



HAL
open science

Etude de profils en adduits à l'ADN comme biomarqueurs potentiels d'exposition aux polluants aériens en milieu urbain dans une approche de type adductomique

Helena Alamil

► **To cite this version:**

Helena Alamil. Etude de profils en adduits à l'ADN comme biomarqueurs potentiels d'exposition aux polluants aériens en milieu urbain dans une approche de type adductomique. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université; Université Libanaise, 2019. Français. NNT : 2019NORMC407 . tel-02373739

HAL Id: tel-02373739

<https://theses.hal.science/tel-02373739>

Submitted on 21 Nov 2019

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

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



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

En cotutelle internationale avec Université Libanaise , LIBAN

Etude de profils en adduits à l'ADN comme biomarqueurs potentiels d'exposition aux polluants aériens en milieu urbain dans une approche de type adductomique.

**Présentée et soutenue par
Helena ALAMIL**

**Thèse soutenue publiquement le 23/10/2019
devant le jury composé de**

Mme SAADIA Kerdine-Römer	Professeur des universités, Université Paris-Saclay	Rapporteur du jury
Mme Pauline Poinot	Maître de conférences, Université de Poitiers	Rapporteur du jury
M. Joseph Saab	Professeur, Université Saint-Esprit de Kaslik	Rapporteur du jury
M. Dominique Courcot	Professeur des universités, Université Littoral Côte d'Opale	Membre du jury
Mme Mathilde Lechevrel	Maître de conférences, Université Caen Normandie	Membre du jury
Mme Pascale Salameh	Professeur, Université Libanaise	Membre du jury
Mme Zeina Dagher	Professeur, Université Libanaise	Directeur de thèse
M. Raphaël Delepee	Professeur des universités, Université Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par Raphaël Delepee et Zeina Dagher, Aliments bioprocédés toxicologie environnements



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE



Normande de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



Aliments Bioprocédés
Toxicologie Environnements



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

THÈSE EN PARTENARIAT INTERNATIONAL DE COTUTELLE DE THÈSE

Pour obtenir le grade de Docteur délivré par

**L'UNIVERSITÉ LIBANAISE
ET L'UNIVERSITÉ DE CAEN NORMANDIE**

Ecole Doctorale de Sciences et Technologie (UL)

Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative Santé Environnement (UNICAEN)

Spécialité : **Toxicologie / Sciences de Vie et de Santé**

Présentée et soutenue publiquement par

Hélène ALAMIL

Le 23 octobre 2019

Etude de profils en adduits à l'ADN comme biomarqueurs potentiels d'exposition aux polluants aériens en milieu urbain dans une approche de type adductomique

Sous la direction de

M. Rapahël DELÉPÉE, professeur de l'unité de recherche Aliments Bioprocédés
Toxicologie Environnements (ABTE EA4651) pour l'Université de Caen Normandie

Et **Mme Zeina DAGHER**, professeur de l'équipe de recherche Microbiologie -
Tox/Ecotox (L2GE) pour l'Université Libanaise.

Membres du jury :

Saadia Kerdine-Römer	Professeur, Université Paris-Sud	Rapporteur
Pauline Poinot	Docteur, Université de Poitiers	Rapporteur
Joseph Saab	Professeur, Université Saint-Esprit de Kaslik	Rapporteur
Pascale Salameh	Professeur, Université Libanaise	Examineur
Dominique Courcot	Professeur, Université du Littoral Côte d'Opale	Examineur
Mathilde Lechevrel	Docteur, Université de Caen Normandie	Examineur
Zeina Dagher	Professeur, Université Libanaise	Directeur
Raphaël Delepee	Professeur, Université de Caen Normandie	Directeur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les deux universités dans lesquelles j'ai effectué cette thèse, l'Université Libanaise et l'Université de Caen Normandie. Je remercie ainsi Messieurs **Fawaz EL OMAR** et **François DAUPHIN**, les directeurs de l'École Doctorale des Sciences et de Technologie de l'Université Libanaise et de l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement de l'Université de Caen Normandie, respectivement, pour leur efficacité sur le plan administratif et pour leur soutien de mon projet doctoral.

