée

Temps d'exposition (h)	HepG2			A549		
	CYP1A2	CYP3A4	EH	CYP1A2	CYP3A4	EH
0,5	0,66 ± 0,28	1,94 ± 0,12 *	0,82 ± 0,23	2,41 ± 1,34	2,10 ± 0,86	0,67 ± 0,28
1	1,52 ± 0,93	0,96 ± 0,55	0,60 ± 0,41	1,16 ± 0,58	1,18 ± 0,39	0,35 ± 0,12
2	1,70 ± 0,30 *	1,56 ± 0,28	0,80 ± 0,21	1,68 ± 0,85	1,01 ± 0,32	0,75 ± 0,19
4	4,47 ± 0,31 *	1,59 ± 0,17	0,80 ± 0,11	1,40 ± 0,67	1,06 ± 0,37	0,71 ± 0,21
6	7,39 ± 0,73 *	1,43 ± 0,21	0,93 ± 0,14	1,34 ± 0,78	1,37 ± 0,41	0,90 ± 0,13
14	4,76 ± 0,94 *	1,42 ± 0,22	0,91 ± 0,09	0,67 ± 0,46	1,38 ± 0,51	0,72 ± 0,22
24	4,88 ± 0,49 *	2,12 ± 0,07 *	0,80 ± 0,14	1,61 ± 0,85	1,98 ± 0,89	0,75 ± 0,31

Tableau 15 : Cinétique de modulation de l'expression des isoformes 1A2 et 3A4 deCYP450 ainsi que de l'EH dans les HepG2 et A549 incubées de 30 min à 24h avec 0,2 µM de B[a]P. * : significativement différent (p<0,05) du témoin DMSO

3.1.3.2. Activité EROD

Une étude préliminaire sur la cinétique de l'activité EROD dans les HepG2 et A549 exposées à 0,2 ou 2 µM de B[a]P a montré que, dans les A549, l'activité augmente jusqu'à 14h pour atteindre un plateau (Figure 44). De plus, aucune différence significative entre 0,2 et 2 µM n'est mise en évidence pour tous les temps. En ce qui concerne les HepG2, on observe une augmentation de l'activité jusqu'à 24h et l'apparition d'un plateau avec une activité EROD beaucoup plus importante à 2 µM qu'à 0,2 µM. Enfin, la comparaison des résultats obtenus pour les deux lignées révèle à 2 µM une activité beaucoup plus faible pour les A549 alors qu'à 0,2 µM il n'y a pas de différence significative entre l'activité EROD dans les HepG2 et les A549 pour tous les temps.

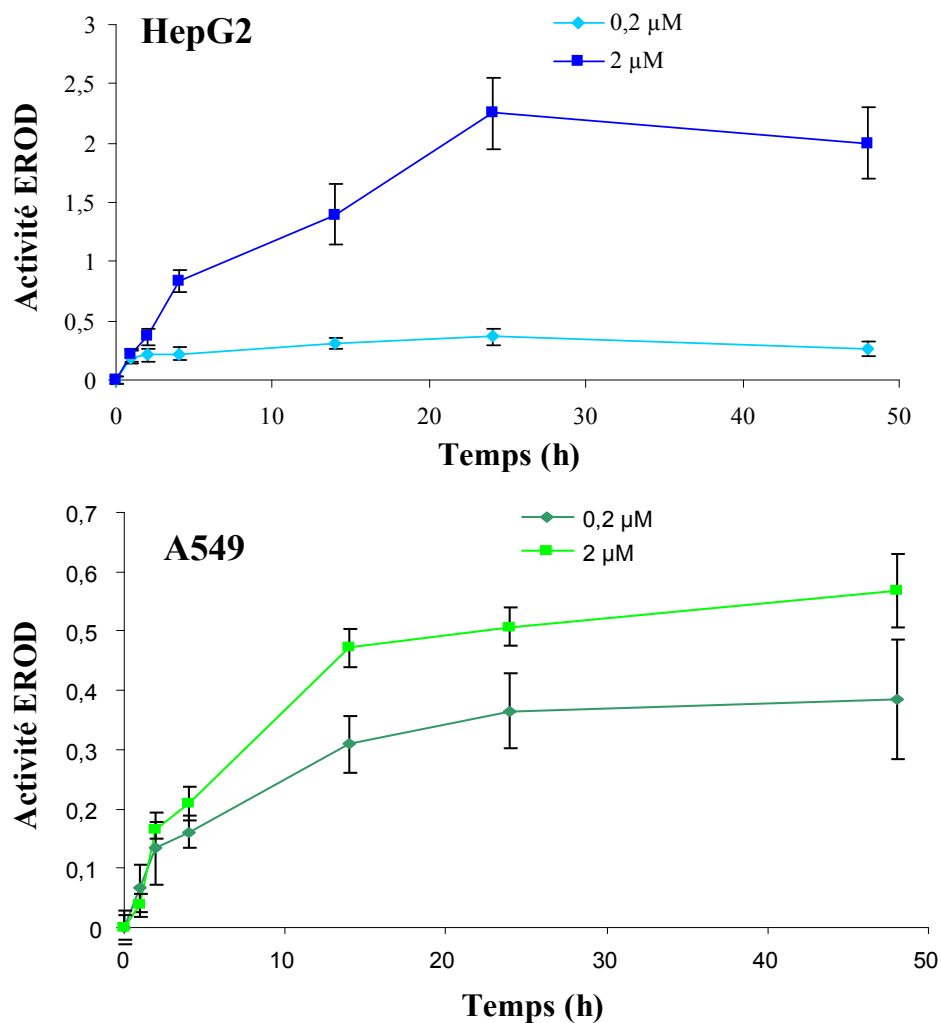


Figure 44 : Cinétique d'activité EROD en pmol/min/mg de protéines pour les A549 et HepG2 exposées à 0,2 ou 2 μM de B[a]P pour une durée de 1h à 48h. Cette expérience a été réalisée une seule fois, les résultats représentent la moyenne de 6 réplicats \pm écart-type à la moyenne.

3.2. Le B[a]P et les Glutathion-S-transférases (GST), enzymes de phase II

3.2.1. Modulation de l'expression des gènes

La modulation des niveaux d'ARNm des GST A1 et P1 en fonction de la dose de B[a]P est limitée pour les 3 lignées cellulaires de 0,2 à 5 μM avec uniquement une induction d'un facteur 3 par rapport au témoin de l'isoforme P1 dans la lignée HepG2 à 2 et 5 μM (Figure 45). Aucune modulation n'est observée dans les A549 et T24 pour les GST étudiées. Ces

résultats sont confirmés par l'étude cinétique. La quantité de transcrits des GST demeure relativement constante au cours du temps dans les HepG2 et A549 incubées de 30 min à 24h avec 0,2 μM de B[a]P. On observe néanmoins, une faible surexpression de la forme P1 après 2h d'exposition dans les HepG2 (Tableau 16).

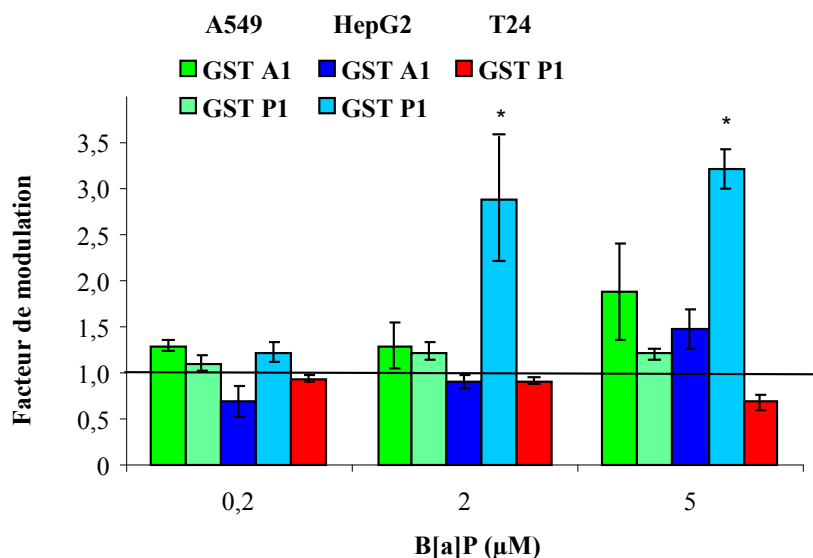


Figure 45 : Modulation de l'expression des GSTA1 et P1 dans A549, T24 et HepG2 exposées 14h à des concentrations croissantes de B[a]P de 0,2 μM à 5 μM . L'ARNm de la GSTP1 n'est pas détecté dans la lignée T24. * : significativement différent ($p < 0,05$) du témoin DMSO

Exposition (h)	HepG2		A549	
	GSTA1	GSTP1	GSTA1	GSTP1
0,5	1,21 \pm 0,07	0,58 \pm 0,13	1,06 \pm 0,45	1,09 \pm 0,50
1	1,27 \pm 0,01	0,68 \pm 0,54	0,86 \pm 0,22	1,05 \pm 0,44
2	1,28 \pm 0,02	2,99 \pm 0,95 *	0,75 \pm 0,25	1,21 \pm 0,44
4	1,41 \pm 0,12	0,92 \pm 0,07	0,98 \pm 0,32	0,33 \pm 0,16 *
6	1,27 \pm 0,01	2,30 \pm 0,65	1,21 \pm 0,19	0,54 \pm 0,33
14	1,26 \pm 0,14	0,66 \pm 0,34	0,70 \pm 0,23	0,60 \pm 0,26
24	1,38 \pm 0,02	0,55 \pm 0,06	1,32 \pm 0,52	0,66 \pm 0,31

Tableau 16 : Cinétique de modulation de l'expression des GST A1 et P1 dans les HepG2 et A549 incubées de 30 min à 24h avec 0,2 μM de B[a]P. Les différences significatives ($p < 0,05$) par rapport au témoin DMSO de la lignée concernée sont notées *

3.2.2. Activité GST

L'activité des GST, mesurée à l'aide du test CDNB, demeure constante quelle que soit la dose (de 0,2 à 5 μM) de B[a]P appliquée (Tableau 17) ou le temps d'exposition (de 2h à 24h) pour 0,2 μM de B[a]P dans les HepG2 et A549 (Figure 46). Par ailleurs, elle est tout à fait similaire entre les 2 lignées.

		HepG2	A549
B[a]P (μM)	0	0,24 \pm 0,02	0,30 \pm 0,03
	0,2	0,19 \pm 0,03	0,26 \pm 0,02
	2	0,18 \pm 0,02	0,28 \pm 0,03
	5	0,22 \pm 0,03	0,28 \pm 0,02

Tableau 17 : Mesure de l'activité GST en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines dans les lignées HepG2 et A549 exposées pendant 14h à des doses de 0,2 à 5 μM de B[a]P

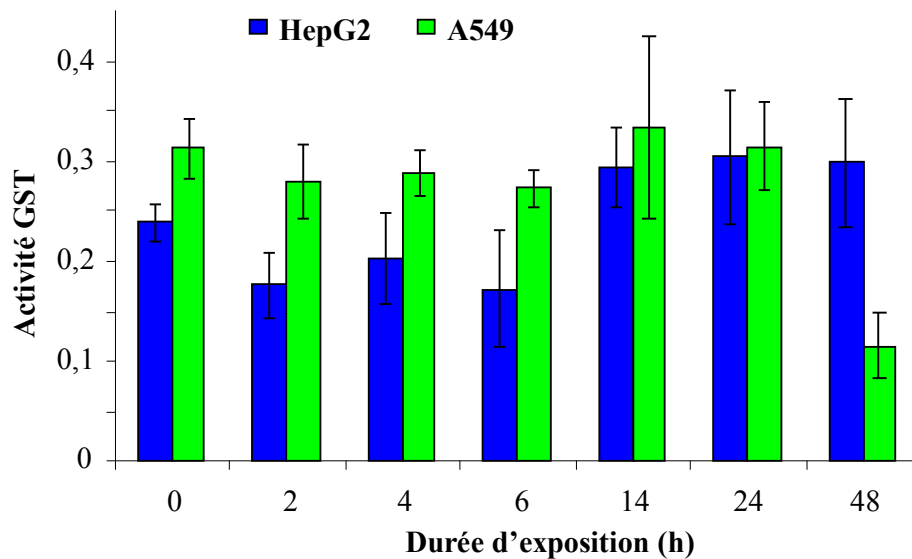


Figure 46 : Variation de l'activité GST ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines) au cours du temps dans les HepG2 et les A549 incubées de 2 à 48h avec 0,2 μM de B[a]P

3.3. Expression d'AKR1C1 et MRP4

Afin de compléter l'évaluation de la métabolisation du B[a]P mais aussi de mieux comprendre les différences observées dans la formation des adduits, nous avons étudié l'expression d'AKR1C1 et MRP4. Ces deux protéines sont impliquées dans la détoxification du diol-B[a]P. AKR1C1 constitue une enzyme de la voie des *o*-quinones qui transforme notamment le 7,8-diol-B[a]P en catéchol qui va être à son tour soit converti en *o*-quinones soit éliminé après conjugaison au GSH. MRP4 est une protéine d'efflux qui prend en charge le 7,8-diol-B[a]P et l'exporte hors de la cellule. A l'état basal, les niveaux d'ARNm correspondant aux deux protéines sont environ 10 fois plus importants dans les A549 que les HepG2 (Figure 47). Pour AKR1C1, cette différence s'accroît avec l'augmentation de la concentration en B[a]P jusqu'à 5 μ M (Figure 48). En effet, on observe une surexpression de AKR1C1 à 2 et 5 μ M dans les A549 alors que le B[a]P n'a pas d'effet dans les HepG2 pour l'induction de ce gène. L'expression de MRP4 est quant à elle inhibée dans les A549 après exposition au B[a]P mais à des niveaux qui ne compensent pas sa surexpression basale par rapport à HepG2.

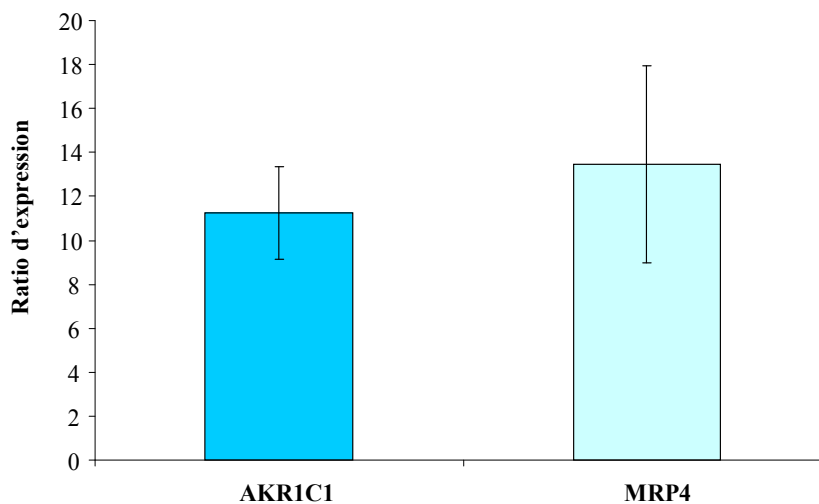


Figure 47 : Ratio d'expression d'AKR 1C1 et MRP4 mesuré par RT-qPCR à l'état basal dans les A549 par rapport à HepG2

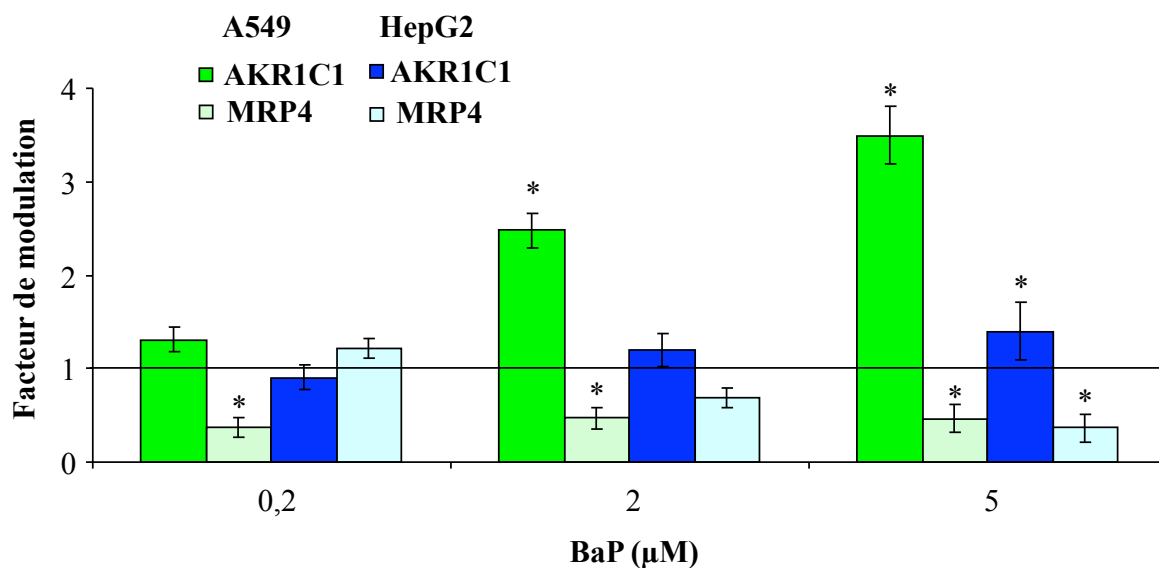


Figure 48 : Modulation de l'expression d'AKR1C1 et MRP4 dans les A549 et HepG2 exposées 14h à des concentrations croissantes de B[a]P de 0,2 à 5 μM avec * correspondant à une différence significative ($p < 0,05$) par rapport au témoin DMSO.

3.4. Absorption du B[a]P dans les cellules

L'absence de formation d'adduits BPDE- N^2 -dGuo et de détection d'une quelconque métabolisation du B[a]P dans les T24 nous a amené à vérifier l'absorption effective du B[a]P par les cellules. Pour ce faire, les trois lignées cellulaires ont été exposées 1h à 0,1 μM de (±)-*anti*-BPDE, utilisé comme molécule modèle. La formation des adduits BPDE est la plus forte dans les HepG2 (Figure 49). Les A549 et T24 présentent des niveaux d'adduits proches mais la présence d'adduits BPDE mesurée dans les T24 indique bien qu'elles internalisent le BPDE.

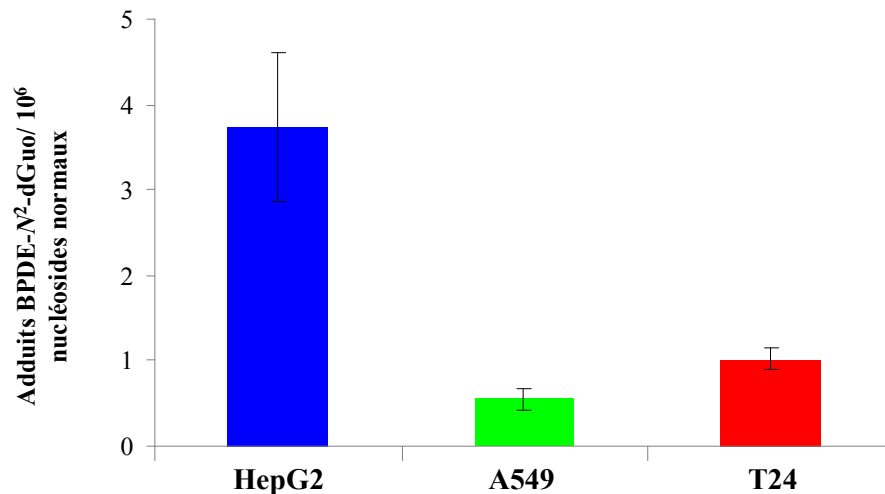


Figure 49 : Dosage des adduits BPDE- N^2 -dGuo par HPLC-MS/MS dans les lignées cellulaires A549, T24 et HepG2 exposées 1h à 0,1 μ M de (\pm)-*anti*-BPDE

IV. Conclusions et discussion sur l'effet du B[a]P dans les 3 lignées étudiées

Comme nous venons de le voir dans les différents résultats rapportés ci-dessus, la réponse des trois lignées cellulaires à une exposition au B[a]P est assez différente. Trois faits marquants sont à mettre en avant : le faible impact du B[a]P sur les T24, l'effet de concentration inattendu avec les A549, et les informations sur la nature des dommages de l'ADN induits par le B[a]P.

1. Faible génotoxicité du B[a]P dans la lignée de vessie T24

En marge des cancers du poumon, les HAP seraient également impliqués dans le développement de cancer de la vessie. Même si ces cancers sont moins déclarés en maladie professionnelle en raison de leur survenue à un âge plus avancé que pour les poumons, leur incidence est importante, notamment chez les salariés exposés aux HAP, en particulier dans les usines de production d'aluminium (RR = 1,29 [1,12-1,49]), les fonderies de fer ou d'acier (RR = 1,29 [1,06-1,57]) ou encore lors de la gazéification du charbon (RR = 2,39 [1,36-4,21]) (Bosetti, 2007). Néanmoins, le mécanisme d'action sous-jacent reste encore peu connu.

L'exposition de l'urothélium aux HAP implique probablement davantage les métabolites, plutôt de phase II, que les composés parents, la vessie ayant un temps de contact important avec les métabolites produits par les différents organes de l'organisme avant élimination. Cependant des études sur l'homme mais aussi sur les animaux ont montré que l'épithélium urinaire pouvait être exposé au B[a]P par diffusion à travers les capillaires sanguins ou directement au niveau de l'urine contenant, en faible proportion, du B[a]P non métabolisé (Campo, 2009, Campo, 2010, Rossella, 2009). Par ailleurs, la vessie ne doit pas être considérée uniquement comme un organe cible passif pour les HAP non métabolisés et les métabolites potentiellement cancérigènes. En effet, différents travaux ont mis en évidence l'expression de différentes enzymes du métabolisme notamment les CYP1A1 et 1B1 ou les AKR1C2 et 1C3 et la capacité de métabolisation active de l'urothélium face à des xénobiotiques comme le B[a]P (Brauers, 2000, Figueroa, 2008).

Dans le but d'éclaircir l'implication et le mode d'action des HAP dans la formation de cancers de la vessie, nous avons choisi d'étudier les effets du B[a]P, utilisé comme composé de référence des HAP, dans une lignée humaine de vessie et de les comparer aux résultats obtenus pour les hépatocytes et les cellules pulmonaires. Très peu de lignées cellulaires humaines de vessie existent. Les T24 sont l'une d'entre elles et constituent une lignée cancéreuse issue d'un carcinome d'épithélium de vessie.

L'exposition de ces cellules au B[a]P n'entraîne pas la formation d'adduits BPDE-N²-dGuo pour une large gamme de concentrations (0,2 à 20 µM) et de durées d'incubation (30 minutes à 24h). De plus, aucune induction des enzymes de phase I n'a été détectée. D'autre part, l'absence de génération d'adduit ne peut pas s'expliquer par une activité importante des GST, enzymes de phase II, puisque aucune induction ou augmentation de l'activité n'est observée. En outre, l'activité GST basale mesurée est similaire à celle observée pour les lignées A549 et HepG2. Une dernière hypothèse quant à l'absence d'adduits BPDE serait que l'action toxique du B[a]P mettrait en jeu des voies alternatives de génotoxicité. La formation d'adduits instables en N7 de la guanine, par exemple, par le radical cation semble cependant peu impliquée puisque les mesures comètes ne montrent de formations de cassures ou de sites abasiques qu'en faible quantité et aux plus fortes concentrations étudiées. La génération d'ERO via la voie de métabolisation des quinones peut être écartée aux vues de l'absence d'induction des CYP1A1 et 1B1 impliqués, comme pour la voie des diols époxydes, dans l'étape initiale de transformation du B[a]P en 7,8-dihydrodiol. La

faible induction de dommages oxydatifs confirme cette hypothèse. Tous ces résultats négatifs sur la métabolisation et la faible génotoxicité du B[a]P dans ces cellules nous ont amené à vérifier l'absorption effective du B[a]P dans ces cellules. L'exposition des cellules à du BPDE, comme composé modèle, a montré une génération d'adduits BPDE- N^2 -dGuo à des niveaux comparables à ceux mesurés pour les A549 dans les mêmes conditions suggérant ainsi une absorption similaire du B[a]P dans ces deux lignées. En conclusion, nos résultats montrent que le B[a]P est internalisé mais qu'il n'induit qu'une faible génotoxicité dans les cellules T24.

Cependant, d'autres modèles de vessie ont montré la capacité de cet organe à métaboliser les HAP convertis en métabolites réactifs à l'origine de la formation de dommages à l'ADN. Tout d'abord, des études sur cellules primaires d'épithélium de vessie de porcs (Primary porcine Urinary Bladder Epithelial Cells – PUBEC) ont montré que le B[a]P était absorbé à de faibles concentrations dès 0,1 μ M dans ces cellules (Verma, 2012) et que ces dernières concentraient de façon très importante le B[a]P. En effet, des niveaux de B[a]P de l'ordre de 7,28 à 35,70 μ M sont détectés dans ces cellules exposées 24h à 0,5 μ M de B[a]P (Verma, 2012). Wolf *et al* (Wolf, 2005) ont également rapporté une induction du CYP1A1 d'un facteur 200 pour une exposition à 5 μ M pendant 5h. Il est par ailleurs important de noter qu'une forte susceptibilité individuelle est observée au niveau de l'absorption du B[a]P et de l'induction de l'expression de l'ARNm du CYP1A1 chez le porc même lorsque des pools de différents urothéliums sont effectués. Cette variabilité importante est observée dans la plupart des études sur PUBEC (Verma, 2012). Par exemple, Plöttner *et al* ont rapporté une variation dans le facteur d'induction du CYP1A1 de 162 à 982 pour une exposition à 5 μ M de B[a]P pendant 24h dans des lignées primaires issues de 15 donneurs différents (Plöttner, 2008a). Une variabilité similaire est observée chez l'homme en fonction de la susceptibilité génétique en particulier pour l'expression du CYP1A1 dans les urothéliums sains (Brauers, 2000). Des analyses complémentaires par cytométrie de flux sur les PUBEC ont permis à Plöttner *et al* de mettre en évidence l'existence de deux sous-populations distinctes de cellules dans ces lignées primaires. Alors que, dans la première sous-population, aucune surexpression du CYP1A1 n'est induite jusqu'à de fortes concentrations de 100 μ M, dans la seconde, une induction du CYP1A1 est observée de façon dose dépendante jusqu'à 10 μ M avec une forte variabilité individuelle de 10 à 65 % (Plöttner, 2008b, Plöttner, 2009). La formation des adduits BPDE n'a pas été mesurée jusqu'à présent dans ces cellules. Néanmoins, une analyse

protéomique après exposition au B[a]P y montre l'expression d'enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN par la voie du NER suggérant la formation d'adduits (Verma, 2013). Par ailleurs, la présence de métabolites comme le BPDE et la formation d'adduits a été mise en évidence dans des explants issus de vessies humaines incubés avec du B[a]P (Daniel, 1983, Moore, 1982). La formation d'adduits BPDE dans les explants et leur absence dans les T24 suggèrent fortement que seulement une partie de la population cellulaire de la vessie possède des CYP1A1 inductibles. Les cellules T24 correspondraient donc plus à la fraction inerte. L'utilisation de cette lignée dans le cadre de l'évaluation de la toxicité des HAP ne semble donc pas adaptée.

2. La lignée A549, un bon modèle de cellules pulmonaires

La lignée A549 a été choisie dans ce travail comme modèle pulmonaire *in vitro*. Ces cellules sont issues d'un adénocarcinome pulmonaire et possèdent les caractéristiques de pneumocytes alvéolaires de type II. Cette lignée est extrêmement utilisée en toxicologie comme modèle de cellules pulmonaires (Billet, 2008, Bonetta, 2009, Castorena-Torres, 2008, Danielsen, 2011, Huang, 2013, Hukkanen, 2000, Jugan, 2012, Mattsson, 2009, Palackal, 2002, Srivastava, 2012, Urani, 1998).

La génotoxicité du B[a]P a été évaluée dans cette lignée à la fois en termes de formation d'adduits BPDE- N^2 -dGuo et de dommages oxydatifs. Afin de comparer l'effet du B[a]P dans différents organes, les résultats obtenus ont été comparés avec ceux de la lignée d'hépatocytes HepG2.

La formation des adduits BPDE- N^2 -dGuo en fonction de la dose de B[a]P suit une courbe en cloche avec un maximum à 0,2 μ M pour les A549. Ces résultats contrastent fortement avec la formation dose-dépendante des adduits BPDE dans la lignée HepG2, ce qui est cohérent avec les résultats précédemment publiés (Tarantini, 2009). Ces différences ne peuvent pas être expliquées par la durée d'exposition car la production d'adduits est plus élevée à 0,2 μ M quelle que soit la durée d'incubation à partir de 4h comme l'indique l'étude cinétique. Aux faibles concentrations, inférieures à 0,2 μ M, qui sont les plus

pertinentes au niveau biologique, les taux d'adduits observés sont plus importants dans les A549 que dans les HepG2.

Ce type de dose dépendance avec un maximum à faible concentration a également été rapporté dans différents modèles pulmonaires *in vitro*. En effet, des résultats similaires ont été observés dans les cellules HEL qui correspondent à des cellules embryonnaires fibroblastiques pulmonaires et les cellules BEAS-2B qui sont des cellules épithéliales bronchiques (Binkova, 2004, Pohjola, 2003, Sevastyanova, 2007). En effet, la formation des adduits atteint un maximum à 1 μM pour les HEL et 2,5 μM dans les BEAS-2B exposées jusqu'à 10 μM de B[a]P pendant 24 ou 48 h. De façon intéressante, ces auteurs observent également des niveaux d'adduits plus importants dans les HEL que dans la lignée HepG2 pour des expositions de 0,2 à 1 μM de B[a]P.

Une première explication à cette différence de formation d'adduits à forte concentration dans les A549 et HepG2 pourrait résider dans une disparité d'absorption du B[a]P. Néanmoins, une étude sur l'internalisation de ce composé dans les deux lignées montre que le taux d'absorption du B[a]P n'est qu'inférieur d'un facteur 2 dans les A549 (Urani, 1998). Ces résultats sont en accord avec ce que nous avons observé en mesurant les adduits après une exposition au BPDE dans les A549, HepG2 et T24. Les niveaux d'adduits, du même ordre de grandeur, suggèrent une absorption comparable des HAP par les 3 lignées cellulaires. De plus, une absorption plus faible du B[a]P dans les A549 n'expliquerait en rien la différence observée simultanément à faible et forte concentration entre HepG2 et A549.

Il est beaucoup plus probable que la différence dans le profil d'induction des adduits BPDE- N^2 -dGuo reflète une dissemblance dans la métabolisation en termes de cinétique ou d'effet dose après un traitement au B[a]P. De ce fait, nous avons par la suite examiné le métabolisme du B[a]P à travers la mesure de l'expression des gènes codant pour les enzymes de métabolisation puis de l'activité d'enzymes de phase I (EROD) et de phase II (GST).

Alors que les niveaux d'ARNm du CYP1A1 atteignent un plateau pour une exposition à 2 μM de B[a]P pendant 14h dans les A549, l'augmentation de l'expression est proportionnelle à la dose de B[a]P dans les HepG2. En termes de cinétique, nous avons observé une expression du CYP1A1 moins intense à son maximum et moins persistante

dans les A549 par rapport aux HepG2 pour une exposition à 0,2 μM . Ces différences sont en accord avec les données publiées dans la littérature. En effet, Urani *et al* ont montré que la distribution des métabolites radioactifs du B[a]P était qualitativement similaire dans les deux lignées mais à des niveaux plus importants dans la lignée HepG2 (Urani, 1998). Ces observations cellulaires sont à l'image de ce qui se déroule *in vivo* avec le foie comme siège préférentiel de la métabolisation des xénobiotiques. Ce métabolisme tissu-spécifique est également observé quand on compare les résultats publiés entre les tranches de poumons et de foie de rat. Au niveau du poumon, une induction maximale de métabolisation est atteinte pour une exposition de 1 μM alors que dans les tranches issues du foie, l'obtention de ce maximum nécessite une incubation à 10 μM de B[a]P. Ceci suggère bien une activité métabolique plus importante au niveau du foie par rapport au poumon. Une augmentation linéaire des niveaux de l'ARNm du CYP1A1 en fonction de la dose dans les tranches de foie et un plateau à 1 μM pour les tranches issues de poumons viennent encore appuyer cette différence dans le métabolisme (Pushparajah, 2008a).

Par ailleurs, la saturation observée dans l'induction du CYP1A1 et de l'activité EROD dans les A549 pourrait également être liée à l'expression d'AhR dans ces cellules. En effet, AhR, qui est le récepteur cytoplasmique des HAP, joue un rôle central dans le métabolisme du B[a]P en activant différents gènes codant pour les enzymes du métabolisme de phase I et II notamment les CYP1A1, 1B, les GST mais aussi les protéines d'efflux (Baird, 2005, Gelhaus, 2012, Gelhaus, 2011, Hayes, 1995, McFadyen, 2003, Shimada, 2006a, Shimada, 2004, Xue, 2005). Ce récepteur Ah est détecté dans la grande majorité des tissus et organes mais à des niveaux variables. Iwanari *et al* ont mis en évidence une présence plus faible d'AhR dans les A549 par rapport aux HepG2 (Iwanari, 2002). La même observation a été faite dans les tranches de foie et de poumons de rat par Harrigan *et al* en 2006 (Harrigan, 2006). Ces résultats sont en ligne avec l'idée d'une plus forte activité métabolique vis-à-vis du B[a]P dans la lignée d'hépatocytes HepG2 que dans la lignée pulmonaire A549. Néanmoins, alors qu'à forte concentration l'induction du CYP 1A1 et de l'EROD sont très dissemblables entre HepG2 et A549, elles sont très proches à une plus faible concentration en B[a]P de 0,2 μM aux différents temps d'exposition. Ces résultats sont tout à fait en accord avec une plus forte quantité d'adduits BPDE- N^2 -dGuo formés à 0,2 μM dans les A549.

Par ailleurs, les autres gènes dont l'expression est modulée sont différents dans les deux lignées. Ceci est en accord avec les travaux de Castorena-Torres *et al* qui montrent que le nombre de gènes modulés après une exposition à 1 μM de B[a]P est différent entre les

deux lignées (Castorena-Torres, 2008). La différence la plus importante que nous ayons observée concerne le CYP1B1. En effet, le niveau maximal d'ARNm du CYP1B1 est atteint plus vite et de façon 8 fois plus intense dans les A549 exposées à 0,2 μM que dans les HepG2. Une plus forte expression du CYP1B1 dans le poumon par rapport au foie a également été rapportée pour les tranches d'organes de rat (Pushparajah, 2008a). En outre, il a été montré par Shimada *et al* que l'efficacité du CYP1B1 dans la conversion du B[a]P en son dérivé 7,8-diol était plus importante que pour le CYP1A1 (Shimada, 2003). L'ARNm de l'isoforme B1 présente un temps de demi-vie également plus important que l'ARNm du CYP1A1 (Lekas, 2000). Tout ceci suggère que le CYP1B1 joue un rôle prépondérant dans la formation des adduits BPDE- N^2 -dGuo. Une autre isoforme du CYP450, le CYP1A2, est également exprimé de façon différente dans les deux lignées après une exposition au B[a]P avec une induction significative dans la lignée HepG2 bien que 20 fois inférieure à celle observée pour le CYP1A1. L'exposition au B[a]P n'a que peu d'impact sur la modulation de l'expression des autres enzymes de phase I étudiées comme les autres CYP ou l'EH.

A l'inverse des CYP1A1 et 1B1, aucune différence n'a été détectée dans la modulation de l'expression des gènes ou l'activité des GST considérées comme l'une des meilleures protections face à la toxicité des diol-époxydes en particulier du BPDE. Ces enzymes cytosoliques de phase II sont présentes dans de nombreux tissus notamment le foie où leur expression est forte (Dreij, 2002, Jernstrom, 1989, Jernstrom, 1996). L'impact d'une exposition au B[a]P sur les A549 et les HepG2 semble être mineur en ce qui concerne la modulation de l'induction des gènes ou de l'activité des GST. D'autres travaux rapportent également cette absence de modulation montrant que la phase I est bien plus inductible que la phase II (Dreij, 2002, Pushparajah, 2008a, Pushparajah, 2008c). En effet, aucune modulation dans l'activité GST n'est détectée dans les tranches de foie et de poumons de rat exposées à des concentrations de B[a]P jusqu'à 50 μM pendant 24h en utilisant le CDNB. Cependant, une activité GST 10 fois plus intense a été mesurée dans les tranches de foie par rapport au poumon alors que nos résultats montrent une activité basale similaire pour les A549 et les HepG2.

L'ensemble de ces données explique en partie les différences observées dans la formation des adduits BPDE- N^2 -dGuo en fonction de la dose de B[a]P appliquée. En effet, la plus forte induction du CYP1A1 observée dans les hépatocytes est cohérente avec les niveaux

d'adduits plus importants mesurés pour une exposition à 2 et 5 μM . La plus faible induction du CYP1A1 dans A549 semble en partie compensée par un niveau plus important de CYP1B1. Ceci pourrait expliquer également pourquoi les activités EROD sont plus proches à 0,2 μM dans les deux lignées que pour des doses de 2 ou 5 μM et par conséquent la formation d'adduits en quantité plus importante dans les A549 à faible concentration.

Néanmoins, en l'absence d'impact du B[a]P sur les GST de phase II, il est difficile d'expliquer la courbe en cloche de dose dépendance pour la formation des adduits dans A549 en particulier la décroissance des niveaux d'adduits à de fortes concentrations. Une explication à cela pourrait être l'implication d'une seconde voie de métabolisation du B[a]P initiée à forte dose, en particulier du 7,8-diol-B[a]P, par la voie des *o*-quinones. Les enzymes AKR1C sont responsables de la conversion du 7,8-diol-Benzo[a]pyrène en quinones. Comme le montre nos résultats, AKR1C1 est très exprimée au niveau des cellules pulmonaires A549, à l'image d'autres isoformes comme AKR1C2 et C3, et de façon plus importante que dans les HepG2 (Jiang, 2005, Quinn, 2008). Toutefois, il a été montré que l'activité catalytique des CYP1A1 et 1B1 face au diol était 100 et 500 fois plus efficace respectivement que celle des différentes isoformes d'AKR1C de C1 à C4 (Quinn, 2008).

De façon similaire pour la protéine d'efflux MRP4, impliquée dans l'élimination du B[a]P diol (Gelhaus, 2012), les niveaux d'ARNm sont plus importants dans les A549 au niveau basal par rapport aux HepG2 suggérant une expression de la protéine plus importante dans A549. Cette différence est également observée après une exposition au B[a]P bien qu'une légère diminution dans les niveaux d'ARNm se produit dans les deux lignées.

On peut donc envisager que la quantité de BPDE est plus limitée dans A549 à forte concentration de par une expression plus importante d'AKR1C1 et MRP4 qui soustraient le 7,8-diol à la voie des diol-époxydes.

3. Faible contribution du stress oxydant et des adduits dépurinants dans la génotoxicité du B[a]P

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) produites lors du cycle catalytique des CYP450 ou lors des cycles redox de la voie des *o*-quinones peuvent également être à l'origine de

dommages de l'ADN (Luch, 1999, Xue, 2005). Le B[a]P peut donc exercer sa génotoxicité de façon indirecte à travers la génération d'un stress oxydant. Peu d'études ont comparé la contribution du stress oxydant face à la génération d'adduits dans les mécanismes de génotoxicité des HAP. Nous avons étudié les dommages induits par le stress oxydant dans les trois lignées cellulaires à la fois parce que nous attendions des niveaux importants dans la lignée A549, de par la forte expression des AKR1C, mais aussi au niveau des HepG2 de par leurs fortes capacités métaboliques. De plus, nous souhaitions vérifier que l'absence d'adduits BPDE dans la lignée T24 n'était pas compensée par la génération de lésions sur l'ADN résultant d'un stress oxydant. Ce même méthode des Comètes nous a permis également de déterminer indirectement la contribution des adduits dépurinants qui induisent des sites abasiques alcali-labiles.

Aucune formation significative de cassures de brin ou de purines oxydées n'a été observée dans les trois lignées cellulaires pour une dose d'exposition faible de 0,2 μM comme rapporté précédemment pour les HepG2 (Tarantini, 2009). Dans les mêmes conditions d'exposition, le niveau d'adduits BPDE- N^2 -dGuo est de l'ordre d'un adduit pour un million de bases normales pour les A549 et les HepG2. A 2 μM de B[a]P, des niveaux significatifs et similaires de lésions oxydatives ont été détectés dans les trois lignées cellulaires. Comme publié précédemment (Tarantini, 2009), le ratio entre les adduits BPDE- N^2 -dGuo et les cassures est très important avec une valeur de 41 pour les HepG2. Un ratio de 15 est observé entre les adduits et les 8-oxodGuo induites par le B[a]P. Les valeurs de ratio pour les A549 sont de 18 pour les cassures induites et 3 pour les 8-oxodGuo. Néanmoins, à cette concentration relativement haute de 2 μM , les niveaux d'adduits sont en dessous du niveau maximal de génération des adduits BPDE- N^2 -dGuo à 0,2 μM dans les A549. On peut noter que le traitement de cellules par 20 μM de quinone-B[a]P ne génère que 0,4 8-oxodGuo/ 10^6 bases (Mangal, 2009). Ce niveau est beaucoup plus faible que celui atteint ici pour les adduits à des concentrations de 0,2 et 2 μM . Au total, les dommages oxydatifs ne représentent qu'une faible contribution dans la génotoxicité du B[a]P dans les trois lignées cellulaires à de faibles concentrations, plus pertinentes au niveau biologique. Les lésions oxydatives sont induites de façon plus importante à de plus fortes doses d'exposition mais leur fréquence demeure inférieure à la formation des adduits BPDE- N^2 -dGuo dans les A549 et les HepG2. L'impact limité du stress oxydant dans la génotoxicité du B[a]P à de faibles doses pourrait expliquer la faible

corrélation observée entre l'exposition de salariés à des atmosphères riches en HAP et les mesures de biomarqueurs d'oxydation de l'ADN (Marie, 2009)

Par ailleurs, les cassures mesurées par la méthode des comètes correspondent d'une part aux cassures induites par le stress oxydant mais aussi aux sites alcali-labiles qui peuvent être issus de la perte d'adduits dépurinés (site abasiques). On peut donc en conclure, par rapport à la faible proportion de cassures mesurée, que la contribution des adduits dépurinants est également faible dans la génotoxicité du B[a]P. Il faut insister sur le fait que cette conclusion vient tant de mesures réalisées à différentes doses qu'à différents temps. Ce dernier point est important car les cassures simple-brin ont des temps de réparation d'une trentaine de minute et la 8-oxodGuo de quelques heures. Il aurait été possible qu'une mesure limitée à 14h d'exposition nous ait fait conclure de façon erronée à l'absence de formation de ces lésions oxydatives. Ce n'est pas le cas puisque seule une augmentation de seulement d'un facteur 2 du niveau basal est observé à 2h avant de redescendre.