Je remercie chaleureusement Madame **Zeina DAGHER**, professeur de Toxicologie à l'Université Libanaise, pour avoir été l'initiatrice de ce projet de recherche et pour son encadrement sur l'aspect toxicologique et épidémiologique de cette thèse. Je la remercie particulièrement pour sa disponibilité, son soutien et son expertise en toxicologie, et pour sa confiance en mes capacités et mon travail.

Je tiens à remercier vivement Monsieur **Raphaël DELÉPÉE**, professeur de Chimie Analytique à l'Université de Caen, pour son encadrement sur l'aspect fondamental de cette thèse. Je le remercie pour son expertise et ses compétences qui m'ont beaucoup aidée pour la réalisation de ce travail et pour m'avoir fait entrer dans le monde de Chromatographie.

J'exprime mes remerciements chaleureux à Madame **Mathilde LECHEVREL** pour sa contribution efficace à l'approche *in vitro* et à l'étude tabacologique, un volet supplémentaire de ma thèse qui est venu rajouter plus de richesse à ce travail. Ce fut un plaisir énorme d'avoir bénéficié de ses connaissances scientifiques et pédagogiques, de sa rigueur et de sa générosité, de sa disponibilité et de son écoute sans faille.

J'adresse mes profonds remerciements à Monsieur **Antoine EL SAMRANI**, le directeur du L2GE, et à l'Equipe Microbiologie - Tox/Ecotox de l'Université Libanaise, qui m'ont accueillie au sein de leurs laboratoires et ont cofinancé mes recherches.

Je tiens à remercier également Monsieur **François SICHEL**, le directeur de l'Unité Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements (ABTE), Madame **Christelle MONTEIL** et Monsieur **David GARON**, les responsable et responsable adjoint de l'Equipe Toxicologie de l'Environnement, Milieux Aériens et Cancers (ToxEMAC) de l'Université de Caen Normandie, qui m'ont accueillie au sein de leurs laboratoires respectifs et ont cofinancé mes recherches.

Je souhaite remercier les membres du jury, Madame **Saadia Kerdine-Römer**, Madame **Pauline POINOT** et Monsieur **Joseph SAAB**, pour avoir accepté de juger mon travail en étant les rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également Madame **Pascale SALAMEH** et Monsieur **Dominique COURCOT**, pour avoir accepté de participer au jury en étant les examinateurs de la thèse.

Je tiens à remercier la **Direction Générale des Forces de Sécurité Intérieure au Liban**, le Major-Général Imad Ossman, le Colonel Joseph Mssalem, les officiers et les policiers volontaires ainsi que les différentes **municipalités** du Liban pour leur collaboration avec notre établissement et leur confiance en nous. Je remercie également Madame **Laurence GALANTI** pour sa générosité pour m'avoir envoyé les échantillons sanguins des fumeurs, et qui ont ainsi contribué aux résultats de cette thèse.

J'adresse mes remerciements à Monsieur **Chawki SALIBA**, le directeur de la Plateforme Analytique Emballages Alimentaires au Liban (LFP), pour m'avoir permis l'accès à toutes les installations et m'avoir adjoint l'aide précieuse des différents membres du laboratoire. Je tiens à remercier ainsi Monsieur **Antonio-Carlo RAZZOUK**, docteur en Chimie Analytique à l'Université Libanaise, les techniciennes Mesdames **Souha EL KHOURY** et **Nisrine OUEIDAT** pour m'avoir guidée lors des manipes de dosage effectuées au laboratoire LFP.

Je remercie plus particulièrement Monsieur **Charbel AFIF**, docteur en Chimie Analytique à l'Université Saint Joseph à Beyrouth pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire afin de pouvoir bénéficier de la HPLC à injection automatique.

Je souhaite remercier également Monsieur **Fouad EL HAJ HASSAN**, le directeur de la Plateforme de Recherche et d'Analyse en Sciences de l'Environnement (PRASE) à Hadath pour m'avoir permis d'accéder à l'évaporateur sous azote.

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont aidée d'un point de vue technique dans mon travail au laboratoire ABTE : Madame **Isabelle CATRO**, pour son aide importante lors des manip de purification en chromatographie liquide à détection UV et Madame **Stéphanie LAGADU**, pour sa précieuse aide sur la mise au point des différents protocoles et des méthodes analytiques et surtout pour son expertise en spectrométrie de masse.

J'adresse mes remerciements à Madame **Natacha HEUTTE**, professeur de Mathématiques et Statistiques à l'Université de Rouen pour son aide en traitement statistique des résultats de l'étude tabacologique.

Je remercie vivement Mademoiselle **Lara MOUSSA** pour son aide précieuse dans les analyses des échantillons biologiques lors de son stage à L2GE et Mademoiselle **Marine ORTILLON**, pour son efficacité dans les hydrolyses de l'ADN modifié *in vitro* lors de son stage au sein du laboratoire ABTE.

Je souhaite remercier sans exception tous les membres d'ABTE pour leur gentillesse, leur accueil et pour m'avoir régulièrement dépannée lors de différentes manip. Je pense particulièrement aux ex-thésards (Antoine D. et Quentin A.) pour avoir été mes modèles ainsi qu'à tous les autres thésards (Simon R., Adeline C., Samia C., Antoine G. et Carine H.) pour leur accueil exceptionnel et pour toutes nos sorties et nos soirées sans oublier la magnifique ambiance au bureau des doctorants !

J'adresse mes remerciements plus particulièrement aux personnes avec qui nous avons tissée notre amitié au cours de ces trois années en France (Cléa A.J., Anita D. et Esther, Mira H., Clara A., Jad K., Muaweah A.S., Alexandre E., Pierre-Emmanuel B., Rafic N., Mohamad B., Amjad Z. et Majd E.D.) ainsi que mes voisins du Campus 1 et la famille MAALOUF à Caen !

Je remercie mes proches des deux familles ALAMIL et MAKHOUL ainsi que mes amis au Liban (Maria K., Joyce C., Leila M., Saline J., Rita N., Agness R., Maryam S., Mario S., Imad A., Joseph A. et surtout Charbel S.), pour leur soutien et leur grande contribution à ma motivation pour la réussite de ce travail !

Je pense aussi au médecin libanais Monsieur **Ziad ASSAF** pour son soutien à mon arrivée en France, pour toutes les belles randonnées à Cherbourg et pour sa joie de vivre et son sourire gravé dans mon cœur, pour sa force et son insistance, pour sa résistance contre le cancer jusqu'au dernier soupire... j'ai tant voulu que tu sois présent le jour de ma soutenance !

Du fond du cœur je rends grâce à ma **famille** : mon papa, ma maman, ma grand-mère, mon frère Georges, ma sœur Rebecca et son mari Georges ainsi que mes belles nièces (Maria et Maven) et mes adorables neveux (Elias, Gabriel, Joseph et Raphaël). Mon soutien éternel, ma vie et ma joie ! Sans vous je n'aurais pas pu réaliser cette thèse.

Enfin, j'adresse mes remerciements :

au Centre de Lutte contre le Cancer François Baclesse, qui héberge le laboratoire ABTE et qui a participé aux frais de mes recherches ;

au Centre Médical Saint Joseph (Achrafieh, Liban) et son directeur Dr Makram BOUSTANY ;

à la société Elia Medical (Amiens, France) et son PDG M. Ziad BOUKHALED, pour avoir sponsorisé le fonctionnement de l'étude épidémiologique réalisée au Liban ;

au Conseil National de la Recherche Scientifique Libanais (CNRS-L), qui a cofinancé ma mobilité en M2 et le fonctionnement de ce projet (Contrat numéro 01-08-15) ;

à l'Agence Universitaire de la Francophonie (AUF), qui a cofinancé ma mobilité et mon séjour en France durant les trois années de thèse ;

et à l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) pour avoir participé au financement de cette thèse.

Valorisation scientifique

Les travaux présentés dans cette thèse et les autres travaux auxquels j'ai contribué durant ma thèse ont été valorisés sous la forme de publications et de communications orales ou affichées lors des congrès. La liste détaillée en est présentée ci-dessous.