De telles observations d'une faible induction de cassures ont également été rapportées dans la littérature. En effet, 70 % des lésions formées dans les cellules MCF-7, lignée mammaire humaine, après 24h d'exposition à 1 ou 2 μM correspondent à des adduits stables (Kuljuka-Rabb, 2001). A l'inverse, pour des durées d'exposition plus courtes de 4h, ce sont les sites abasiques qui prédominent. Ceci est en accord avec nos résultats qui montrent un temps de latence d'environ 4h dans la formation des adduits dans A549 et HepG2 alors que la production des cassures est rapide (maximum à 2h) après exposition au B[a]P. *In vivo*, alors que les adduits dépurinants représentent 71 % des adduits totaux sur de la peau de souris traitées 4h à 20 nmol de B[a]P (Chen, 1996), pour 4 souris sur 5, exposées à 50 $\mu\text{g/g}$ par souris par injection intrapéritonéale, aucun adduit dépurinant n'est détecté dans les tissus pulmonaires 2 à 3 jours après traitement (Banasiewicz, 2004). De plus, les travaux de Marie *et al* dans les lignées cellulaires humaines HaCat, lignée de kératinocytes, et HepG2, lignées d'hépatocytes, traitées respectivement à de 100 à 400 et de 1 à 50 μM de B[a]P pendant 24h n'ont pas mis en évidence d'adduits dépurinants issus de la voie du radical cation.

Enfin, des niveaux de cassures, mesurées par la méthodes des comètes, sont comparables entre les trois lignées y compris les T24 qui ne semblent pas métaboliser le B[a]P. L'absence de métabolisation implique l'absence d'adduit. Ceci suggère fortement un impact limité des voies indirectes liées à formation d'adduits instables de différents métabolites dans la génotoxicité du B[a]P à des concentrations d'intérêt biologique.

CHAPITRE 4

EFFET D'AUTRES HAP PARTICULAIRES OU GAZEUX SUR LA LIGNEE PULMONAIRE A549

Chapitre 4 - Effet d'autres HAP particulières ou gazeux sur la lignée pulmonaire A549

Le B[a]P est le composé de référence dans l'étude de l'effet des HAP, ce qui a justifié son choix pour la caractérisation des trois lignées cellulaires. Notre ambition étant de caractériser l'effet de mélanges, il nous fallait également étudier l'impact d'autres HAP moins étudiés mais largement présents dans l'atmosphère en milieu environnemental ou industriel. Nous avons donc étudié leur cytotoxicité et leur capacité à induire leur métabolisme. Un point important a également été la mise au point du dosage de leurs éventuels adduits à l'ADN. Les HAP sélectionnés sont le Benzo[e]Pyrène (B[e]P), le Benzo[b]Fluoranthène (B[b]F), le Benzo[k]Fluoranthène (B[k]F), le Benzo[j]Fluoranthène (B[j]F), le Benz[a]Anthracène (B[a]A), le Dibenzo[a,h]Anthracène (D[a,h]A), le Benzo[g,h,i]Pérylène (B[g,h,i]P), l'Indéno[cd]Pyrène (IP), le Chrysène (Chrys), le Fluoranthène (Flua), le Pyrène (Pyr) et le Naphthalène (Naph). Les teneurs de ces HAP sont surveillées en raison de leur toxicité, de leur abondance ou leur qualité en tant que traceur de sources d'émission. Les études ont été réalisées principalement sur les A549 qui représentent, comme démontré dans la partie précédente, comme un bon modèle pulmonaire. Quelques informations complémentaires ont été acquises sur HepG2.

I. Cytotoxicité d'autres HAP sur les lignées HepG2 et A549

La cytotoxicité des HAP sélectionnés est similaire à celle du B[a]P pour la même gamme de concentrations (Figure 50). Ces HAP ont peu d'impact sur la viabilité cellulaire qui reste supérieure à 65% à l'exception du B[g,h,i]P à 2 et 5 μ M dans les HepG2 et le D[a,h]A qui diminue la viabilité cellulaire de presque 50 % pour toutes les doses dans les deux lignées.

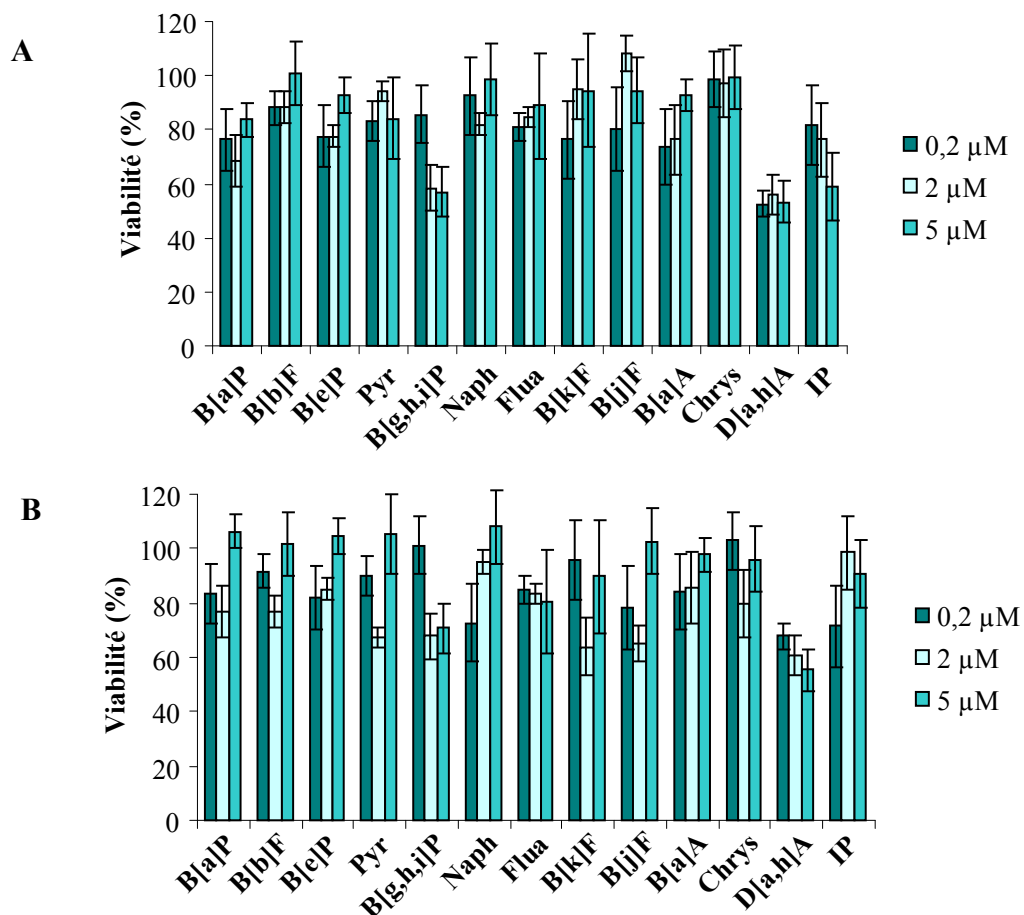


Figure 50 : Cytotoxicité des différents HAP dans les HepG2 (A) et les A549 (B) exposées à des concentrations croissantes de 0,2 à 5 µM pendant 14h

II. Métabolisme des HAP

1. Modulation de l'expression des gènes

Les cellules A549 ont été incubées avec les 13 HAP sélectionnés à des concentrations de 0,2 et 2 µM pendant 2h afin d'étudier la modulation de l'expression des gènes de métabolisation pour chaque HAP. Les gènes choisis pour le reste de ce travail sont les isoformes 1A1 et 1B1 des cytochromes P450 car ce sont les seuls gènes significativement modulés dans les A549 après exposition au B[a]P. Le temps d'exposition de 2h correspond à la durée d'incubation pour laquelle l'induction est maximale après un traitement au B[a]P. Des résultats similaires sont obtenus à 0,2 et 2 µM et sont comparables aux résultats précédents pour le B[a]P.

Parmi les HAP testés, 7 induisent significativement ($p < 0,05$) l'expression du CYP1A1 par rapport au témoin DMSO alors que le B[e]P, le B[g,h,i]P, le Flua, le Pyr et le Naph n'ont pas d'effet. Le D[a,h]A et le B[k]F augmentent le plus fortement les niveaux de transcrits du CYP1A1 avec des facteurs d'induction d'environ 40 (Figure 51). De plus, certains HAP induisent différemment le CYP1A1 par rapport au B[a]P notamment le B[b]F, le B[k]F, le B[j]F, le D[a,h]A et l'IP qui augmentent significativement ($p < 0,05$) l'expression du CYP1A1 par rapport au B[a]P. A l'inverse, le B[e]P, le B[g,h,i]P, le Chrys, le Flua, le Pyr et le Naph inhibent l'expression du gène du CYP1A1.

En ce qui concerne le gène 1B1, l'expression de celui-ci est beaucoup plus faiblement modulée que celle du 1A1 avec des facteurs d'induction plus bas. Tous les HAP, à l'exception du Pyr et du Chrys, induisent le gène du CYP1B1 par rapport au témoin avec un facteur d'induction maximum de 6,5 pour le B[j]F. Les niveaux d'ARNm du CYP1B1 sont significativement ($p < 0,05$) plus bas pour le B[e]P, le Chrys, le B[b]F, le B[g,h,i]P, le Pyr et le Naph et plus importants pour le B[j]F et l'IP par rapport au B[a]P.

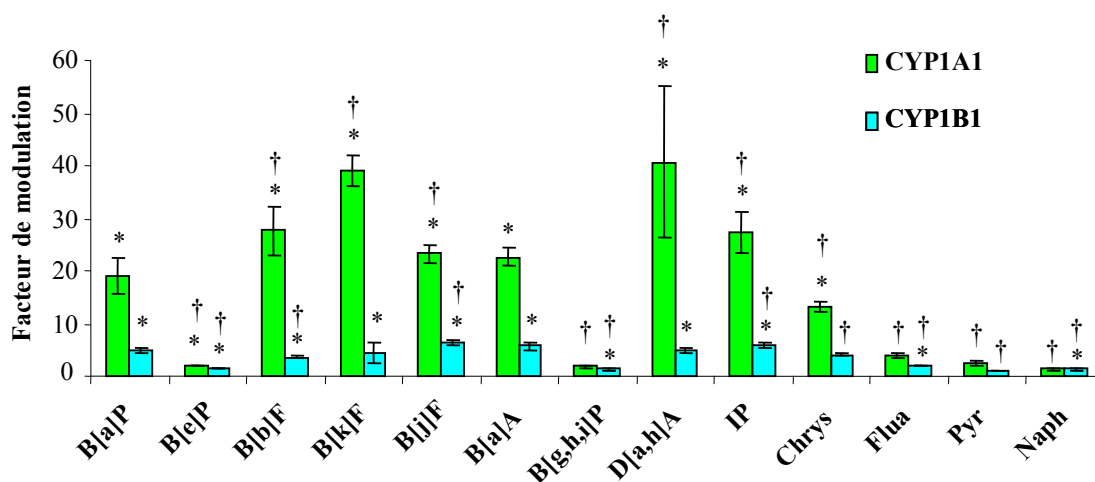


Figure 51 : Modulation de l'expression des gènes des isoformes 1A1 et 1B1 des cytochromes P450 pour les HAP seuls à 0,2 μ M pendant 2 heures par rapport au témoin DMSO 0,5% avec * une différence significative par rapport au témoin et † une différence significative ($p < 0,05$) par rapport au B[a]P à la concentration concernée

2. Modulation de l'activité EROD

L'activité des CYP450 est très différente selon les HAP considérés. Certains HAP, le D[a,h]A, le B[g,h,i]P, le Pyr et le Naph, n'induisent pas d'activité EROD détectable quelle que soit la dose testée. A 0,2 μ M, une augmentation d'activité est observée le plus

fortement pour le B[b]F, l'IP et le B[a]P de façon comparable puis, dans une moindre mesure (différence significative $p < 0,05$), pour le B[k]F et le Chrys. A 2 μM , alors que l'activité reste stable pour les HAP induisant une activité déjà détectable à 0,2 μM , une activité, inférieure à celle engendrée par le B[a]P, est mesurée pour le B[j]F et le B[a]A.

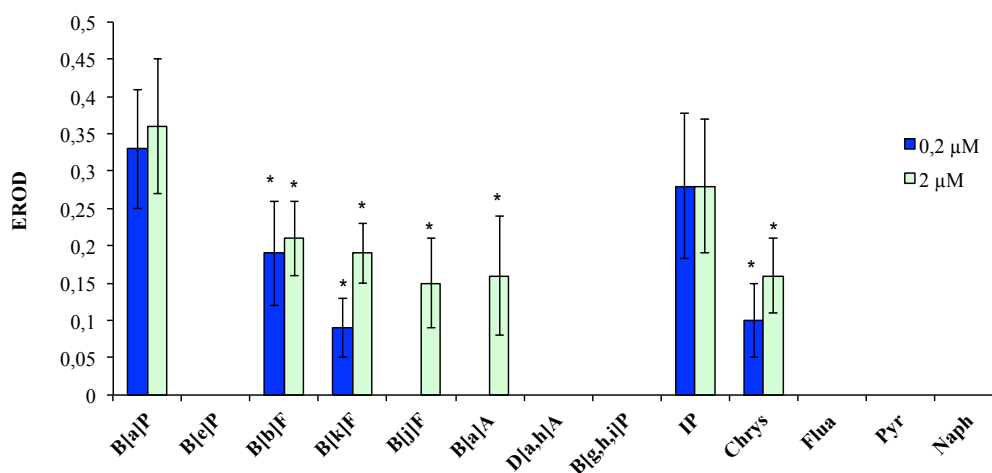


Figure 52 : Mesure de l'activité EROD (pmol/min/mg de protéines) induite par les 13 HAP d'étude dans la lignée A549 exposée 24h à 0,2 ou 2 μM de HAP avec * une différence significative ($p < 0,05$) par rapport à l'activité EROD obtenue pour le B[a]P seul à la même dose

III. Mise au point du dosage de nouveaux biomarqueurs de génotoxicité

Seul le dosage des adduits issus du B[a]P, les adduits BPDE- N^2 -dGuo, avait été mis au point au laboratoire. Les informations sur les adduits des autres HAP notamment en termes de nature mais aussi de structure sont très limitées. L'approche envisagée pour la recherche des adduits d'autres HAP que le B[a]P repose sur l'utilisation du mode perte de neutre de la spectrométrie de masse.

1. Métabolisation *in vitro* des HAP

La première méthode pour identifier les adduits d'autres HAP que ceux du B[a]P est de produire leurs métabolites via un système de métabolisation *in vitro*, et de les faire réagir avec l'ADN pour former les adduits qui pourront alors être analysés par spectrométrie de masse (HPLC-MS/MS) en mode perte de neutre (Figure 53). L'avantage de la

spectrométrie de masse est double : le mode "perte de neutre" donne la possibilité de rechercher et de caractériser les adduits, même inconnus, par la perte d'un fragment neutre correspondant à la perte du 2'-désoxyribose commun à tous les nucléosides soit un rapport m/z de 116. L'identification des adduits et l'obtention d'informations structurales permettent ensuite le développement de méthodes en mode MRM pour un dosage sensible et spécifique. Une grande différence entre ces deux types d'analyse est la sensibilité, bien meilleure en mode MRM qu'en mode perte de neutre. Dans un premier temps, la production d'adduits doit être mise au point avec le B[a]P, dont les adduits sont bien connus afin de définir les meilleures conditions de métabolisation *in vitro*, de séparation chromatographique et de réglage du spectromètre de masse pour l'optimisation de la méthode.

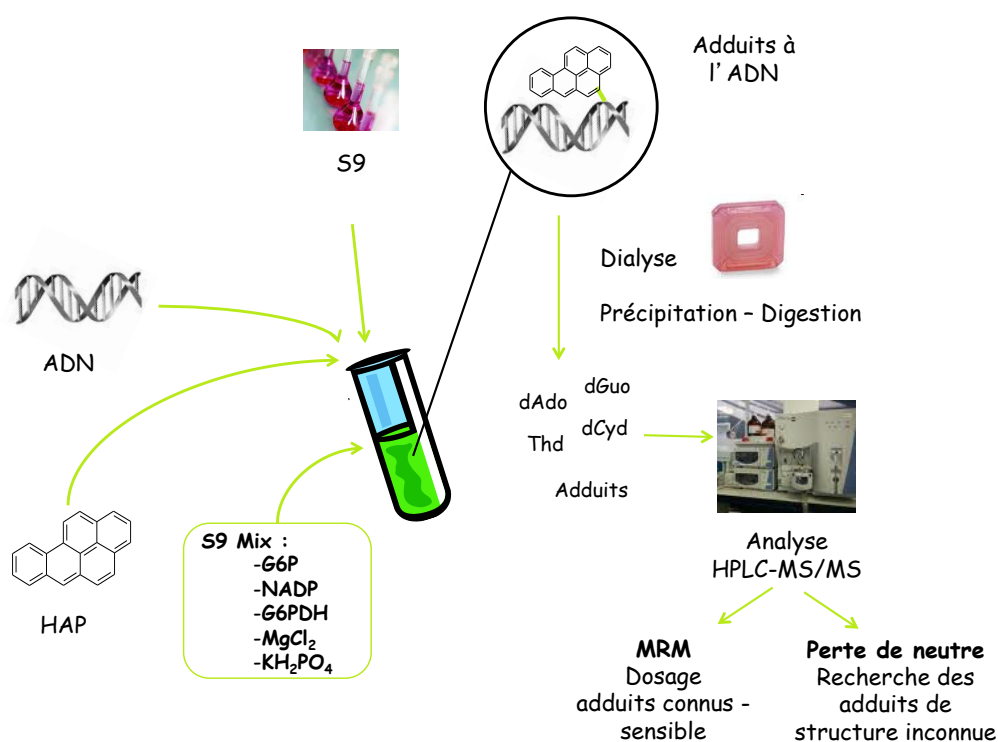


Figure 53 : Principe général de la stratégie mise en place pour la production des adduits des HAP via le S9 comme système de métabolisation *in vitro* à l'aide du B[a]P comme composé modèle.

1.1. *La fraction subcellulaire S9*

Le premier système de métabolisation mis en œuvre est la fraction subcellulaire S9. Le S9 utilisé est du S9 commercial de foie de rat obtenu après une centrifugation à 9000 g qui contient à la fois les enzymes de phase I et de phase II. Pour leur bon fonctionnement, les CYP450 ont besoin d'apport de NADPH qui va être fourni par un système de génération de NADPH. La transformation du Glucose-6-phosphate (G6P) par la Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) en présence de NADP va produire du NADPH alors disponible pour les mono-oxygénases du CYP450. De façon pratique, 100 µg d'ADN lyophilisé est repris dans 1 mL du tampon du S9 dit « S9 Mix » qui contient 3,3 mM de MgCl₂, 3,3 mM de G6P et 1,3 mM de NADP dans un tampon phosphate à pH 7,4 (100 mM) comme conseillé par le fournisseur. Par la suite, 500 µg de S9, 0,4 U de G6PDH puis 200 µM de B[a]P sont ajoutés au mélange et la réaction s'effectue pendant 4h à 37°C. La solution est ensuite centrifugée et le surnageant dialysé pendant la nuit afin d'obtenir un pH compatible avec le fonctionnement des enzymes de digestion. L'ADN est hydrolysé en monomères et les adduits BPDE-*N*²-dGuo sont analysés par HPLC-MS/MS en mode MRM afin de doser les niveaux d'adduits puis en mode perte de neutre pour vérifier que ces niveaux sont quantifiables.

Avec ce protocole, la production d'adduits est de 2,1 adduits BPDE-*N*²-dGuo/10⁶ nucléotides non modifiés comme déterminé en mode MRM. Ceci permet de confirmer que le système de métabolisation fonctionne (Figure 54). Néanmoins, cette quantité est insuffisante pour être détectée en mode perte de neutre, qui est beaucoup moins sensible que le mode MRM utilisé ici pour le dosage des adduits. De plus, la quantité d'ADN en fin de réaction est presque 10 fois moins importante que les 100 µg introduits initialement dans le mélange.

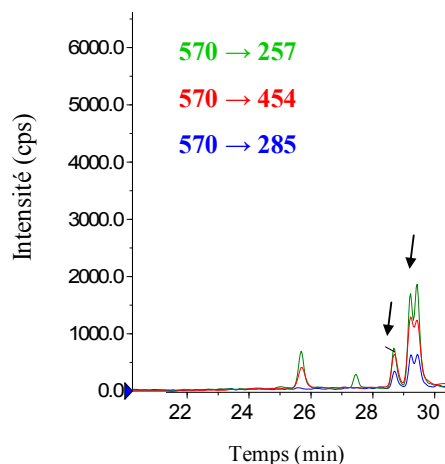


Figure 54 : Production d’adduits BPDE- N^2 -dGuo/ 10^6 nucléotides indiqués par les flèches et mesurés en HPLC-MS/MS mode MRM pour la métabolisation *in vitro* par 500 μ g de S9 de foie de rats pendant 4h en présence de 3,3 mM de G6P et 1,3 mM de NADP et 0,4 U de G6PDH dans un tampon phosphate à pH 7,4 (100 mM) et 0,2 μ M de B[a]P.

Différents paramètres ont ensuite été testés afin d’améliorer le rendement de production des adduits BPDE- N^2 -dGuo : la concentration en B[a]P, en S9, en ADN puis pour les différents acteurs du système de génération du NADPH.

La concentration en B[a]P a ensuite été optimisée en testant une gamme de 100 μ M à 2,55 mM (Tableau 18). Entre 0,2 et 1,3 mM, la concentration en B[a]P a peu d’influence sur le rendement de production des adduits. La diminution de la teneur en B[a]P diminue le rendement de production des adduits et une plus forte concentration diminue l’efficacité de la métabolisation du fait notamment de l’augmentation de la quantité de DMSO dans lequel le B[a]P est dilué. La concentration utilisée pour la suite des expériences est de 1,3 mM de B[a]P.

B[a]P (mM)	Adduits BPDE- N^2 -dGuo/ 10^6 nucléotides normaux
0,1	0,4
0,2	2,1
1,3	2,5
2,55	1,5

Tableau 18 : Gamme de concentration en B[a]P pour la métabolisation *in vitro* par 500 μ g de S9 de foie de rats pendant 4h en présence de 3,3 mM de G6P et 1,3 mM de NADP et 0,4 U de G6PDH dans un tampon phosphate à pH 7,4 (100 mM). 0,2 μ M est la dose de B[a]P utilisée initialement

Une gamme de concentration en S9 de 50 μ g à 1,5 mg dans du tampon normal ou 2X avec 1U de G6PDH n’a pas permis d’améliorer le rendement de production des adduits. Aucun

adduit n'a été détecté en perte de neutre à 50 et 200 µg. Les nombreuses optimisations testées ont été rendues difficiles par la dégradation ou la perte très importante d'ADN.

La quantité d'ADN a donc été multipliée par 10 et une cinétique de production des adduits BPDE- N^2 -dGuo de 30 min à 5h par le S9 a été réalisée afin de déterminer le temps de réaction optimal. Les niveaux d'adduits obtenus sont similaires en termes d'intensité mais la quantité d'ADN étant largement plus importante les valeurs en adduits BPDE- N^2 -dGuo/ 10^6 nucléotides normaux sont beaucoup plus faibles. Cette amélioration permet de disposer d'une quantité d'ADN suffisante pour tous les échantillons même si la quantité d'ADN finale est encore très inférieure à celle introduite initialement.

Comme présenté Figure 55, la production d'adduits mesurée en mode MRM augmente de façon linéaire pour atteindre un plateau à 4h qui représente le temps de réaction optimal.

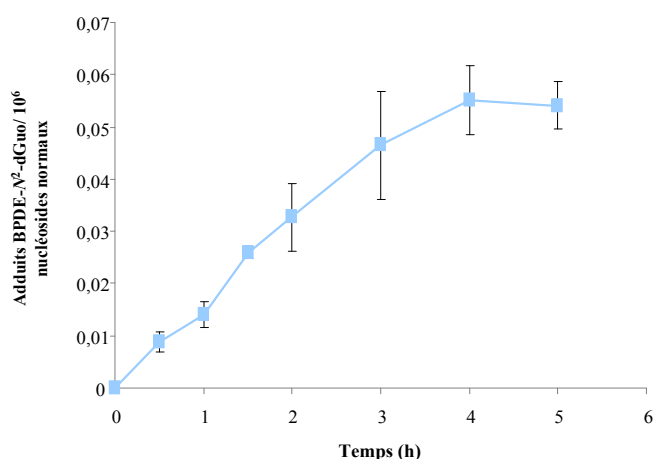


Figure 55 : Cinétique de formation des adduits BPDE- N^2 -dGuo par 500 µg de S9 de foie de rats en présence de 3,3 mM de G6P et 1,3 mM de NADP et 0,4 U de G6PDH dans un tampon phosphate à pH 7,4 (100 mM), 1,3 mM de B[a]P et 1 mg d'ADN

De nombreux tests ont ensuite été réalisés sur les concentrations des différents acteurs du système de génération dont une partie des résultats est présentée Tableau 19. L'augmentation des teneurs en G6P, NADP, G6PDH ou l'ajout de NADPH directement, afin de permettre aux CYP de démarrer l'oxydation du B[a]P immédiatement après l'ajout de celui-ci, a permis d'augmenter fortement le rendement de production des adduits BPDE mais de façon encore insuffisante pour l'analyse en perte de neutre. Enfin, la combinaison de plusieurs conditions qui ont permis d'augmenter le rendement de réaction entraîne le retour au niveau d'adduits obtenu initialement sans optimisation.

Condition	Adduits BPDE-N ² -dGuo/ 10 ⁶ nucléotides normaux
Protocole de base	0,06
G6PDH 5 U	0,3
NADP 4 mM	0,3
G6P 5 mM	0,2
NADPH 1,3 mM	0,3
G6PDH 5 U + NADP 4 mM	0,07
G6PDH 5 U + NADP 4 mM + G6P 5 mM	0,06
G6PDH 5 U + NADP 4 mM + G6P 5 mM + NADPH 1,3 mM	0,06

Tableau 19 : Tests d'optimisation du rendement de production des adduits BPDE en jouant sur les concentrations des acteurs du système de génération du NADPH. Le protocole de base correspond à la réaction de 500 µg de S9 de foie de rats en présence de 3,3 mM de G6P et 1,3 mM de NADP et 0,4 U de G6PDH dans un tampon phosphate à pH 7,4 (100 mM) et 1 mg d'ADN sur 1,3 mM de B[a]P

1.2. Les microsomes

Afin d'obtenir de plus grandes quantités d'adduits BPDE-N²-dGuo, nous avons testé un second système de métabolisation *in vitro*, les microsomes. Les microsomes commerciaux employés sont, comme pour le S9, issus de foie de rats et obtenus après une ultracentrifugation à 100 000 g. Ils correspondent à des vésicules du réticulum endoplasmique et contiennent essentiellement les enzymes de phase I en particulier les CYP450 en plus forte concentration que dans les fractions S9. Les conditions pour la métabolisation sont identiques à celles utilisées pour le S9 : 500 µg de microsomes de foie de rats en présence de 3,3 mM de G6P et 1,3 mM de NADP et 0,4 U de G6PDH dans un tampon phosphate à pH 7,4 (100 mM), 1 mg d'ADN et une exposition à 1,3 mM de B[a]P. La cinétique de formation des adduits déterminée en MRM montre (Figure 56) que les niveaux d'adduits augmentent de façon linéaire avec le temps jusqu'à atteindre un plateau après 6h de réaction pour lequel on obtient 3 fois plus d'adduits qu'avec les fractions S9 dans les mêmes conditions. Néanmoins, la détection de ces adduits n'est toujours pas réalisable en perte de neutre. Par ailleurs, mais de façon moindre qu'avec le S9, la quantité d'ADN finale est drastiquement plus faible que les 1 mg initiaux ce qui complique grandement la mise au point.

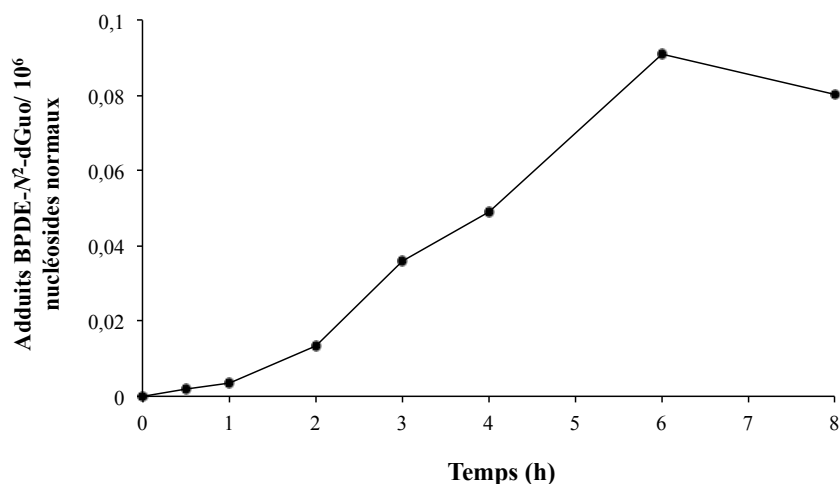


Figure 56 : Cinétique de formation des adduits BPDE- N^2 -dGuo par 500 μ g de microsomes de foie de rats en présence de 3,3 mM de G6P et 1,3 mM de NADP et 0,4 U de G6PDH dans un tampon phosphate à pH 7,4 (100 mM), 1,3 mM de B[a]P et 1 mg d'ADN

Là encore, de nombreux tests ont ensuite été réalisés dans le but d'augmenter la quantité d'adduits produits, seuls les plus caractéristiques sont présentés ici. Tout d'abord, la concentration en B[a]P optimale est de 650 μ M (Tableau 20.A) avec une production de 0,85 BPDE- N^2 -dGuo/10⁶ nucléotides normaux. Celle-ci a donc été utilisée pour les mises au point suivantes sur la concentration en microsomes et des différents acteurs du système de génération du NADPH. La réalisation d'une gamme de concentration en microsomes, de 10 μ g à 1,5 mg a permis de mettre en évidence que le meilleur rendement de production était obtenu en doublant la concentration en microsomes (Tableau 20.B). Le doublement de toutes les concentrations de G6P, G6PDH, NADP et de microsomes simultanément entraîne une diminution de la quantité d'adduits par rapport aux conditions initiales. En ce qui concerne le système de génération, une plus forte concentration en G6PDH ou G6P permet d'obtenir des niveaux plus importants d'adduits. Enfin, la combinaison de tous les facteurs optimaux, 1 mg de microsomes, 10 mM de G6P et 4 U de G6PDH, aboutit à une diminution de la formation des adduits. Malgré tous ces essais, les niveaux d'adduits sont toujours insuffisants pour être analysés en perte de neutre.

A	B[a]P (mM)	Adduits BPDE-N ² -dGuo/ 10 ⁶ nucléotides normaux
	1,3	0,2
	0,65	0,8
	0,2	0,4
	0,06	0,2

B	Microsomes (µg)	Adduits BPDE/10 ⁶ nucléotides normaux
	1500	0,2
	1000	0,8
	500	0,4
	100	0,2
	10	0,091
	1500 dans tampon 2X	0,2
	1000 dans tampon 2X	0,2

C	Condition	Adduits BPDE/10 ⁶ nucléotides normaux
	G6PDH 4 U	2,3
	NADP 4 mM	0,3
	G6P 10 mM	1,13
	NADPH 4 mM	0,3
	NADP 4 mM + NADPH 4 mM + G6P 4 mM + G6PDH 4 U	0,1
	G6PDH 4 U + G6P 10 mM + 1 mg de microsomes	0,1

Tableau 20 : Optimisations apportées au protocole de métabolisation *in vitro* avec en A l'effet de la concentration en B[a]P, en B l'effet de la concentration en microsomes et en C l'effet de la concentration des différents acteurs du système de génération du NADPH

1.3. Les HepG2 comme système de métabolisation *in vitro*

Les HepG2 représentent un bon système de métabolisation des HAP, les niveaux d'adduits atteints sont plus importants qu'avec les microsomes et leur formation est linéaire avec la dose de B[a]P appliquée. Nous avons donc décidé de réaliser des cinétiques de formation des adduits BPDE-N²-dGuo à de fortes concentrations de B[a]P de 20, 50 et 100 µM. Le niveau maximal d'adduits est atteint à 24h pour une exposition à 20 µM avec une bonne viabilité des cellules contrairement aux plus fortes concentrations de 50 et 100 µM (Figure 57). Le niveau d'adduits diminue après 24h d'exposition à 20 µM et la cytotoxicité devient trop importante. On obtient un meilleur rendement avec les HepG2 puisque les quantités d'adduits obtenues sont 10 fois plus élevées qu'avec les microsomes. Néanmoins et après plusieurs tests notamment sur le nombre optimal de cellules, la quantité d'adduits BPDE-N²-dGuo est toujours insuffisante pour être détectée en spectrométrie de masse en mode « perte de neutre ».

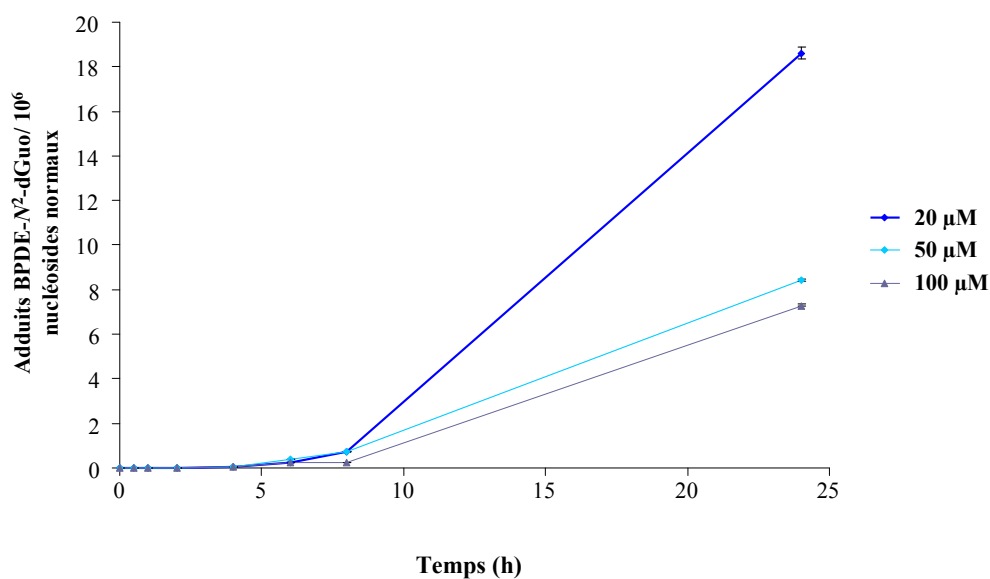


Figure 57 : Mesure des adduits BPDE- N^2 -dGuo dans les cellules HepG2ensemencées à raison de $12 \cdot 10^6$ cellules dans des T175 cm^2 en triplicats exposées 24h après à 20, 50 ou 100 μM pendant 24h

2. Recherche des adduits des diol-époxydes et triol époxydes sur la dGuo

La quantité d'adduits formés n'est pas suffisante pour une caractérisation chimique complète d'adduits inconnus d'autres HAP que le B[a]P, compte tenu de la sensibilité du mode de détection utilisé. Toutes les conditions ont été analysées en perte de neutre. Néanmoins, l'utilisation de ce mode pour rechercher les adduits inconnus ne semble pas être applicable aux HAP puisque que même le B[a]P, considéré comme le HAP qui entraîne le plus fort taux d'adduits parmi nos HAP d'intérêt, ne donne pas un signal suffisant. Pour pallier ces difficultés, une stratégie différente a été mise en place. La démarche consiste à rechercher les adduits des différents HAP en utilisant l'HPLC-MS/MS dans son mode le plus sensible, le mode MRM, en réalisant des hypothèses de structures basées sur une étude bibliographique. D'après la littérature, les adduits majoritairement documentés et formés sont les adduits issus des métabolites du type diol-époxydes et pour certains HAP, comme le B[b]F, de triol époxydes. Ce sont donc ces adduits que nous avons recherchés en HPLC-MS/MS après métabolisation *in vitro* des HAP individuellement à 10 μM par les microsomes en présence d'ADN et du système de génération du NADPH pendant 6h. Par ailleurs, nous avons choisi de rechercher les adduits formés avec la base Guanine dans l'ADN car ils sont à la fois les plus référencés dans la littérature mais aussi les adduits majoritaires formés avec le B[a]P (Marie, 2008). Les transitions suivies en

masse dans son mode MRM sont présentées Tableau 21 et correspondent à la perte du sucre, donc une m/z de 116.

HAPs	Masse HAPs	Adduit diol époxyde-dGuo [M + H] ⁺ → [M - 116+H] ⁺ (m/z)	Adduit triol époxyde-dGuo [M + H] ⁺ → [M - 116+H] ⁺ (m/z)
B[a]P, B[e]P, B[b]F, B[k]F, B[j]F	252	570 → 454	586 → 470
B[a]A, Chrys	228	546 → 430	562 → 446
B[g,h,i]P	278	594 → 480	612 → 496
D[a,h]A, IP	276	596 → 478	610 → 494
Flua, Pyr	202	520 → 404	536 → 420
Naph	128	446 → 330	462 → 346

Tableau 21 : Fragmentations recherchées par spectrométrie de masse en tandem en mode MRM pour les adduits des diol et triol époxydes avec la dGuo après métabolisation *in vitro* de HAP par des microsomes de foie de rat

Une série de nouveaux adduits a pu être mise en évidence pour les diol-époxydes du B[b]F, B[k]F, B[j]F, B[a]A, D[a,h]A et Chrys qui représentent des HAP classés 2A ou 2B par le CIRC. Néanmoins, aucun adduit généré par les triol époxydes avec la dGuo n'a été détecté. Afin de mettre au point le dosage de ces nouveaux adduits, d'autres transitions similaires à celles utilisées pour l'analyse des adduits BPDE-*N*²-dGuo ont été recherchées pour ces 6 adduits. Ces transitions sont présentées Tableau 22.

HAPs	[M + H] ⁺ → [M - 116+H] ⁺ (m/z)	[M + H] ⁺ → [HAPDE - H ₂ O] ⁺ (m/z)	[M + H] ⁺ → [HAPDE - H ₂ O-CO] ⁺ (m/z)
B[a]P, B[b]F, B[k]F, B[j]F	570 → 454	570 → 285	570 → 257
B[a]A, Chrys	546 → 430	546 → 261	546 → 230
D[a,h]A	596 → 478	596 → 311	595 → 283

Tableau 22 : Transitions recherchées par spectrométrie de masse en tandem en mode MRM pour les adduits diol-époxydes-dGuo identifiés après métabolisation *in vitro* de HAP par des microsomes de foie de rat

Les trois transitions sont observées pour tous les adduits analysés (Figure 58). A noter la présence de pics inconnus, présents déjà dans les échantillons d'ADN exposés seulement au système de métabolisation sans HAP.

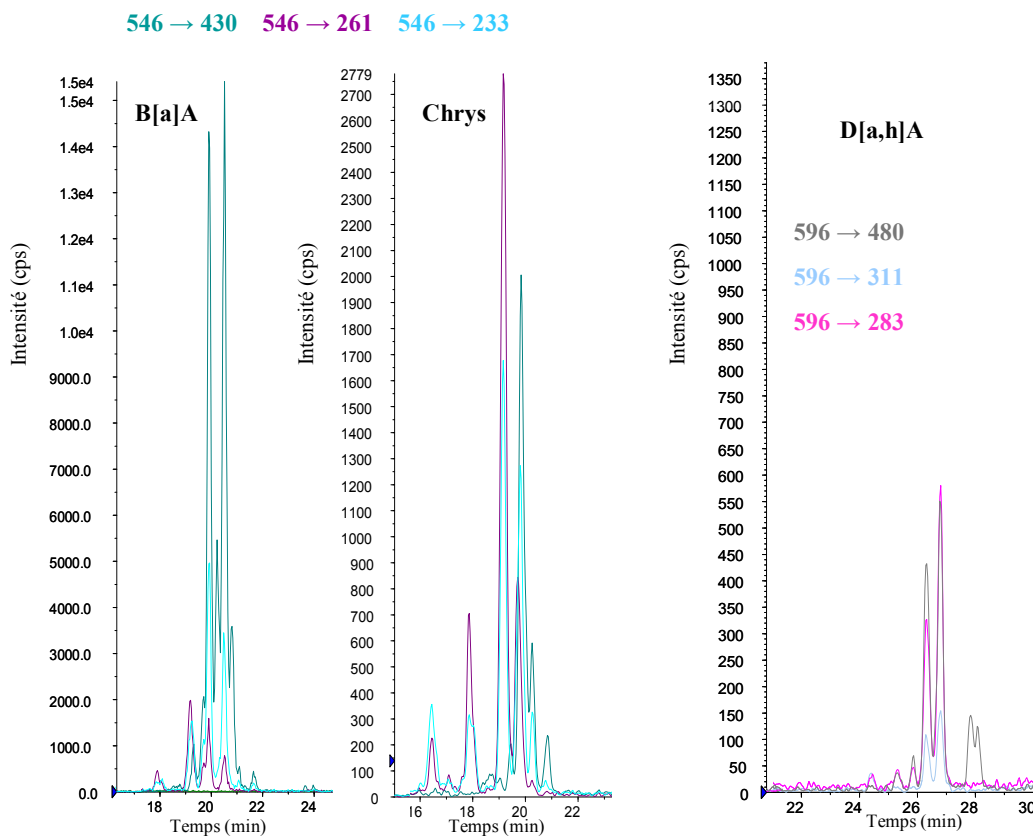
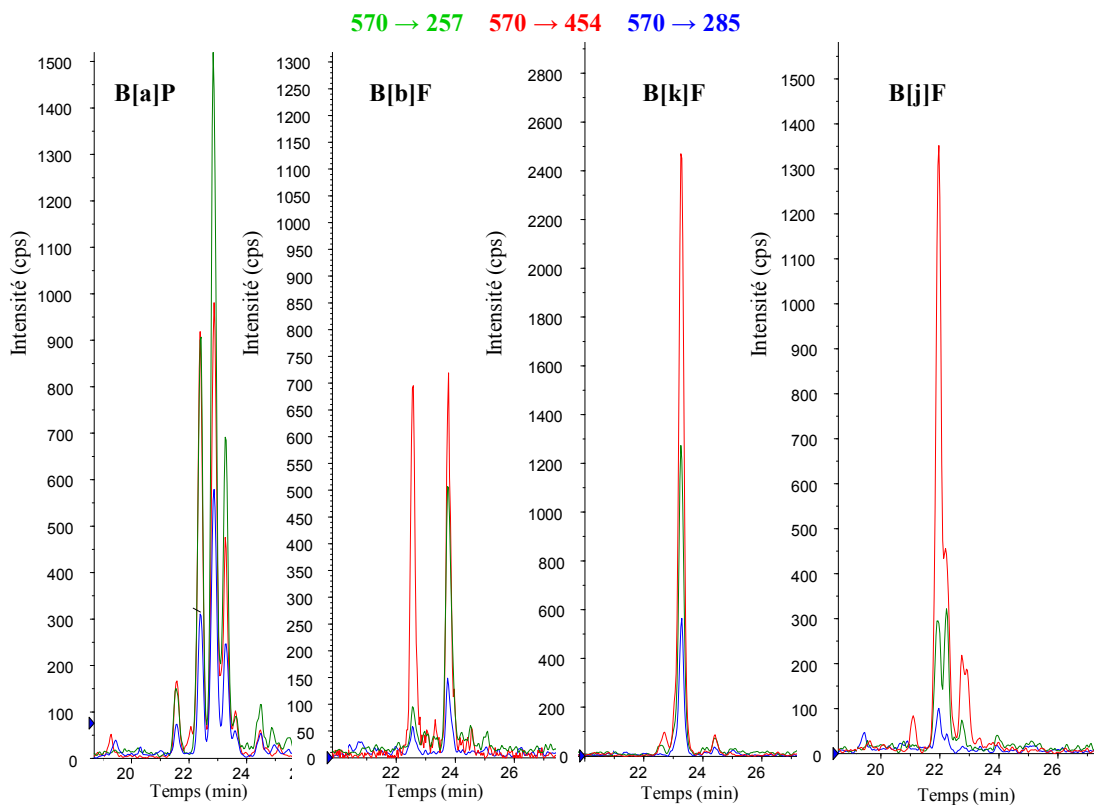


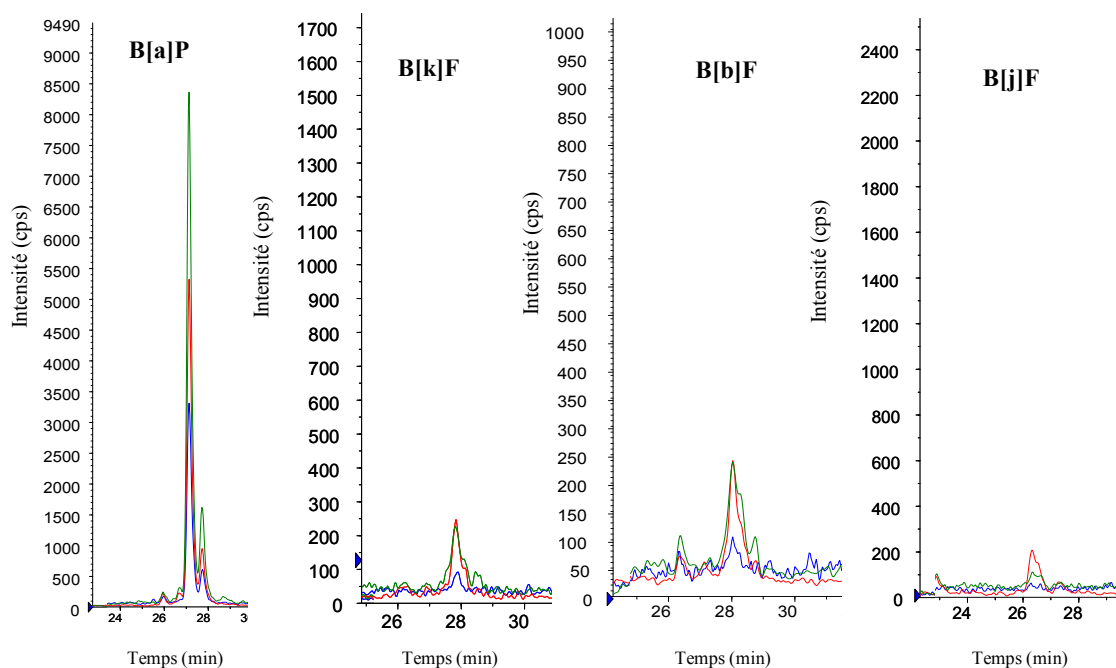
Figure 58 : Chromatogrammes obtenus en MS/MS pour les adduits diol-époxydes-dGuo du B[a]P, B[b]F, B[k]F, B[j]F, B[a]A, Chrys et D[a,h]A via la métabolisation *in vitro* par les microsomes de foie de rats

3. Recherche des adduits des diol-époxydes-dGuo identifiés dans la lignée HepG2

Les adduits diol-époxydes-dGuo ont ensuite été recherchés dans les cellules HepG2 exposées pendant 24h aux différents HAP à 20 μ M. Ces conditions ont été choisies car elles correspondent à la quantité maximale d'adduits BPDE- N^2 -dGuo obtenus pour les HepG2 lors de l'expérimentation à forte concentration de B[a]P, le but n'étant pas d'être réaliste en terme d'exposition mais de savoir si ces adduits sont formés dans cette lignée cellulaire qui représente un bon modèle de métabolisation. La quantification des différents adduits a été réalisée par comparaison avec la courbe de calibration du détecteur réalisée pour les adduits BPDE- N^2 -dGuo.

Tous les adduits identifiés grâce aux microsomes sont détectés dans la lignée HepG2 sous forme d'un pic unique à l'exception du B[b]F et du D[a,h]A pour lesquels on observe deux pics (Figure 59). A cette concentration, le B[a]P génère davantage d'adduits que les autres HAP. Par ailleurs, les adduits du B[a]P, B[b]F, B[k]F et B[j]F ont des temps de rétention extrêmement proches de ceux du B[a]P. La même observation peut être faite pour les adduits du Chrys et du B[a]A.

570 → 257 570 → 454 570 → 285



546 → 430 546 → 261 546 → 233

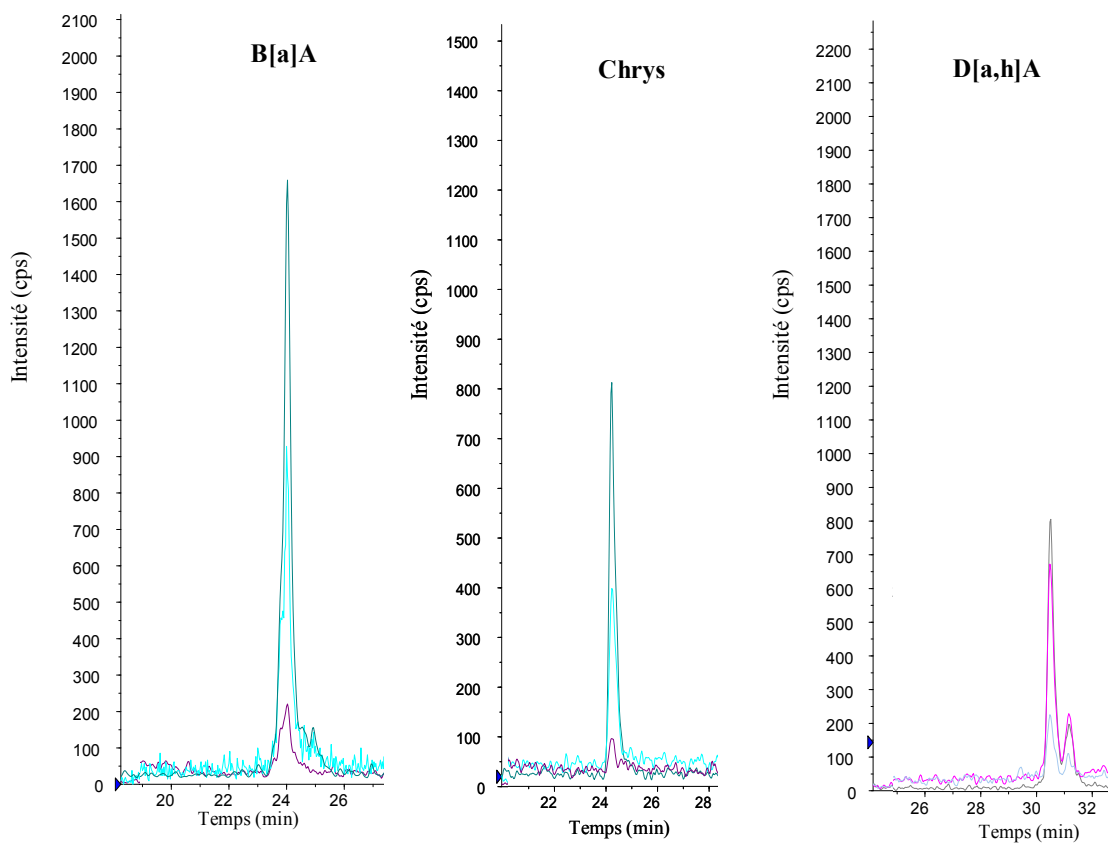


Figure 59 : Chromatogrammes obtenus en MS/MS pour les adduits diol-époxydes-dGuo du B[a]P, B[b]F, B[k]F, B[j]F, B[a]A, Chrys et D[a,h]A dans la lignée HepG2 exposées 24h à 20 μ M de chaque HAP

Les niveaux d'adduits rapportés à la quantité de bases normales pour les 6 HAP sont comparables mais significativement ($p < 0,05$) plus bas que ceux détectés pour le B[a]P à la même dose (Figure 60). La calibration est faite ici par référence à l'adduit BPDE- N^2 -dGuo.

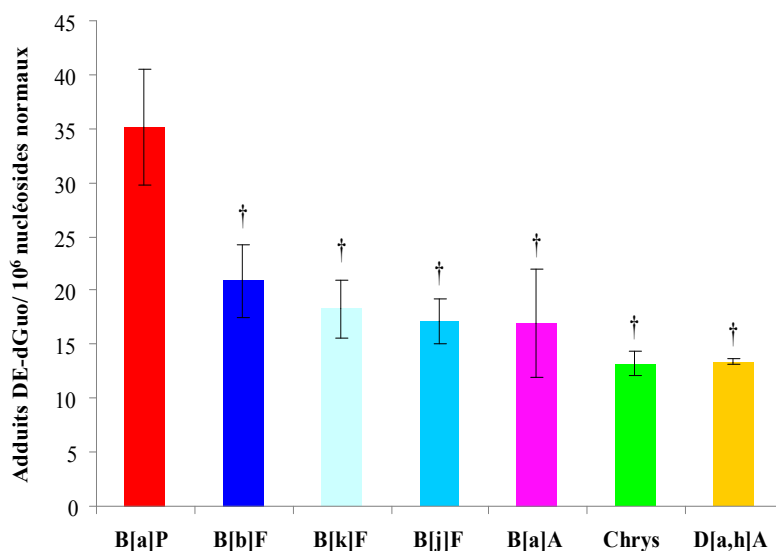


Figure 60 : Analyse des adduits diol-époxyde-dGuo par HPLC-MS/MS dans les HepG2 exposées aux différents HAP à 20 μ M pendant 24h. † : différence significative ($p < 0,05$) par rapport au B[a]P à la concentration concernée

4. Recherche et dosage des adduits des diol-époxydes-dGuo identifiés dans les A549

La même expérience a été réalisée pour les A549 pour une exposition à 20 μ M pendant 24h mais aucun adduit n'a été détecté à l'exception de l'adduit BPDE- N^2 -dGuo. Après augmentation du nombre de cellules de $10 \cdot 10^6$ à $40 \cdot 10^6$ cellules, les adduits de 5 des HAP ont été détectés dans les A549 exposées 16h à des concentrations croissantes des 6 HAP d'intérêt de 0,1 à 5 μ M (Figure 61). En effet, seuls les adduits diols époxyde-dGuo du D[a,h]A ne sont détectés à aucune des doses testées. Les niveaux de ces adduits sont inférieurs à ceux observés pour le B[a]P.

De plus, alors que les adduits issus du B[b]F et du B[k]F sont détectés à partir de 0,2 μ M, les adduits générés par le B[j]F, le B[a]A et le Chrys ne sont mesurables qu'à partir de 1 μ M. A partir de 1 μ M, le B[b]F génère le plus d'adduits suivi du B[k]F et du B[j]F et à un plus faible niveau, le B[a]A et le Chrys.

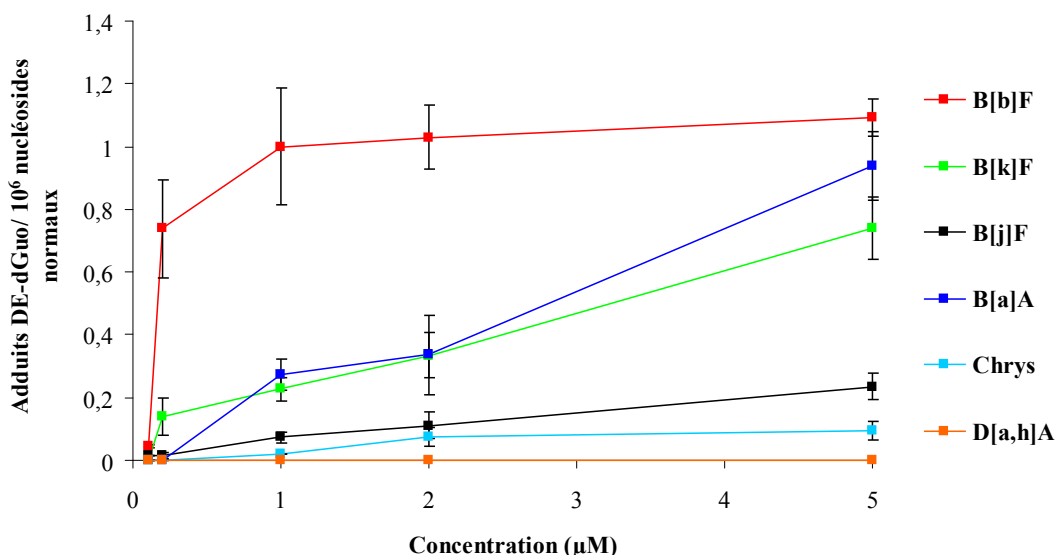


Figure 61 : formation des adduits diol-époxyde-dGuo par HPLC-MS/MS dans les A549 exposées 16h à des concentrations croissantes des différents HAP de 0,1 à 5 μM

De la même façon que pour les HepG2, tous les adduits identifiés sont sous forme d'un pic unique à l'exception du B[b]F pour lequel on observe deux pics. De même, les adduits du B[a]P, B[b]F, B[k]F et B[j]F ont des temps de rétention extrêmement proches voire identiques, de la même façon que les adduits du Chrys et du B[a]A sont de même masse. Malgré toutes les optimisations du gradient de séparation chromatographique en HPLC, les adduits de m/z 570 sont élués dans la même fenêtre de temps ainsi que les adduits de m/z 546.

5. Mise au point et recherche des adduits des quinones

Une étude bibliographique a permis d'identifier les adduits majoritairement formés *in vitro* (Balu, 2004) ou dans la lignée A549 (Huang, 2013, Huang, 2012) à la suite d'une exposition directe à la 7,8-dione-B[a]P. Les structures de ces adduits sont présentées Figure 63.

De la même façon que pour les hypothèses structurales utilisées pour les adduits des diols époxydes, les différentes masses théoriques des adduits ont été calculées pour chaque HAP et la transition suivie en spectrométrie de masse correspond à la perte du sucre (Tableau 23).

HAPs	Masse HAPs	Adduit quinone-dGuo [M + H] ⁺ → [M - 116+H] ⁺ (m/z)	Adduit triol quinone-dAde [M + H] ⁺ → [M - 116+H] (m/z)
B[a]P, B[e]P, B[b]F, B[k]F, B[j]F	252	566 → 450	550 → 434
B[a]A, Chrys	228	542 → 426	526 → 410
B[g,h,i]P, IP	276	590 → 474	574 → 458
D[a,h]A	278	592 → 476	576 → 460
Flua, Pyr	202	516 → 400	500 → 384
Naph	128	442 → 326	426 → 310

Tableau 23 : Transitions suivies correspondant à la perte du sucre (m/z 116) par les adduits potentiels *o*-quinone-dGuo ou dAde des différents HAP d'intérêt en spectrométrie de masse en tandem en mode d'ionisation positive

Aucun adduit issu de la voie des *o*-quinones n'a été détecté dans les cellules HepG2 exposées 24h à 20 µM de chaque HAP ou les A549 exposées aux différents HAP de 0,1 à 10 µM pendant 14h.

IV. Discussion : adduits à l'ADN de HAP purs autre que le B[a]P

Une fois le modèle A549 validé, la suite de ce travail consistait à l'étude des mélanges de HAP. Il était donc nécessaire de pouvoir mesurer les adduits d'HAP autres que ceux du B[a]P. Pour cela, la préparation de standards était indispensable. Les HAP étant des procarcinogènes (IARC, 2010, WHO, 1998, Shimada, 2006a, Xue, 2005), la formation des adduits *in vitro* ne peut donc pas consister à juste mettre en présence le HAP et l'ADN mais nécessite une étape de métabolisation préalable.

La stratégie générale mise en œuvre dans ce travail est inspirée des tests de génotoxicité réglementaires comme le test d'Ames ou l'HPRT (OCDE, 1997a, OCDE, 1997b) mais aussi de différents travaux qui utilisent la métabolisation via la fraction subcellulaire S9, classiquement issue de foie de rats, pour détecter ensuite les adduits des différents HAP par la méthode au ³²P (Binkova, 2007, Fuchs, 1993b, Hall, 1988, Hughes, 1993, King, 1994,

Lecoq, 1991b, Mlcoch, 1993). Après métabolisation et hydrolyse de l'ADN en monomères, l'utilisation du mode perte de neutre de la spectrométrie de masse en tandem devait permettre de cribler de façon la plus exhaustive possible les adduits des différents HAP, en suivant la perte du sucre par les nucléosides modifiés. Cette approche devait permettre d'en déterminer ensuite la nature et la structure, ce qui n'est pas fait par la technique du ^{32}P . La limitation la plus importante de cette stratégie est le manque de sensibilité du mode perte de neutre par rapport au mode MRM classiquement utilisé pour les dosages en HPLC-spectrométrie de masse. Néanmoins, pour pouvoir utiliser ce mode MRM, on doit disposer des structures et des masses des molécules d'intérêt alors que la perte de neutre permet d'identifier des adduits inconnus.

Les différents systèmes de métabolisation testés (S9, microsomes et HepG2) n'ont pas permis, malgré la modification de nombreux paramètres, de produire des niveaux d'adduits suffisants avec le B[a]P pour la détection des adduits en perte de neutre. La perte d'une grande quantité d'ADN au cours de la métabolisation *in vitro* a fortement limité le niveau d'adduits produits. Cette perte peut être due, d'une part, aux nombreuses étapes de purification et à l'interaction éventuelle des protéines avec l'ADN qui éliminées en même temps que celles-ci notamment au cours des centrifugations. D'autre part, une oxydation importante via la forte activité catalytique des CYP450 pourrait être à l'origine d'une fragmentation importante de l'ADN, celui-ci serait ensuite éliminé au cours des différentes étapes de purification des adduits.

La plus grande sensibilité de la détection au ^{32}P explique probablement la détection possible des adduits après métabolisation avec le S9. Par ailleurs, différents travaux rapportent l'utilisation de l'HPLC-MS/MS dans son mode perte de neutre pour identifier les adduits des HAP. En effet, Singh *et al* (Singh, 2010) analysent la formation des adduits des diol-époxydes du B[b]F, DB[a,l]PD, D[a,h]A et B[a]P avec l'adénine, la guanine ou la cytosine en utilisant notamment la perte du fragment neutre 116 par les adduits formés et le mode perte de neutre. Les différences majeures de ce travail par rapport à notre stratégie initiale est, tout d'abord, l'absence de métabolisation préalable car la production des adduits par cette équipe repose sur l'utilisation de diol-époxydes synthétisés chimiquement et la détection exclusive des adduits des diol-époxydes. La mise en œuvre de diol-époxydes synthétisés chimiquement permet d'obtenir des quantités d'adduits plus importantes pouvant être analysées en perte de neutre. L'emploi du mode perte de neutre a également

été rapporté par Compagnone *et al* (Compagnone, 2011) pour détecter les adduits formés par le BPDE en présence des nucléosides et des photoproduits du B[a]P. De la même façon, les rendements de production d'adduits sont beaucoup plus importants de par l'absence de métabolisation *in vitro*.

L'emploi du mode perte de neutre pour le criblage des adduits des HAP après métabolisation *in vitro* semble compromis par la sensibilité limitée de ce mode de détection et paraît donc peu adapté à la recherche d'adduits nouveaux sans *a priori*.

La connaissance de la structure des adduits permet d'utiliser directement le mode MRM de la spectrométrie de masse qui est plus sensible. Malgré le peu ou l'absence de données sur la nature et la structure des adduits pour certains HAP dans la littérature, la plupart des adduits documentés concernent les adduits de la voie des diol-époxydes sur la guanine. Nous avons mis en évidence ce type d'adduits pour le D[a,h]A, le B[b]F, le B[k]F, le B[j]F, le B[a]A et le Chrys après métabolisation *in vitro* de ces HAP par des microsomes de foie de rat.

Il est intéressant de noter que les adduits détectés par cette approche correspondent aux HAP classés 2A (D[a,h]A) ou 2B par le CIRC. Cependant, nous ne détectons pas d'adduit issus de l'IP et du Naph classés également 2B. Différentes études toxicologiques réalisées sur le Naph, récemment classé 2B, montrent que celui-ci exercerait sa toxicité sous la forme de quinones notamment via la 1,2-naphtoquinone (Brusick, 2008a, Brusick, 2008b), ce qui expliquerait qu'on ne détecte pas d'adduit issu de la voie des diol-époxydes. Des adduits générés par l'IP ont été mesurés par analyse au ³²P dans les cellules HEL ou HepG2, mais les quantités dosées sont relativement faibles (Binkova, 2004, Sevastyanova, 2007, Topinka, 1998). Il ne s'agit pas forcément d'adduits issus de la voie des diols époxydes sur la dGuo, d'autant plus que la structure de cet adduit n'est pas rapportée dans la littérature.

Par ailleurs, les adduits du B[g,h,i]P, un HAP pourtant classé dans le groupe 3 par le CIRC, ont été détectés dans des cellules en culture HEL en utilisant la méthode de détection au ³²P (Binkova, 2004, Sevastyanova, 2007). Les adduits issus du Flua, également classé dans le groupe 3, sont détectés dans hépatocytes primaires de poisson traités avec de fortes concentrations de 50 et 100 µM en Flua (Wessel, 2012) et chez le rat au niveau des poumons et du foie (Gorelick, 1989) mais pas dans la lignée HepG2 exposée 6h à 30 µM à (Staal, 2006). L'adduit majoritaire généré par le Flua serait issu de la liaison du diol-

époxyde en N^2 de la dGuo (Gorelick, 1989). On peut supposer que ces adduits sont produits en faible quantité et donc que leur détection ne peut être réalisée que par l'utilisation du ^{32}P , même s'il ne donne cependant pas d'informations sur la nature exacte de ces adduits. De plus, les adduits du Flua sont détectés pour de fortes concentrations. Enfin, l'absence d'adduits observée pour le Pyr et le B[e]P dans nos études est en accord avec la littérature qui ne recense pas d'adduit issu de ces deux composés (IARC, 2010).

Ces observations faites avec un système de métabolisation reconstitué sont également en accord avec les Facteurs d'Equivalence Toxique (FET) utilisés afin d'évaluer le risque lié aux mélanges de HAP. En effet, les adduits détectés sont issus des HAP avec les valeurs de FET les plus importantes de 1 pour le D[a,h]A ou de 0,1 pour le B[k]F, le B[b]F ou le B[a]A dans la table de l'INERIS. Le B[j]F n'est pas classé dans la table de l'INERIS (INERIS, 2003 Novembre) ou celle de Nisbeth et Lagoy (Nisbet, 1992) mais Malcolm et Dobson lui ont attribué un FET de 0,05 identique à celui du B[k]F (Malcolm, 1994). Enfin, le B[g,h,i]P et le Flua ont les FET les plus faibles, de 0,01 et 0,001 respectivement, dans la classification de l'INERIS, en accord avec l'absence d'adduit. Les FET sont en accord avec nos résultats quant à la formation d'adduits par la voie des diol-époxydes pour les HAP seuls lors d'une métabolisation *in vitro*. Ceci est dû au fait que la détermination de ces FET est en partie basée sur des études de génotoxicité mettant en jeu la production d'adduits après métabolisation des HAP par des microsomes.

Nous avons également mis en évidence des adduits des diol-époxydes, non seulement en utilisant des systèmes de métabolisation reconstitués, mais aussi dans les cellules en culture HepG2 et A549. Les adduits retrouvés au niveau cellulaire sont les mêmes que ceux identifiés avec les microsomes. Une exception est l'adduit du D[a,h]A qui n'est pas retrouvé dans les A549, un niveau plus faible de cet adduit que celui du BPDE- N^2 -dGuo étant aussi observé dans les HepG2. Pour les A549, les HAP peuvent être classés en fonction des niveaux d'adduits générés selon l'ordre suivant B[a]P >> B[b]F > B[k]F \approx B[a]A > B[j]F > Chrys. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Binkova *et al* sur la lignée HEL (Binkova, 2004). En effet, les quantités les plus importantes d'adduits sont retrouvées pour le B[a]P, puis de façon plus faible, pour le B[b]F, le B[k]F et le B[a]A puis le Chrys et enfin pour le D[a,h]A suivi de l'IP et du B[g,h,i]P. La détection des adduits du D[a,h]A, de l'IP et du B[g,h,i]P dans ces travaux et non dans les nôtres est probablement due à l'utilisation du ^{32}P , plus sensible que l'HPLC-MS/MS, bien que, la

nature de ces adduits n'étant pas précisée, il ne s'agit pas forcément d'adduits issus de la voie des diol-époxydes.

De façon similaire aux adduits obtenus après métabolisation *in vitro* par les microsomes, ces résultats sont en accord avec les FET et la classification du CIRC. Les adduits produits en plus grande quantité sont issus des HAP classés 2B ou avec un FET important de 0,1. La valeur plus basse du FET du Chrys de 0,01, également classé cancérigène probable, est en accord avec des niveaux d'adduits plus faibles que pour les autres HAP. Deux exceptions, sont l'IP, classé 2B par le CIRC, pour lequel aucun adduit n'est détecté mais surtout le D[a,h]A, classé 2A, dont les adduits sont détectés dans les HepG2 à des niveaux comparables à ceux des adduits des autres HAP (sauf du B[a]P) mais pas dans les A549. La valeur de FET de 1 du D[a,h]A est similaire à celle du B[a]P voire supérieure dans la table de Nisbeth et Lagoy qui lui attribuent un FET de 5 (INERIS, 2003 Novembre, Nisbet, 1992). L'approche par les FET n'est donc pas assez précise et ne prédit pas de façon complètement correcte la génotoxicité des HAP en termes de génération d'adduits. Cette approche globale néglige les différences entre les organes et leur métabolisation spécifique qui entraîne une toxicité différente des HAP suivant le tissu considéré.

D'un point de vue mécanistique, la différence dans la formation des adduits par les différents HAP peut être expliquée de différentes façons. Tout d'abord, l'affinité de liaison des différents HAP au récepteur Ah conditionne l'induction des CYP450 même si elle n'est pas nécessairement en accord avec l'activité EROD mesurée dans notre travail. Cette affinité serait fonction de la planarité du HAP, de sa taille et de la présence d'une région baie (Pushparajah, 2008a).

Le Pyr, le Naph, le B[g,h,i]P ou le Flua ont très peu ou pas d'affinité pour AhR (Pushparajah, 2008a, Till, 1999), une capacité d'induction du CYP1A1 faible et aucune activité EROD n'est détectée après traitement par ces HAP, ce qui pourrait expliquer l'absence de formation d'adduit des diols époxyde. A l'inverse, le B[k]F, le D[a,h]A, le B[b]F ou encore le B[j]F présentent une plus forte affinité pour AhR que le B[a]P et induisent de façon plus importante le CYP1A1, en accord avec nos résultats et différents travaux (Bosveld, 2002, Machala, 2001, Pushparajah, 2008a, Shimada, 2003, Staal, 2006, Staal, 2007, Till, 1999). Ces capacités d'induction de la métabolisation peuvent expliquer la formation d'adduits par ces HAP. L'explication semble moins directe pour le Chrys qui présente une affinité plus faible pour AhR et induit moins le CYP1A1 que le B[a]P dans

nos deux lignées cellulaires d'étude, A549 et HepG2. Pourtant, des adduits sont observés également pour le Chrys dans les HepG2, et dans une moindre mesure, dans les A549.

Néanmoins, les considérations sur l'expression des gènes de métabolisation n'expliquent pas de façon quantitative les niveaux d'adduits observés dans les A549, en particulier que ces derniers soient plus faibles pour tous les HAP que pour le B[a]P. A l'inverse, la formation d'adduits est plus en accord avec la mesure de l'activité EROD. En effet, le B[k]F, le B[b]F et le B[a]P pour lesquels une activité EROD est détectée à 0,2 μM forment des adduits des diol-époxydes dès 0,2 μM , alors que le B[a]A, le Chrys et le B[j]F, pour lesquels on ne détecte une activité EROD qu'à 2 μM ne génèrent des adduits qu'à partir de 1 μM . Néanmoins, cette relation entre activité EROD et adduit n'est pas mise en évidence pour le Chrys. Par ailleurs, la différence observée entre l'induction du CYP1A1 et l'activité EROD peut en partie être expliquée par leur capacité d'inhibition des CYP450 qui joue probablement un rôle important dans la métabolisation des HAP en diol-époxydes. L'exemple le plus évident est le cas du D[a,h]A qui est un bon inducteur du CYP1A1 mais pour lequel aucune activité EROD n'est détectée dans les A549 aux deux doses d'exposition testées. En effet, le D[a,h]A est un inhibiteur fort et spécifique de la forme 1B1, un CYP fortement induit dans A549, avec une IC_{50} (Inhibition Concentration 50) de 5,2 nM (Shimada, 2006b). Une inhibition plus importante de l'EROD dans les A549 pourrait conduire à des niveaux de métabolisation du D[a,h]A plus bas et par conséquent à des niveaux non détectables d'adduit voire leur absence de formation ce qui expliquerait à la fois l'absence d'adduit diol-époxyde dans les A549 mais aussi la différence observée avec les HepG2.

De plus, on peut également imaginer que la voie des *o*-quinones est plus importante pour certains HAP que pour le B[a]P. Il faut noter cependant que cette voie est souvent proposée comme induisant un stress oxydant alors qu'aucune augmentation des cassures n'est observée avec les 9 HAP testés à 1 μM dans les HepG2 pour une exposition de 14h (Tarantini, 2011b). Afin d'évaluer la contribution de la voie des *o*-quinones dans la génotoxicité des HAP, les adduits stables des *o*-quinones avec l'adénine ou la guanine ont été recherchés dans les cellules en culture mais aucun adduit n'a été détecté dans les lignées A549 et HepG2. Pourtant, la formation d'adduits de la 7,8-dione-B[a]P avec l'adénine et la guanine a été rapportée dans les A549 par Huang *et al* après exposition des cellules directement à la *o*-quinone (Huang, 2013, Huang, 2012).

CHAPITRE 5

IMPACT DE MELANGES SYNTHETIQUES SUR LA LIGNEE A549

Chapitre 5 - Impact de mélanges synthétiques sur la lignée A549

Comme nous l'avons déjà souligné, l'évaluation du risque lors de l'exposition aux mélanges de HAP repose sur l'approche des TEF, basée sur un effet additif. Pour estimer les limites de ce modèle, nous avons exposé les A549 à des mélanges synthétiques, d'abord binaires puis plus complexes, représentant la fraction HAP de mélanges réels.

I. Métabolisme et génotoxicité de mélanges binaires de HAP

Dans le même esprit qu'une étude réalisée précédemment au laboratoire, nous avons étudié comment l'ajout d'un second HAP modifiait la réponse au B[a]P des cellules, et notamment la génotoxicité. Ce dernier pan de l'étude s'est focalisé sur les adduits car peu de stress oxydant a été mis en évidence avec le B[a]P seul. De plus, les études sur HepG2 n'ont montré que peu d'effet des mélanges de HAP sur l'induction de cassures et de sites alcali-labiles analysés par la méthode des comètes (Tarantini, 2011b).

1. Cytotoxicité des mélanges binaires

De façon générale, la cytotoxicité du B[a]P est faiblement modulée par les autres HAP en mélanges binaires équimolaires à 1 μ M dans les deux lignées à l'exception du D[a,h]A et du B[k]F pour les A549 ($p < 0,05$). La viabilité minimale est de 54 % pour les A549 exposées 14h au mélange B[a]P/D[a,h]A. La lignée pulmonaire semble être légèrement plus sensible que les HepG2 aux différents mélanges même si au départ l'effet du B[a]P semble plus marqué dans les A549 (Figure 62). Les conditions testées sont néanmoins inférieures à la CL_{50} (Concentration Létale 50) et leur impact sur la viabilité est globalement limité.

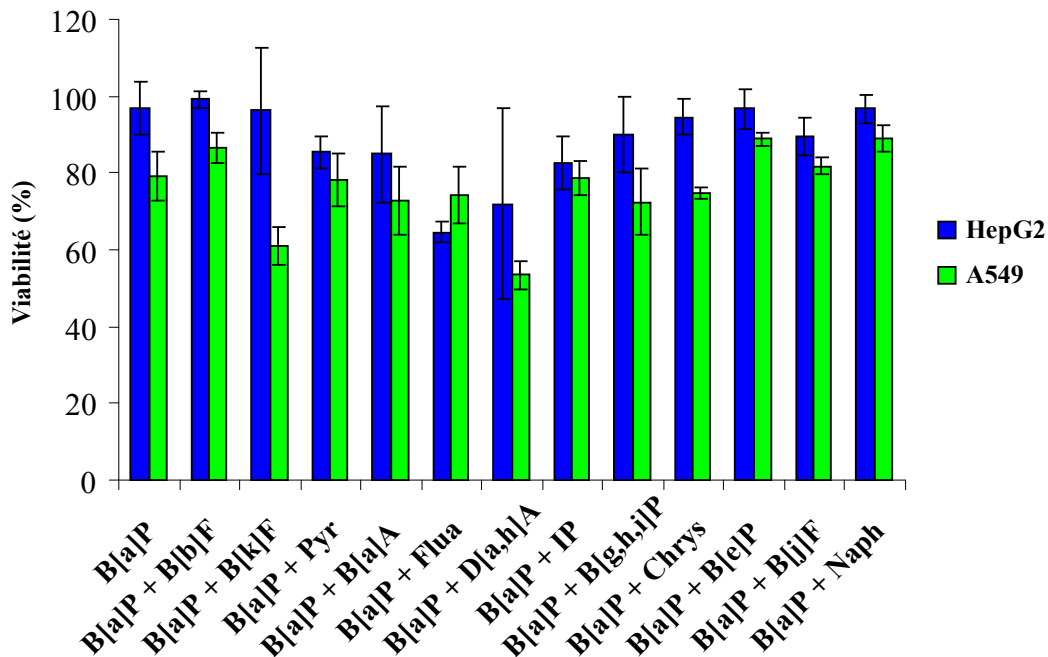


Figure 62 : Cytotoxicité des mélanges binaires B[a]P/HAPx à 1 μ M/1 μ M comparée à 1 μ M de B[a]P seul et mesurée par le test MTT dans les cellules A549 et HepG2 exposées pendant 14h.

2. Mesure de l'EROD induite par les mélanges binaires

Afin, d'étudier les interactions entre HAP au niveau du métabolisme, l'activité EROD a été mesurée dans les A549 après exposition à des mélanges binaires. Les résultats présentés Figure 63 montrent que l'activité EROD observée avec le B[a]P est diminuée significativement ($p < 0,05$) dans tous les mélanges binaires avec tous les HAP à l'exception de l'IP et B[b]F.

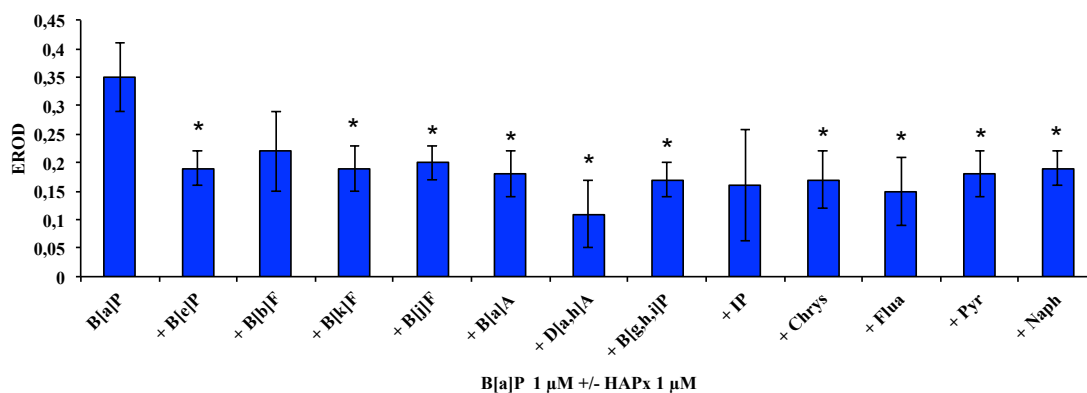


Figure 63 : Mesure de l'activité EROD (pmol/min/mg de protéines) induite par les mélanges binaires de HAP B[a]P + HAPx (1 μ M/1 μ M) dans la lignée A549 pour une durée d'exposition de 24h avec * une différence significative ($p < 0,05$) par rapport à l'activité du B[a]P seul à la même dose

3. Modulation de la formation des adduits BPDE- N^2 -dGuo du B[a]P par d'autres HAP en mélange binaires équimolaires

3.1. Formation des adduits Diol Epoxydes dans la lignée A549

De précédents travaux de l'équipe sur les HepG2 (Tarantini, 2011b) ont montré que les niveaux d'adduits BPDE- N^2 -dGuo induits par le B[a]P sont modulés par la présence d'autres HAP en mélanges binaires équimolaires à 1 μ M : le B[b]F, le D[a,h]A ou l'IP augmentent significativement la quantité d'adduits BPDE- N^2 -dGuo par rapport à une exposition au B[a]P seul, alors que le B[k]F inhibe fortement la formation des adduits en mélange binaire. Par contre, d'autres HAP n'ont pas d'effet comme le B[g,h,i]P, le Chrys, le Flua, le Pyr ou encore le B[a]A (Tarantini, 2011b). Le même type d'expérimentation a été réalisé avec la lignée pulmonaire A549 exposée de la même façon 14h à des mélanges binaires équimolaires B[a]P/HAPx à 1 μ M. Les résultats, présentés Figure 64, montrent que tous les HAP testés inhibent de façon significative la formation des adduits BPDE par rapport au B[a]P seul à 1 μ M mais cette inhibition est plus faible pour le Pyr et le Naph. On peut classer les HAP en 3 groupes d'inhibition. Le Pyr et le Naph inhibent peu la formation des adduits BPDE suivis du B[e]P, du B[g,h,i]P, du Chrys et du Flua. Enfin le B[b]F, le B[k]F, le B[j]F, le B[a]A, le D[a,h]A et l'IP inhibent très fortement la formation des adduits BPDE.

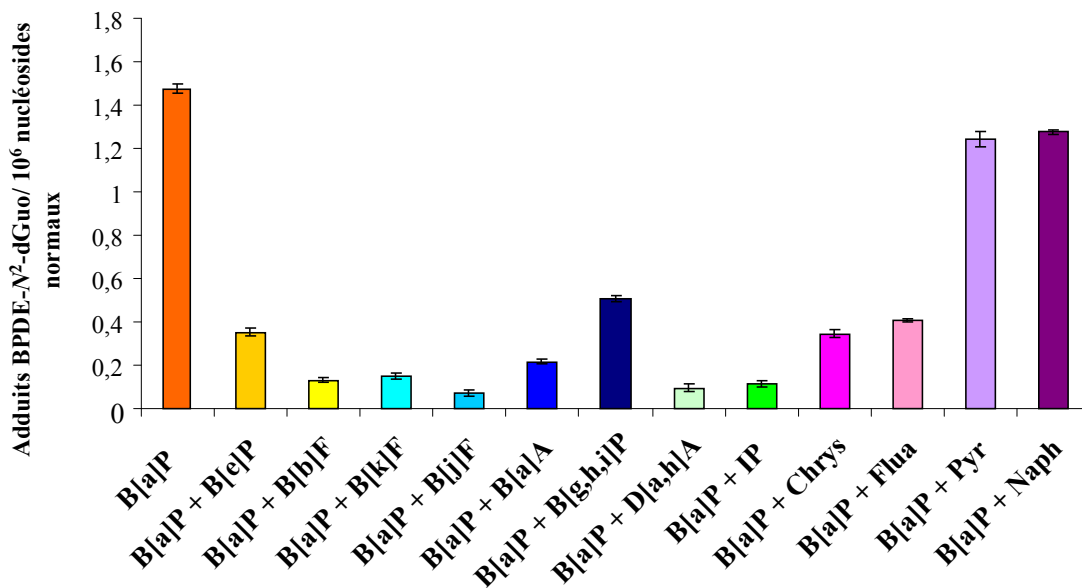


Figure 64 : Adduits BPDE induits par le B[a]P en mélange binaire équimolaire à 1 μ M avec d'autres HAP dans la lignée A549 pour une durée d'exposition de 14h. Toutes les différences sont significatives ($p < 0,05$) par rapport au B[a]P.

Nous avons par la suite souhaité vérifier la modulation de la formation des adduits BPDE-N²-dGuo dans les mélanges binaires à 0,2 μ M, dose pour laquelle les niveaux maximum d'adduits sont atteints après incubation avec le B[a]P (Figure 65). De la même façon que pour les mélanges binaires équimolaires à 1 μ M, on observe une forte inhibition de la formation des adduits BPDE en présence des autres HAP. La plupart des HAP inhibent de façon comparable la formation des adduits BPDE, à l'exception du B[k]F et du D[a,h]A qui inhibent très fortement la génération des adduits du B[a]P.

La concentration en HAP semble avoir un effet sur les niveaux d'adduits. Tout d'abord, on retrouve bien pour le B[a]P seul un niveau d'adduits supérieur à 0,2 μ M qu'à 1 μ M. Ensuite, pour la majorité des composés testés, les niveaux d'adduits sont moins importants à 1 μ M qu'à 0,2 μ M. A l'inverse, ils demeurent stables pour les mélanges avec B[k]F, B[g,h,i]P et D[a,h]A alors qu'ils diminuent fortement à 0,2 μ M pour le Pyr et le Naph. Par ailleurs, il est important de préciser qu'aucun adduit diol-époxyde d'un autre HAP n'a été mis en évidence dans ces mélanges binaires. Une limitation reste l'élution très proche des adduits BPDE-N²-dGuo et de ceux des diols époxyde de B[b]F, B[k]F et B[j]F. Pour les mélanges binaires correspondant, les valeurs pour l'adduit du B[a]P incluent donc peut-être une légère contribution de l'autre HAP du mélange.