Communications orales :

- Septembre 2017 : Etude de profils en adduits à l'ADN comme potentiels biomarqueurs d'exposition aux polluants aériens en milieu urbain dans une approche de type adductomique ; H. Alamil ; Forum Doctoral, Ecole Doctorale en Sciences et Technologie (EDST), 27 et 28 Septembre 2017, Hadath, Beyrouth, Liban.
- Mars 2018 : Development of a new LC-MS/MS method to study a profile of exocyclic DNA adducts as potential new biomarkers for cancer risk related to oxidative stress ; H. Alamil ; Journées de l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EDnBISE), 22 et 23 Mars 2018, Rouen, France.
- Mai 2019 : Validated UHPLC-MS/MS Method for the Simultaneous Quantification of 9 Exocyclic DNA Adducts formed from 8 Aldehydes ; H. Alamil ; European Environmental Mutagenesis and Genomics society (eemgs 2019), 19 à 23 Mai 2019, Rennes, France.
- Septembre 2019 : Etude de profils en adduits à l'ADN comme biomarqueurs potentiels d'exposition aux polluants aériens en milieu urbain dans une approche de type adductomique ; H. Alamil ; Forum Doctoral, Ecole Doctorale en Sciences et Technologie (EDST), 18 Septembre 2019, Hadath, Beyrouth, Liban.

Communications affichées :

- Septembre 2016 : Analysis and screening of DNA adducts as a contribution to cancer etiology comprehension in the exposome context ; H. Alamil, J. Legoff, M. Lechevrel, S. Lagadu, D. Pottier, Z. Dagher et R. Delépée ; Journée Normande de Recherche Biomédicale, 16 Septembre 2016, Rouen.

- Mars 2017 : Analysis and screening of DNA adducts as a contribution to cancer etiology comprehension in the exposome context ; H. Alamil, M. Lechevrel, S. Lagadu, D. Pottier, Z. Dagher et R. Delépée ; Journées de l'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EDnBISE), 16 et 17 Mars 2017, Le Havre.
- Octobre 2017 : Adduits à l'ADN liés aux aldéhydes : Contribution de l'exposition aérienne et du stress oxydant dans le contexte de l'exposome ; H. Alamil, M. Lechevrel, S. Lagadu, J. Legoff, Z. Dagher et R. Delépée ; 3^{ème} colloque international francophone « Environnement et Santé » (CES), 23 - 25 Octobre 2017, Dunkerque.
- Novembre 2017 : Evidences of genotoxic properties of oxy-PAHs and aldehydes using DNA adducts as a contribution to cancer etiology comprehension in exposome context; A. Clergé et H. Alamil, M. Lechevrel, J. Legoff, Z. Dagher et R. Delépée. Journée Normande de Recherche Biomédicale (JnRB), 14 Novembre 2017, Caen, France.
- Septembre 2018 : Determination of exocyclic DNA adducts profile by UHPLC-MS/MS as potential biomarker of genotoxicity related to oxidative stress ; H. Alamil, M. Lechevrel, S. Lagadu, S. Billet, Z. Dagher et R. Delépée ; 32nd International Symposium on Chromatography (ISC), 23 - 27 Septembre 2018, Cannes - Mandelieu, France.
- Mars 2019 : Validation d'une méthode UHPLC-MS/MS pour la quantification simultanée de 9 adduits à l'ADN exocycliques formés à partir de 8 aldéhydes ; H. Alamil, M. Lechevrel, S. Lagadu, Z. Dagher et R. Delépée ; 13^{ème} Congrès Francophone sur les Sciences Séparatives et les Couplages (SEP19), 25 à 28 Mars 2019, Paris, France.
- Mai 2019 : Profiles of exocyclic DNA adducts generated *in vitro* as potential biomarkers of aldehydes mixture genotoxicity ; H. Alamil, R. Delépée, S. Lagadu, L. Galanti, Z. Dagher et M. Lechevrel ; European Environmental Mutagenesis and Genomics society (eemgs 2019), 19 à 23 Mai 2019, Rennes, France.