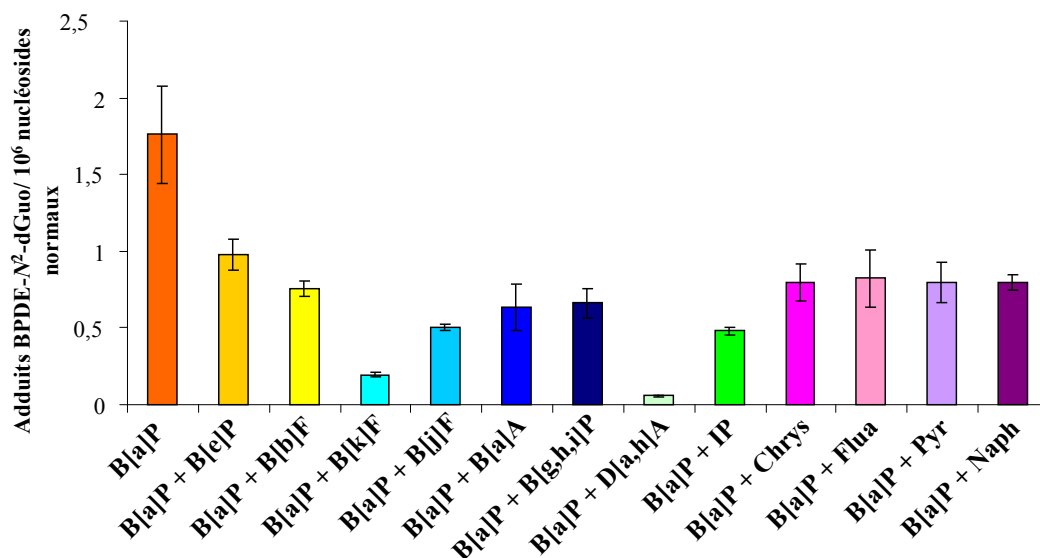


Figure 65 : Adduits BPDE induits par le B[a]P en mélange binaire équimolaire à 0,2 μ M avec d'autres HAP dans la lignée A549 pour une durée d'exposition de 14h. Toutes les différences sont significatives ($p < 0,05$) par rapport au B[a]P.

3.2. Effet dose des mélanges équimolaires pour le B[b]F et le B[k]F

Une plus grande gamme de concentrations (0,2 à 5 μ M) de mélanges binaires a été testée dans les A549 et les HepG2 afin de pouvoir comparer les deux lignées. Nous nous sommes focalisés sur des mélanges équimolaires B[a]P / B[k]F et B[a]P / B[b]F car ils induisent des effets opposés dans les HepG2 à 1 μ M. Le B[k]F inhibe très fortement la formation des adduits BPDE du B[a]P dans ces hépatocytes, et à l'inverse le B[b]F a un effet de synergie. La proportion de modulation pour la formation des adduits BPDE-N²-dGuo aux différentes doses par rapport au B[a]P seul est présentée Figure 66. Pour les HepG2, les mêmes résultats sont observés avec le B[b]F de 0,2 à 1 μ M puis celui-ci a un effet inhibiteur sur la formation des adduits à 5 μ M. Le B[k]F inhibe quant à lui fortement la formation des adduits BPDE à toutes les concentrations testées. Enfin, pour les A549, on observe une inhibition de la formation des adduits pour les deux types de mélanges binaires à toutes les concentrations testées.

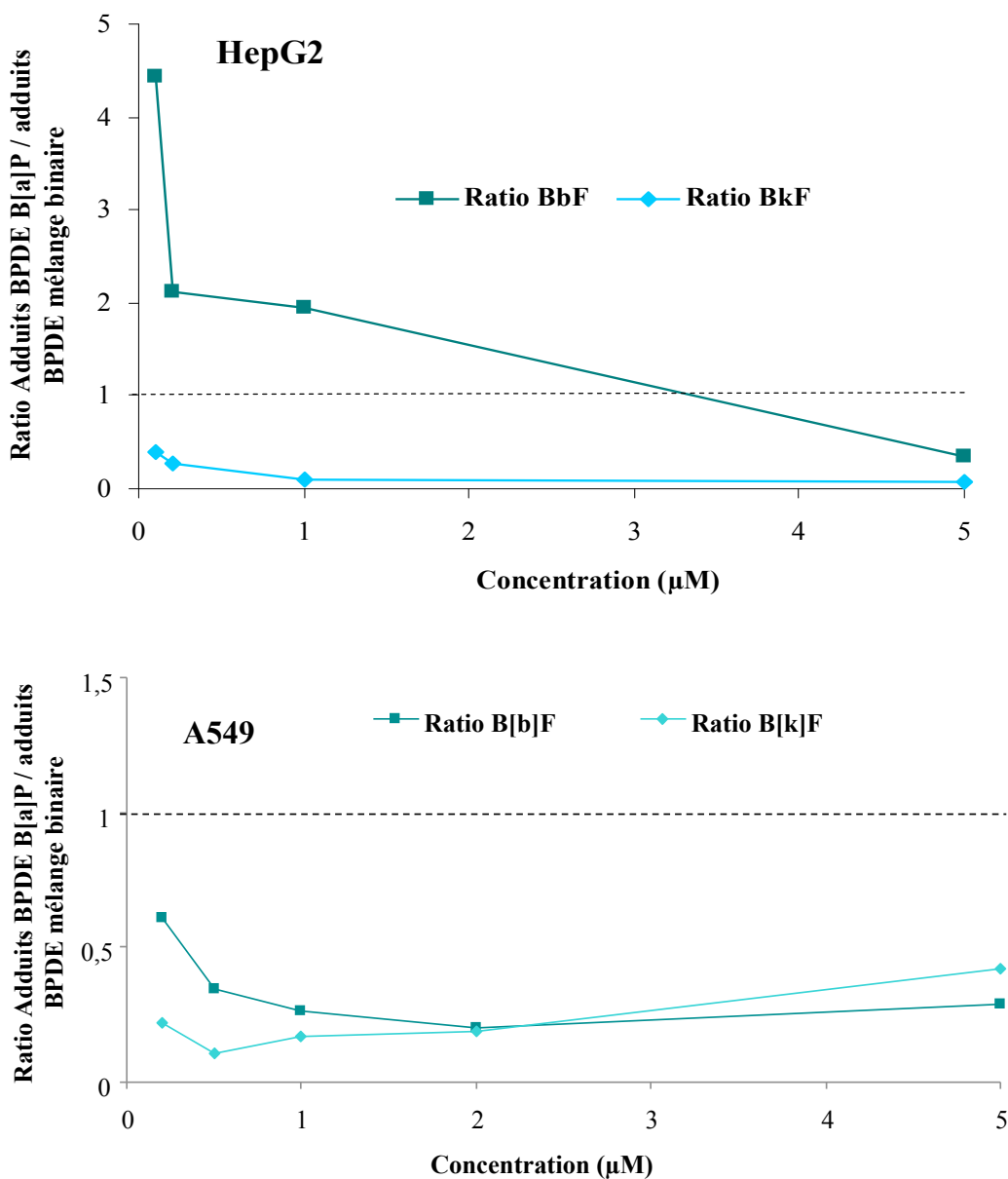


Figure 66 : Modulation de la formation des adduits BPDE en fonction de la concentration du mélange binaire B[a]P / B[b]F ou B[a]P / B[k]F de 0,2 à 5 µM dans les A549 et les HepG2 exposées pendant 14h. Les résultats sont présentés sous forme de ratio des adduits BPDE induits par le B[a]P / adduits BPDE générés par le mélange binaire

3.3. Modulation de la formation des adduits BPDE- N^2 -dGuo à des concentrations constantes en B[a]P et croissantes en B[b]F et B[k]F

Pour les HepG2, la formation des adduits est modulée différemment en fonction de la concentration du B[b]F et du B[k]F pour une concentration en B[a]P constante de 1 µM (Figure 67). En effet, on observe une potentialisation pour le B[b]F à 1 µM qui tend à

diminuer avec la concentration. A l'inverse, pour le B[k]F, il y a une inhibition forte dès les faibles doses qui s'accroît jusqu'à 1 μM pour atteindre un plateau. L'effet du B[k]F et du B[b]F pour les A549 est similaire aux résultats obtenus avec les mélanges binaires équimolaires. Ces deux HAP inhibent fortement la génération d'adduits BPDE à toutes les concentrations testées avec une amplification de cette inhibition à partir de 1 μM .

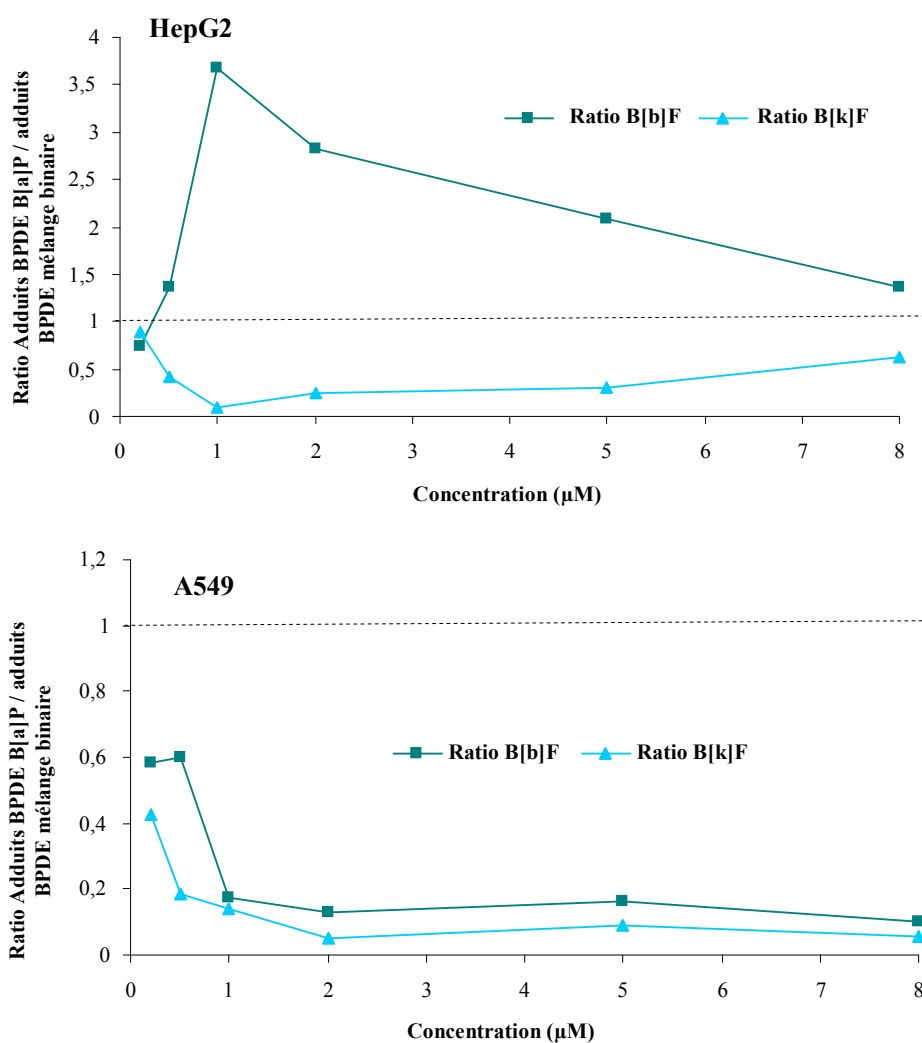


Figure 67 : Modulation de la formation des adduits BPDE en fonction de la concentration en B[b]F ou B[k]F de 0,2 à 8 μM dans des mélanges binaires avec 1 μM le B[a]P dans les A549 et les HepG2 exposées pendant 14h

II. Effet de mélanges reconstitués de 12 HAP sur la lignée A549

1. Choix des mélanges de HAP

Un des critères principaux dans la sélection des mélanges réside dans leur différence de composition afin notamment d'identifier des combinaisons particulièrement nocives ou d'estimer l'impact de certains HAP en particulier en fonction de leur abondance relative. Notre choix s'est porté sur 5 mélanges représentant des environnements réels : Silicium, Urbain, Garage, Bois et Cigarette. Les trois premiers sont issus de données recueillies sur le terrain par l'équipe EPSP et sont représentatifs d'expositions professionnelles. Le mélange dit « Silicium » correspond à l'exposition de travailleurs dans une usine de production de silicium en utilisant la médiane de tous les postes étudiés. Le mélange « Urbain » est, quant à lui, le reflet de l'exposition de différents travailleurs en zone urbaine : égoutiers, réparation de canalisation, agents de nettoyage ou de chauffeurs de camions. Enfin, le mélange « Garage » se rapporte essentiellement à des émissions de moteurs dans des garages de véhicules légers. Les données recueillies pour ces deux derniers mélanges sont plus anciennes et le dosage du B[j]F et du B[e]P n'avait pas encore été développé au laboratoire. Ces deux HAP sont donc absents de la composition finale de nos mélanges. Une étude bibliographique a permis de constituer les mélanges Bois et Cigarette qui concernent davantage la population générale. Les études ou rapports privilégiés dans les deux cas sont ceux rapportant le dosage de tous nos HAP d'intérêt. De façon générale, la composition du mélange « Bois » a été calculée à partir des données obtenues sur des poêles à bois récents (après 1996) utilisés de façon nominale avec soit des granulés soit des copeaux de bois (INERIS, Février 2000, Jalava, 2012, Khalili, 1995). Enfin, le mélange « Cigarette » est issu de données de différents travaux sur la composition de la fumée de cigarettes sans filtre de type européennes respirée directement par le fumeur (Ding, 2006, Ding, 2008, Lee, 1976). Les mélanges ont été reconstitués uniquement pour les 12 HAP particuliers d'intérêt à partir de solutions commerciales et des abondances relatives calculées. Après préparation, les niveaux des différents HAP ont été dosés par HPLC-Fluorescence afin de vérifier que nous reproduisons bien la composition de ces mélanges présentée Figure 68.

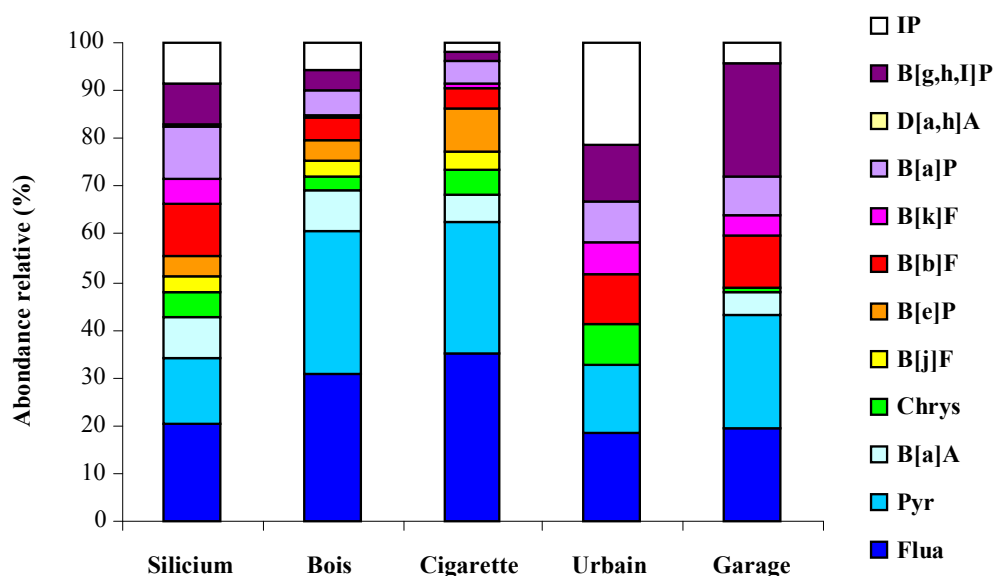


Figure 68 : Abondances relatives des 12 HAP particuliers d'intérêt dans les 5 mélanges Silicium, Bois, Garage, Urbain et Cigarette mesurées par HPLC-Fluo

De façon générale pour les 5 mélanges, on observe une prépondérance des HAP de faible poids moléculaire, le Flua et le Pyr. Cette prépondérance est accompagnée d'une forte proportion de B[g,h,i]P pour le mélange Garage et d'IP pour le mélange Urbain. Par ailleurs, l'abondance relative du B[a]P est comprise entre 5 et 10 % pour les 5 mélanges avec la plus forte teneur dans le mélange Silicium. Les mélanges Urbain et Garage sont les plus proches en termes de composition avec pour seules différences majeures une proportion en IP de l'ordre de 21 % et une absence de B[a]A pour le mélange Urbain contre 4 % d'IP et 5 % de B[a]A pour le mélange Garage. Par ailleurs, seul le mélange Silicium contient du D[a,h]A mais en faible quantité (0,8 %).

2. Cytotoxicité des mélanges

Les concentrations de travail choisies pour l'étude de l'effet des mélanges dans la lignée A549 sont 0,2, 2 et 5 μM de concentration totale en HAP particuliers. La dose 0,2 μM représente la dose de B[a]P pur pour laquelle la quantité d'adduits BPDE- N^2 -dGuo formés est maximale pour les A549. La proportion maximale de B[a]P dans les mélanges est de l'ordre de 10 %. Afin de se placer à 0,2 μM en concentration finale de B[a]P, la concentration totale du mélange est de 2 μM . Enfin, nous avons fait le choix d'une plus forte concentration de 5 μM . De plus, ces doses correspondent à celles que nous avons utilisées pour étudier les effets des HAP purs.

Dans le but de s'assurer de la bonne viabilité cellulaire des A549 aux concentrations choisies, un test de cytotoxicité a été réalisé après 14h d'exposition des cellules aux différentes doses pour les 5 mélanges à l'aide du test MTT. Le B[a]P seul à 0,2, 2 et 5 μM ainsi qu'une solution à 0,5 % de DMSO constitue les conditions témoins. Les résultats, présentés Figure 69 sont exprimés en % de viabilité par rapport au témoin DMSO. Les 5 mélanges présentent une cytotoxicité similaire à la fois entre eux et par rapport au B[a]P à concentration égale avec une viabilité minimale de l'ordre de 75 %. Les doses testées sont inférieures à la CL_{50} et leur impact sur la viabilité est limité.

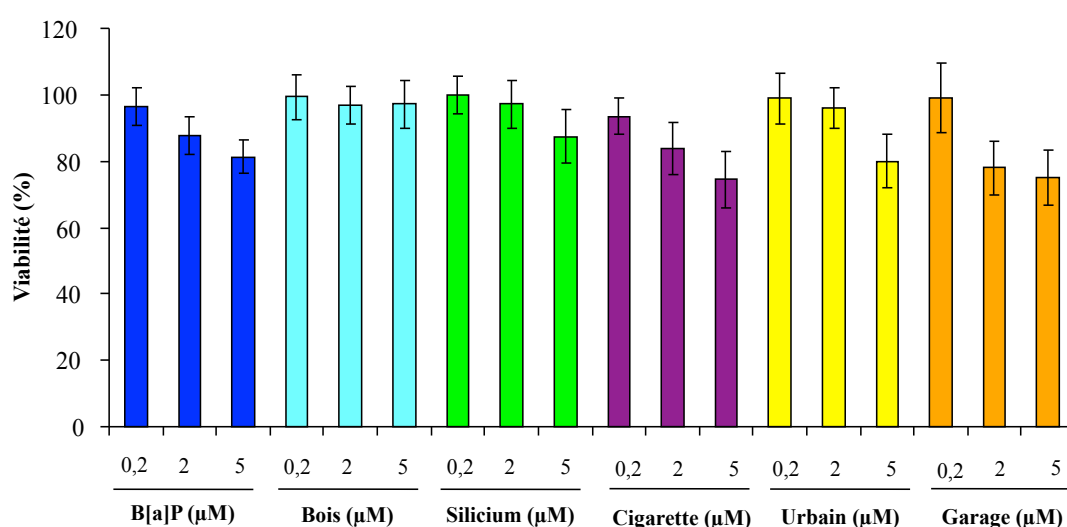


Figure 69 : Cytotoxicité mesurée à l'aide du test MTT des 5 mélanges synthétiques de HAP dans les cellules A549 exposées pendant 14h à des concentrations totales en HAP croissantes de 0,2 à 5 μM

3. Modulation de l'induction des gènes de phase I par les mélanges

3.1. Effet de la dose

L'effet de la concentration sur la modulation de l'expression des gènes a été étudié pour un temps d'exposition de 2h dans les A549 (Figure 70). Celui-ci correspond au maximum d'induction des CYP1A1 et 1B1 par le B[a]P lors de l'étude cinétique. Tous les mélanges induisent de façon significative ($p < 0,05$) l'expression du CYP1A1 mais aucun effet dose

n'est mis en évidence. Seule une différence significative existe entre 0,2 et 2 μM pour le B[a]P.

A 0,2 μM , on observe une augmentation significative de l'induction du CYP1A1 de tous les mélanges par rapport au B[a]P, ainsi qu'à 2 μM à l'exception du Bois. A 5 μM , seuls les mélanges Garage et Silicium induisent significativement plus le CYP1A1 que le B[a]P pur. L'induction du CYP1B1 est 10 fois plus faible que celle du CYP1A1 à la fois pour le B[a]P pur et les mélanges. De façon similaire à ce que nous avons observé pour le CYP1A1, tous les mélanges induisent significativement ($p < 0,05$) le CYP1B1 par rapport au témoin DMSO et il n'y a peu ou pas de différence entre les 3 doses pour chacun des mélanges. Par ailleurs, à 0,2 μM et 5 μM , abstraction faite du mélange Bois, tous les mélanges induisent significativement ($p < 0,05$) le CYP1B1 de façon plus importante que le B[a]P à cette même dose. Aucune différence significative n'est observée à 2 μM entre le B[a]P et les mélanges.

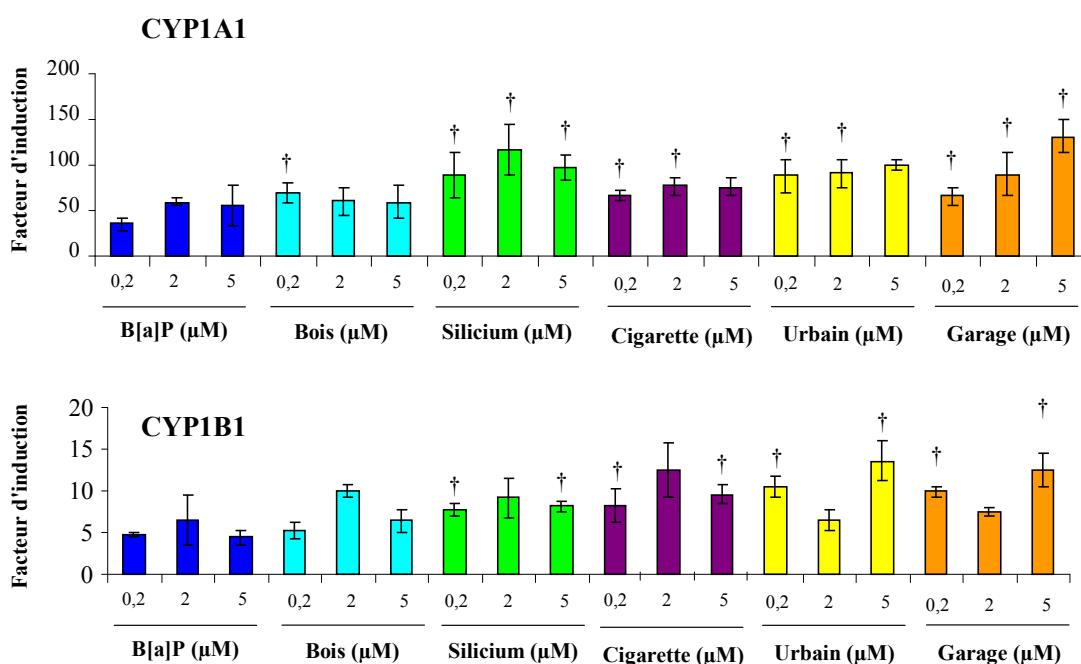


Figure 70 : Modulation de l'expression des gènes des isoformes CYP1A1 et 1B1 du cytochrome P450 par rapport au témoin DMSO dans les A549 exposées pendant 2h à des concentrations totales en HAP croissantes et de B[a]P pur de 0,2 à 5 μM . Toutes les valeurs sont significatives ($p < 0,05$) par rapport au témoin DMSO et † : différence significative ($p < 0,05$) par rapport au B[a]P à la concentration concernée

3.2. *Cinétique d'expression des gènes de métabolisation après exposition aux mélanges*

L'étude de la modulation des gènes de métabolisation en fonction de la durée d'exposition a été réalisée avec les mélanges et le B[a]P pur à 0,2 μ M car on observe un effet sur l'expression des CYP1A1 et 1B1 dès cette dose. Cette partie du travail permet de déterminer si les mélanges de HAP modulent l'expression des gènes de la même manière au cours du temps et de façon similaire ou non au B[a]P.

De façon générale, le CYP1A1 est induit de façon significative ($p < 0,05$) par rapport au témoin DMSO jusqu'à 6h d'exposition pour tous les mélanges (Figure 71). De plus les profils cinétiques de modulation de l'expression des gènes semblent similaires à celui obtenu pour le B[a]P seul avec un maximum d'induction des CYP pour une exposition entre 1h et 2h. De la même façon, le CYP1B1 est induit significativement ($p < 0,05$) pour tous les temps et tous les mélanges avec des profils d'induction des gènes au cours du temps tout à fait comparables à celui du B[a]P seul avec un maximum d'induction après 2h d'exposition.

Par ailleurs les niveaux de transcrits du CYP1A1 sont significativement ($p < 0,05$) plus importants, par rapport au B[a]P seul, pour tous les mélanges jusqu'à 6h d'exposition sauf à partir de 6h pour le mélange Cigarette.

En ce qui concerne le CYP1B1, son expression est multipliée par 10 à 1h par rapport au B[a]P seul. Les mélanges Silicium et Garage induisent de façon plus importante le CYP1B1 que le B[a]P seul jusqu'à 16h d'incubation. De la même façon, le mélange Urbain induit davantage le CYP1B1 que le B[a]P pour tous les temps d'incubation à l'exception du temps 6h. Le mélange Bois induit plus le CYP1B1 de façon significative ($p < 0,05$) à 30 min et 16h et le mélange Cigarette pour 30 min, 1 et 2h d'exposition par rapport au B[a]P. Enfin, les mélanges Garage et Silicium modulent l'expression du CYP1B1 de façon similaire au B[a]P pour toutes les durées d'exposition. Cependant, les niveaux de CYP1B1 sont plus hauts que ceux observés pour l'analyse en effet dose.

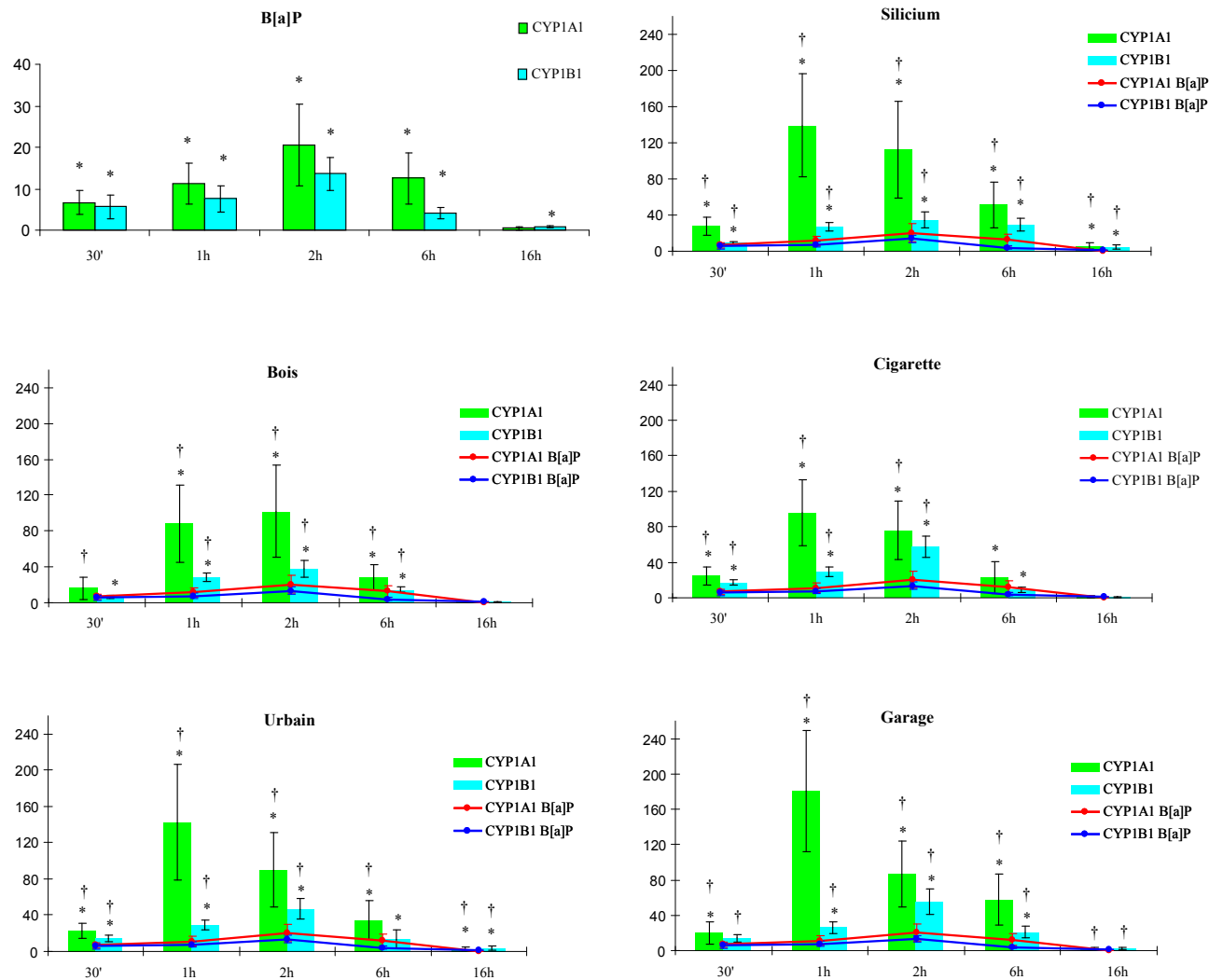


Figure 71 : Modulation de l'expression des gènes CYP1A1 et 1B1 par rapport au témoin DMSO dans les A549 exposées de 30 minutes 16h aux mélanges et au B[a]P seul à 0,2 μ M traitées par des mélanges de HAP à 0,2 μ M avec * pour une différence significative ($p < 0,05$) par rapport au témoin DMSO et † pour une différence significative ($p < 0,05$) par rapport au B[a]P à la durée d'exposition concernée

4. Mesure de l'EROD induite par les mélanges

L'analyse de l'activité EROD dans les A549 exposées pendant 24h aux mélanges à 2 μM montre que l'activité mesurée en présence de B[a]P est inhibée par la présence d'autres HAP dans le mélange avec au maximum 10 % de B[a]P dans les mélanges soit 0,2 μM . Pour les cellules exposées à des mélanges à 0,2 μM , une activité EROD extrêmement faible est détectée uniquement pour les mélanges Silicium, Garage et Urbain (résultats non présentés).

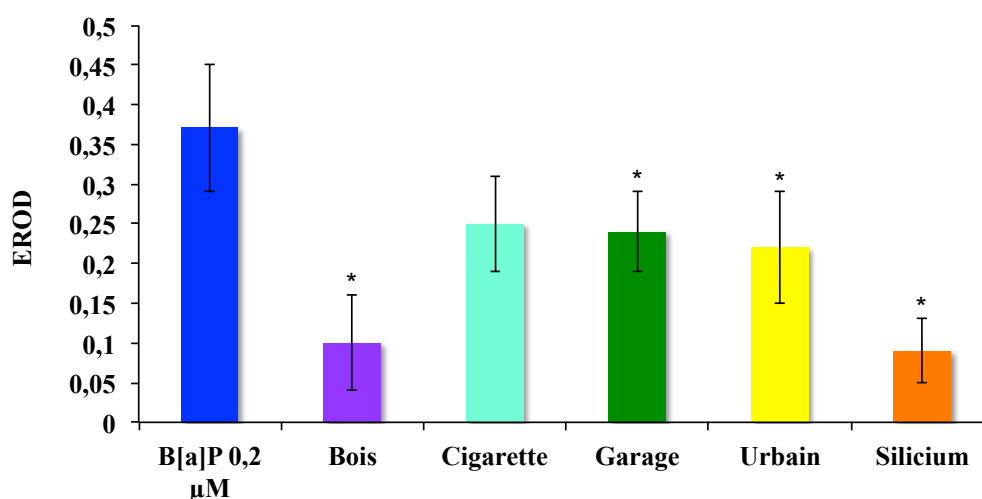


Figure 72 : Mesure de l'activité EROD (pmol/min/mg de protéines) induite par les mélanges synthétiques de HAP à 2 μM et le B[a]P à 0,2 μM dans la lignée A549 pour une durée d'exposition de 24h avec * une différence significative ($p < 0,05$) par rapport à l'activité du B[a]P seul à 0,2 μM .

5. Analyse des adduits générés par les mélanges

Les adduits BPDE- N^2 -dGuo et des diol-époxydes du B[b]F, B[k]F, B[j]F, D[a,h]A, B[a]A et Chrys ont été analysés après 14h d'exposition des A549 aux 5 mélanges, à une concentration totale en HAP de 0,2 μM , qui correspond à la dose la plus faible pour laquelle on observe un effet sur l'induction des gènes (Figure 73). A 0,2 μM , aucun adduit n'est détecté pour les mélanges Bois et Cigarette, alors que de faibles niveaux d'adduits sont détectés pour les autres mélanges avec un maximum pour le mélange Silicium. Il est important de noter que la concentration finale en B[a]P dans les milieux de traitement n'est

au maximum que de 0,02 μM . La même mesure réalisée avec les mélanges à 2 μM montre là encore que la formation des adduits générés par les mélanges est significativement ($p < 0,05$) plus faible que les adduits BPDE induits par le B[a]P seul à sa concentration maximale dans les mélanges soit 0,2 μM (Figure 74). Par ailleurs, alors qu'aucun adduit n'était détecté pour les mélanges Bois et Cigarette à 0,2 μM , on observe la formation d'adduits à 2 μM . La hiérarchie entre les mélanges pour la formation d'adduits est différente à 0,2 μM , Silicium > Garage \approx Urbain (différence entre ces deux mélanges non significative), et à 2 μM avec Urbain > Garage \approx Cigarette > Silicium > Bois.

Par ailleurs, les adduits mesurés ici correspondent, pour les mélanges, à la somme des adduits DE-dGuo du B[a]P, B[b]F, B[k]F et B[j]F. Aucun adduit DE du D[a,h]A, du Chrys ou du B[a]A n'a été détecté.

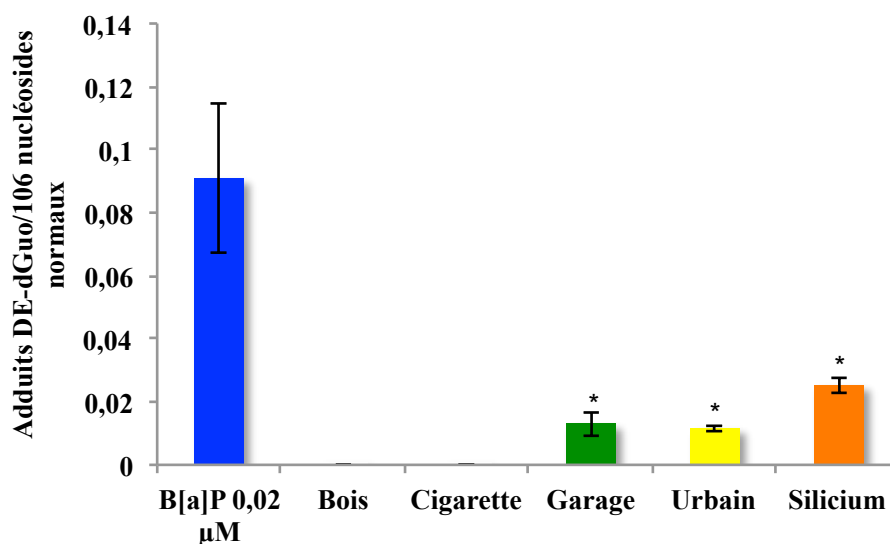


Figure 73 : Mesure des adduits Diol Epoxyde-dGuo par HPLC-MS/MS dans les A549 exposées pendant 14h à 0,2 μM total en HAP pour les 5 mélanges d'étude et 0,02 μM de B[a]P avec *, une différence significative ($p < 0,05$) au maximum de B[a]P seul présent dans les mélanges soit 0,02 μM

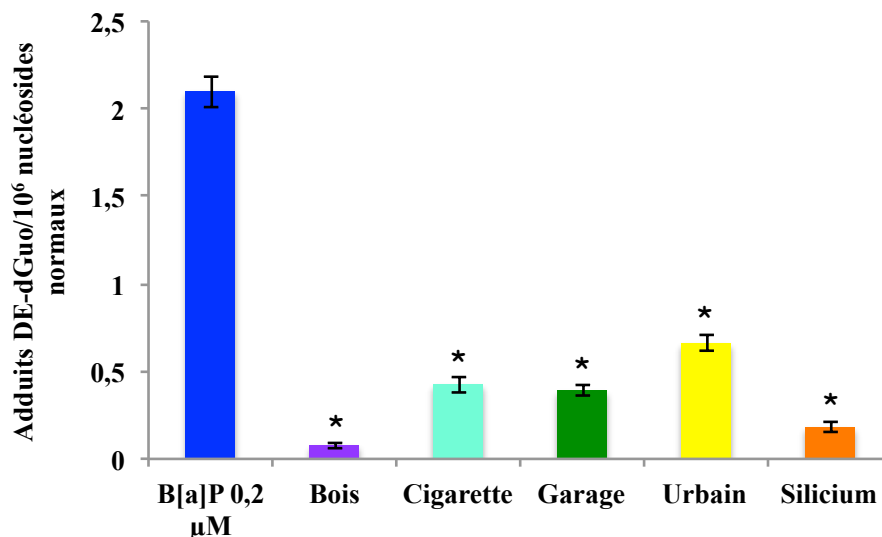


Figure 74 : Mesure des adduits Diol Epoxyde-dGuo par HPLC-MS/MS dans les A549 exposées pendant 14h à 2 μM total en HAP pour les 5 mélanges d'étude et 0,2 μM de B[a]P avec *, une différence significative ($p < 0,05$) au maximum de B[a]P seul présent dans les mélanges soit 0,2 μM

Aucun adduit stable des quinones n'a été détecté dans les A549 après exposition aux mélanges.

III. Conclusions et discussion : HAP en mélanges, loin de l'additivité

En appliquant les différents tests de métabolisme et en quantifiant la formation des adduits à l'ADN, nous avons pu mettre en évidence de nombreux indices d'une interaction entre HAP en termes de réponses cellulaires. Ces phénomènes impactent en particulier l'EROD et la génotoxicité.

1. Modulation de la génotoxicité du B[a]P par d'autres HAP

Après avoir démontré la pertinence du modèle pulmonaire choisi pour l'étude de la génotoxicité du B[a]P, caractérisé la nature et les niveaux de dommages induits par le B[a]P puis sa métabolisation dans les A549, nous nous sommes intéressés à la modulation de la formation des adduits BPDE-N²-dGuo, dommage majoritaire généré par le B[a]P, par d'autres HAP. Pour ce faire, nous avons étudié l'impact de 12 HAP choisis en fonction de leur abondance ou de leur toxicité en mélanges binaires avec le B[a]P dans les A549 et comparé avec les résultats obtenus avec ceux des HepG2. Le but de cette partie était

d'évaluer si les composés présents dans les mélanges entraînaient des effets de potentialisation ou d'inhibition sur la formation des adduits BPDE.

A l'image de ce que nous avons observé pour le B[a]P, la modulation de la formation des adduits BPDE par les autres HAP est très différente dans la lignée d'hépatocytes HepG2 et la lignée pulmonaire A549. En effet, alors qu'en mélanges équimolaires tous les HAP testés ont un effet inhibiteur sur la formation des adduits BPDE dans A549, ces mêmes HAP peuvent être divisés en trois sous-groupes selon leur effet potentialisateur, inhibiteur ou leur absence d'effet dans les HepG2, ceci en accord pour cette dernière lignée avec des résultats précédents de l'équipe (Tarantini, 2011b).

De tels effets d'inhibition en mélange ont également été rapportés dans la littérature pour d'autres modèles pulmonaires en particulier la lignée HEL. En effet, Sevastyanova *et al* (Sevastyanova, 2007) et Binkova *et al* (Binkova, 2004) ont montré une inhibition de la formation des adduits du B[a]P en mélanges binaires à 1 μ M avec le B[a]A, le B[k]F, le B[b]F, le B[g,h,i]P, le Chrys, le D[a,h]A et l'IP. L'inhibition la plus forte est observée avec le D[a,h]A (-99 %), le B[k]F (-97 %) puis l'IP (-76 %) et le Chrys (-74 %) ce qui correspond à nos résultats sur A549. Il est également intéressant de noter qu'ils observent la même différence entre HepG2 et HEL que celle que nous avons observée entre HepG2 et A549.

Par ailleurs, nous avons mis en évidence que la concentration des HAP dans les mélanges binaires n'avait pas d'impact, quant au type d'effet, sur la modulation de la formation des adduits BPDE qui reste toujours une inhibition. Une exception à cela a été montrée pour le B[b]F qui a un effet tantôt potentialisateur tantôt inhibiteur suivant sa concentration dans les mélanges binaires, mais uniquement dans HepG2.

Il est également intéressant de noter que les HAP qui induisent le moins les CYP1A1 et 1B1, lorsqu'ils sont appliqués seuls sur les cellules A549, sont ceux qui y inhibent le moins la formation des adduits BPDE et inversement.

Plusieurs hypothèses mécanistiques peuvent expliquer l'inhibition dans la formation des adduits BPDE observée dans les A549 pour tous les HAP testés et la différence de modulation par rapport aux HepG2 :

1.1. Compétition au niveau des CYP450 :

La capacité d'induction de l'expression des CYP450 est étroitement liée à l'affinité des HAP pour le récepteur AhR. Celle-ci est fonction de la taille du HAP et de son ratio aire/profondeur qui est un marqueur de planarité (Pushparajah, 2008a). Ainsi, certains HAP induisent plus ou moins l'expression des CYP1A1 et 1B1. On peut également supposer que les HAP autres que le B[a]P, de par une affinité plus importante, sont préférentiellement métabolisés par les CYP1A1 et 1B1 au détriment du B[a]P diminuant ainsi la quantité de BPDE disponible pour la formation d'adduit, mais ceci n'a pas été démontré.

1.2. Inhibition de l'activité des CYP450 :

En dehors de la capacité des HAP à induire leur propre métabolisation via la liaison à AhR et, en cela, l'induction des différentes enzymes, en particulier les CYP1A1 et 1B1, la plupart des HAP ont également une activité inhibitrice de l'activité EROD qui correspond à des propriétés d'inhibition plus ou moins marquées des CYP1A1, 1B1 et 1A2 (Shimada, 2006b, Shimada, 2008).

De façon globale, la plupart des HAP testés inhibent l'activité EROD, néanmoins de façon différente en particulier au niveau des isoformes inhibées. Ainsi, le B[a]A, le B[b]F, le B[j]F et le Chrys représentent de forts inhibiteurs des CYP1B1 et 1A2 ainsi que dans une moindre mesure le 1A1. Le B[e]P et le Flua, considérés faiblement cancérigènes, inhibent fortement les isoformes 1A2 et 1B1 mais pas le CYP1A1. Le D[a,h]A, qui induit fortement l'expression du CYP1A1, inhibe faiblement l'activité de cette isoforme. Cependant, c'est un inhibiteur fort et spécifique de la forme 1B1 avec une CI_{50} (Concentration d'Inhibition 50) de 5,2 nM. Le fait que les HAP inhibent davantage la forme 1B1 explique en partie les différences observées entre HepG2 et A549. En effet, alors que le D[a,h]A et le B[b]F ont un effet potentialisateur pour la formation des adduits BPDE dans les HepG2, ils ont un effet inhibiteur dans les A549 qui présentent des niveaux de 1B1 beaucoup plus importants. En effet, ces deux HAP inhibent peu ou pas l'activité du CYP1A1 mais

fortement la forme 1B1. De plus, la forme 1B1 catalyse de façon plus efficace la transformation du B[a]P en 7,8-diol, donc les niveaux de 7,8-diol disponibles pour la transformation en BPDE sont probablement plus faibles (Shimada, 2008). L'activité inhibitrice vis-à-vis des CYP peut également impliquer les métabolites, néanmoins cette action d'inhibition n'est pas documentée pour tous nos HAP d'intérêt.