Publication acceptée après révision mineure :

- A validated UHPLC-MS/MS method for simultaneous quantification of 9 exocyclic DNA adducts induced by 8 aldehydes. H. Alamil, M. Lechevrel, S. Lagadu, Z. Dagher et R. Delépée. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.

Publication en préparation pour soumission à des revues scientifiques internationales à comité de lecture :

- Profiles of exocyclic DNA adducts generated *in vitro* and in human blood DNA as potential biomarkers of aldehydes mixture genotoxicity using UHPLC-MS/MS method...

Avant-propos

Bien que des facteurs environnementaux soient les principaux responsables des maladies chroniques, les études sur « l'environnement » se sont concentrées sur les polluants de l'air ayant une importance en terme de morbidité globale. Pour rechercher les causes environnementales des maladies chroniques, il est nécessaire de recourir à des méthodes pour caractériser les expositions humaines aux substances toxiques d'origine exogène et endogène (stress oxydant, peroxydation lipidique, etc.), qui constituent collectivement l'exposome humain. Les expositions à des électrophiles réactifs sont particulièrement préoccupantes en raison de la toxicité inhérente de ces substances, en raison de leur capacité à modifier l'acide désoxyribonucléique (ADN) en formant des adduits résultant de réactions entre ces électrophiles et les nucléophiles cellulaires. Nous définissons la totalité de ces adduits avec une cible nucléophile donnée (par exemple, ADN) comme « adductome ». Parmi les contaminants organiques volatils, les aldéhydes sont des agents chimiques hautement réactifs, présents dans la plupart des environnements, dérivés de sources naturelles et anthropiques. Des niveaux élevés d'aldéhydes ont déjà été mesurés dans les domaines de la pollution urbaine et industrielle mais aussi intérieure. Le tabagisme est un pourvoyeur d'aldéhydes. Par ailleurs, ces aldéhydes peuvent être produits de manière endogène par le stress oxydant. Les aldéhydes sont bien connus pour former des adduits exocycliques qui peuvent déclencher des réponses cellulaires mutagènes et initier la cancérogenèse. L'amélioration des outils d'investigation de « l'aldéhydome », dans un contexte d'exposition complexe multi-contaminants est nécessaire pour améliorer nos connaissances sur leur impact sanitaire et élucider le rôle complexe que ces composés jouent dans les événements pathologiques.

L'essor considérable à l'heure actuelle des technologies « - omiques » a ouvert la voie à une possible stratification des patients sur la base de l'expression de biomarqueurs. Il est crucial d'évaluer la contribution d'un profil des adduits exocycliques en tant que biomarqueur d'exposition de l'Homme aux génotoxiques. Récemment, les recherches scientifiques ont été orientées vers une meilleure connaissance du concept de l'exposome et aux développements méthodologiques dans l'évaluation et la traçabilité des expositions aux aldéhydes. Malgré l'avancement de la recherche dans le domaine de détection des adduits à l'ADN en tant que biomarqueurs d'exposition, de nombreux défis en matière de

sélectivité, sensibilité, quantification et facilité de l'analyse des données restent à soulever pour l'analyse adductomique de l'ADN dans des échantillons humains.

De nombreuses études dans la seconde moitié du 20^{ème} siècle, ont mis en évidence que des génotoxiques cancérigènes, soit directement, soit après une activation métabolique, réagissent avec l'ADN pour former par liaison covalente des adduits qui sont absolument central dans le processus cancérigène. Bien qu'il existe des preuves convaincantes de la présence de multiples adduits à l'ADN dans les poumons de sujets exposés au tabagisme ou en milieu professionnel à un aldéhyde donné, il est à noter que c'est un domaine dans lequel des recherches supplémentaires ont été nécessaires.

Dans le présent travail de thèse, une nouvelle méthode sensible par la chromatographie liquide à ultra-performance couplée à la spectrométrie de masse (UHPLC-MS) pour la détection et la quantification simultanées d'adduits exocycliques dérivés des aldéhydes, a été développée et validée conformément à la directive de l'Agence européenne des médicaments. Une attention particulière a été portée à la caractérisation *in vitro* de ces adduits suite à une exposition à chaque aldéhyde seul et à un mélange équimolaire des 8 aldéhydes et à leurs recherches dans des échantillons humains.