1.3. Détoxification plus importante par les enzymes de phase II :

Une explication à la diminution de la formation des adduits BPDE en mélange binaire pourrait être une élimination plus efficace du BPDE par les enzymes de phase II. Certains HAP à l'image du B[b]F induisent de façon plus importante l'activité GST dans les tranches de foie ou de poumon de rat. A l'inverse, l'activité GST est similaire pour le D[a,h]A, le B[b]F ou le Flua et le B[a]P dans les tranches de poumon de rat (Pushparajah, 2008c). Néanmoins, un effet synergique sur l'expression des GST pourrait entraîner une plus forte conjugaison du BPDE avec le glutathion et donc des niveaux d'adduits plus faibles.

1.4. Répression d'AhR par AhRR :

La liaison des HAP à AhR entraîne la formation d'un complexe AhR/ARNT qui se lie sur la séquence XRE des gènes des différentes enzymes du métabolisme. Cependant, il a été montré que ce complexe pouvait également se lier à la séquence XRE du gène AhRR codant pour un répresseur d'AhR. Le mécanisme reste peu connu mais il impliquerait une compétition avec AhR pour la liaison à ARNT (Mimura, 1999). Cette protéine a été mise en évidence chez le rat mais aussi chez l'Homme et dans différentes lignées cellulaires, notamment les HepG2 et A549 (Watanabe, 2001). Le Chrys qui est un inducteur plus faible que le B[a]P du CYP1A1 induit davantage l'expression d'AhRR. Il existe peu d'informations sur la capacité d'induction d'AhRR par les différents HAP. Le B[a]A induirait de façon similaire au B[a]P son expression dans HepG2 alors que le Flua aurait un effet inducteur plus faible (Tsuchiya, 2003). La répression d'AhR pourrait diminuer

l'induction des CYP1A1 et 1B1 ce qui conduirait à une diminution de la formation du BPDE et donc des adduits.

1.5. Voie des *o*-quinones et protéines d'efflux :

Une dernière hypothèse pourrait être une plus forte induction des AKR impliquées dans la voie des *o*-quinones qui transformeraient le 7,8-diol-B[a]P en catéchol diminuant ainsi la quantité de BPDE et donc la formation des adduits. De même une plus forte induction des protéines d'efflux en particulier de MRP4 qui élimine le diol-B[a]P de la cellule pourrait entraîner une diminution de la formation des adduits.

2. Effet de mélanges complexes

Dans une dernière partie du travail, nous avons étudié l'effet de mélanges plus complexes contenant des proportions différentes de 12 HAP particuliers sur les A549 en termes de métabolisation et de formation d'adduits. Les mélanges des 12 HAP ont été reconstitués en fonction de la composition de mélanges réels mesurée par l'équipe EPSP en milieu professionnel pour les mélanges Silicium, Urbain ou Garage ou rapporté dans la littérature pour les mélanges Cigarette et Bois qui correspondent à une exposition en environnement général.

L'induction des CYP1A1 et 1B1 est similaire pour les 5 mélanges étudiés avec un effet dose très peu marqué voire absent de 0,2 à 5 μ M (concentration totale de HAP) pouvant suggérer une saturation ou un effet seuil dans l'induction des CYP comme observé pour le B[a]P seul. La modulation de l'induction des CYP au cours du temps est comparable entre les mélanges.

A 2 μ M de mélange, l'induction du CYP1A1 est plus importante que pour le B[a]P considéré seul. En effet, les mélanges sont composés au maximum de 10 % de B[a]P donc à 2 μ M, la concentration en B[a]P est de l'ordre de 0,2 μ M. Le mélange Bois est le mélange qui induit le plus faiblement le CYP1A1 avec un facteur de 60. Ce facteur

d'induction est supérieur à celui observé pour le B[a]P à 0,2 µM qui est de 36. Cette différence est moins marquée pour le CYP1B1.

De façon théorique, on peut calculer l'induction du CYP1A1 attendu pour les différents mélanges en utilisant les données obtenues sur les HAP seuls. Pour cela, nous avons fait l'hypothèse d'un effet dose linéaire dans l'induction du CYP1A1 à faible concentration pour les différents HAP, les mesures d'induction de CYP pour les HAP purs ayant été faite à 0,2 µM. Le facteur d'induction théorique a été obtenu par la formule suivante :

$FI_{th} = \sum_i ([HAP]_i \times FI_{i,0,2} / 0,2)$ où est FI_{th} , le facteur d'induction théorique du mélange, $FI_{i,0,2}$ le facteur d'induction mesuré à 0,2 µM pour le HAP_i et $[HAP]_i$ la concentration finale du HAP_i dans le mélange à 0,2 µM total en HAP. Les facteurs d'induction ainsi calculés sont inférieurs d'un facteur 10 aux valeurs d'induction observées, suggérant un effet synergique des mélanges dans l'induction du CYP1A1.

L'augmentation dans l'induction des CYP par rapport au B[a]P est expliquée par un effet additif de l'induction des CYP, à la fois par les différents HAP, mais aussi par les métabolites de certains des HAP. En effet, des métabolites des diol-époxydes comme le B[k]F-diol ou les *o*-quinones seraient impliqués dans l'induction des CYP via la liaison à AhR (Burczynski, 2000, Jiang, 2005, Park, 2009, Spink, 2008). Ainsi, des métabolites peu formés quand le HAP est métabolisé seul peuvent l'être davantage de par la quantité plus importante de CYP disponibles et les effets de compétition au niveau de la métabolisation.

La formation respective des adduits par les différents mélanges est différente selon la concentration appliquée. Il faut tout d'abord remarquer qu'aucun des adduits des diols-époxydes, autre que le BPDE ou éventuellement de quinone, n'est détecté. On confirme donc bien que le B[a]P est le HAP le plus génotoxique. La présence de HAP fortement inducteur du métabolisme ne conduit à une production plus importante de métabolites réactifs avec l'ADN. Il faut également ajouter que l'absence d'adduit du B[a]A, D[a,h]A, Chrys, B[k]F, B[b]F et B[j]F pourrait, à 0,2 µM et 2 µM, être également due à leur faible concentration dans les différents mélanges. En effet, la formation de ces adduits n'est détectée, avec les HAP seuls qu'à partir de 0,2 µM pour B[b]F et B[k]F et 1 µM pour les autres HAP. On note cependant, que dans les mélanges, la quantité d'adduit BPDE reste plus faible que ce que l'on aurait attendu avec le B[a]P seul. Pour cela, les données doivent

être comparées à un traitement de B[a]P de 0,02 pour les mélanges à 0,2 μM ou 0,2 μM de B[a]P pour les mélanges à 2 μM puisque la proportion de ce HAP dans les mélanges est au maximum de 10%.

Cette inhibition de la formation des adduits BPDE est en accord avec nos résultats sur les mélanges binaires mais aussi avec les résultats de différents travaux sur des modèles pulmonaires exposés à des mélanges synthétiques de 2 à 8 HAP ou à des fractions organiques de prélèvements atmosphériques (Binkova, 2004, Sevastyanova, 2007, Topinka, 1998). En effet, des travaux menés sur les cellules pulmonaires HEL montrent une inhibition de la formation des adduits BPDE pour des mélanges synthétiques de HAP cancérigènes et, de façon encore plus prononcée, pour des prélèvements environnementaux d'atmosphère urbaine (fraction organique) avec des concentrations en B[a]P de 0,01 à 0,1 μM . De plus, ces auteurs ont montré que les adduits issus du B[a]P représentent jusqu'à 85 % des adduits totaux après une exposition à des mélanges synthétiques de 9 HAP cancérigènes contenant 1 μM de B[a]P. Ceci suggère bien la prépondérance des adduits du B[a]P par rapport aux adduits générés par d'autres HAP. Les niveaux d'adduits totaux de ces 9 HAP sont en corrélation avec la concentration en B[a]P dans les HEL pour les différents mélanges environnementaux. Enfin, ils observent un effet d'inhibition dans la formation des adduits par ces mêmes mélanges par rapport au B[a]P seul dans la lignée HepG2 et un pourcentage d'adduit attribuable au B[a]P plus faible que pour les HEL. Par ailleurs, les HEL sont plus sensibles à la génotoxicité des mélanges qui forment des adduits dès les plus faibles concentrations en B[a]P à la différence des HepG2.

Nos résultats apportent également un éclairage sur les liens entre composition et génotoxicité. A 0,2 μM , on retrouve plus d'adduits dans le mélange silicium, que dans urbain et garage qui, assez logiquement, sont similaires. Aucun adduit n'est détecté dans les cellules exposées aux mélanges bois et cigarette. De façon intéressante, les concentrations équivalentes en B[a]P calculées par l'approche TEF sont de 0,03 μM pour le mélange Silicium, 0,02 pour les mélanges Urbain et Garage et 0,01 pour les mélanges Bois et Cigarette. La corrélation est très bonne avec l'induction des adduits. La situation est tout à fait différente lorsque la concentration en HAP totale appliquée est de 2 μM . Dans ce cas, des adduits sont trouvés pour tous les mélanges avec des quantités d'adduits dans l'ordre décroissant suivant : garage > cigarette > urbain > silicium > bois. Dans ces conditions, l'approche TEF est peu prédictive.

Un paramètre est lui bien corrélé à la quantité d'adduits générés : c'est l'activité EROD. A 0,2 µM, on a l'ordre Silicium = Garage = Urbain > Cigarette = Bois = 0 alors qu'à 2 µM on retrouve Garage ≈ Cigarette ≈ Urbain > Silicium ≈ Bois. Bien qu'attendue, cette bonne corrélation démontre bien le lien entre métabolisation de phase I et formation d'adduits. Comme vu pour ces derniers, l'activité EROD mesurée pour les mélanges est plus faible que pour le B[a]P. Cette dernière considération contraste fortement avec l'induction des gènes des CYP qui sont eux plus fortement induits que par le B[a]P. Cette observation *a priori* contradictoire pourrait s'expliquer par le fait que l'induction de gène des CYP reflète essentiellement la liaison des HAP à AhR. Cette expression ne se retrouverait ensuite pas forcément en terme d'activité du fait des inhibitions de certains CYP par certains HAP. Une explication complémentaire pourrait être avancée pour la moindre quantité d'adduits après exposition aux mélanges : l'expression de protéines consommant le BPDE ou ses précurseurs avant que ce métabolite ne réagisse avec l'ADN. On peut penser aux enzymes de phase II mais nous avons montré, en accord avec la littérature, que l'expression des GST est très stable. Par contre, comme nous le proposons pour l'effet du B[a]P seul aux concentrations les plus élevées étudiées, les protéines AKR1C1 et MRP4 pourraient jouer un rôle dans la consommation du diol-B[a]P.

CHAPITRE 6

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Chapitre 6 - Discussion générale et perspectives

L'évaluation des risques sanitaires liés à l'exposition aux composés chimiques en environnement général ou professionnel est un véritable enjeu de santé publique. Parmi tous les composés présents dans les mélanges environnementaux très complexes, nous nous sommes intéressés aux HAP qui représentent une famille d'une centaine de molécules, toujours émises en mélanges, et dont certaines sont connues ou suspectées d'être cancérigènes pour l'homme. Le B[a]P est la seule classée cancérigène certain par le CIRC. D'autres HAP sont classés cancérigènes probables comme le D[a,h]A ou cancérigènes possibles comme le B[a]A, le B[j]F ou le B[b]F. Enfin, d'autres HAP, à l'image du B[g,h,i]P, sont considérés peu ou pas cancérigènes pour l'homme car ils n'ont pas d'effet cancérigène direct mais ils peuvent favoriser la toxicité d'autres HAP notamment le B[a]P (Cherng, 2001). Par ailleurs, les organes cibles des HAP en termes de cancer sont les poumons, la peau et la vessie (Boffetta, 1997, Bosetti, 2007, Mastrangelo, 1996).

Plusieurs problématiques pour l'évaluation de la génotoxicité des HAP dans les mélanges complexes se posent comme la pertinence du modèle étudié, le choix des HAP testés, le choix des mélanges mais aussi la nature des interactions qui peuvent exister entre les effets des différents HAP au sein de ces mélanges. Ce dernier aspect est actuellement peu étudié dans l'évaluation du risque lié à l'exposition à des mélanges d'HAP qui est uniquement basée sur l'approche par les facteurs d'équivalence toxique ou FET (INERIS, 2003 Novembre).

Pour apporter des informations nouvelles à cette thématique importante, nous avons développé une approche *in vitro* pour mieux comprendre la différence de réponse cellulaire à des HAP seuls ou en mélange. Un travail similaire avait été initié précédemment au laboratoire sur des hépatocytes HepG2, aux capacités métaboliques importantes mais non issus d'un organe-cible (Tarantini, 2011a, Tarantini, 2009, Tarantini, 2011b). Ici, nous nous sommes intéressés à des lignées, représentatives des organes cibles, c'est-à-dire le poumon avec la lignée A549 et la vessie avec la lignée T24. Dans un premier temps, le B[a]P a été utilisé comme composé modèle afin d'étudier la réponse des cellules aux HAP. Une absence quasi-totale de métabolisation et une génotoxicité limitée (quelques lésions oxydatives à forte concentration) a été observée avec les T24. Par contre, la formation d'adduit et l'induction de protéines de métabolisation a été mise en évidence pour les

A549, avec des effets notamment de dose-réponse « en cloche » similaires à ceux observés dans d'autres modèles de poumons. La pertinence de l'utilisation de cette lignée nous a permis de faire progresser le travail vers l'effet des mélanges.

Pour cette partie de l'étude, nous avons choisi 12 HAP classiquement mesurés dans l'atmosphère en milieu environnemental ou industriel en raison de leur toxicité, de leur abondance ou de leur qualité en tant que traceur de sources. Pour évaluer leur impact sur les cellules, nous avons été amenés à mettre au point la mesure de leurs éventuels adduits à l'ADN par HPLC-MS/MS. L'intérêt de cette technique est de pouvoir quantifier séparément et spécifiquement les adduits des différents HAP après exposition à un mélange. Après avoir étudié la réponse métabolique des A549 à ces HAP, nous avons montré, que lorsqu'ils étaient combinés au B[a]P en mélange binaire ou dans des combinaisons plus complexes mimant des mélanges réels, une forte inhibition de la formation des adduits BPDE était observée. Celle-ci n'est d'ailleurs pas compensée par l'apparition d'adduits d'autres HAP. Ces résultats rappellent les effets génotoxiques du B[a]P seul dans les A549. En effet, lorsque la concentration augmente au-delà de 0,2 μM , la quantité d'adduits diminue. L'« effet mélange » va dans le même sens : lorsque l'on rajoute des HAP en plus du B[a]P sur les A549, la quantité de ses adduits diminue. Cette observation de non-linéarité de la dose-réponse est une première difficulté dans l'évaluation du risque génotoxique puisque l'on met ici en évidence la possibilité d'un seuil au-dessus duquel de nouvelles défenses sont initiées dans les cellules pulmonaires. Ces nouvelles défenses peuvent concerner la mise en jeu d'autres voies métaboliques comme les o-quinones, une activité plus importante des enzymes de phase II, des protéines d'efflux ou encore des enzymes de réparation. Il faut noter, pour complexifier le problème, que tous les types cellulaires ne réagissent pas de la même façon, une nette dose-dépendance et parfois une synergie étant observée dans les hépatocytes.

L'inhibition de la formation des adduits à l'ADN dans les mélanges s'observe cependant même à faible concentration. Les mécanismes par lesquels s'exerce cette modulation restent encore à élucider mais la métabolisation des HAP constitue l'étape clé dans la génotoxicité des mélanges. Des phénomènes d'inhibition de CYP ou de compétition avec le B[a]P au niveau des CYP pourraient en partie expliquer les effets d'inhibition observés pour les mélanges. Ces phénomènes ne semblent pas concerner l'induction des gènes qui est plus fortement stimulée par les mélanges que par le B[a]P seul. Il est donc clair que

l'étude des HAP de façon individuelle n'est pas suffisante pour appréhender la génotoxicité des mélanges complexes. L'approche FET couramment utilisée pour évaluer le risque lié à l'exposition aux mélanges de HAP repose sur l'additivité des effets toxiques et écarte les interactions d'effets possibles entre les HAP (INERIS, 2003 Novembre, Malcolm, 1994, Nisbet, 1992, USEPA, 1984). Nos résultats montrent que la génotoxicité du B[a]P, à travers la formation des adduits BPDE-*N*²-dGuo, peut être modulée par la présence d'autres HAP, indiquant qu'il existe des interactions entre les HAP du mélange et que cette modulation est différente en fonction de la lignée considérée.

L'approche FET est donc imprécise et peu prédictive car elle néglige ces interactions métaboliques entre les différents HAP et aboutit à une sur-estimation ou à une sous-estimation du risque lié à l'exposition aux mélanges de HAP. Nos résultats montrent que l'effet de mélange sur l'expression des gènes de métabolisation varie en sens inverse de l'effet sur la formation des adduits. Or, les FET sont en grande partie basés sur les capacités de liaisons des HAP à AhR, c'est-à-dire à la régulation génique. On peut voir là un problème fondamental à l'approche FET. L'amélioration de cet outil de prédiction de risque passe obligatoirement par des études sur les mécanismes sous-jacents qui relient la composition des mélanges complexes et leur effet génotoxique.

Outre cette conclusion importante pour l'évaluation du risque lié à l'exposition aux mélanges, notre travail permet également quelques remarques sur les outils de quantification de la génotoxicité. La première observation est, dans le cas des mélanges, la forte différence d'effet entre l'induction des gènes de phase I et l'activité EROD. De façon attendue, l'activité EROD est bien mieux corrélée à la formation des adduits à l'ADN et doit être privilégiée par rapport à la réponse génique, sauf bien sûr si des informations biochimiques précises sont attendues. Par ailleurs, nous n'observons pas de dommages oxydatifs ou de sites alcali-labiles avec la méthode des Comètes à 0,2 μ M, et seulement un doublement du niveau basal à 2 μ M. Ceci signifie que le stress oxydant ou la formation d'adduits instables ne contribue pas à la génotoxicité des HAP seuls. De façon similaire, des mélanges de HAP ne conduisaient pas à un signal en comète dans les hépatocytes HepG2. La méthode des Comètes reste cependant pertinente dans l'étude de mélanges plus complexes, comme nous l'avons montré dans les HepG2 dans lesquels les mélanges urbains inhibent la formation d'adduits du B[a]P mais induisent de nombreuses cassures de l'ADN (Tarantini, 2011a).

Perspectives :

Afin de compléter nos résultats concernant le métabolisme des HAP, il serait intéressant de mesurer, dans les cellules pulmonaires, l'induction d'autres gènes du métabolisme comme d'autres isoformes du CYP mais aussi les enzymes de phase II et l'activité de différentes enzymes de phase II pour les HAP seuls mais surtout pour les mélanges binaires ou plus complexes reconstitués et issus de prélèvements environnementaux. La méthode de dosage des activités enzymatiques par HPLC-MS/MS en utilisant différents substrats spécifiques permettrait à la fois d'augmenter la sensibilité du test mais aussi de doser simultanément différentes activités des CYP ou les activités GST, SULT et UGT. En effet, de façon classique, les activités des CYP sont mesurées de façon individuelles ce qui peut rendre ces dosages à la fois très consommateurs en temps mais aussi en cellules ou microsomes. Pour pallier cet inconvénient, des techniques de dosages simultanés des activités enzymatiques ont été développées, que ce soient sur les cellules en culture ou sur des microsomes (Dierks, 2001, Lahoz, 2008a, Lahoz, 2008b, Lahoz, 2007, Pillai, 2013, Zhang, 2008). Elles reposent sur l'utilisation de cocktails de substrats spécifiques de chaque enzyme d'intérêt et le dosage des produits formés par HPLC-spectrométrie de masse en tandem (HPLC-MS/MS). Par exemple, Pillai *et al* ont mis au point une méthode de dosage simultané des activités des CYP1A2, 3A4/5, 2C9, 2C19 et 2D6 de cultures primaires d'hépatocytes. Les cellules sont exposées à un cocktail de substrats composés de phénacétine (1A2), diclofénac (2C9), S-méphénytoïne (2C19), dextrométhorphan (2D6) et midazolam. Le milieu de culture est ensuite injecté en HPLC-MS/MS après purification et les métabolites formés par la transformation des substrats sont alors quantifiés (Pillai, 2013). La contribution des différentes voies métaboliques dans les cellules en culture pourrait être complétée par le dosage de différents métabolites à la fois dans le milieu de culture mais aussi au niveau cytoplasmique comme le 3-OH-B[a]P, le tétraol ou encore les catéchols pour le B[a]P ainsi que des métabolites pour d'autres HAP cancérigènes.

Par ailleurs, il serait intéressant d'effectuer des cinétiques de formation des adduits de ces HAP et d'évaluer la réparation de ces adduits par les A549.

Ce travail a permis de mettre au point une méthode de mesure spécifique pour certains adduits diols époxyde des HAP. Néanmoins, pour mieux appréhender la génotoxicité des

HAP en mélanges, la méthode de dosage des adduits des diol-époxydes doit être optimisée afin de séparer les différents adduits de structure extrêmement proche. Pour ce faire, l'HPLC-IMS-MS/MS semble constituer un outil de choix. En effet, l'IMS (Ion Mobility Spectrometry), basé sur la séparation des ions en fonction de leur mobilité, permet une séparation des composés après ionisation en fonction de leur forme ce qui conduit à la séparation de molécules de même masse moléculaire mais de géométrie différente comme c'est le cas pour les HAP notamment B[a]P, B[b]F, B[k]F et B[j]F. Ceci permettrait d'avoir une idée plus précise de la contribution de chaque HAP dans la génotoxicité des mélanges.

Une autre perspective intéressante serait d'approfondir la description de la réponse aux HAP en mélange dans le poumon. Pour se faire, d'autres modèles cellulaires pourraient être étudiés. Toujours pour une meilleure compréhension des effets dans les organes cible, des études sur la peau seraient intéressantes, de même qu'un approfondissement du travail sur la vessie. Dans un premier temps, comme la vessie est davantage exposée aux métabolites qu'aux HAP parents, les T24 pourraient être utilisées en co-culture avec des cellules possédant des capacités métaboliques, comme les HepG2 par exemple. Par ailleurs, il serait intéressant de travailler sur des lignées primaires, à l'image des PUBEC qui présentent les deux types de populations cellulaires dont une possède des CYP1A1 inductibles. Quelques études ont été menées sur le B[a]P seul mais aucune sur les autres HAP ou des mélanges, que ce soit en termes de métabolisation ou d'adduits. Ces analyses de métabolisation et de mesure d'adduits permettraient de mieux comprendre le mécanisme sous-jacent à la survenue de cancer de la vessie. Par ailleurs, l'utilisation de cultures primaires est intéressante car ce type de modèle est très pertinent d'un point de vue biologique. Néanmoins la variabilité génétique entraîne une forte hétérogénéité dans la réponse aux toxiques. Le génotypage des principaux polymorphismes par RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) pourrait compléter les études de métabolisation et de génotoxicité afin de mieux prendre en compte cette variabilité.

Il serait également intéressant d'intégrer aux mélanges d'autres HAP cancérigènes, comme le Dibenzo[a,l]pyrène classé 2A par le CIRC, des dérivés oxydés ou nitrés des HAP ou une autre classe de polluants comme les métaux lourds dont des effets sur la modulation de la toxicité du B[a]P ont été suggérés. On peut également envisager, dans un souci de réalisme quant aux expositions, d'utiliser des prélèvements atmosphériques réels dont la toxicité

semble différente de celle observée pour les mélanges de HAP. En effet, les travaux de Taratini *et al* sur les HepG2 exposées à des prélèvements atmosphériques de composition différente ont montré que les prélèvements composés de façon presque exclusive de HAP tels que les mélanges prélevés en industrie ont plutôt tendance à potentialiser la formation d'adduits BPDE. A l'inverse, alors que dans les mélanges environnementaux, pour lesquels la proportion de HAP est plus faible, les dommages générés sont plutôt de type oxydatifs, la formation des adduits BPDE est inhibée pour une même quantité de B[a]P.

Enfin ces études *in vitro* sur les lignées cellulaires sont très éloignées des conditions physiologiques réelles et l'extrapolation de ces données est très délicate en termes de risque sanitaire. Il serait donc important de comparer les résultats obtenus *in cellulo*, *in vitro* chez des animaux. De plus, dans le cadre du suivi de l'exposition professionnelle, on pourrait envisager d'effectuer des prélèvements atmosphériques et de comparer *in vitro* les dommages à l'ADN induits sur les cellules en culture et mesurés au niveau des lymphocytes des salariés. Mais ceci pose tant des problèmes méthodologiques que des difficultés éthiques.

Le recueil de données expérimentales mécanistiques sur l'effet des mélanges complexes, notamment de génotoxicité, est indispensable pour mettre au point des modèles mathématiques qui tiennent compte à la fois de la toxicité individuelle des HAP et de leurs interactions afin d'estimer leurs effets en mélanges complexes. Un tel système de modélisation permettrait d'évaluer de façon plus réaliste les risques liés à l'exposition des populations aux mélanges complexes atmosphériques que l'évaluation par les B[a]Peq utilisée actuellement mais ceci nécessite encore de nombreux travaux.

Valorisation scientifique

Article scientifique :

Camille Genies, Anne Maître, Emmanuel Lefebvre, Amandine Jullien, Marianne Chopard-Lallier and Thierry Douki.

The extreme variety of genotoxic response to benzo[a]pyrene in three different human cell lines from three different organs.

PLoS ONE 8(11): e78356. doi:10.1371/journal.pone.0078356

Communications affichées :

- **Colloque INERIS-Adebiotech, Evaluation des expositions de l'Homme via son environnement : nouveaux outils et aide à la décision. Romainville, 15 et 16 Novembre 2011.**

Non additivité de l'effet génotoxique des HAP atmosphériques dans des modèles cellulaires humains

Camille Genies, Anne Maître, Emmanuel Lefebvre, Adeline Tarantini, Marianne Chopard-Lallier and Thierry Douki.

- **9th Winter Research Conference. DNA Damage: formation, repair, health consequences and industrial issues. CERLIB. Les Houches, 11 au 16 Mars 2012.**

Camille Genies, Anne Maître, Emmanuel Lefebvre, Adeline Tarantini, Marianne Chopard-Lallier and Thierry Douki

Drastically different genotoxic properties of benzo(a)pyrene in two human cell lines

- **EUROTOX, Congress of the European Societies of Toxicology. Stockholm, 17-20 Juin 2012.**

Camille Genies, Anne Maître, Emmanuel Lefebvre, Amandine Jullien et Thierry Douki

Drastically different genotoxic properties of benzo(a)pyrene in pulmonary, bladder and liver human cell lines

- **38ème congrès annuel de la Société Française de Toxicologie. Relations entre Recherche, Évaluation du Risque et Réglementation Toulouse, 29 et 30 novembre 2012**

Camille Genies, Anne Maître, Emmanuel Lefebvre, Amandine Jullien et Thierry Douki

Variabilité de l'effet génotoxique du benzo(a)pyrene dans trois lignées cellulaires humaines représentatives d'organes cibles

Communication orale :

Journée Air Ademe. Paris, 10 Juillet 2012.

Camille Genies, Anne Maître, Emmanuel Lefebvre, Amandine Jullien et Thierry Douki

Génotoxicité des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques en mélanges dans des modèles cellulaires humains.

BIBLIOGRAPHIE

Références bibliographiques

Agarwal ML, Agarwal A, Taylor WR, Stark GR

p53 controls both the G2/M and the G1 cell cycle checkpoints and mediates reversible growth arrest in human fibroblasts

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1995;92(18):8493-8497

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. 403-418.

Andrysik Z, Vondracek J, Machala M, Krcmar P, Svihalkova-Sindlerova L, Kranz A, et al.

The aryl hydrocarbon receptor-dependent deregulation of cell cycle control induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in rat liver epithelial cells

Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2007;615(1-2):87-97

Appel KE, Fürstenberger G, Hapke HJ, Hecker E, Hildebrandt AG, Koransky W, et al.

Chemical cancerogenesis: Definitions of frequently used terms

Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. 1990;116(3):232-236

Arand M, Cronin A, Adamska M, Oesch F

Epoxide Hydrolases: Structure, Function, Mechanism, and Assay

In: Helmut S, Lester P, editors. Methods in Enzymology, Volume 400 Phase II Conjugaison Enzymes and Transport System: New York, Academic Press; 2005. p 569-588.

Arif JM, Dresler C, Clapper ML, Gairola CG, Srinivasan C, Lubet RA, et al.

Lung DNA adducts detected in human smokers are unrelated to typical polycyclic aromatic carcinogens

Chemical Research in Toxicology. 2006;19(2):295-299

Atkinson R, Arey J

Atmospheric chemistry of gas-phase polycyclic aromatic hydrocarbons: formation of atmospheric mutagens

Environmental Health Perspectives. 1994;102 Suppl 4:117-126

Audebert M, Dolo L, Perdu E, Cravedi JP, Zalko D

Use of the gamma-H2AX assay for assessing the genotoxicity of bisphenol A and bisphenol F in human cell lines

Archives of Toxicology. 2011;85(11):1463-1473

- Audebert M, Zeman F, Beaudoin R, Pery A, Cravedi JP**
Comparative potency approach based on H2AX assay for estimating the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons
Toxicology and Applied Pharmacology. 2012;260(1):58-64
- Azqueta A, Shaposhnikov S, Collins AR**
DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay
Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2009;674(1-2):101-108
- Babson JR, Russo-Rodriguez SE, Rastetter WH, Wogan GN**
In vitro DNA-binding of microsomally-activated fluoranthene: evidence that the major product is a fluoranthene N2-deoxyguanosine adduct
Carcinogenesis. 1986;7(6):859-865
- Babson JR, Russo-Rodriguez SE, Wattley RV, Bergstein PL, Rastetter WH, Liber HL, et al.**
Microsomal activation of fluoranthene to mutagenic metabolites
Toxicology and Applied Pharmacology. 1986;85(3):355-366
- Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B**
Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action
Environmental Molecular Mutagenesis. 2005;45(2-3):106-114
- Balls M**
Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing
Laboratory Animals. 1994;28(3):193-211
- Balu N, Padgett WT, Lambert GR, Swank AE, Richard AM, Nesnow S**
Identification and characterization of novel stable deoxyguanosine and deoxyadenosine adducts of benzo[a]pyrene-7,8-quinone from reactions at physiological pH
Chemical Research in Toxicology. 2004;17(6):827-838
- Banasiewicz M, Nelson G, Swank A, Grubor N, Ross J, Nesnow S, Kofeler H, et al.**
Identification and quantitation of benzo[a]pyrene- derived DNA adducts formed at low adduction level in mice lung tissue
Analytical Biochemistry. 2004;334(2): 390-400.
- Barhoumi R, Mouneimne Y, Ramos E, Morisseau C, Hammock BD, Safe S, et al.**
Multiphoton spectral analysis of benzo[a]pyrene uptake and metabolism in a rat liver cell line
Toxicology and Applied Pharmacology. 2011;253(1):45-56
- Barhoumi R, Mouneimne Y, Ramos KS, Safe SH, Phillips TD, Centonze VE, et al.**
Analysis of benzo[a]pyrene partitioning and cellular homeostasis in a rat liver cell line
Toxicological Sciences. 2000;53(2):264-270

Bassing CH, Alt FW

H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity

Cell Cycle. 2004;3(2):149-153

Beels L, Bacher K, De Wolf D, Werbrouck J, Thierens H

gamma-H2AX foci as a biomarker for patient X-ray exposure in pediatric cardiac catheterization: are we underestimating radiation risks?

Circulation. 2009;120(19):1903-1909

Bekki K, Takigami H, Suzuki GO, Toriba A, Tang N, Kameda T, et al.

Gene Expression Changes of Phases I and II Metabolizing Enzymes Induced by PAH Derivatives

Polycyclic Aromatic Compounds. 2012;32(2):141-153

Billet S, Abbas I, Le Goff J, Verdin A, Andre V, Lafargue PE, et al.

Genotoxic potential of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-coated onto airborne Particulate Matter (PM 2.5) in human lung epithelial A549 cells

Cancer Letters. 2008;270(1):144-155

Binkova B, Sram RJ

The genotoxic effect of carcinogenic PAHs, their artificial and environmental mixtures (EOM) on human diploid lung fibroblasts

Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2004;547(1-2):109-121

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

Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2007;620(1-2):114-122

Blaha L, Kapplova P, Vondracek J, Upham B, Machala M

Inhibition of gap-junctional intercellular communication by environmentally occurring polycyclic aromatic hydrocarbons

Toxicological Sciences. 2002;65(1):43-51

Boffetta P, Jourenkova N, Gustavsson P

Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons

Cancer Causes and Control. 1997;8(3):444-472

Bonetta S, Gianotti V, Gosetti F, Oddone M, Gennaro MC, Carraro E

DNA damage in A549 cells exposed to different extracts of PM(2.5) from industrial, urban and highway sites

Chemosphere. 2009;77(7):1030-1034

Bosetti C, Boffetta P, La Vecchia C

Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers: a quantitative review to 2005
Annals of Oncology. 2007;18(3):431-446

Bosveld ATC, De Bie PAF, 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;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;19(7):1239-1246

Brandon EF, Raap CD, Meijerman I, Beijnen JH, Schellens JH

An update on in vitro test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons
Toxicology and Applied Pharmacology. 2003;189(3):233-246

Brandt HC and Watson WP

Monitoring human occupational and environmental exposures to polycyclic aromatic compounds
Annals of Occupational Hygiene. 2003;47(5): 349-78.

Brauers A, Manegold E, Buettner R, Baron JM, Merk HF, Jakse G

Cytochrome P450 isoenzyme mRNA expression pattern in human urinary bladder malignancies and normal urothelium
Cancer Detection and Prevention. 2000;24(4):356-363

Brusick D

Critical assessment of the genetic toxicity of naphthalene
Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2008a;51(2 Suppl):S37-42

Brusick D, Small MS, Cavalieri EL, Chakravarti D, Ding X, Longfellow DG, et al.

Possible genotoxic modes of action for naphthalene
Regulatory Toxicology and Pharmacology. 2008b;51(2 Suppl):S43-50

Burczynski ME, Harvey RG, Penning TM

Expression and characterization of four recombinant human dihydrodiol dehydrogenase isoforms: oxidation of trans-7, 8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[a]pyrene to the activated o-quinone metabolite benzo[a]pyrene-7,8-dione
Biochemistry. 1998;37(19):6781-6790

Burczynski ME, Lin HK, Penning TM

Isoform-specific induction of a human aldo-keto reductase by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), electrophiles, and oxidative stress: implications for the alternative pathway of PAH activation catalyzed by human dihydrodiol dehydrogenase
Cancer Research. 1999;59(3):607-614

- 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 Research. 2000;60(4):908-915
- Burdick AD, Davis JW, 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 Research. 2003;63(22):7825-7833
- Burke MD, Mayer RT**
Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene
Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals. 1974;2(6):583-588
- Burrows CJ, Muller JG**
Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission
Chemical Reviews. 1998;98(3):1109-1152
- Cadet J, Berger M, Douki T, Ravanat JL**
Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance
Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology. 1997;131:1-87
- Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget JP, Ravanat JL, et al.**
Hydroxyl radicals and DNA base damage
Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 1999;424(1-2):9-21
- Cadet J, Douki T, Gasparutto D, Ravanat JL**
Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features
Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2003;531(1-2):5-23
- Campo L, Mercadante R, Rossella F, Fustinoni S**
Quantification of 13 priority polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine by headspace solid-phase microextraction gas chromatography-isotope dilution mass spectrometry
Analytical Chimica Acta. 2009;631(2):196-205
- Campo L, Rossella F, Pavanello S, Mielzynska D, Siwinska E, Kapka L, et al.**
Urinary profiles to assess polycyclic aromatic hydrocarbons exposure in coke-oven workers
Toxicology Letters. 2010;192(1):72-78
- Carberry SE, Geacintov NE, Harvey RG**
Reactions of stereoisomeric non-bay-region benz[a]anthracene diol epoxides with DNA and conformations of non-covalent complexes and covalent adducts
Carcinogenesis. 1989;10(1):97-103

Carberry SE, Shahbaz M, Geacintov NE, Harvey RG

Reactions of stereoisomeric and structurally related bay region diol epoxide derivatives of benz[a]anthracene with DNA. Conformations of noncovalent complexes and covalent carcinogen-DNA adducts
Chemico-Biological Interactions. 1988;66(1-2):121-145

Carmichael PL, Platt KL, She MN, Lecoq S, Oesch F, Phillips DH, et al.

Evidence for the involvement of a bis-diol-epoxide in the metabolic activation of dibenz[a,h]anthracene to DNA-binding species in mouse skin
Cancer Research. 1993;53(5):944-948

Castorena-Torres F, de León MB, Cisneros B, Zapata-Pérez O, Salinas JE, Albores A

Changes in gene expression induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in the human cell lines HepG2 and A549
Toxicology in Vitro. 2008;22(2):411-421

Cavalieri E, Rogan E

Role of radical cations in aromatic hydrocarbon carcinogenesis
Environmental Health Perspectives. 1985;64:69-84

Cavalieri EL, Devanesan PD, Rogan EG

Radical cations in the horseradish peroxidase and prostaglandin H synthase mediated metabolism and binding of benzo[a]pyrene to deoxyribonucleic acid
Biochemical Pharmacology. 1988;37(11):2183-2187

Cavalieri EL, Rogan EG

The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation
Pharmacology and Therapeutics. 1992;55(2):183-199

Chakravarti D, Pelling JC, Cavalieri E, Rogan E

Relating aromatic hydrocarbons-induced DNA adducts and c-H-ras mutations in mouse skin papillomas: the role of apurinic sites
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1995;92(22):10422-10426

Cheh AM, Chadha A, Sayer JM, Yeh HJC, Yagi H, Pannell LK, et al.

Structures of covalent nucleoside adducts formed from adenine, guanine, and cytosine bases of DNA and the optically active bay-region 3,4-diol 1,2-epoxides of benz[a]anthracene
Journal of Organic Chemistry. 1993;58(15):4013-4022

Chen L, Devanesan PD, Higginbotham S, Ariese F, Jankowiak R, Small GJ, et al.

Expanded analysis of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed in vitro and in mouse skin: their significance in tumor initiation
Chemical Research in Toxicology. 1996;9(5):897-903

Chen JH, Chou FP, Lin HH, Wang CJ

Gaseous nitrogen oxide repressed benzo[a]pyrene-induced human lung fibroblast cell apoptosis via inhibiting JNK1 signals
Archives of Toxicology. 2005;79(12):694-704

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
Journal of Biological Chemistry. 2003;278(21):19526-19533

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
Toxicology and Applied Pharmacology. 2001;170(1):63-68

CITEPA, Serveau L, Nicco L

Inventaire des émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serre en France séries sectorielles et analyses étendues - Format Sectorisation Economique et Energétique (SECTEN): Réf. CITEPA 956.
Paris: Centre Interprofessionnel Technique d'Etudes de la Pollution Atmosphérique (CITEPA); 2012 Avril. 316 p.

Cleaver JE

GammaH2Ax: biomarker of damage or functional participant in DNA repair "all that glitters is not gold!"
Photochemistry and Photobiology. 2012;87(6):1230-1239

Cogliano VJ, Baan R, Straif K, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, et al.

Preventable exposures associated with human cancers
Journal of the National Cancer Institute. 2011;103(24):1827-1839

Compagnone D, Curini R, D'Ascenzo G, Del Carlo M, Montesano C, Napoletano S, et al.

Neutral loss and precursor ion scan tandem mass spectrometry for study of activated benzopyrene-DNA adducts
Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2011;401(6):1983-1991

Cooper CS, Ribeiro O, Farmer PB, Hewer A, Walsh C, Pal K, et al.

The metabolic activation of benz[a]anthracene in hamster embryo cells: evidence that diol-epoxides react with guanosine, deoxyguanosine and adenosine in nucleic acids
Chemico-Biological Interactions. 1980a;32(1-2):209-231

Cooper CS, Ribeiro O, Hewer A, Walsh C, Pal K, Grover PL, et al.

The involvement of a 'bay-region' and a non-'bay-region' diol-epoxide in the metabolic activation of benz[a]anthracene in mouse skin and in hamster embryo cells
Carcinogenesis. 1980b;1(3):233-243

Dahl AR, Snipes MB, Gerde P

Sites for uptake of inhaled vapors in beagle dogs
Toxicology and Applied Pharmacology. 1991;109(2):263-275

Daniel FB, Schut HA, Sandwisch DW, Schenck KM, Hoffmann CO, Patrick JR, et al.

Interspecies comparisons of benzo(a)pyrene metabolism and DNA-adduct formation in cultured human and animal bladder and tracheobronchial tissues
Cancer Research. 1983;43(10):4723-4729

Danielsen PH, Moller P, Jensen KA, Sharma AK, Wallin H, Bossi R, et al.

Oxidative stress, DNA damage, and inflammation induced by ambient air and wood smoke particulate matter in human A549 and THP-1 cell lines
Chemical Research in Toxicology. 2011;24(2):168-184

De Boer J, Hoeijmakers JH

Nucleotide excision repair and human syndromes
Carcinogenesis. 2000;21(3):453-460

De Kok TM, Moonen HJ, Van Delft J, Van Schooten FJ

Methodologies for bulky DNA adduct analysis and biomonitoring of environmental and occupational exposures
Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 2002;778(1-2):345-355

De Vries A, Dolle ME, Broekhof JL, Muller JJ, Kroese ED, van Kreijl CF, et al.

Induction of DNA adducts and mutations in spleen, liver and lung of XPA-deficient/lacZ transgenic mice after oral treatment with benzo[a]pyrene: correlation with tumour development
Carcinogenesis. 1997;18(12):2327-2332

DeMaio L, Corn M

Polynuclear aromatic hydrocarbons associated with particulates in Pittsburgh air
Journal of the Air Pollution Control Association. 1966;16(2):67-71

Denissenko MF, Pao A, Pfeifer GP, Tang M

Slow repair of bulky DNA adducts along the nontranscribed strand of the human p53 gene may explain the strand bias of transversion mutations in cancers
Oncogene. 1998;16(10):1241-1247

Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP

Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53
Science. 1996;274(5286):430-432

Dianov GL, Hubscher U

Mammalian base excision repair: the forgotten archangel
Nucleic Acids Research. 2013;41(6):3483-3490

Dierks EA, Stams KR, Lim HK, Cornelius G, Zhang H, Ball SE

A method for the simultaneous evaluation of the activities of seven major human drug-metabolizing cytochrome P450s using an in vitro cocktail of probe substrates and fast gradient liquid chromatography tandem mass spectrometry
Drug Metabolism and Disposition: the Biological Fate of Chemicals. 2001;29(1):23-29

Ding YS, Yan XJ, Jain RB, Lopp E, Tavakoli A, Polzin GM, et al.