Ce manuscrit se compose de cinq chapitres.

Une synthèse bibliographique des données existantes sur l'exposome, les aldéhydes et ainsi que sur l'impact des aldéhydes exogènes et endogènes sur la santé humaine est présentée dans le chapitre 1, et suivie d'une description des objectifs de ce travail.

Dans le deuxième chapitre, nous décrivons la mise au point de la méthode de dosage des adduits par chromatographie liquide à ultra performance couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem (UHPLC-MS/MS) et sa validation.

Dans le chapitre 3, nous présentons et discutons les résultats de détection de profils d'adduits engendrés par l'exposition de l'ADN acellulaire aux aldéhydes.

Le quatrième chapitre est consacré à la méthodologie de l'étude de l'exposition tabagique et les résultats des profils d'adduits engendrés par l'exposition au tabac.

Le dernier chapitre est consacré à la méthodologie de l'étude de l'exposition aux aldéhydes en milieu urbain et aux premiers résultats de dosage de quelques biomarqueurs.

Nous clôturerons ce manuscrit par une discussion générale et proposerons des perspectives en vue d'approfondir notre étude.

Sommaire

Etude de profils en adduits à l'ADN comme biomarqueurs potentiels d'exposition aux polluants aériens en milieu urbain dans une approche de type adductomique	1
I. Chapitre 1 : De l'exposome à la compréhension mécanistique des effets induits par les aldéhydes	1
I- Exposome : Nouveau concept pour étudier les risques sanitaires	2
II- Surveillance biologique de l'exposition chez l'Homme : notion de biomarqueurs	3
III- Exposition systémique aux aldéhydes	6
1. Expositions environnementales	6
2. Expositions endogènes	10
IV- Adduits des aldéhydes à l'ADN et cancérogenèse	31
1. Stress oxydant et adduits exocycliques	33
2. Réactions de quelques aldéhydes dérivés de la LPO avec l'ADN et conséquences fonctionnelles	38
3. Effets des aldéhydes dans l'induction de la transformation maligne des cellules normales.	45
4. Mécanisme de réparation des lésions de l'ADN	47
5. Intérêt des adduits à l'ADN comme biomarqueurs d'exposition	48
V- Méthodes de dosage des adduits à l'ADN	50
1. Méthodes non chromatographiques	51
2. Méthodes chromatographiques	55
VI- Objectifs de la thèse	67
II. Chapitre 2 : Mise au point de la méthode d'analyse par UHPLC-MS/MS	69
I- Etat de l'art	70
II- Préparation des adduits	71
1. Réactifs	71
2. Préparation des solutions mères	71
III- Mise au point de la méthode de dosage	78
1. Préparation des étalons de calibration et des échantillons de contrôle de la qualité	79
2. Hydrolyse enzymatique	79
3. Chromatographie liquide	80
4. Conditions de spectrométrie de masse	82
5. Validation	84
6. Résultats	86
IV- Discussion	91
III. Chapitre 3 : Etude <i>in vitro</i> des adduits à l'ADN des aldéhydes	96
I- Partie expérimentale	99
1. Exposition acellulaire aux aldéhydes	99
2. Exposition acellulaire aux mélanges équimolaires d'aldéhydes	100
3. Analyse des adduits formés par la méthode validée en UHPLC-ESI-MS/MS ...	101
II- Résultats et discussion	102
1. Analyse de l'ADN du thymus de veau traité avec des aldéhydes	102