Determination of 14 polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream smoke from U.S. brand and non-U.S. brand cigarettes
Environmental Science and Technology. 2006;40(4):1133-1138

Ding YS, Zhang L, Jain RB, Jain N, Wang RY, Ashley DL, et al.

Levels of tobacco-specific nitrosamines and polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream smoke from different tobacco varieties
Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention. 2008;17(12):3366-3371

Dmitrieva NI, Burg MB

Analysis of DNA breaks, DNA damage response, and apoptosis produced by high NaCl
American Journal of Physiology - Renal Physiology. 2008;295(6):F1678-1688

Donato MT, Lahoz A, Castell JV, Gomez-Lechon MJ

Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies
Current Drug Metabolism. 2008;9(1):1-11

Douki T, Ksoury Z, Marie C, Favier A, Ravanat JL, Maitre A

Genotoxicity of combined exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and UVA-a mechanistic study
Photochemistry and Photobiology. 2008;84(5):1133-1140

Dreij K, Seidel A, Jernstrom B

Differential removal of DNA adducts derived from anti-diol epoxides of dibenzo[a,l]pyrene and benzo[a]pyrene in human cells
Chemical Research in Toxicology. 2005;18(4):655-664

Dreij K, Sundberg K, Johansson AS, Nordling E, Seidel A, Persson B, et al.

Catalytic activities of human alpha class glutathione transferases toward carcinogenic dibenzo[a,l]pyrene diol epoxides
Chemical Research in Toxicology. 2002;15(6):825-831

EFSA

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Question N°EFSA-Q-2007-136)
The European Food Safety Authority Journal. 2008(724):1-114

Engel LS, Taioli E, Pfeiffer R, Garcia-Closas M, Marcus PM, Lan Q, et al.

Pooled Analysis and Meta-analysis of Glutathione S-Transferase M1 and Bladder Cancer: A HuGE Review
American Journal of Epidemiology. 2002;156(2):95-109

- Feng Z, Hu W, Chen JX, Pao A, Li H, Rom W, et al.**
Preferential DNA damage and poor repair determine ras gene mutational hotspot in human cancer
Journal of the National Cancer Institute. 2002;94(20):1527-1536
- Festing S, Wilkinson R**
The ethics of animal research. Talking Point on the use of animals in scientific research
European Molecular Biology Organization Reports. 2007;8(6):526-530
- Figuerola JD, Malats N, García-Closas M, Real FX, Silverman D, Kogevinas M, et al.**
Bladder cancer risk and genetic variation in AKR1C3 and other metabolizing genes
Carcinogenesis. 2008;29(10):1955-1962
- Franco R, Schoneveld O, Georgakilas AG, Panayiotidis MI**
Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenic
Cancer Letters. 2008;266(1):6-11
- Fuchs J, Mlcoch J, Oesch F, Platt KL**
Characterization of highly polar DNA adducts derived from dibenz[A,H]anthracene (DBA), 3,4-dihydroxy-3,4-dihydro-DBA, and 3,4,10,11-tetrahydroxy-3,4,10,11-tetrahydro-DBA
Toxicology and Industrial Health. 1993a;9(3):503-509
- Fuchs J, Mlcoch J, Platt KL, Oesch F**
Characterization of highly polar bis-dihydrodiol epoxide--DNA adducts formed after metabolic activation of dibenz[a,h]anthracene
Carcinogenesis. 1993b;14(5):863-867
- Funk M, Ponten I, Seidel A, Jernstrom B**
Critical parameters for adduct formation of the carcinogen (+)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol 9,10-epoxide with oligonucleotides
Bioconjugate Chemistry. 1997;8(3):310-317
- Gabelova A, Valovicova Z, Harthova E, Slamenova D, Binkova B, Sram RJ, et al.**
Genotoxicity of environmental air pollution in three European cities: Prague, Kosice and Sofia
Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2004;563(1):49-59
- Gao D, Luo Y, Guevara D, Wang Y, Rui M, Goldwyn B, et al.**
Benzo[a]pyrene and its metabolites combined with ultraviolet A synergistically induce 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine via reactive oxygen species
Free Radical Biology and Medicine. 2005;39(9):1177-1183
- Geacintov NE, Yoshida H, Ibanez V, Jacobs SA, Harvey RG**
Conformations of adducts and kinetics of binding to DNA of the optically pure enantiomers of anti-benzo(a)pyrene diol epoxide
Biochemical and Biophysical Research Communications. 1984;122(1):33-39

Gelhaus SL, Gilad O, Hwang WT, Penning TM, Blair IA
Multidrug resistance protein (MRP) 4 attenuates benzo[a]pyrene-mediated DNA-adduct formation in human bronchoalveolar H358 cells
Toxicology Letters. 2012;209(1):58-66

Gelhaus SL, Harvey RG, Penning TM, Blair IA
Regulation of benzo[a]pyrene-mediated DNA-and glutathione-adduct formation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in human lung cells
Chemical Research in Toxicology. 2011;24(1):89-98

Genter MB, Marlowe J, Kevin Kerzee J, Dragin N, Puga A, Dalton TP, et al.
Naphthalene toxicity in mice and aryl hydrocarbon receptor-mediated CYPs
Biochemical and Biophysical Research Communications. 2006;348(1):120-123

Gentil A, Cabral-Neto JB, Mariage-Samson R, Margot A, Imbach JL, Rayner B, et al.
Mutagenicity of a unique apurinic/apyrimidinic site in mammalian cells
Journal of Molecular Biology. 1992;227(4):981-984

Gerde P, Muggenburg BA, Henderson RF
Disposition of polycyclic aromatic hydrocarbons in the respiratory tract of the beagle dog. III. Mechanisms of the dosimetry
Toxicology and Applied Pharmacology. 1993a;121(2):328-334

Gerde P, Muggenburg BA, Hoover MD, Henderson RF
Disposition of polycyclic aromatic hydrocarbons in the respiratory tract of the beagle dog. I. The alveolar region
Toxicology and Applied Pharmacology. 1993b;121(2):313-318

Gerde P, Muggenburg BA, Lundborg M, Tesfaigzi Y, Dahl AR
Respiratory epithelial penetration and clearance of particle-borne benzo[a]pyrene
Research Report (Health Effects Institute). 2001(101):5-25; discussion 27-32

Glatt H
Sulfotransferases in the bioactivation of xenobiotics
Chemico-Biological Interactions. 2000;129(1-2):141-170

Glatt H, Wameling C, Elsberg S, Thomas H, Marquardt H, Hewer A, et al.
Genotoxicity characteristics of reverse diol-epoxides of chrysene
Carcinogenesis. 1993;14(1):11-19

Goodhead DT
The initial physical damage produced by ionizing radiations.
International Journal of Radiation Biology. 1989;56:623-634

Gorelick NJ, Wogan GN
Fluoranthene-DNA adducts: identification and quantification by an HPLC-32P-postlabeling method
Carcinogenesis. 1989;10(9):1567-1577

Groten JP

Mixtures and interactions

Food and Chemical Toxicology. 2000;38, Supplement 1(0):S65-S71

Grove AD, Llewellyn GC, Kessler FK, White KL, Jr., Crespi CL, Ritter JK

Differential protection by rat UDP-glucuronosyltransferase 1A7 against Benzo[a]pyrene-3,6-quinone- versus Benzo[a]pyrene-induced cytotoxic effects in human lymphoblastoid cells

Toxicology and Applied Pharmacology. 2000;162(1):34-43

Guengerich FP

Cytochrome P450 and chemical toxicology

Chemical Research in Toxicology. 2008;21:70-83

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;25(7):1201-1209

Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB

Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation

Journal of Biological Chemistry. 1974;249(22):7130-7139

Hall M, Parker DK, Hewer AJ, Phillips DH, Grover PL

Further metabolism of diol-epoxides of chrysene and dibenz[a,c]anthracene to DNA binding species as evidenced by ³²P-postlabelling analysis

Carcinogenesis. 1988;9(5):865-868

Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GC, Wolf CR

Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer

Carcinogenesis. 1997;18(4):641-644

Harrigan JA, McGarrigle BP, Sutter TR, Olson JR

Tissue specific induction of cytochrome P450 (CYP) 1A1 and 1B1 in rat liver and lung following in vitro (tissue slice) and in vivo exposure to benzo(a)pyrene

Toxicology in Vitro. 2006;20(4):426-438

Harris SL, Levine AJ

The p53 pathway: positive and negative feedback loops

Oncogene. 2005;24(17):2899-2908

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;3(3):421-428

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

Japanese Journal of Cancer Research. 1992;83(8):866-870

Hayes JD, Pulford DJ

The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part II
Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology. 1995;30(6):521-600

Hecht SS, Amin S, Lin JM, Rivenson A, Kurtzke C, el-Bayoumy K

Mammary carcinogenicity in female CD rats of a diol epoxide metabolite of fluoranthene, a commonly occurring environmental pollutant

Carcinogenesis. 1995;16(6):1433-1435

Hegde ML, Hazra TK, Mitra S

Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells

Cell Research. 2008;18(1):27-47

Heinrich U, Pott F, Rittinghausen S

Comparison of chronic inhalation effects in rodents after long-term exposure to either coal oven flue gas mixed with pyrolyzed pitch or diesel engine exhaust

Developments in Toxicology and Environment Science. 1986a;13:441-457

Heinrich U, Pott F, Mohr U, Fuhst R, König J

Lung tumours in rats and mice after inhalation of PAH-rich emissions

Experimental Pathology. 1986b;29(1):29-34

Heinrich U

Exhaust-specific carcinogenic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons and their significance for the estimation of the exhaust exposure-related lung cancer risk

In: Berlin, Mohr U, Bates DV, Dungworth DL, Lee PN, McClellan RO, Roe FJC, editors. Assessment of Inhalation Hazards: Integration and Extrapolation Using Diverse Data. Berlin, Springer; 1989, pp. 301–313

Heinrich U, Dungworth DL, Pott F, Peters L, Dasenbrock C, Levsen K, et al.

The Carcinogenic Effects of Carbon Black Particles and Tar–Pitch Condensation Aerosol after Inhalation Exposure of Rats

Annals of Occupational Hygiene. 1994;38(inhaled particles VII):351-356

Hemminki K, Cooper CS, Ribeiro O, Grover PL, Sims P

Reactions of 'bay-region' and non-'bay-region' diol-epoxides of benz(a)anthracene with DNA: evidence indicating that the major products are hydrocarbon-N2-guanine adducts

Carcinogenesis. 1980;1(3):277-286

Hemon - Delsaux J

Evaluation des niveaux d'exposition professionnelle aux hydrocarbures aromatiques polycycliques et des pathologies cancéreuses associées

Thèse de Médecine - Grenoble: Université Joseph Fourier; 2004.

Higinbotham KG, Rice JM, Diwan BA, Karprzak KS, Reed CD, Perantoni AO
GGT to GTT transversions in codon 12 of the K-ras oncogene in rat renal sarcomas induced with nickel subsulfide or nickel subsulfide/iron are consistent with oxidative damage to DNA
Cancer Research. 1992;52(17):4747-4751

Hodgson RM, Weston A, Grover PL
Metabolic activation of chrysene in mouse skin: evidence for the involvement of a triol-epoxide
Carcinogenesis. 1983;4(12):1639-1643

Hoeijmakers JH
Genome maintenance mechanisms for preventing cancer
Nature. 2001;411(6835):366-374

Hreljac I, Filipic M
Organophosphorus pesticides enhance the genotoxicity of benzo(a)pyrene by modulating its metabolism
Mutation Research/ Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2009;671(1-2):84-92

Huang M, Blair IA, Penning TM
Identification of Stable Benzo[a]pyrene-7,8-dione-DNA Adducts in Human Lung Cells
Chemical Research in Toxicology. 2013;26(5):685-692

Huang M, Liu X, Basu SS, Zhang L, Kushman ME, Harvey RG, et al.
Metabolism and distribution of benzo[a]pyrene-7,8-dione (B[a]P-7,8-dione) in human lung cells by liquid chromatography tandem mass spectrometry: detection of an adenine B[a]P-7,8-dione adduct
Chemical Research in Toxicology. 2012;25(5):993-1003

Hughes NC, Phillips DH
32P-postlabelling analysis of the covalent binding of benzo[ghi]perylene to DNA in vivo and in vitro
Carcinogenesis. 1993;14(1):127-133

Hukkanen J, Lassila A, Päävilärinta K, Valanne S, Sarpo S, Hakkola J, et al.
Induction and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450s in the human A549 lung adenocarcinoma cell line
American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology. 2000;22(3):360-366

Hukkanen J, Pelkonen O, Hakkola J, Raunio H
Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung
Critical Reviews in Toxicology. 2002;32(5):391-411

Husgafvel-Pursiainen K, Ridanpaa M, Anttila S, Vainio H
p53 and ras gene mutations in lung cancer: implications for smoking and occupational exposure
Journal of Occupational and Environmental Medicine. 1995;37(1):69-76

IARC

Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 92. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010. 868 p.

IARC

Agents classified by the IARC Monographs, Volume 1-106. IARC, 2012 (update on 06 Novembre 2012)
monographs.iarc.fr/ENG/ClassificationsAlphaOrder.pdf

INERIS, Albinet A, Beauchamp M, Harel G, Malherbe L

Concentrations atmosphériques des HAP au niveau national (France) : cartographie et tendances sur le long terme: DRC-11-118206-12134A. Verneuil-en-Halatte: INERIS; 2012 Janvier. 70 p.

INERIS, Collet S

Emissions de dioxines, de furanes et d'autres polluants liées à la combustion de bois naturels et adjuvants, Contract No.: DRC-n°00/60-MAPA-SCo-22420. Verneuil-en-Halatte: INERIS; 2000 Février. 69 p.

INERIS, Doonaert B, Pichard A

Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) - Evaluation de la relation dose-réponse pour des effets cancérogènes : approche substance par substance (Facteurs d'équivalence toxique-FET) et approche par les mélanges - Evaluation de la relation dose-réponse pour les effets non cancérogènes : Valeurs Toxicologiques de Référence (VTR): INERIS-DRC-03-47026-ETSC-BDo-N°03DR177. Verneuil-en-Halatte: INERIS; 2003 Novembre. 63 p.

INERIS, Rollin C, Quiot F

Acquisition des données d'entrée des modèles analytiques ou numériques de transferts dans les sols et les eaux souterraines. Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques - Guide méthodologique, Contract No.: 66244-DESP-R01. Verneuil-en-Halatte: INERIS; 18 août 2005. 99 p.

INERIS, Bisson M, Diderich R, Dujardin R, Hulot C, Lacroix G, et al.

Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques, le benzo[a]pyrène : DRC-01-25590-00DF252
Verneuil-en-Halatte: INERIS; Version N°2-3-juillet 2006, dernière mise à jour 18 août 2006. 44 p.

Ingram AJ, Lee R, Phillips JC

Factors affecting the bioavailability of benzo[a]pyrene from oils in mouse skin: oil viscosity, grooming, activity and its prevention
Journal of Applied Toxicology. 1995;15(3):175-182

INRS, Cadou S

Produits chimiques cancérogènes, mutagènes, toxiques pour la reproduction ED 976. Paris: Institut National de Recherche et de Sécurité (INRS); 2012

Irigaray P, Belpomme D

Basic properties and molecular mechanisms of exogenous chemical carcinogens
Carcinogenesis. 2010;31(2):135-148

Ishida M, Mikami S, Kikuchi E, Kosaka T, Miyajima A, Nakagawa K, et al.

Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway enhances cancer cell invasion by upregulating the MMP expression and is associated with poor prognosis in upper urinary tract urothelial cancer
Carcinogenesis. 2010;31(2):287-295

Iwanari M, Nakajima M, Kizu R, Hayakawa K, Yokoi T

Induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNAs by nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in various human tissue-derived cells: chemical-, cytochrome P450 isoform-, and cell-specific differences
Archives in Toxicology. 2002;76(5-6):287-298

Jalava PI, Happonen MS, Kelz J, Brunner T, Hakulinen P, Mäki-Paakkanen J, et al.

In vitro toxicological characterization of particulate emissions from residential biomass heating systems based on old and new technologies
Atmospheric Environment. 2012;50(0):24-35

Janosek J, Hilscherova K, Blaha L, Holoubek I

Environmental xenobiotics and nuclear receptors - Interactions, effects and in vitro assessment
Toxicology in Vitro. 2006(20):18-37

Jeffrey AM, Weinstein IB, Jennette KW, Grzeskowiak K, Nakanishi K, Harvey RG, et al.

Structures of benzo(a)pyrene--nucleic acid adducts formed in human and bovine bronchial explants
Nature. 1977;269(5626):348-350

Jernstrom B, Dock L, Hall M, Mannervik B, Tahir MK, Grover PL

Glutathione transferase catalyzed conjugation of benzo[a]pyrene 7,8-diol 9,10-epoxide with glutathione in human skin
Chemico-Biological Interactions. 1989;70(1-2):173-180

Jernstrom B, Funk M, Frank H, Mannervik B, Seidel A

Glutathione S-transferase A1-1-catalysed conjugation of bay and fjord region diol epoxides or polycyclic aromatic hydrocarbons with glutathione
Carcinogenesis. 1996;17(7):1491-1498

Jia L, Liu X

The conduct of drug metabolism studies considered good practice (II): in vitro experiments
Current Drug Metabolism. 2007;8(8):822-829

Jiang H, Shen Y-M, Quinn AM, Penning TM

Competing Roles of Cytochrome P450 1A1/1B1 and Aldo-Keto Reductase 1A1 in the Metabolic Activation of (±)-7,8-Dihydroxy-7,8-dihydro-benzo[a]pyrene in Human Bronchoalveolar Cell Extracts
Chemical Research in Toxicology. 2005;18(2):365-374

Jugan ML, Barillet S, Simon-Deckers A, Herlin-Boime N, Sauvaigo S, Douki T, et al.

Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells
Nanotoxicology. 2012;6(5):501-513

Kaufmann WK, Paules RS

DNA damage and cell cycle checkpoints
Federation of American Societies for Experimental Biology Journal. 1996;10(2):238-247

Kelley MJ, Littman SJ

Etiology of the mutational spectrum of ras genes in human carcinomas
Journal of the National Cancer Institute. 2002;94(20):1516-1517

Kennedy K, Macova M, Leusch F, Bartkow ME, Hawker DW, Zhao B, et al.

Assessing indoor air exposures using passive sampling with bioanalytical methods for estrogenicity and aryl hydrocarbon receptor activity
Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2009;394(5):1413-1421

Kennedy SW, Lorenzen A, James CA, Collins BT

Ethoxyresorufin-O-deethylase and porphyrin analysis in chicken embryo hepatocyte cultures with a fluorescence multiwell plate reader
Analytical Biochemistry. 1993;211(1):102-112

Khalili NR, Scheff PA, Holsen TM

PAH source fingerprints for coke ovens, diesel and, gasoline engines, highway tunnels, and wood combustion emissions
Atmospheric Environment. 1995;29(4):533-542

Kienzler A, Tronchère X, Devaux A, Bony S

Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay
Toxicology in Vitro. 2012;26(3):500-510

Kim H-YH, Finneman JI, Harris CM, Harris TM

Studies of the Mechanisms of Adduction of 2'-Deoxyadenosine with Styrene Oxide and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Dihydrodiol Epoxides
Chemical Research in Toxicology. 2000;13(7):625-637

King LC, George M, Gallagher JE, Lewtas J

Separation of ³²P-postlabeled DNA adducts of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons by HPLC
Chemical Research in Toxicology. 1994;7(4):503-510

Ko CB, Kim SJ, Park C, Kim BR, Shin CH, Choi S, et al.

Benzo(a)pyrene-induced apoptotic death of mouse hepatoma Hepal1c7 cells via activation of intrinsic caspase cascade and mitochondrial dysfunction
Toxicology. 2004;199(1):35-46

Kohle C, Bock KW

Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2
Biochemical Pharmacology. 2007;73(12):1853-1862

Kondraganti SR, Jiang W, Moorthy B

Differential regulation of expression of hepatic and pulmonary cytochrome P4501A enzymes by 3-methylcholanthrene in mice lacking the CYP1A2 gene
Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 2002;303(3):945-951

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;16(4):353-358

Lagerqvist A, Hakansson D, Lundin C, Prochazka G, Dreij K, Segerback D, et al.

DNA repair and replication influence the number of mutations per adduct of polycyclic aromatic hydrocarbons in mammalian cells
DNA Repair (Amsterdam). 2011;10(8):877-886

Lahoz A, Donato MT, Castell JV, Gomez-Lechon MJ

Strategies to in vitro assessment of major human CYP enzyme activities by using liquid chromatography tandem mass spectrometry
Current Drug Metabolism. 2008a;9(1):12-19

Lahoz A, Donato MT, Montero S, Castell JV, Gomez-Lechon MJ

A new in vitro approach for the simultaneous determination of phase I and phase II enzymatic activities of human hepatocyte preparations
Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2008b;22(2):240-244

Lahoz A, Donato MT, Picazo L, Gomez-Lechon MJ, Castell JV

Determination of major human cytochrome P450s activities in 96-well plates using liquid chromatography tandem mass spectrometry
Toxicology in Vitro. 2007;21(7):1247-1252

Laville N, Ait-Aissa S, Gomez E, Casellas C, Porcher JM

Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes
Toxicology. 2004;196(1-2):41-55

LaVoie EJ, Amin S, Hecht SS, Furuya K, Hoffmann D

Tumour initiating activity of dihydrodiols of benzo[b]fluoranthene, benzo[j]fluoranthene, and benzo[k]fluoranthene
Carcinogenesis. 1982a;3(1):49-52

LaVoie EJ, He ZM, Wu Y, Meschter CL, Weyand EH

Tumorigenic activity of the 4,5- and 9,10-dihydrodiols of benzo[j]fluoranthene and their syn- and anti-diol epoxides in newborn mice
Cancer Research. 1994;54(4):962-968

LaVoie EJ, Hecht SS, Amin S, Bedenko V, Hoffmann D

Identification of mutagenic dihydrodiols as metabolites of benzo(j)fluoranthene and benzo(k)fluoranthene
Cancer Research. 1980a;40(12):4528-4532

LaVoie EJ, Hecht SS, Amin S, Bedenko V, Hoffmann D

Identification of mutagenic dihydrodiols as metabolites of benzo(j)fluoranthene and benzo(k)fluoranthene
Cancer Research. 1980b;40(12):4528-4532

LaVoie EJ, Hecht SS, Bedenko V, Hoffmann D

Identification of the mutagenic metabolites of fluoranthene, 2-methylfluoranthene, and 3-methylfluoranthene
Carcinogenesis. 1982;3(8):841-846

Lecoq S, Chalvet O, Strapelias H, Grover PL, Phillips DH, Duquesne M

Microsomal metabolism of dibenz[a,c]anthracene, dibenz[a,h]anthracene and dibenz[a,j]anthracene to bis-dihydrodiols and polyhydroxylated products
Chemico-Biological Interactions. 1991a;80(3):261-279

Lecoq S, Ni She M, Grover PL, Platt KL, Oesch F, Phillips DH

The in vitro metabolic activation of dibenz[a,h]anthracene, catalyzed by rat liver microsomes and examined by 32P-postlabelling
Cancer Letters. 1991b;57(3):261-269

Lecoq S, She MN, Hewer A, Grover PL, Platt KL, Oesch F, et al.

The metabolic activation of dibenz[a,h]anthracene in mouse skin examined by 32P-postlabelling: minor contribution of the 3,4-diol 1,2-oxides to DNA binding
Carcinogenesis. 1991c;12(6):1079-1083

Lee CH, Ito Y, Yanagiba Y, Yamanoshita O, Kim H, Zhang SY, et al.

Pyrene-induced CYP1A2 and SULT1A1 may be regulated by CAR and not by AhR
Toxicology. 2007;238(2-3):147-156

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;48(11):1566-1572

Lekas P, Tin KL, Lee C, Prokipcak RD

The human cytochrome P450 1A1 mRNA is rapidly degraded in HepG2 cells
Archives in Biochemistry and Biophysics. 2000;384(2):311-318

Loft S, Fisher-Nielsen IB, Jeding K, Vistisen K, Poulsen HE

8-hydroxydeoxyguanosine as a urinary biomarker of oxidative DNA damage
Journal of Toxicological Environmental Health A. 1993;40(2-3):391-404

Lorenzen A, Kennedy SW

A Fluorescence-Based Protein Assay for Use with a Microplate Reader
Analytical Biochemistry. 1993;214(1):346-348

Luch A

The Carcinogenic Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
London: Imperial College Press; 2004. 400 p.

Luch A, Schober W, Soballa VJ, Raab G, Greim H, Jacob J, et al.

Metabolic activation of dibenzo[a,l]pyrene by human cytochrome P450 1A1 and P450 1B1 expressed in V79 Chinese hamster cells
Chemical Research in Toxicology. 1999;12(4):353-364

Machala M, Vondráček J, Bláha L, Ciganek M, Neča J

Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using in vitro reporter gene assay
Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2001;497(1-2):49-62

Mackay D, Shiu WY, Ma KC, Lee SC

Handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals
Boca Raton (USA): Taylor & Francis; 2006.

Malcolm HM, Dobson S

The calculation of an environmental assessment level (EAL) for atmospheric PAHs using relative potencies: DoE/HMIP/RR/94/041.
London: Department of the environment; 1994

Mangal D, Vudathala D, Park JH, Lee SH, Penning TM, Blair IA

Analysis of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in cellular DNA during oxidative stress
Chemical Research in Toxicology. 2009;22(5):788-797

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
Journal of Applied Toxicology. 2008;28(5):579-590

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 Molecular Mutagenesis. 2009;50(2):88-95

Marsch GA, Jankowiak R, Suh M, Small GJ

Sequence dependence of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adduct conformer distribution: a study by laser-induced fluorescence/polyacrylamide gel electrophoresis
Chemical Research in Toxicology. 1994;7(1):98-109

- Marshall MV, He ZM, Weyand EH, Rice JE, LaVoie EJ**
Mutagenic activity of the 4,5- and 9,10-dihydrodiols of benzo[*j*]fluoranthene and their syn- and anti-dihydrodiol epoxides in *Salmonella typhimurium*
Environmental and Molecular Mutagenesis. 1993;22(1):34-45
- Mass MJ, Abu-Shakra A, Roop BC, Nelson G, Galati AJ, Stoner GD, et al.**
Benzo[*b*]fluoranthene: tumorigenicity in strain A/J mouse lungs, DNA adducts and mutations in the *Ki-ras* oncogene
Carcinogenesis. 1996;17(8):1701-1704
- Mastrangelo G, Fadda E, Marzia V**
Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man
Environmental Health Perspectives. 1996;104(11):1166-1170
- 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;82(5):273-299
- Matthias C, Bockmuhl U, Jahnke V, Harries LW, Wolf CR, Jones PW, et al.**
The glutathione S-transferase GSTP1 polymorphism: effects on susceptibility to oral/pharyngeal and laryngeal carcinomas
Pharmacogenetics. 1998;8(1):1-6
- Mattsson A, Jernstrom B, Cotgreave IA, Bajak E**
H2AX phosphorylation in A549 cells induced by the bulky and stable DNA adducts of benzo[*a*]pyrene and dibenzo[*a,l*]pyrene diol epoxides
Chemico-Biological Interactions. 2009;177(1):40-47
- McFadyen MCE, Rooney PH, Melvin WT, Murray GI**
Quantitative analysis of the Ah receptor/cytochrome P450 CYP1B1/CYP1A1 signalling pathway
Biochemical Pharmacology. 2003;65(10):1663-1674
- McWilliams JE, Sanderson BJ, Harris EL, Richert-Boe KE, Henner WD**
Glutathione S-transferase M1 (GSTM1) deficiency and lung cancer risk
Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention. 1995;4(6):589-594
- Meek DW**
The p53 response to DNA damage
DNA Repair. 2004;3(8-9):1049-1056
- Meschini R, Marotta E, Berni A, Filippi S, Fiore M, Mancinelli P, et al.**
DNA repair deficiency and BPDE-induced chromosomal alterations in CHO cells
Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2008;637(1-2):93-100

Miller KP, Ramos KS

Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons

Drug Metabolism Review. 2001;33(1):1-35

Mimura J, Ema M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y

Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function

Genes and Development. 1999;13(1):20-25

Ministère de l'Emploi

Les expositions aux produits cancérigènes - Enquête SUMER

Premières Informations Premières Synthèses N°28.1

Ministère de l'emploi, Juillet 2005; p 1-6

Mitchell CE

Distribution and retention of benzo(a)pyrene in rats after inhalation

Toxicology Letters. 1982;11(1-2):35-42

Mitchell CE

The metabolic fate of benzo[a]pyrene in rats after inhalation

Toxicology. 1983;28(1-2):65-73

Mlcoch J, Fuchs J, Oesch F, Platt KL

Characterization of DNA adducts at the bay region of dibenz[a,h]anthracene formed in vitro

Carcinogenesis. 1993;14(3):469-473

Modica R, Fiume M, Guaitani A, Bartosek I

Comparative kinetics of benz(a)anthracene, chrysene and triphenylene in rats after oral administration. I. Study with single compounds

Toxicology Letters. 1983;18(1-2):103-109

Moir D, Viau A, Chu I, McMullen JW

Pharmacokinetics of Benzo[a]pyrene in the Rat

Journal of Toxicological Environmental Health Part A. 1998;53(7):507-530

Mondal NK, Mukherjee B, Das D, Ray MR

Micronucleus formation, DNA damage and repair in premenopausal women chronically exposed to high level of indoor air pollution from biomass fuel use in rural India

Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2010;29(697(1-2)):47-54

Moore BP, Hicks RM, Knowles MA, Redgrave S

Metabolism and binding of benzo(a)pyrene and 2-acetylaminofluorene by short-term organ cultures of human and rat bladder

Cancer Research. 1982;42(2):642-648

Morisseau C, Hammock BD

Epoxide Hydrolase : Mechanisms, Inhibitor Design, and Biological Role

Annual Review of Pharmacology and Toxicology. 2005;45:311-333

- Murahashi T, Watanabe T, Kanayama M, Kubo T, Hirayama T**
Human aryl hydrocarbon receptor ligand activity of 31 non-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons as soil contaminants
Journal of Health Science. 2007;53(6):715-721
- Nagayoshi K, Nemoto T, Yokoyama S, Yamashita F, Hashida M**
Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on generation and efflux of glutathione conjugates in primary cultured alveolar epithelial cells
Drug Metabolism and Pharmacokinetics. 2004;19(6):407-412
- Nakachi K, Imai K, Hayashi S, Kawajiri K**
Polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population
Cancer Research. 1993;53(13):2994-2999
- Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ**
Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer
Journal of Biochemical Chemistry. 2004;279(23):23847-23850
- Nebert DW, Roe AL, Dieter MZ, Solis WA, Yang Y, Dalton TP**
Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis
Biochemical Pharmacology. 2000;59(1):65-85
- Nesnow S, Ross J, Beck S, Lasley J, Nelson G, Lambert G, et al.**
Morphological transformation and DNA adduct formation by dibenz[a,h]anthracene and its metabolites in C3H10T1/2CL8 cells
Carcinogenesis. 1994;15(10):2225-2231
- Nisbet IC, LaGoy PK**
Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)
Regulatory Toxicology and Pharmacology. 1992;16(3):290-300
- Nordqvist M, Thakker DR, Vyas KP, Yagi H, Levin W, Ryan DE, et al.**
Metabolism of chrysene and phenanthrene to bay-region diol epoxides by rat liver enzymes
Molecular Pharmacology. 1981;19(1):168-178
- Nospikel T**
DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility
Cellular and Molecular Life Sciences. 2009;66(6):994-1009
- O'Neill IK, Goldberg MT, el Ghissassi F, Rojas-Moreno M**
Dietary fibre, fat and beef modulation of colonic nuclear aberrations and microcapsule-trapped gastrointestinal metabolites of benzo[a]pyrene-treated C57/B6 mice consuming human diets
Carcinogenesis. 1991;12(2):175-180

OCDE

Essai n° 471: Essai de mutation réverse sur des bactéries
Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4 Effets sur la santé
Paris: Organisation de Coopération et de Développement Economiques; 21 juillet 1997a.

OCDE

Essai n° 476: Essai in vitro de mutation génique sur des cellules de mammifères
Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4 Effets sur la santé
Paris: Organisation de Coopération et de Développement Economiques; 21 juillet 1997b.

Ogba N, Wang C, Raychoudhury S

Differential effects of fluoranthene and benzo[a]pyrene in MCF-7 cells
Journal of Environmental Science and Health Part A, Toxic/hazardous Substances and Environmental Engineering. 2005;40(5):927-936

Osborne MR

Sequence specificity in the reaction of benzopyrene diol epoxide with DNA
Chemico-Biological Interactions. 1990;75(2):131-140

Osborne MR, Crosby NT

Benzopyrenes
Cambridge (USA): Press of the University of Cambridge; 1987. 341 p.

Palackal NT, Lee SH, Harvey RG, Blair IA, Penning TM

Activation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiol proximate carcinogens by human aldo-keto reductase (AKR1C) enzymes and their functional overexpression in human lung carcinoma (A549) cells
Journal of Biological Chemistry. 2002;277(27):24799-24808

Park JH, Mangal D, Frey AJ, Harvey RG, Blair IA, Penning TM

Aryl hydrocarbon receptor facilitates DNA strand breaks and 8-oxo-2'-deoxyguanosine formation by the aldo-keto reductase product benzo[a]pyrene-7,8-dione
Journal of Biological Chemistry. 2009;284(43):29725-29734

Park JH, Mangal D, Tacka KA, Quinn AM, Harvey RG, Blair IA, et al.

Evidence for the aldo-keto reductase pathway of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol activation in human lung A549 cells
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008;105(19):6846-6851

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 Epidemiology, Biomarkers and Prevention. 1998;7(8):703-709

Payan JP, Lafontaine M, Simon P, Marquet F, Champmartin-Gendre C, Beydon D, et al.

3-Hydroxybenzo(a)pyrene as a biomarker of dermal exposure to benzo(a)pyrene
Archives of Toxicology. 2009;83(9):873-883

Penning TM, Shen YM, Mick R, Shults J, Field JM

Polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinones mutate p53 in human lung adenocarcinoma (A549) cells
Polycyclic Aromatic compounds. 2004;24(4-5)

Petrini JH

The Mre11 complex and ATM: collaborating to navigate S phase
Current Opinion in Cell Biology. 2000;12(3):293-296

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L

Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR
Nucleic Acids Research. 2002;30(9)

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP

Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations
Biotechnology Letters. 2004;26(6):509-515

Pfau W, Hughes NC, Grover PL, Phillips DH

HPLC separation of 32P-postlabelled benzo[b]fluoranthene-DNA adducts
Cancer Letters. 1992;65(2):159-167

Pfeifer GP, Denissenko MF

Formation and repair of DNA lesions in the p53 gene: relation to cancer mutations?
Environmental and Molecular Mutagenesis. 1998;31(3):197-205

Pfeifer GP, Hainaut P

On the origin of G --> T transversions in lung cancer
Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2003;526(1-2):39-43

Phillips DH, Glatt HR, Seidel A, Bochnitschek W, Oesch F, Grover PL

Mutagenic potential of DNA adducts formed by diol-epoxides, triol-epoxides and the K-region epoxide of chrysene in mammalian cells
Carcinogenesis. 1986;7(10):1739-1743

Pillai VC, Strom SC, Caritis SN, Venkataramanan R

A sensitive and specific CYP cocktail assay for the simultaneous assessment of human cytochrome P450 activities in primary cultures of human hepatocytes using LC-MS/MS
Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2013;74:126-132

Platt KL, Aderhold S, Kulpe K, Fickler M

Unexpected DNA damage caused by polycyclic aromatic hydrocarbons under standard laboratory conditions
Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2008a;650(2):96-103

Platt KL, Grupe S

Microsomal biotransformation of benzo[ghi]perylene, a mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbon without a "classic" bay region
Chemical Research in Toxicology. 2005;18(4):700-710

Platt KL, Grupe S, Fickler M

The 3,4-oxide is responsible for the DNA binding of benzo[ghi]perylene, a polycyclic aromatic hydrocarbon without a "classic" bay-region
Chemico-Biological Interactions. 2008b;176(2-3):179-187

Plottner S, Borza A, Wolf A, Bolt HM, Kuhlmann J, Follmann W

Evaluation of time dependence and interindividual differences in benzo[a]pyrene-mediated CYP1A1 induction and genotoxicity in porcine urinary bladder cell cultures
Journal of Toxicological Environmental Health Part A. 2008a;71(13-14):969-975

Plottner S, Degen GH, Roos PH, Follmann W

Analysis of CYP1A1 induction in single cells of urothelial cell populations by flow cytometry
Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2008b;392(6):1149-1158

Plottner S, Selinski S, Bolt HM, Degen GH, Hengstler JG, Roos PH, et al.

Distinct subtypes of urinary bladder epithelial cells with inducible and non-inducible cytochrome P450 1A1
Archives in Toxicology. 2009;83(2):131-138

Pohjola SK, Lappi M, Honkanen M, Rantanen L, Savela K

DNA binding of polycyclic aromatic hydrocarbons in a human bronchial epithelial cell line treated with diesel and gasoline particulate extracts and benzo[a]pyrene
Mutagenesis. 2003;18(5):429-438

Pospelova TV, Demidenko ZN, Bukreeva EI, Pospelov VA, Gudkov AV, Blagosklonny MV

Pseudo-DNA damage response in senescent cells
Cell Cycle. 2009;8(24):4112-4118

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;13:541-549

Pozzoli L, Gilardoni S, Perrone MG, De Gennaro G, De Rienzo M, Vione D
Polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere: monitoring, sources, sinks and fate. I: Monitoring and sources
Annali di Chimica. 2004;94(1-2):17-32

Puga A, Ma C, Marlowe JL
The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways
Biochemical Pharmacology. 2009;77(4):713-722

Pushparajah DS, Umachandran M, Nazir T, Plant KE, Plant N, Lewis DFV, 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
Toxicology in Vitro. 2008a;22(1):128-145

Pushparajah DS, Umachandran M, Plant KE, Plant N, Ioannides C
Differential response of human and rat epoxide hydrolase to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure: Studies using precision-cut tissue slices
Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2008b;640(1-2):153-161

Pushparajah DS, Umachandran M, Plant KE, Plant N, Ioannides C
Up-regulation of the glutathione S-transferase system in human liver by polycyclic aromatic hydrocarbons; comparison with rat liver and lung
Mutagenesis. 2008c;23(4):299-308

Qu SX, Stacey NH
Formation and persistence of DNA adducts in different target tissues of rats after multiple administration of benzo[a]pyrene
Carcinogenesis. 1996;17(1):53-59

Quinn AM, Penning TM
Comparisons of (\pm)-benzo[a]pyrene-trans-7,8-dihydrodiol activation by human cytochrome P450 and aldo-keto reductase enzymes: Effect of redox state and expression levels
Chemical Research in Toxicology. 2008;21(5):1086-1094

Rahman A, Barrowman JA, Rahimtula A
The influence of bile on the bioavailability of polynuclear aromatic hydrocarbons from the rat intestine
Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 1986;64(9):1214-1218

RamaKrishna NV, Gao F, Padmavathi NS, Cavalieri EL, Rogan EG, Cerny RL, et al.
Model adducts of benzo[a]pyrene and nucleosides formed from its radical cation and diol epoxide
Chemical Research in Toxicology. 1992;5(2):293-302

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;78(10):6126-6129

Ravindra K, Sokhi R, Van Grieken R

Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation

Atmospheric Environment. 2008;42(13):2895-2921

Redon CE, Nakamura AJ, Martin OA, Parekh PR, Weyemi US, Bonner WM

Recent developments in the use of gamma-H2AX as a quantitative DNA double-strand break biomarker

Aging. 2011;3(2):168-174

Redon CE, Nakamura AJ, Zhang YW, Ji JJ, Bonner WM, Kinders RJ, et al.

Histone gammaH2AX and poly(ADP-ribose) as clinical pharmacodynamic biomarkers

Clinical Cancer Research. 2010 15(16(18)):4532-4542

Rice JE, Coleman DT, Hosted TJ, Jr., LaVoie EJ, McCaustland DJ, Wiley JC, Jr.

Identification of mutagenic metabolites of indeno[1,2,3-cd]pyrene formed in vitro with rat liver enzymes

Cancer Research. 1985;45(11 Pt 1):5421-5425

Rice JE, Hosted TJ, Jr., DeFloria MC, LaVoie EJ, Fischer DL, Wiley JC, Jr.

Tumor-initiating activity of major in vivo metabolites of indeno[1,2,3-cd]pyrene on mouse skin

Carcinogenesis. 1986;7(10):1761-1764

Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM

DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139

Journal of Biological Chemistry. 1998;273(10):5858-5868

Rogan EG, RamaKrishna NV, Higginbotham S, Cavalieri EL, Jeong H, Jankowiak R, et al.

Identification and quantitation of 7-(benzo[a]pyren-6-yl)guanine in the urine and feces of rats treated with benzo[a]pyrene

Chemical Research in Toxicology. 1990;3(5):441-444

Rogan EG, Devanesan PD, RamaKrishna NV, Higginbotham S, Padmavathi NS, Chapman K, et al.

Identification and quantitation of benzo[a]pyrene-DNA adducts formed in mouse skin

Chemical Research in Toxicology 1993;6(3): 356-63

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 Research. 1990;50(16):5088-5094

Ross JA, Nelson GB, Holden KL, Kligerman AD, Erexson GL, Bryant MF, et al.
DNA adducts and induction of sister chromatid exchanges in the rat following benzo[b]fluoranthene administration
Carcinogenesis. 1992;13(10):1731-1734

Ross JA, Nelson GB, Wilson KH, Rabinowitz JR, Galati A, Stoner GD, et al.
Adenomas induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in strain A/J mouse lung correlate with time-integrated DNA adduct levels
Cancer Research. 1995;55(5):1039-1044

Rossella F, Campo L, Pavanello S, Kapka L, Siwinska E, Fustinoni S
Urinary polycyclic aromatic hydrocarbons and monohydroxy metabolites as biomarkers of exposure in coke oven workers
Occupational and Environmental Medicine. 2009;66(8):509-516

Ryberg D, Skaug V, Hewer A, Phillips DH, Harries LW, Wolf CR, et al.
Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk
Carcinogenesis. 1997;18(7):1285-1289

Saeed M, Higginbotham S, Gaikwad N, Chakravarti D, Rogan E, Cavalieri E
Depurinating naphthalene-DNA adducts in mouse skin related to cancer initiation
Free Radical Biology and Medicine. 2009;47(7):1075-1081

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

Sak A, Grehl S, Erichsen P, Engelhard M, Grannass A, Levegrun S, et al.
gamma-H2AX foci formation in peripheral blood lymphocytes of tumor patients after local radiotherapy to different sites of the body: dependence on the dose-distribution, irradiated site and time from start of treatment
International Journal of Radiation Biology. 2007;83(10):639-652

Schinkel AH, Jonker JW
Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview
Advanced Drug Delivery Reviews. 2003;55(1):3-29

Schwerdtle T, Walter I, Hartwig A
Arsenite and its biomethylated metabolites interfere with the formation and repair of stable BPDE-induced DNA adducts in human cells and impair XPAzf and Fpg
DNA Repair (Amsterdam). 2003;2(12):1449-1463

Seidegard J, Ekstrom G
The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics
Environmental Health Perspectives. 1997;105 Suppl 4:791-799

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
Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2007;620(1–2):123-134

Sharovskaya J, Kobliakova I, Solomatina N, Kobliakov V
Effect of some carcinogenic and non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons on gap junction intercellular communication in hepatoma cell cultures
European Journal of Cell Biology. 2006;85(5):387-397

Shen Y, 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
Chemical Research in Toxicology. 2006;19(11):1441-1450

Shertzer HG, Clay CD, Genter MB, Schneider SN, Nebert DW, Dalton TP
Cyp1a2 protects against reactive oxygen production in mouse liver microsomes
Free Radical Biology and Medicine. 2004;36(5):605-617

Sheu HL, Lee WJ, Lin SJ, Fang GC, Chang HC, You WC
Particle-bound PAH content in ambient air
Environmental Pollution. 1997;96(3):369-382

Shimada T
Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons
Drug Metabolization and Pharmacokinetics. 2006a;21(4):257-276

Shimada T, Fujii-Kuriyama Y
Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1
Cancer Science. 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
Chemical Research in Toxicology. 2006b;19(2):288-294

Shimada T, Murayama N, Tanaka K, Takenaka S, Imai Y, Hopkins NE, et al.
Interaction of polycyclic aromatic hydrocarbons with human cytochrome P450 1B1 in inhibiting catalytic activity
Chemical Research in Toxicology. 2008;21(12):2313-2323

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
Toxicology and Applied Pharmacology. 2003;187(1):1-10

Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA

Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice
Cell Research. 2008;18(1):134-147

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL

A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells
Experimental Cell Research. 1988;175(1):184-191

Singh R, Teichert F, Seidel A, Roach J, Cordell R, Cheng MK, et al.

Development of a targeted adductomic method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts using online column-switching liquid chromatography/tandem mass spectrometry
Rapid Communications in Mass Spectrometry. 2010;24(16):2329-2340

Smart DJ, Ahmedi KP, Harvey JS, Lynch AM

Genotoxicity screening via the gammaH2AX by flow assay
Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2011;715(1-2):25-31

Smith LE, Denissenko MF, Bennett WP, Li H, Amin S, Tang M, et al.

Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons
Journal of the National Cancer Institute. 2000;92(10):803-811

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
Chemico-Biological Interactions. 2005;151(2):101-119

Soutoglou E, Misteli T

Activation of the cellular DNA damage response in the absence of DNA lesions
Science. 2008;320(5882):1507-1510

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
Toxicology and Applied Pharmacology. 2008;226(3):213-224

Srivastava R, Rahman Q, Kashyap M, Singh A, Jain G, Jahan S, et al.

Nano-titanium dioxide induces genotoxicity and apoptosis in human lung cancer cell line, A549
Human and Exposition Toxicology. 2012;32(2):153-166

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 in Biochemistry and Biophysics. 1999;371(2):340-344

Srivastava SK, Watkins SC, Schuetz E, Singh SV

Role of glutathione conjugate efflux in cellular protection against benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-induced DNA damage

Molecular Carcinogenesis. 2002;33(3):156-162

Staal YC, van Herwijnen MH, van Schooten FJ, van Delft JH

Modulation of gene expression and DNA adduct formation in HepG2 cells by polycyclic aromatic hydrocarbons with different carcinogenic potencies

Carcinogenesis. 2006;27(3):646-655

Staal YCM, Van Herwijnen MHM, Pushparajah DS, Umachandran M, Ioannides C, Van Schooten FJ, et al.

Modulation of gene expression and DNA-adduct formation in precision-cut liver slices exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons of different carcinogenic potency

Mutagenesis. 2007;22(1):55-62

Sun JD, Wolff RK, Kanapilly GM

Deposition, retention, and biological fate of inhaled benzo(a)pyrene adsorbed onto ultrafine particles and as a pure aerosol

Toxicology and Applied Pharmacology. 1982;65(2):231-244

Sundberg K, Dreij K, Seidel A, Jernstrom B

Glutathione conjugation and DNA adduct formation of dibenzo[a,l]pyrene and benzo[a]pyrene diol epoxides in V79 cells stably expressing different human glutathione transferases

Chemical Research in Toxicology. 2002;15(2):170-179

Sundberg K, Seidel A, Mannervik B, Jernstrom B

Detoxication of carcinogenic fjord-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by glutathione transferase P1-1 variants and glutathione

Federation of European Biochemical Societies Letters. 1998;438(3):206-210

Tang D, Phillips DH, Stampfer M, Mooney LA, Hsu Y, Cho S, et al.

Association between carcinogen-DNA Adducts in White Blood Cells and Lung Cancer Risk in the Physicians Health Study

Cancer Research. 2001;61:6708-6712

Tarantini A, Douki T, Personnaz MB, Besombes JL, Jafrezo JL, Maître A

Effect of the chemical composition of organic extracts from environmental and industrial atmospheric samples on the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons mixtures

Toxicological and Environmental Chemistry. 2011a;93(5):941-954

Tarantini A, Maitre A, Lefebvre E, Marques M, Marie C, Ravanat JL, et al.

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

Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2009;671(1-2):67-75

Tarantini A, Maitre A, Lefebvre E, Marques M, Rajhi A, Douki T

Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo[a]pyrene to form DNA adducts in human cells

Toxicology. 2011b;279(1-3):36-44

Till M, Riebniger D, Schmitz H-J, Schrenk D

Potency of various polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of CYP1A1 in rat hepatocyte cultures

Chemico-Biological Interactions. 1999;117(2):135-150

Topinka J, Schwarz LR, Kiefer F, Wiebel FJ, Gajdoš O, Vidová P, et al.

DNA adduct formation in mammalian cell cultures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and nitro-PAH in coke oven emission extract

Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 1998;419(1-3):91-105

Toyooka T, Amano T, Ibuki Y

Titanium dioxide particles phosphorylate histone H2AX independent of ROS production

Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 2012;742(1-2):84-91

Tsuchiya Y, Nakajima M, Itoh S, Iwanari M, Yokoi T

Expression of aryl hydrocarbon receptor repressor in normal human tissues and inducibility by polycyclic aromatic hydrocarbons in human tumor-derived cell lines

Toxicological Sciences. 2003;72(2):253-259

Tudorovic R, Ariese F, Devanesan P, Jankowiak R, Small GJ, Rogan E, et al.

Determination of benzo[a]pyrene- and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-DNA adducts formed in rat mammary glands

Chemical Research in Toxicology. 1997, Sep;10(9):941-7

UNECE, United Nations Economic Commission for Europe, Geneva

The 1998 Aarhus Protocol on Persistent Organic Pollutants (POPs), Original text of the protocol, 24 June 1998, 49 p.

www.unece.org/env/Irtap/pops_h1.html

Urani C, Doldi M, Crippa S, Camatini M

Human-derived cell lines to study xenobiotic metabolism

Chemosphere. 1998;37(14-15):2785-2795

US EPA

Review and evaluation of the evidence for cancer associated with air pollution: EPA-450/5-83-006R.

Arlington: US EPA, 1984

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;50(7):623-632

- Vaury C, Laine R, Noguez P, de Coppet P, Jaulin C, Praz F, et al.**
Human glutathione S-transferase M1 null genotype is associated with a high inducibility of cytochrome P450 1A1 gene transcription
Cancer Research. 1995;55(23):5520-5523
- Veglia F, Matullo G, Vineis P**
Bulky DNA adducts and risk of cancer: a meta-analysis
Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. 2003;12(2):157-160
- Verma N, Pink M, Petrat F, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S**
Exposure of primary porcine urothelial cells to benzo(a)pyrene: in vitro uptake, intracellular concentration, and biological response
Archives in Toxicology. 2012;86(12):1861-1871
- Verma N, Pink M, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S**
Benzo[a]pyrene-mediated toxicity in primary pig bladder epithelial cells: A proteomic approach
Journal of Proteomics. 2013;85:53-64
- Vione D, Barra S, De Gennaro G, De Rienzo M, Gilardoni S, Perrone MG, et al.**
Polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere: monitoring, sources, sinks and fate. II: Sinks and fate
Annali di Chimica. 2004;94(4):257-268
- Wallace SS**
DNA damages processed by base excision repair: biological consequences
International Journal of Radiation Biology. 1994;66(5):579-589
- Wang JS, Busby WF, Wogan GN**
Tissue distribution of DNA adducts in pre-weanling BLU:Ha mice treated with a tumorigenic dose of fluoranthene
Cancer Letters. 1995;92(1):9-19
- Watanabe T, Imoto I, Kosugi Y, Fukuda Y, Mimura J, Fujii Y, et al.**
Human arylhydrocarbon receptor repressor (AHRR) gene: genomic structure and analysis of polymorphism in endometriosis
Journal of Human Genetics. 2001;46(6):342-346
- Wessel N, Menard D, Pichavant-Rafini K, Ollivier H, Le Goff J, Burgeot T, et al.**
Genotoxic and enzymatic effects of fluoranthene in microsomes and freshly isolated hepatocytes from sole (*Solea solea*)
Aquatic Toxicology. 2012;108:33-41
- Wessel N, Santos R, Menard D, Le Menach K, Buchet V, Lebayon N, et al.**
Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*)
Marine Environmental Research. 2010;69 Suppl:S71-73

Weston A, Newman MJ, Mann DL, Brooks BR

Molecular mechanics and antibody binding in the structural analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-diol-epoxide--DNA adducts
Carcinogenesis. 1990;11(5):859-864

Weyand EH, Bryla P, Wu Y, He ZM, LaVoie EJ

Detection of the major DNA adducts of benzo[j]fluoranthene in mouse skin: nonclassical dihydrodiol epoxides
Chemical Research in Toxicology. 1993;6(1):117-124

Weyand EH, Geddie N, Rice JE, Czech A, Amin S, LaVoie EJ

Metabolism and mutagenic activity of benzo[k]fluoranthene and 3-, 8- and 9-fluorobenzo[k]fluoranthene
Carcinogenesis. 1988;9(7):1277-1281

Weyand EH, Rice JE, LaVoie EJ

³²P-postlabeling analysis of DNA adducts from non-alternant PAH using thin-layer and high performance liquid chromatography
Cancer Letters. 1987;37(3):257-266

Whyte JJ, Jung RE, Schmitt CJ, Tillitt DE

Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure
Critical Reviews in Toxicology. 2000;30(4):347-570

WHO

Selected Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria n°202
Geneva: World Health Organization; 1998

Wilkening S, Bader A

Influence of culture time on the expression of drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2
Journal of Biochemical et Molecular Toxicology. 2003;17(4):207-213

Wilson AS, Davis CD, Williams DP, Buckpitt AR, Pirmohamed M, Park BK

Characterisation of the toxic metabolite(s) of naphthalene
Toxicology. 1996;114(3):233-242

Wolf A, Kutz A, Plottner S, Behm C, Bolt HM, Follmann W, et al.

The effect of benzo(a)pyrene on porcine urinary bladder epithelial cells analyzed for the expression of selected genes and cellular toxicological endpoints
Toxicology. 2005;207(2):255-269

Xue W, Warshawsky D

Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review
Toxicology and Applied Pharmacology. 2005;206(1):73-93

Zanger UM, Schwab M

Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzymes activities, and impact of genetic variation
Pharmacology and Therapeutics. 2013(Article in press)

Zhang L, Jin Y, Huang M, Penning TM

The role of human aldo-keto reductases in the metabolic activation and detoxication of polycyclic aromatic hydrocarbons: Interconversion of PAH catechols and PAH o-quinones
Frontiers in Pharmacology, Experimental Pharmacology and Drug Discovery. 2012 November, Volume 3: article 193

Zhang S, Song N, Li Q, Fan H, Liu C

Liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for simultaneous evaluation of activities of five cytochrome P450s using a five-drug cocktail and application to cytochrome P450 phenotyping studies in rats
Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences. 2008;871(1):78-89

Zhang X, Wu RS, Fu W, Xu L, Lam PK

Production of reactive oxygen species and 8-hydroxy-2'deoxyguanosine in KB cells co-exposed to benzo[a]pyrene and UV-A radiation
Chemosphere. 2004;55(10):1303-1308

Zhang Y, Wu X, Guo D, Rechkoblit O, Geacintov NE, Wang Z

Two-step error-prone bypass of the (+)- and (-)-trans-anti-BPDE-N2-dG adducts by human DNA polymerases eta and kappa
Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2002;510(1-2):23-35

Zhong Q, Amin S, Lazarus P, Spratt TE

Differential repair of polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts from an actively transcribed gene
DNA Repair (Amsterdam). 2010;9(9):1011-1016

Zhou W, Doetsch PW

Effect of abasic sites and DNA single-strand breaks on prokariotic RNA polymérases
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993;90(14):6601-6605

The Extreme Variety of Genotoxic Response to Benzo[a]pyrene in Three Different Human Cell Lines from Three Different Organs

Camille Genies^{1,2,3}, Anne Maître², Emmanuel Lefèbvre², Amandine Jullien¹, Marianne Chopard-Lallier¹, Thierry Douki^{1*}

1 Laboratoire « Lésions des Acides Nucléiques », Université Joseph Fourier – Grenoble 1/CEA/Institut Nanoscience et Cryogénie/SCIB, Grenoble, France, **2** Equipe EPSP Environnement et Prédiction de la Santé des Populations – laboratoire TIMC (UMR CNRS 5525), CHU de Grenoble, Université Joseph Fourier, UFR de médecine, Domaine de la Merci, La Tronche, France, **3** Agence de l'environnement et de la Maîtrise de l'Énergie 20, Angers, France

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are associated with occupational exposure and urban atmospheric pollution. Determination of the genotoxic properties of these compounds is thus of utmost importance. For this purpose a variety of cellular models have been widely used. Reliable results can however only be obtained with models reflecting the specific sensitivity of different organs towards PAHs. In this work, we compared the response to benzo[a]pyrene in cell lines from human lungs (A549) and bladder (T24); two important target organs for PAHs-induced cancer. Human hepatocytes (HepG2) were used as a reference, although liver is not a concern for PAHs carcinogenesis. Adducts arising from the ultimate diol-epoxide metabolite of B[a]P, BPDE, were found to be produced in a dose-dependent manner in HepG2. BPDE DNA adducts were not detected in T24 and in A549 their formation was found to be most efficient at the lowest concentration studied (0.2 μ M). These results are probably explained by differences in induction and activity of phase I metabolism enzymes, as well as by proteins eliminating the B[a]P epoxide in A549. In addition to BPDE adducts, oxidative DNA damage, namely strand breaks and oxidized purines were measured and found to be produced only in minute amounts in all three cell lines. In summary, our results emphasize the large differences in the response of cells originating from different organs. Our data also point out the importance of carefully selecting the doses used in *in vitro* toxicological experiments. The example of A549 shows that working at high doses may lead to an underestimation of the risk. Finally, the choice of method for evaluating genotoxicity appears to be of crucial importance. The comet assay does not seem to be the best method for a compound like B[a]P which induces stable adducts causing limited oxidative damage.

Citation: Genies C, Maître A, Lefèbvre E, Jullien A, Chopard-Lallier M, et al. (2013) The Extreme Variety of Genotoxic Response to Benzo[a]pyrene in Three Different Human Cell Lines from Three Different Organs. PLoS ONE 8(11): e78356. doi:10.1371/journal.pone.0078356

Editor: Robert W. Sobol, University of Pittsburgh, United States of America

Received: June 16, 2013; **Accepted:** September 19, 2013; **Published:** November 8, 2013

Copyright: © 2013 Genies et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the French Environment and Energy Management Agency (ADEME) and CEA. Funding for this project was also provided by a grant from "La Région Rhône-Alpes". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: thierry.douki@cea.fr

Introduction

Atmospheric pollution concerns numerous occupations but also the general population and includes a wide variety of chemical substances. Among these, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) arise mainly from vehicle exhaust, cigarette smoke, residential heating and industry by incomplete combustion of organic matter or in processes using charcoal or petroleum derivatives [1,2]. Some PAHs are suspected or known human carcinogens and exposure to these compounds is associated with increased cancer incidence, especially in case of occupational exposure [3]. Assessing the deleterious properties of PAHs is thus a major issue in public health. Due to the diversity of the chemical structures of PAHs with more than 100 compounds identified this is however not a straightforward task. In addition, the different PAHs are not all equally carcinogenic and basic toxicological data cannot be extrapolated from one to the other. Another specificity of PAHs is that they are always emitted in complex mixtures whose composition depends on the source. Although a risk

assessment strategy based on Toxic Equivalent Factors is applied [4], it does not take into consideration interactions between different PAHs and thus needs to be refined. Consequently, numerous pieces of information concerning the genotoxicity of PAHs remain to be gathered. Animal studies appear to be powerful tools for this purpose. Such studies are however cumbersome and expensive, and regulations tend to limit their use. *In vitro* approaches are thus attractive alternatives [5]. Such investigations may be informative but should take into consideration the target organs of the studied compounds.

In spite of an extensive literature on the toxicity of PAHs, only limited work has been devoted to a systematic comparison between the responses of different human cell lines. This is yet a key issue in modern toxicology. So far, the best documented target organ of PAHs-induced cancer is the lungs [6] although evidence has also been obtained for a role of PAHs in the induction of skin [7] and bladder cancer [8]. We designed the present study to determine whether PAHs, and in particular benzo[a]pyrene

(B[a]P), were equally genotoxic in cell lines originating from lungs and bladder, with hepatocytes as a reference metabolizing model. B[a]P is the only PAH classified in group 1 by the International Agency for Research on Cancer (IARC) and considered as a known carcinogen to humans [9]. B[a]P has thus been extensively studied and constitutes the reference compound for assessing toxicity of exposure to mixtures in the Toxic Equivalent Factors approach [4]. The carcinogenic properties of PAHs, and B[a]P in particular are mainly explained by their ability to induce DNA damage. Two main types of DNA lesions have been described, both involving the cellular metabolism aimed at eliminating PAHs [10]. First, the oxidative stress associated with the activity of some metabolism enzymes or by the redox properties of some metabolites can induce DNA strand breaks and oxidized bases. Second, reactive compounds produced during the phase I metabolism, are expected to be conjugated with hydrosoluble groups by transferases, and may add to DNA bases yielding covalent adducts.

Metabolic detoxification has been extensively studied in the case of B[a]P. Cytochrome P450-dependent oxygenases (CYP450), especially 1A1 and 1B1 isoforms, metabolize B[a]P into epoxides. These reactive compounds can be detoxified as glutathione conjugates by glutathione-S-transferases (GST). Epoxides are also converted into dihydrodiol derivatives by epoxide hydrolase (EH) and further oxidized by CYP450 to produce B[a]P diol epoxide (BPDE). Most of this ultimate carcinogenic metabolite is detoxified by GST and other phase II enzymes, but it may react in part with DNA. Several types of adducts are thus produced; the predominant one (BPDE-*N*²-dGuo) results from addition of BPDE to the N2 exocyclic amino group of guanine [11,12]. Evidence has also been provided for the formation of oxidative DNA lesions as the result of the production of reactive oxygen species upon metabolism of B[a]P [13,14,15]. However, we recently showed that BPDE-*N*²-dGuo adducts were produced in an almost two orders of magnitude larger frequency than oxidative strand breaks in human hepatocytes [16].

Obviously, these observations greatly depend on the metabolic properties of the considered organs and cell types. A large number of *in vitro* studies have been carried out using hepatocyte cell lines such as human HepG2, mainly because they possess a large number of enzymatic activities involved in the bioactivation of xenobiotics and of PAHs in particular [17,18]. Since the liver is not a target organ of PAHs, studies aimed at predicting genotoxic effects should however involve cells more relevant to human health issues. In the present work, we investigated the cytotoxicity and genotoxicity of B[a]P in A549 alveolar epithelial lung cells and in T24 bladder cells which are human cell lines representative of two target tissues. The results were compared to those obtained with HepG2 hepatocytes. The link between the formation of DNA damage and the metabolizing potential of the different cell lines was studied. For this purpose, a wide variety of biological endpoints were monitored, including formation of BPDE-*N*²-dGuo, induction of oxidative DNA damage, modulation of the expression of genes involved in metabolism and variation in EROD and GST activities.

Materials and Methods

1. Products and Chemicals

Cell culture reagents including culture media, fetal bovine serum, MEM- non essential amino acids, L- glutamine, PBS, trypsin-EDTA, trypsin 10X, collagen type I rat tail and antibiotics were purchased from Life Technologies (Carlsbad, CA). Dimethylsulfoxide (DMSO), deferoxamine, RNase A, RNase T1,

phosphodiesterase I, DNase II, phosphodiesterase II, nuclease P1, alkaline phosphatase, agarose low melt, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), cell lysis M Cell lysis agent, ethoxyresorufin and resorufin were obtained from Sigma Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). MESA Blue qPCR Mastermix for SYBR Assay Low ROX was provided by Eurogentec (Angers, France). B[a]P (Sigma) was suspended in DMSO and the stock solution was kept at -20°C and diluted directly in culture medium when needed. Solvents used for HPLC- mass spectrometry were of analytical grade.

2. Cell Culture

2.1 Cell lines and culture conditions. HepG2 human hepatocyte cell line was supplied by ATCC (HB-8065). A549 human alveolar cells and T24 urinary bladder cell line were purchased from CLS Cell Lines Services, Germany. HepG2 cells were grown in Dubelco's Modified Eagle Medium with a preliminary collagen type I coating of the flasks. A549 cells were grown in a DMEM F12 medium while T24 cells were grown in a Mc Coy's 5A Medium. All media were supplemented with 10% of fetal calf serum, 1% of non-essential amino acids, 1% of L-Glutamine and antibiotics (penicillin 0.01 U/mL, streptomycin 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

2.2. Treatment. Cells were seeded at a density of 27 000 cells/cm² and incubated for 48 h (37°C , 5% CO₂). Semi-confluency cells were exposed to B[a]P solutions prepared in culture medium without serum. A concentrated solution of B[a]P in DMSO was used for this purpose. Cells exposed to treatment medium with 0.5% of DMSO were used as negative controls. Measurements were performed after 14 h of incubation for dose effect assessment as described by Tarantini *et al* [16] with 0.2, 2 and 5 μM of B[a]P. Several time points ranging between 30 min and 24 h with 0.2 μM of B[a]P were chosen for study of the time-dependence of the cellular response. Finally, after incubation, cells were harvested using trypsin-EDTA and stored as dry pellets at -80°C until analysis for adducts quantification, RT-qPCR analysis or enzymatic activities measurement.

3. BPDE-*N*²-dGuo quantification

3.1 DNA extraction and hydrolysis. Buffer A (sucrose 320 mM, MgCl₂ 5 mM, Tris-HCl 10 mM, deferoxamine 0.1 mM and Triton 1%) was added to the cellular pellet. After lysis of the plasmid membranes lysis by use of a vortex, the nuclei were collected after centrifugation (1500 \times g, 5 min). Nuclear membrane lysis was achieved by buffer B (EDTA-Na₂ 5 mM, Tris HCl 5 mM, deferoxamine 0.15 mM, SDS 10%) and RNA was removed by incubation with a RNase mixture (RNase A 100 mg/mL and T1 1 U/ μL) for 15 min at 50°C . Then, proteins were hydrolyzed by incubation for 1 h at 37°C after addition of protease (20 mg/mL). DNA was precipitated by addition of 2 \times volumes of a NaI solution (7.6 M NaI, 40 mM Tris, 20 mM EDTA-Na₂, 0.3 mM deferoxamine pH 8) and 3.3 \times volumes of absolute isopropanol. The sample was washed first with 40% isopropanol then with 70% ethanol and finally resuspended in 50 μl of an aqueous deferoxamine mesylate solution (0.1 mM). Subsequently, the DNA hydrolysis was performed in two successive steps. First, a cocktail of enzymes containing phosphodiesterase II (0.05 U), DNase II (0.5 U) and nuclease P1 (0.5 U) together with buffer (200 mM succinic acid, 100 mM CaCl₂ pH 6) was added to the sample. After 2 h incubation at 37°C , the pH was raised from 6 to 8 by addition of buffer (500 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8). The sample was then incubated further for 2 h at 37°C following addition of phosphodiesterase I (0.05 U), alkaline phosphatase (2 U). The reaction was stopped with HCl

0.1 N. After centrifugation (5000×g, 5 min), the DNA hydrolysate was collected, lyophilized and resuspended in MeOH/H₂O (50/50 v/v) for HPLC-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) analysis.

3.2 HPLC-MS/MS. A high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry system (HPLC-MS/MS) was used to quantify BPDE-*N*²-dGuo adducts as previously described [19]. The HPLC separation was performed on a 150×2 mm ID C18 reverse phase Uptisphere ODB column (Interchim, Montluçon, France). A gradient of acetonitrile from 0 to 100% in a 2 mM ammonium formate aqueous solution was used. Under these conditions, the retention time of the BPDE-*N*²-dGuo adduct was 18 min. Quantification was performed with a tandem mass spectrometer (API 3000, SCIEX) operated in the positive electrospray ionization mode. Detection was performed in the multiple reaction monitoring mode using specific fragmentations: *m/z* 570→454, 570→285 and 570→257. In addition to that of adducts, the amount of unmodified nucleosides was determined by using a UV detector set at 260 or 300 nm placed upstream of the inlet of the mass spectrometer. For both types of analytes, quantitative results were obtained by external calibration based on the injection of known amounts of standards. Calibration of the response of the detector was performed for each run of analyses. Repeated injections of standards during the run permitted to control the stability of the sensitivity of the detection and of the retention times.

4. Comet assay

Single- and double-strand breaks together with alkali-labile sites were quantified using single-cell alkaline gel electrophoresis technique as previously described [16]. Suspensions of 1500 cells in low melt agarose (0.6%) were deposited on microscopic slides in triplicate for each condition and covered with 1% of agarose. Cell lysis was achieved in a buffer (2.5 M NaCl, 0.5 M Na₂-EDTA, 10 mM Tris, 1% Sodium lauryl sulfate, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH 10) for 1 h at 4°C in the dark. Slides were washed 3 times with a reaction buffer (40 mM HEPES, 0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA and 200 mg BSA). After the washing step, slides were immersed 30 min in an alkaline electrolysis buffer (300 mM NaOH, 1 mM Na₂-EDTA, pH 13) for DNA unwinding. Electrophoresis was performed at 25 V/300 mA for 30 min migration. After 3 rinses with neutralizing buffer (0.4 M Tris-HCl, pH 4), DNA was stained with ethidium bromide (20 µg/mL). Some samples were also incubated with Formamidopyrimidine-DNA-*N*-glycosylase (Fpg) to reveal the presence of oxidized purines. In this version of the Comet assay, slides were incubated after lysis for 45 min at 37°C in Fpg buffer (0.1 M KCl, 0.5 mM EDTA-Na₂, and 0.04 M Tris-HCl, pH 8) in the presence of 0.17 µg of Fpg. Slides were then treated as described above for the standard Comet protocol. For both versions of the assay, slides were analyzed with a fluorescence microscope coupled with a computer system using Comet Assay IV software. We randomly picked 50 comets on each slide and the percentage of tail intensity (% tail intensity) was determined. Results were expressed as an average of scores arising from three different slides for each sample. For calibration purposes, cells exposed to 2 Gy of γ -radiation (2 Gy/min emitted by a ⁶⁰Co source) were analyzed. The increase in % tail intensity was defined as corresponding to 2000 breaks per cell, knowing that 1 Gy is expected to induce 1000 DNA strand breaks in mammalian cells [20,21,22]. This correlation was used to calculate the extent of strand breaks and Fpg-sensitive sites in B[a]P treated cells.

5. Gene induction of metabolism enzyme

Gene expression was quantified by RT-qPCR using a protocol previously described [23]. Total RNA was extracted from cell pellets using the GenElute mammalian total RNA miniprep kit (Sigma) following the manufacturer's protocol with optional DNase treatment step. Reverse transcription of RNA in cDNA was performed on 2 µg of RNA samples (Superscript II Reverse transcriptase) and 20 ng were amplified by PCR using gene specific primers (CYP1A1, 1A2, 3A4, 1B1, EH, GST A1 and P1, AKRC1 and MRP4). Sequences of the primers are presented in supplementary data (Table S1). Quantitative PCR was performed in a MX3005P multiplex quantitative PCR system (Stratagene) using MESA Blue qPCR Mastermix for SYBR Assay Low ROX. S18 and GAPDH were chosen as housekeeping genes for normalization and amplified in triplicate for each assay. Variability of genes expression among the various conditions was assessed by Bestkeeper, an Excel based pair-wise RNAm correlation tool with cycle threshold (Ct). RNA level modulation of target genes was computed using the Relative expression Software tool based on Ct comparison.

$$R = \frac{(E_{target})^{\Delta C_p(\text{mean control} - \text{mean sample})}}{(E_{target})^{\Delta C_p \text{ref}(\text{mean control} - \text{mean sample})}}$$

6. GST activity

After harvest, cells were lysed using cell lysis agent mixed with a protease inhibitor cocktail. Samples were then centrifuged at 4°C for 10 min at 2000×g and for 20 min at 16000×g. Activity was measured in the supernatant. Cytosolic GST activity was assessed according to the method of Habig *et al* [24]. CDNB was used as a substrate in the presence of GSH. The reaction medium contained 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 1 mM EDTA, 6 mM GSH and 1 mM CDNB. After addition of 25 µL of diluted cellular extract (1:4 or 1:10 v/v), the formation of a GSH-CDNB complex, which is catalyzed by the GST activity present in the sample, was monitored for 5 min by spectroscopic measurement at a 340 nm wavelength. The protein content of the supernatant was measured by the BCA assay. Activity was expressed in µmol of product/min/mg of proteins.

7. EROD activity

A549 and HepG2 cells were seeded at 50 000 cells per well in black 96 well plates and incubated for 24 h in culture medium. They were then exposed for 24 h (HepG2) or 48 h (A549) to increasing B[a]P concentrations in DMEM treatment medium. Medium was then removed and replaced by 7-ethoxyresorufin-containing medium (2 µM in culture medium without serum) for 15 min. Resorufin production was then measured by fluorescence on a microplate spectrofluorimeter (Spectra Max M2, Molecular Devices) with excitation and emission wavelengths set at 535 and 590 nm, respectively. Plates were washed twice with PBS and frozen for 45 min at -80°C. Protein content was determined by fluorescamine assay as described by Lorenzen *et al.*[25] EROD activity was expressed in picomoles of resorufin per minute and per milligram of protein (pmol/min/mg protein).

8. Statistical analysis.

All experiments were performed three times and analyses were each time performed in triplicate. Statistical analysis was conducted using the Student test for qPCR studies. Mann-

Whitney tests were applied for all other experiments. Differences were considered as significant when p values were below 0.05.

Results

1. Formation BPDE- N^2 -dGuo adducts in HepG2, A549 and T24

The level of BPDE- N^2 -dGuo adduct was very different from one cellular model to the other. While adduct formation was dose dependent for HepG2 from 0.2 to 5 μM , the pattern observed in A549 was a bell-shaped response (Fig 1A). In this latter cell line, the level of DNA adducts reached a maximum at 0.2 μM and then continuously decreased as the B[a]P concentration increased to 5 μM . In order to confirm that 0.2 μM B[a]P was the actual concentration leading to the maximal level of adduct, an additional experiment was made with lower concentrations (Fig. S1). It should be emphasized that the amount of DNA adducts at 0.2 μM B[a]P was larger in A549 than in HepG2. Unlike the results obtained in these two cell lines, no BPDE- N^2 -dGuo was detected in T24 cells (Fig 1a), even when the B[a]P dose was increased to 10 and 20 μM (data not shown).

In order to determine the time dependence of the formation of BPDE- N^2 -dGuo adducts, cell lines were exposed from 30 minutes to 24 hours to 0.2 μM of B[a]P, the dose that induced the maximum amount of adducts in A549 cells (Fig 1B). The kinetic profiles were considerably different between the cellular models. A linear formation of adducts took place in A549 cells from 4 h to 24 h and slowed down after 24 h. Conversely, the amount of adducts observed in hepatocytes increased after a delay of 2 h, and then reached a plateau at 4 h until 24 h. Again, the adduct level was higher after 8 h in A549 than in HepG2. Another experiment confirmed the larger induction of BPDE- N^2 -dGuo adducts at 0.2 μM B[a]P than at higher concentrations over a 24 h period of time (Fig. S2). In T24 bladder cells, BPDE- N^2 -dGuo adduct could not be detected at any time even when the cells were exposed up to 20 μM for up to 24 h (data not shown).

2 Dose- and time-dependent formation of oxidative damage within cells exposed to B[a]P

In a subsequent series of experiments, oxidative DNA damage resulting from exposure to B[a]P was measured in cells by the γ -

radiation calibrated Comet assay in the presence or the absence of Fpg treatment. Similar results were obtained for the three cell lines investigated. In untreated cells, the background level of 8-oxodGuo was higher than that of strand breaks. Significant induction was observed at 2 μM , but not at 0.2 μM . The increase of damage at 2 μM was in the average of 0.1 break/ 10^6 bases (Fig. 2A) and a larger induction of 0.4 8oxodGuo/ 10^6 bases (Fig. 2B). It should be mentioned that we checked the induction of

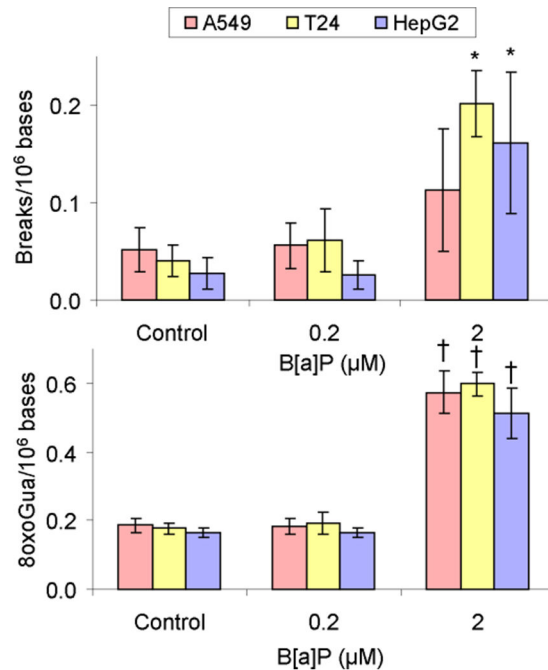


Figure 2. Level of oxidative DNA damage measures by a calibrated Comet assay in cells exposed to B[a]P for 14 h. Values for the strand breaks (A) were obtained from the standard version of the method while the level of 8-oxodGuo (B) was obtained with incubation of the slides with the Fpg repair enzyme. (Statistically significant ($p < 0.05$) with respect to (*) DMSO control and (†) Fpg buffer control). doi:10.1371/journal.pone.0078356.g002

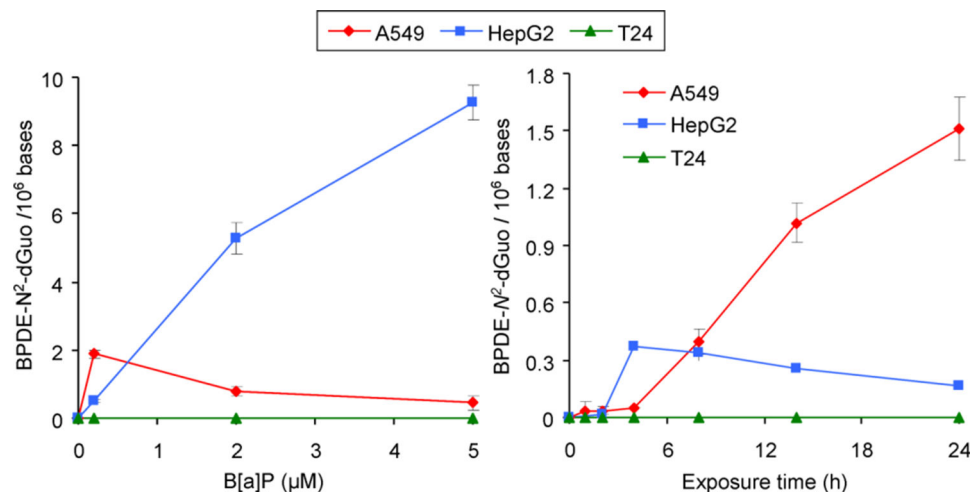


Figure 1. Dose-dependent (A) and time course formation (B) of BPDE- N^2 -dGuo adducts in HepG2, A549 and T24 cell lines exposed 14 h to increasing concentrations from 0.2 to 5 μM of B[a]P (A) or incubated with 0.2 μM from 30 minutes to 24 h (B). doi:10.1371/journal.pone.0078356.g001

strand breaks by the Fpg buffer alone and observed a small increase of approximately 0.03 breaks/ 10^6 bases (data not shown).

The time-dependence was similar for the three cell lines exposed to 0.2 μ M B[a]P from 30 minutes to 24 h (Fig. 3). A small but significant increase in the level of strand breaks relative to control was observed at 2 h. The basal level was restored at 6 h.

3 Metabolization of B[a]P in the three cell lines

In order to better understand the huge differences in adduct formation between the cell lines, the expression of cytochrome P450 oxygenases and epoxide hydrolase, the two enzymes involved in the formation of BPDE, was studied and the EROD activity quantified. Information was also gathered on GST, the main phase II enzyme involved in the BPDE detoxification pathway.

3.1 Concentration-dependent expression of phase I enzymes in HepG2, A549 and T24. Exposure to B[a]P markedly increased the level of CYP1A1 mRNA within HepG2 and A549 cells (Fig. 4). For both cell lines, a strong induction of CYP1A1 was observed at 2 μ M with a 60 times higher value than in controls. While a plateau was reached within A549, induction in HepG2 was further enhanced to a 200 fold increase at 5 μ M. CYP1B1 transcript level increased at 2 μ M B[a]P and remained stable at 5 μ M (induction fold of 9 relative to control) within A549 cells. In contrast, the over-expression of CYP1B1 was observed only for a treatment with 5 μ M B[a]P in hepatocytes. Only limited modulation in the expression of other metabolization genes was observed (Table 1). In T24 cells, no significant over-expression of targeted genes was detected (Fig. 5), even repression was observed especially for CYP1B1, 1A2 and 3A4 at 2 μ M and for 1A2 and 3A4 at 5 μ M. Expression of EPH was found to remain unchanged in all cell lines at all B[a]P concentrations.

3.2 Time-dependence of the modulation of the expression of phase I enzymes in A549 and HepG2 cells. Time-dependent expression of metabolism enzymes was investigated for a period ranging from 30 min to 24 h. The concentration of B[a]P was 0.2 μ M because it corresponded to the maximum of DNA adduct formation in A549. T24 cells were not included in this study because of the absence in detected adducts and the lack of variation in gene expression in the dose-dependence study at 14 h reported above. In HepG2, the level of CYP1A1 mRNA strongly increased with exposure time until 6 h (219 ± 18 induction fold) and then drastically decreased after 14 h of treatment (Fig. 6).

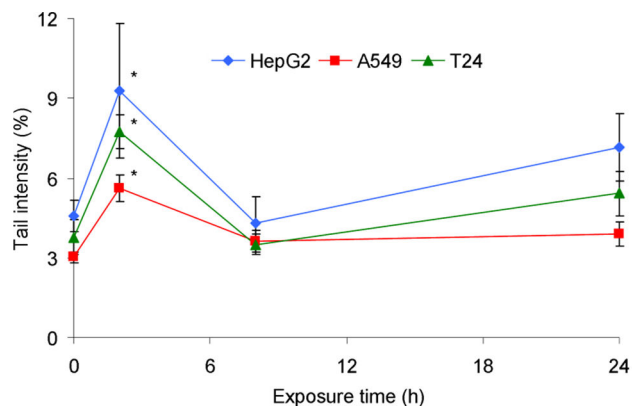


Figure 3. Time-dependent formation of DNA strand breaks measured by the Comet assay in HepG2, A549 and T24 cell lines incubated with 0.2 μ M for a time period ranged between 30 min to 24 h. *: significantly different from t=0 h ($p < 0.05$).
doi:10.1371/journal.pone.0078356.g003

A much more modest over-expression of CYP1B1 and CYP1A2 (expression ratio of 5 and 8) was observed with a maximum at 2 h and 6 h of treatment respectively. No overexpression of CYP3A4 and EPH was detected. In A549 maximal induction for CYP1A1 and 1B1 was reached at 2 h with levels 4-times lower and 8-times higher, respectively, than those observed in HepG2 (Fig. 6). The induction of both genes was 5-times lower at 6 h than at 2 h. No significant modulation was detected in A549 for the other transcripts (Table 2).

3.3 EROD activity. Incubation times were selected on the basis of the work conducted by Billet *et al.* [26] who showed that the maximum EROD activity was recorded at 24 h in HepG2 and 48 h in A549. We found a similar EROD activity in HepG2 and A549 in response to 0.2 μ M B[a]P (Table 3). In contrast a large difference was observed at 2 and 5 μ M with an order of magnitude difference. In addition, the dose response was different, with a trend to a plateau at 2 and 5 μ M for lung cells and a roughly linear dose-response for hepatocytes.

3.4 Expression and activity of GSTs. Limited modulation of the expression of the genes coding for GSTs was observed in the three cell lines with only a 3-fold induction of GSTP1 in HepG2 cells (Fig. 7). None of the investigated GSTs were modulated in T24 cells. This result was confirmed in the study of the time-dependence where only a small induction of GSTP1 was observed in cells at 2 h (Table S2).

In agreement with these data, the GST activity remained constant for all concentrations (Table 4) and incubation times (figure S3). In addition, similar basal levels of activity were determined for the three cell types.

3.5 Expression of AKRC1 and MRP4 genes. Last, we quantified the expression of the genes coding for AKRC1 and MRP4. These proteins are involved in the detoxification of the B[a]P mono-epoxide by conjugation to GSH and export out of the cell, respectively. At the basal level, the mRNA of both proteins were found to be more than 10 times more frequent in A549 than in HepG2. This difference was increased for AKRC1 upon exposure to B[a]P since significant over expression compared to untreated control was observed at 2 and 5 μ M in A549 but not in HepG2 (Fig. 8). The expression of MRP4 was found to be lowered in both cell lines by addition of B[a]P but not to an extent which could compensate for the initial larger expression in A549.

Discussion

Because animal studies are expensive, time-consuming and of limited use because of regulatory issues, development of reliable cellular tests is an obviously interesting and widely developed alternative. Yet, the question is raised of the relevance of the cellular models. For the study of PAH genotoxicity, hepatocytes have been widely used because they express a large part of the metabolic activities required for phase I and II metabolization [27,28,29,30]. PAHs do not induce liver cancers whereas lungs, and to a lesser extent bladder and skin are the main target organs. We therefore designed this study to compare the DNA damage induced by B[a]P in pulmonary and bladder cell lines with those in widely studied HepG2 hepatocytes. All experiments were performed at low concentrations of B[a]P in order to be close to biologically relevant exposure conditions and to limit the impact on cellular viability. Indeed, at least 70% of cells are viable in our experiments (data not shown). Concentration is also an important parameter to consider when comparing cell lines, as shown for example by the difference in the dose dependence of mutation profile in cells exposed to PAHs diol epoxides [31,32].

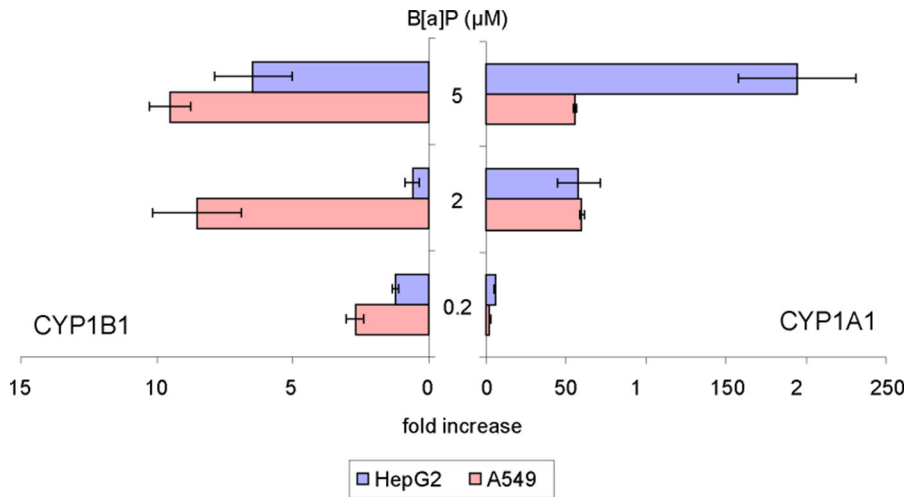


Figure 4. Expression of CYP1A1 (right) and CYP1B1 (left) genes in HepG2 and A549 cells exposed to increasing concentrations of B[a]P from 0.2 to 5 μM for 14 h. Differences with respect to DMSO control were found statistically significant for both genes in both cell lines at all concentrations ($p < 0.05$) except CYP1B1 in HepG2 at 0.2 and 2 μM B[a]P. doi:10.1371/journal.pone.0078356.g004

The A549 cell line was chosen as *in vitro* pulmonary model. This cell line is a type II pneumocyte which is extensively used in toxicology [26,33,34,35]. Genotoxicity was investigated both in terms of BPDE adducts and oxidative DNA damage. In a concentration-effect study, we obtained a bell-shaped curve with a maximal induction of DNA adducts at 0.2 μM. This behaviour contrasts with the formation of adducts proportional to the B[a]P concentration observed in HepG2, in agreement with our previous observations [16]. These contrasting results could not be explained by a bias related to the time of analysis, as shown by studies of the time dependence of the formation of BPDE- N^2 -dGuo in both cell lines. A concentration dependence with a maximal adduct formation at low concentration has been observed in other lung models. The same results were reported in HEL (Human diploid lung fibroblasts) and BEAS-2B (Bronchial epithelial cells) exposed to increasing doses of B[a]P to 10 μM for 24 h or 48 h [18,36]. The maxima were observed at 1 μM and 2.5 μM respectively. Interestingly, these authors also observed a higher level of BPDE adducts in lungs cells than in HepG2 hepatocytes upon exposure to 0.2 and 1 μM B[a]P.

A possible explanation to the difference in DNA adduct formation in A549 and HepG2 could be a drastic difference in B[a]P intake between the two cell lines. It was however shown that A549 cells are only 2 fold less efficient than HepG2 cells in that respect [37]. We also observed that the levels of adducts in the

three investigated cell lines exposed to pure BPDE were of the same order of magnitude (data not shown), suggesting similar uptakes of polycyclic aromatic molecules. It is thus most likely that the differences in the patterns of induction of BPDE adducts reflect the differences in time- and concentration-dependent metabolic

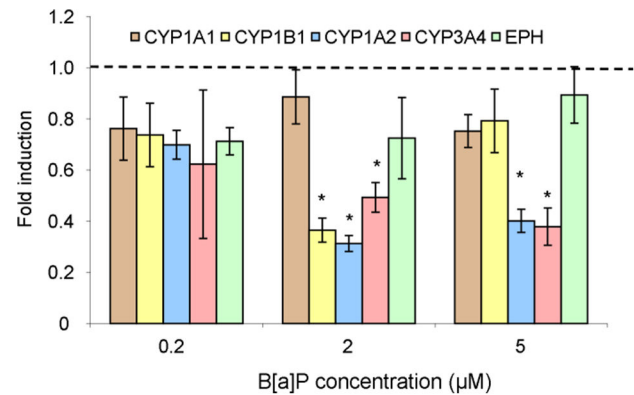


Figure 5. Modulation of gene expression in T24 cells exposed for 14 h to increasing concentrations of B[a]P from 0.2 to 5 μM. (Statistically significant ($p < 0.05$) with respect to (*) DMSO control). doi:10.1371/journal.pone.0078356.g005

Table 1. Modulation of the expression of a series of phase I metabolism enzymes in HepG2 and A549 cells exposed for 14 h to increasing concentrations of B[a]P from 0.2 to 5 μM.

B[a]P (μM)	HepG2			A549		
	CYP1A2	CYP3A4	EPH	CYP1A2	CYP3A4	EPH
0.2	3.25 ± 0.34 *	1.61 ± 0.15	0.86 ± 0.10	2.41 ± 1.34	1.21 ± 0.10	0.68 ± 0.34
2	3.77 ± 0.63 *	1.14 ± 0.11	0.77 ± 0.22	2.64 ± 0.78	1.29 ± 0.05	0.77 ± 0.22
5	4.79 ± 1.45 *	2.18 ± 0.82	1.05 ± 0.04	2.23 ± 0.85	2.75 ± 0.48 *	0.80 ± 0.19

(Statistically significant ($p < 0.05$) with respect to (*) DMSO control of the concerned cell line). doi:10.1371/journal.pone.0078356.t001

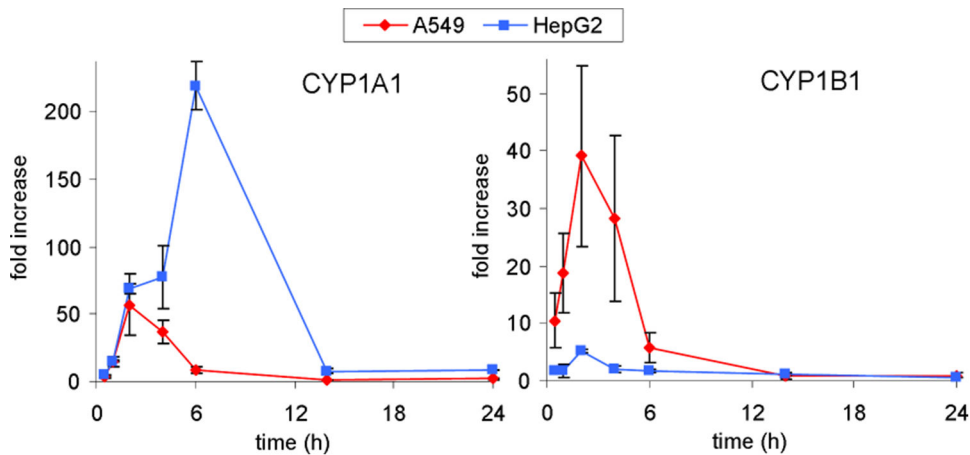


Figure 6. Induction of CYP1A1 and 1B1 in A549 and HepG2 cells exposed to 0.2 μ M B[a]P. Data were found significantly different ($p < 0.05$) with respect to DMSO control for both cell lines between 30 min and 6 h. doi:10.1371/journal.pone.0078356.g006

responses of A549 and HepG2 to B[a]P treatment. We thus investigated B[a]P metabolism in terms of gene expression coding for metabolic enzymes and phase I (EROD) and II (GST) enzymatic activities.

While the CYP1A1 mRNA expression reached a plateau at 2 μ M B[a]P in A549 cells treated for 14 h, it was proportional to the B[a]P concentration in HepG2. In terms of kinetics, we observed that the CYP1A1 expression was less intense at its maximum and less persistent in A549 than in HepG2 upon exposure to 0.2 μ M. All these gene expression data were in accordance with EROD activity. These differences are in agreement with published works showing that the distribution of radioactive metabolites was similar in the two cell lines but that the overall amount was larger in HepG2 [37]. These cellular observations reflect what happens *in vivo*, with liver being the favoured location for metabolism. This tissue specific metabolism was also observed in rat lung and liver slices. Maximal induction of metabolism was reached at 1 μ M B[a]P in lung slices whereas it required 10 μ M for liver slices suggesting better metabolizing capacities in the latter organ [38]. This result correlated with an induction of CYP1A1 mRNA proportional to the B[a]P dose in liver slices and with the observation of a plateau for lung slices at 1 μ M. Furthermore, EROD activity was 10 times weaker in lung slices than in liver slices. The observed saturation of CYP1A1 mRNA induction and EROD activity in A549 may be

linked to AhR expression, a key player in B[a]P metabolism by activating multiple enzyme expressions like CYP1A1, 1B1, GST and efflux proteins [12,39,40,41]. AhR is detected in a majority of tissues but at different levels [42,43]. Iwanari *et al* [44] showed a weaker expression of AhR in A549 than HepG2. The same observation was made when comparing slices of rat liver and lungs [45], which is in line with the idea that hepatocyte cell lines are more metabolically active than A549 towards B[a]P. However, it should be stressed that the differences in CYP1A1 expression and EROD between HepG2 and A549 is lower at low B[a]P concentration, in conformation with the larger amount of BPDE adducts observed in A549 at 0.2 μ M B[a]P.

Furthermore, induction of genes other than CYP1A1 was different in the two cell lines. The most significant differences were observed for CYP1B1 the induction of which by 0.2 μ M of B[a]P was faster and 8 times higher in A549 than in HepG2. This is in agreement with the different pattern of altered genes observed between human hepatic and pulmonary cells exposed to 1 μ M B[a]P [17]. The same observation of a larger expression of CYP1B1 in lung compared to liver has been reported in rat samples [46]. CYP1B1 has been shown to be more efficient than CYP1A1 at converting B[a]P into its 7,8-diol derivative [47] and to exhibit a larger mRNA half-life than CYP1A1 [48]. CYP1B1 is thus likely to play a significant role in the formation of BPDE DNA adducts in A549. Another CYP450, CYP1A2, was also differen-

Table 2. Modulation of phase I metabolism enzymes in HepG2 and A549 cells following exposure to 0.2 μ M B[a]P.

Exposure time (h)	HepG2			A549		
	CYP1A2	CYP3A4	EPH	CYP1A2	CYP3A4	EPH
0.5	0.66 \pm 0.28	1.94 \pm 0.12 *	0.82 \pm 0.23	2.41 \pm 1.34	2.10 \pm 0.86	0.67 \pm 0.28
1	1.52 \pm 0.93	0.96 \pm 0.55	0.60 \pm 0.41	1.16 \pm 0.58	1.18 \pm 0.39	0.35 \pm 0.12
2	1.70 \pm 0.30 *	1.56 \pm 0.28	0.80 \pm 0.21	1.68 \pm 0.85	1.01 \pm 0.32	0.75 \pm 0.19
4	4.47 \pm 0.31 *	1.59 \pm 0.17	0.80 \pm 0.11	1.40 \pm 0.67	1.06 \pm 0.37	0.71 \pm 0.21
6	7.39 \pm 0.73 *	1.43 \pm 0.21	0.93 \pm 0.14	1.34 \pm 0.78	1.37 \pm 0.41	0.90 \pm 0.13
14	4.76 \pm 0.94 *	1.42 \pm 0.22	0.91 \pm 0.09	0.67 \pm 0.46	1.38 \pm 0.51	0.72 \pm 0.22
24	4.88 \pm 0.49 *	2.12 \pm 0.07 *	0.80 \pm 0.14	1.61 \pm 0.85	1.98 \pm 0.89	0.75 \pm 0.31

*: significantly different from DMSO control of concerned cell line ($p < 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0078356.t002

Table 3. Increase in EROD activity^a measured in HepG2 and A549 cells exposed to B[a]P from 0.2 to 5 μM .

B[a]P (μM)	0	0.2	2	5
A549	0.00 \pm 0.08	0.28 \pm 0.08	0.46 \pm 0.11	0.59 \pm 0.17
HepG2	0.00 \pm 0.05	0.30 \pm 0.11	3.49 \pm 0.61	7.25 \pm 0.45

Exposure time was 24 h for HepG2 and 48 h for A549.

a: expressed in pmol of product/min/mg of protein. The average background measured in untreated cells value was subtracted.

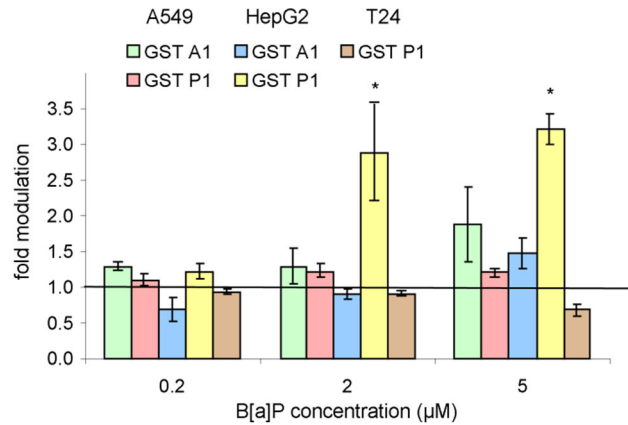
doi:10.1371/journal.pone.0078356.t003

tially expressed in the two cell lines in response to B[a]P, with a significant induction in HepG2 although in a 20-fold lower extent than CYP1A1. Incubation with B[a]P had only minor impact on other phase I enzymes, such as other CYP and epoxide hydrolase.

In contrast to CYP450, no difference was found in the expression and activity of GST, which is one of the most efficient protective enzymes against PAHs epoxides. These cytosolic enzymes are widely distributed in various tissues, with especially high levels in the liver [49,50]. Neither the expression of GST genes nor the global GST activity were greatly impacted by B[a]P treatment of A549 and HepG2. This absence of modulation was reported in other studies where phase I was found to be far more inducible than phase II [49,51,52]. Indeed, no modulation in GST activity was observed in rat lung and liver slices exposed to a B[a]P concentration as high as 50 μM during 24 h using CDNB. Yet, the resulting GST activity was around 10 times higher in liver than in lungs slices [53]. In contrast, we found similar basal level activity in the A549 and HepG2 cell lines.

The bulk of these data partly explains the differences in dose-dependent formation of BPDE adducts in A549 and HepG2. A much higher induction of CYP1A1 is observed in hepatocytes, which likely explains the large level of adducts at 2 and 5 μM . The lower induction of CYP1A1 in A549 is partly compensated by the larger expression in CYP1B1. This may explain why the ratio between the EROD activities in the two cell lines is closer to 1 at 0.2 μM than at 2 or 5 μM . These observations may also explain why a significant formation of adducts is observed at low concentration in A549. However, in the absence of a role of phase II enzymes, it is difficult to explain the bell-shaped curve of the concentration dependence of adduct formation in A549 cells, especially the decreased level of adducts at high concentration. One explanation could be that AKRC1 is massively expressed in pulmonary cells and in A549. This enzyme converts 7,8-diol-7,8-dihydro-benzo[a]pyrene into the corresponding *o*-quinone [33,54,55]. Similarly, the gene for MRP4, a protein that eliminates B[a]P diol, is more expressed at the basal level in A549 than in HepG2. This trend is still observed after incubation with B[a]P although partial down regulation of the expression takes place in both cell lines. It can thus be considered that the pool of free BPDE is limited in A549 at high concentration of B[a]P as the result of the larger expression of these two proteins eliminating the first intermediate in the diol-epoxide pathway.

In addition to lung cancer, PAHs are also suspected to be risk factors for bladder cancer in several occupations [3,6,56] but the underlying mechanism is still poorly understood. Bladder exposure to toxic substances obviously involves metabolites produced in other tissues but urothelium should not be considered as a passive target organ for carcinogenic intermediates. Indeed, the expression of several detoxification enzymes especially CYP1A1 or B1 has been reported and this tissue is capable of actively metabolizing chemical substances such as PAHs [57]. In order

**Figure 7.** Modulation of the expression of a series of GST genes in HepG2, A549 and T24 cells exposed to increasing concentrations of B[a]P from 0.2 to 5 μM . *: significantly different from DMSO control ($p < 0.05$). Expression of GSTA1 was not detected in T24. doi:10.1371/journal.pone.0078356.g007

to clarify the PAHs mode of action in bladder carcinogenicity, we found it of interest to compare the effects of B[a]P in a bladder cell line with those in hepatocytes and lung cells. T24 cells, originating from a highly malignant grade III human urinary bladder carcinoma, are one of the few available bladder models and to our knowledge these cells have not previously been used for the investigation of B[a]P-induced genotoxicity. Exposure of T24 cells to B[a]P did not result in the formation of BPDE-DNA adducts within a broad range of doses and exposure times. In addition no induction of phase I metabolization enzymes was observed. The lack of adducts could not be explained by a more efficient phase II since neither gene expression nor activity was found to increase for GST after exposure to B[a]P. In addition, the basal GST activity was similar to that of HepG2 and A549. A last possibility to explain the absence of BPDE adducts is that the metabolic mechanisms triggered by B[a]P are different from those in liver and lung cells. If so, they are likely to be poorly genotoxic pathways because no unstable N7 adducts like those produced by the radical cation were detected in the Comet assay. The bulk of these negative results made us wonder whether B[a]P actually entered the cells. We thus used BPDE as a model compound and found that the level of adducts in T24 was in the same range as those in BPDE-treated HepG2 and A549 (data not shown), suggesting a similar uptake of PAH by the three cell lines. Our data thus clearly show that B[a]P is incorporated but induces a weak genotoxicity in T24 cells.

Yet, other bladder models have shown that PAHs could be converted into DNA damaging metabolites in this organ. Studies on Primary porcine Urinary Bladder Epithelial Cells (PUBEC)

Table 4. GST activity^a in HepG2 and A549 cells exposed to B[a]P from 0.2 to 5 μM .

	HepG2	A549
Dose B[a]P (μM)		
0	0,24 \pm 0,02	0,30 \pm 0,03
0,2	0,19 \pm 0,03	0,26 \pm 0,02
2	0,18 \pm 0,02	0,28 \pm 0,03
5	0,22 \pm 0,03	0,28 \pm 0,02

a: results are expressed in μmol of product/min/mg of proteins.

doi:10.1371/journal.pone.0078356.t004

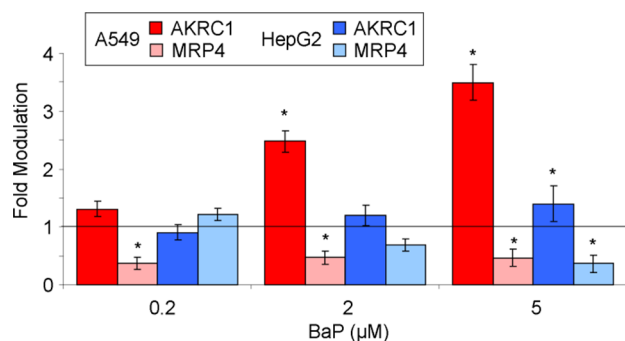


Figure 8. Modulation of the expression of the gene coding for AKRC1 and MRP4 in A549 and HepG2 cells exposed for 14 h to increasing concentrations of B[a]P from 0.2 to 5 μ M. Results were expressed with respect to untreated control. doi:10.1371/journal.pone.0078356.g008

showed that bladder cells are able to concentrate B[a]P which is absorbed even at concentrations as low as 0.1 μ M. Wolf *et al* [58] also reported a 200 fold increase of CYP1A1 mRNA expression after an exposure of 5 μ M during 5 h. It should be stressed that a strong inter-individual and even inter-pool variability was observed for B[a]P uptake [59] and metabolism especially in CYP1A1 induction. For example, Plöttner *et al* [60] reported a 162 to 982-fold variation in the induction of CYP1A1 for a 5 μ M exposure during 24 h for 15 cultures from different donors. In further analyses, these authors also established that PUBEC consisted of two distinct populations where CYP1A1 was inducible/or not and with large inter-individual differences in the proportion of responsive cells [61]. Similar variability has been observed also in humans, with different genetic susceptibilities in particular for CYP1A1 expression in normal urothelium [57]. Studies of human bladder explants exposed to B[a]P also showed the formation of metabolites such as BPDE and of DNA adducts yet with a considerable variability. The observation of formation of BPDE adducts in explants [62,63] and not in T24 cells strongly suggest that a subpopulation of cells in bladder possesses inducible CYP450.

Beside the formation of BPDE adducts extensively discussed above, B[a]P has been proposed to be genotoxic through the induction of oxidative stress. Indeed, reactive oxygen species are produced by the activity of cytochrome P450 enzymes as well as by the redox cycling of metabolites. We decided to study the contribution of this oxidative pathway because *o*-quinones, metabolites known to induce oxidative DNA damage [64], were expected to be found in significant amounts in A549 through the action of AKRC1 and because metabolism was very active in HepG2. In addition, we wanted to find out if the lack of a metabolic pathway leading to production of BPDE in T24 was not compensated by an alternative mechanism resulting in oxidative DNA lesions. As previously reported for HepG2 [16], no significant formation of strand breaks and oxidized purines was observed at low concentration (0.2 μ M) of B[a]P in the three cell lines. Under the same conditions, the level of BPDE-*N*²-dGuo was in the range of 1 per million normal bases in A549 and HepG2. At 2 μ M B[a]P, significant and identical levels of oxidative lesions were determined in the three cell types. As previously observed, the ratio between adducts and induced strand breaks was very high (value: 41) in HepG2. A ratio of 15 was found between the amounts of BPDE-*N*²-dGuo and induced 8-oxodGuo. The corresponding data for the ratio between the level of adduct and induced oxidative lesion in A549 was 18 for strand breaks and 3

for 8-oxodGuo. It should however be reminded that this relatively high concentration is beyond the maximum of induction of BPDE-*N*²-dGuo in A549. In summary, oxidative DNA damage represents only a minor contribution to the genotoxicity of B[a]P in the three studied cell lines at low biologically relevant concentrations. Oxidative lesions are induced in larger amounts at higher concentrations. In A549 and HepG2, the frequency of oxidative lesions remains much lower than the frequency of BPDE adducts. In line with this conclusion, exposure of human bronchoalveolar H358 cells to the *o*-quinone benzo[a]pyrene-7,8-dione was shown to lead to the formation of only 0.4 8-oxodGuo per 10⁶ normal bases at 20 μ M [65]. This concentration is 2 orders of magnitude higher than that required to induce a 5 times larger amount of BPDE adducts in A549 cells. The limited oxidative stress associated with B[a]P treatment in cultured cells may explain the poor correlation between exposure of workers to PAH-rich atmospheres and markers of DNA oxidation [66,67].

Conclusion

The present study emphasizes the drastic differences in the response of different human cell types to B[a]P exposure. In particular, our results show that concentration is a key parameter and thus that erroneous conclusions can be made. For instance, A549 cells, like lungs and other pulmonary models are metabolically active and undergo a formation of significant amounts of DNA adducts more efficiently at a low and biologically relevant concentration than at higher concentration. In that respect A549 appear as a good model for lung genotoxicity of PAH. T24 bladder cells, another target organ for PAHs, are much less metabolically active and no adducts were found after exposure to B[a]P likely because these cells do not metabolize these compounds. However, T24 represent only a subpopulation of bladder cells and cannot be considered as a reliable model for this organ. An important conclusion of the present work is the minor implication of oxidative stress as a genotoxic pathway of B[a]P. Comet assay does not appear to be a good test for PAH genotoxicity studies because it is only suitable at concentrations higher than 1 μ M and furthermore detects only a minor part of the DNA damage. Obviously, these conclusions do not apply to all compounds but should help us to realize the difficulty to define a universal and global genotoxicity assay.

Supporting Information

Table S1 Primers used for qPCR experiments. (PDF)

Table S2 Time-dependent modulation of GST expression in A549 and HepG2 cells exposed to 0.2 μ M B[a]P. (PDF)

Figure S1 (TIF)

Figure S2 (TIF)

Figure S3 (TIF)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CG AM TD. Performed the experiments: CG EL AJ MC. Analyzed the data: CG AM TD. Contributed reagents/materials/analysis tools: CG AM EL AJ MC TD. Wrote the paper: CG AM TD.

References

- Ravindra K, Sokhi R, Van Grieken R (2008) Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmos Environ* 42: 2895–2921.
- Tobiszewski M, Namieśnik J (2012) PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. *Environment Pollut* 162: 110–119.
- Mastrangelo G, Fadda E, Marzia V (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. *Environ Health Perspect* 104: 1166–1170.
- Petry T, Schmid P, Schlatter C (1996) The use of toxic equivalency factors in assessing occupational and environmental health risk associated with exposure to airborne mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Chemosphere* 32: 639–648.
- Balls M (1994) Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. *Lab Anim* 28: 193–211.
- Bosetti C, Boffetta P, La Vecchia C (2007) Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers: a quantitative review to 2005. *Ann Oncol* 18: 431–446.
- Siddens LK, Larkin A, Krueger SK, Bradfield CA, Waters KM, et al. (2012) Polycyclic aromatic hydrocarbons as skin carcinogens: Comparison of benzo[a]pyrene, dibenzo[def,p]chrysene and three environmental mixtures in the FVB/N mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 264: 377–386.
- Burstyn I, Kromhout H, Johansen C, Langard S, Kauppinen T, et al. (2007) Bladder cancer incidence and exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons among asphalt pavers. *Occup Environ Med* 64: 520–526.
- IARC (2010) Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. Lyon: IARC.
- Xue W, Warshawsky D (2005) Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicol Appl Pharmacol* 206: 73–93.
- Peltonen K, Dipple A (1995) Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry of DNA adduct formation. *J Occup Environ Med* 37: 52–58.
- Shimada T (2006) Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab Pharmacokinet* 21: 257–276.
- Briede JJ, Godschalk RW, Emans MT, De Kok TM, Van Agen E, et al. (2004) In vitro and in vivo studies on oxygen free radical and DNA adduct formation in rat lung and liver during benzo[a]pyrene metabolism. *Free Radic Res* 38: 995–1002.
- Singh R, Sram RJ, Binkova B, Kalina I, Popov TA, et al. (2007) 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* 620: 83–92.
- Tsuji G, Takahara M, Uchi H, Takeuchi S, Mitoma C, et al. (2011) An environmental contaminant, benzo(a)pyrene, induces oxidative stress-mediated interleukin-8 production in human keratinocytes via the aryl hydrocarbon receptor signaling pathway. *J Dermatol Sci* 62: 42–49.
- Tarantini A, Maître A, Lefebvre E, Marques M, Marie C, et al. (2009) Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo[a]pyrene as a pure compound and in complex mixtures. *Mutat Res* 671: 67–75.
- Castorena-Torres F, de León MB, Cisneros B, Zapata-Pérez O, Salinas JE, et al. (2008) Changes in gene expression induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in the human cell lines HepG2 and A549. *Toxicol in vitro* 22: 411–421.
- Sevastyanova O, Binkova B, Topinka J, Sram RJ, Kalina I, et al. (2007) In vitro genotoxicity of PAH mixtures and organic extract from urban air particles: Part II: Human cell lines. *Mutat Res* 620: 123–134.
- Marie C, Maître A, Douki T, Gateau M, Tarantini A, et al. (2008) Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo[a]pyrene DNA adducts. *J Appl Toxicol* 28: 579–590.
- Ahnström G, Erixon K (1981) 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. 403–418.
- Goodhead DT (1989) The initial physical damage produced by ionizing radiations. *Int J Radiat Biol* 56: 623–634.
- Pouget J-P, Douki T, Richard M-J, Cadet J (2000) DNA damage induced in cells by gamma and UVA radiations as measured by HPLC/GC-MS, HPLC-EC and comet assay. *Chem Res Toxicol* 13: 541–549.
- Forestier A, Douki T, Sauvaigo S, Rosa VD, Demeilliers C, et al. (2012) Alzheimer's disease-associated neurotoxic Peptide amyloid-beta impairs base excision repair in human neuroblastoma cells. *Int J Mol Sci* 13: 14766–14787.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakob WB (1974) Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130–7139.
- Lorenzen A, Kennedy SW (1993) A Fluorescence-Based Protein Assay for Use with a Microplate Reader. *Anal Biochem* 214: 346–348.
- Billet S, Abbas I, Le Goff J, Verdin A, Andre V, et al. (2008) Genotoxic potential of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-coated onto airborne Particulate Matter (PM 2.5) in human lung epithelial A549 cells. *Cancer Lett* 270: 144–155.
- Westerink WM, Schoonen WG (2007) Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* 21: 1581–1591.
- Wilkening S, Bader A (2003) Influence of culture time on the expression of drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2. *J Biochem Mol Toxicol* 17: 207–213.
- Wilkening S, Stahl F, Bader A (2003) Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line HepG2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos* 31: 1035–1042.
- Wu SJ, Spink DC, Spink BC, Kaminsky LS (2003) Quantitation of CYP1A1 and 1B1 mRNA in polycyclic aromatic hydrocarbon-treated human T-47D and HepG2 cells by a modified bDNA assay using fluorescence detection. *Anal Biochem* 312: 162–166.
- Conney AH, Chang RL, Cui XX, Schiltz M, Yagi H, et al. (2001) Dose-dependent differences in the profile of mutations induced by carcinogenic (R,S,S,R) bay- and fjord-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Adv Exp Med Biol* 500: 697–707.
- Schiltz M, Cui XX, Lu YP, Yagi H, Jerina DM, et al. (1999) Characterization of the mutational profile of (+)-7R,8S-dihydroxy-9S, 10R-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene at the hypoxanthine (guanine) phosphoribosyltransferase gene in repair-deficient Chinese hamster V-H1 cells. *Carcinogenesis* 20: 2279–2286.
- Abedin Z, Sen S, Field J (2012) Aldo-keto reductases protect lung adenocarcinoma cells from the acute toxicity of B[a]P-7,8-trans-dihydrodiol. *Chem Res Toxicol* 25: 113–121.
- Bonetta S, Gianotti V, Gosetti F, Oddone M, Gennaro MC, et al. (2009) DNA damage in A549 cells exposed to different extracts of PM(2.5) from industrial, urban and highway sites. *Chemosphere* 77: 1030–1034.
- Danielsen PH, Moller P, Jensen KA, Sharma AK, Wallin H, et al. (2011) Oxidative stress, DNA damage, and inflammation induced by ambient air and wood smoke particulate matter in human A549 and THP-1 cell lines. *Chem Res Toxicol* 24: 168–184.
- Binkova B, Sram RJ (2004) The genotoxic effect of carcinogenic PAHs, their artificial and environmental mixtures (EOM) on human diploid lung fibroblasts. *Mutat Res* 547: 109–121.
- Urani C, Doldi M, Crippa S, Camatini M (1998) Human-derived cell lines to study xenobiotic metabolism. *Chemosphere* 37: 2785–2795.
- Pushparajah DS, Umachandran M, Nazir T, Plant KE, Plant N, et al. (2008) 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* 22: 128–145.
- Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B (2005) Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen* 45: 106–114.
- Gelhaus SL, Harvey RG, Penning TM, Blair IA (2011) Regulation of benzo[a]pyrene-mediated DNA-and glutathione-adduct formation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in human lung cells. *Chem Res Toxicol* 24: 89–98.
- Hayes JD, Pulford DJ (1995) The Glutathione S-Transferase Supergene Family: Regulation of GST and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance Part II. *Critical Rev Biochem Molec Biol* 30: 521–600.
- McFadyen MCE, Rooney PH, Melvin WT, Murray GI (2003) Quantitative analysis of the Ah receptor/cytochrome P450 CYP1B1/CYP1A1 signalling pathway. *Biochem Pharmacol* 65: 1663–1674.
- Shimada T, Fujii-Kuriyama Y (2004) Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci* 95: 1–6.
- Iwanari M, Nakajima M, Kizu R, Hayakawa K, Yokoi T (2002) Induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNAs by nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in various human tissue-derived cells: chemical-, cytochrome P450 isoform-, and cell-specific differences. *Arch Toxicol* 76: 287–298.
- Harrigan JA, McGarrigle BP, Sutter TR, Olson JR (2006) 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* 20: 426–438.
- Harrigan JA, Vezina CM, McGarrigle BP, Erising N, Box HC, et al. (2004) DNA adduct formation in precision-cut rat liver and lung slices exposed to benzo[a]pyrene. *Toxicol Sci* 77: 307–314.
- Shimada T, Oda Y, Gillam EMJ, Guengerich FP, Inoue K (2001) 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 Metab Dispos* 29: 1176–1182.
- Lekas P, Tin KL, Lee C, Prokopcak RD (2000) The human cytochrome P450 1A1 mRNA is rapidly degraded in HepG2 cells. *Arch Biochem Biophys* 384: 311–318.
- Jernstrom B, Funk M, Frank H, Mannervik B, Seidel A (1996) Glutathione S-transferase A1-1-catalysed conjugation of bay and fjord region diol epoxides or polycyclic aromatic hydrocarbons with glutathione. *Carcinogenesis* 17: 1491–1498.
- Sundberg K, Dreij K, Seidel A, Jernstrom B (2002) Glutathione conjugation and DNA adduct formation of dibenzo[a,l]pyrene and benzo[a]pyrene diol epoxides in V79 cells stably expressing different human glutathione transferases. *Chem Res Toxicol* 15: 170–179.

51. Dreij K, Sundberg K, Johansson AS, Nordling E, Seidel A, et al. (2002) Catalytic activities of human alpha class glutathione transferases toward carcinogenic dibenzo[a,h]pyrene diol epoxides. *Chem Res Toxicol* 15: 825–831.
52. Sundberg K, Seidel A, Mannervik B, Jernstrom B (1998) Detoxication of carcinogenic fjord-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by glutathione transferase P1-1 variants and glutathione. *FEBS Lett* 438: 206–210.
53. Pushparajah DS, Umachandran M, Plant KE, Plant N, Ioannides C (2008) Up-regulation of the glutathione S-transferase system in human liver by polycyclic aromatic hydrocarbons; comparison with rat liver and lung. *Mutagenesis* 23: 299–308.
54. Palackal NT, Lee SH, Harvey RG, Blair IA, Penning TM (2002) Activation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiol proximate carcinogens by human Aldo-Keto Reductase (AKR1C) enzymes and their functional overexpression in human lung carcinoma (A549) cells. *J Biol Chem* 277: 24799–24808.
55. Quinn AM, Penning TM (2008) Comparisons of ($\pm\alpha$)-benzo[a]pyrene-trans-7,8-dihydrodiol activation by human cytochrome P450 and Aldo-Keto Reductase enzymes: Effect of redox state and expression levels. *Chem Res Toxicol* 21: 1086–1094.
56. Tremblay C, Armstrong B, Theriault G, Brodeur J (1995) Estimation of risk of developing bladder cancer among workers exposed to coal tar pitch volatiles in the primary aluminum industry. *Am J Indiv Med* 27: 335–348.
57. Brauers A, Manegold E, Buettner R, Baron JM, Merk HF, et al. (2000) Cytochrome P450 isoenzyme mRNA expression pattern in human urinary bladder malignancies and normal urothelium. *Cancer Detec Prev* 24: 356–363.
58. Wolf A, Kutz A, Plottner S, Behm C, Bolt HM, et al. (2005) The effect of benzo(a)pyrene on porcine urinary bladder epithelial cells analyzed for the expression of selected genes and cellular toxicological endpoints. *Toxicology* 207: 255–269.
59. Verma N, Pink M, Petrat F, Rettenmeier AW, Schmitz-Spanke S (2012) Exposure of primary porcine urothelial cells to benzo(a)pyrene: in vitro uptake, intracellular concentration, and biological response. *Arch Toxicol* 86: 1861–1871.
60. Plottner S, Borza A, Wolf A, Bolt HM, Kuhlmann J, et al. (2008) Evaluation of time dependence and interindividual differences in benzo[a]pyrene-mediated CYP1A1 induction and genotoxicity in porcine urinary bladder cell cultures. *J Toxicol Environ Health A* 71: 969–975.
61. Plottner S, Selinski S, Bolt HM, Degen GH, Hengstler JG, et al. (2009) Distinct subtypes of urinary bladder epithelial cells with inducible and non-inducible cytochrome P450 1A1. *Arch Toxicol* 83: 131–138.
62. Daniel FB, Schut HA, Sandwisch DW, Schenck KM, Hoffmann CO, et al. (1983) Interspecies comparisons of benzo(a)pyrene metabolism and DNA-adduct formation in cultured human and animal bladder and tracheobronchial tissues. *Cancer Res* 43: 4723–4729.
63. Moore BP, Hicks RM, Knowles MA, Redgrave S (1982) Metabolism and binding of benzo(a)pyrene and 2-acetylaminofluorene by short-term organ cultures of human and rat bladder. *Cancer Res* 42: 642–648.
64. Park JH, Mangal D, Frey AJ, Harvey RG, Blair IA, et al. (2009) Aryl hydrocarbon receptor facilitates DNA strand breaks and 8-oxo-2'-deoxyguanosine formation by the Aldo-Keto Reductase product benzo[a]pyrene-7,8-dione. *J Biol Chem* 284: 29725–29734.
65. Mangal D, Vudathala D, Park JH, Lee SH, Penning TM, et al. (2009) Analysis of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in cellular DNA during oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 22: 788–797.
66. Kafferlein HU, Marczynski B, Simon P, Angerer J, Rihs HP, et al. (2012) Internal exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a null result in brief. *Arch Toxicol* 86: 1317–1321.
67. Marie C, Ravanat JL, Badouard C, Marques M, Balducci F, et al. (2009) Urinary levels of oxidative DNA and RNA damage among workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in silicon production: comparison with 1-hydroxypyrene. *Environ Mol Mutagen* 50: 88–95.

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) représentent une famille de polluants atmosphériques issus de la combustion incomplète de la matière organique. Ils sont ainsi présents dans l'atmosphère polluée des villes, la fumée de cigarette et certaines industries. Une exposition aux HAP peut être à l'origine de cancers du poumon, de la peau et de la vessie. A ce titre, certains HAP sont suspectés ou reconnus cancérigènes pour l'Homme, comme le Benzo[a]pyrène (B[a]P), par leur capacité à induire des dommages à l'ADN après métabolisation. Malgré une émission systématique des HAPs en mélanges, la majorité des études s'est intéressée à l'effet génotoxique des HAP purs et principalement au B[a]P. Afin de fournir des données mécanistiques sur la génotoxicité et le mode d'action des mélanges de HAP, nous avons réalisé une étude *in vitro* dans des lignées cellulaires de poumons (A549), de vessie (T24) et de foie (HepG2). Les dommages à l'ADN ont été suivis par la mesure des adduits par HPLC-MS/MS et des dommages oxydatifs par la méthode des comètes, ainsi que le métabolisme par l'induction des gènes par RT-qPCR et les activités enzymatiques des CYP540 de phase I (EROD) et de phase II (GST). Dans un premier temps, l'utilisation du B[a]P, comme composé modèle a montré une absence quasi-totale de métabolisation et de génotoxicité pour T24. Par contre, la formation d'adduits et l'induction de la métabolisation a été mise en évidence pour A549, avec des effets notamment de dose-réponse « en cloche » similaires à ceux observés dans d'autres modèles de poumons. Nous avons ensuite étendu cette démarche à 12 HAP prioritaires et étudié leur métabolisation et la formation d'éventuels adduits en se focalisant sur la lignée pulmonaire A549. La combinaison de ces HAP au B[a]P dans des mélanges binaires ou dans des mélanges plus complexes mimant des mélanges environnementaux entraîne une forte inhibition de la formation des adduits issus du B[a]P sans apparition d'adduits d'autres HAP. Par ailleurs, nous avons observé dans le cas des mélanges complexes une bonne corrélation entre l'activité EROD et la formation des adduits à l'ADN, alors que les gènes de phase sont eux surexprimés par l'exposition au mélange par rapport au B[a]P pur. Les mécanismes par lesquels s'exerce cette inhibition des adduits restent encore à élucider mais la métabolisation des HAPs constitue une étape clé dans la génotoxicité des mélanges à travers des phénomènes d'inhibition ou de compétition au niveau des CYP entraînant une inhibition de l'activité EROD. Il est donc clair que l'étude des HAP de façon individuelle n'est pas suffisante pour appréhender la génotoxicité des mélanges complexes. L'approche FET, couramment utilisée pour évaluer le risque lié à l'exposition aux mélanges de HAP, repose sur l'additivité des effets toxiques et néglige les interactions métaboliques entre les différents HAP. L'amélioration de cet outil de prédiction est nécessaire et passe obligatoirement par l'étude des mécanismes sous-jacents qui relie la composition des mélanges, leur métabolisation et leur génotoxicité.

Mots clés : pollution atmosphérique, HAP, mélanges, génotoxicité, métabolisme, dommages à l'ADN

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) represent a family of ubiquitous atmospheric pollutants produced upon incomplete combustion and thus present in polluted atmosphere of the cities, in cigarette smoke and in certain industries. Exposure to HAP can cause lung, skin and bladder cancers. For this reason, some PAHs are suspected or recognized carcinogenic to humans, especially Benzo[a]pyrene (B[a]P), through their ability at inducing the formation of DNA damage after metabolization. In spite of the systematic emission of PAHs in mixtures, the majority of the studies was interested in the genotoxic effect of pure PAH and mainly B[a]P. In order to provide mechanistic data on the genotoxicity and the mode of action of PAH mixtures, we designed an *in vitro* study using cell lines representative of lungs (A549), bladder (T24) and liver (HepG2). DNA damage was investigated through the quantification of adducts by HPLC-MS/MS and of oxidative damage by the Comet assay. In addition, the metabolism was studied by analyzing genes induction by RT-qPCR and enzymatic activities of phase I CYP540 (EROD) and phase II (GST). First, the use of B[a] P, as a reference compound showed a quasi-total absence of metabolization and genotoxicity for T24. In contrast, the formation of DNA adducts formation and the induction of metabolization was highlighted for A549, with a bell-shaped dose-response curve similar to those observed in other lungs models. Then we extended this approach to 12 priority PAH and analyzed their metabolization and the possible formation of adducts focusing on the pulmonary cell line A549. The combination of these HAP to B[a]P in binary mixtures or in complex mixtures representative to environmental exposures led to a strong inhibition in adducts formation induced by B[a]P without outbreak of adducts from other PAH. In addition, we observed, in the case of complex mixtures, a good correlation between the EROD activity and the formation of adducts in DNA, while phase I genes were always overexpressed after exposure to mixtures when compared to pure B[a]P. The mechanisms involved in the inhibition of DNA adducts remain to be elucidated but PAHs metabolization represents a key step in the mixtures genotoxicity through inhibition or competition of CYP resulting in an inhibition of EROD activity. It is thus clear that the study of the HAP in an individual way is not sufficient to understand the genotoxicity of complex mixtures. The TEF Approach, usually used to asses the risk related to PAH mixtures exposure, relies on toxic effects additivity and ignores metabolic interactions between the various PAH. The improvement of this prediction tool is essential and involves necessarily the study of the underlying mechanisms which connect mixtures composition, their metabolization and their genotoxicity.

Key words : atmospheric pollution, PAH, mixtures, genotoxicity, metabolization, DNA damage