2. Analyse de l'ADN du thymus de veau traité avec des mélanges équimolaires d'aldéhydes	111
IV. Chapitre 4 : Etude de l'exposition tabagique sur le profil d'adduits exocycliques	120
I- Objectif de l'étude	127
II- Méthodologie	127
III- Partie expérimentale	129
1. Échantillons de sang humain	129
2. Extraction d'ADN à partir du sang humain	129
3. Analyse statistique des données des échantillons	130
IV- Résultats	131
V- Discussion	137
V. Chapitre 5 : Etude en milieu professionnel de différents biomarqueurs pour le suivi de l'exposition aux aldéhydes en milieu urbain	144
I- Objectif de l'étude	145
II- Méthodologie	147
III- Partie expérimentale	148
1. Caractérisation de la population	148
2. Questionnaires général et quotidien	148
3. Prélèvements et traitement des échantillons	149
4. Test de la fonction pulmonaire	149
5. Caractérisation de l'exposition aux aldéhydes	149
6. Marqueurs biologiques	150
7. Analyse statistique	153
IV- Résultats	154
1. Caractéristiques générales de la population	154
2. Biomarqueurs du stress oxydant	156
3. Effets des aldéhydes et de divers facteurs sur le MDA	158
V- Discussion	161
Discussion générale et perspectives	166
Références bibliographiques	172
Annexes	199

Liste des figures

Figure 1: Définition de l'Exposome (adapté de Escher <i>et al.</i> , 2016).....	2
Figure 2: Classification des biomarqueurs (d'après Perera et Weinstein, 2000).....	5
Figure 3: Exposition systémique de l'humain aux aldéhydes ; les principales sources endogènes et environnementales (adapté de Dator <i>et al.</i> , 2019).....	7
Figure 4: Différents états de réduction de l'oxygène (Migdal et Serres, 2011).....	12
Figure 5: Réaction de Fenton et Haber-Weiss (Ayala <i>et al.</i> , 2014).	12
Figure 6: Représentation schématique de la balance prooxydants/antioxydants cellulaires, en situation basale (a) et après action des aldéhydes (b).	16
Figure 7: Schéma général des marqueurs d'oxydation des lipides, des acides aminés et des acides nucléiques au cours du stress oxydant (Michel <i>et al.</i> , 2008).....	17
Figure 8: Phases d'initiation, de propagation et de terminaison de la peroxydation lipidique.....	18
Figure 9: Processus de la peroxydation lipidique.....	19
Figure 10: Schéma de formation des produits « primaires » et « secondaires » de la peroxydation lipidique à partir d'une espèce moléculaire de la phosphatidylcholine comportant en sn-2 un acide arachidonique (Michel <i>et al.</i> , 2008).	20
Figure 11: Principaux aldéhydes α,β -insaturés issus de la peroxydation lipidique (Cadet <i>et al.</i> , 2017).....	21
Figure 12: Formation et métabolisme du MDA.	25
Figure 13: Production enzymatique du HNE et métabolisme.	27
Figure 14: Production non enzymatique du HNE.	28
Figure 15: Mécanisme de formation du HNE par la peroxydation de l'acide arachidonique (Gentile <i>et al.</i> , 2017).....	29
Figure 16: Structures des adduits de l'ONE : 2"-oxo-héptyl-substitué 1,N2-éthéno-dG, 1,N6-éthéno-dA et 3,N4- éthéno-dC (Gentile <i>et al.</i> , 2017).....	30
Figure 17: Processus de la cancérogenèse.....	31
Figure 18: Structures des aldéhydes communs associés à diverses maladies humaines (Dator <i>et al.</i> , 2019).	33
Figure 19: Principaux adduits d'aldéhydes α,β -insaturés aux bases amino-substituées de 2'-désoxyribonucléosides (Cadet <i>et al.</i> , 2017).....	34

Figure 20: (a) Adduits du MDA avec la dG, la dA et la dC (b) réorganisation du M1dG lorsqu'il est placé en face de la dC dans l'ADN.....	38
Figure 21: Adduits exocycliques 1,N ² -PdG générés par réaction de l'Acro, du Croto et du HNE avec la dG dans l'ADN.....	40
Figure 22: Réorganisation des adduits N ² -PdG de l'Acro, du Croto et du HNE avec la dG lorsqu'elle est placée à l'opposé de la dC dans l'ADN double brin. PdG, N ² -(3-oxopropyl)dG (Gentile <i>et al.</i> , 2017).....	41
Figure 23: Ethéno-adduits exocycliques formés par la réaction de l'EHN avec la dA dans l'ADN.....	42
Figure 24: Ethéno-adduits exocycliques formés par la réaction de l'EHN avec la dG et la dC.....	43
Figure 25: HNE favorisant la survie cellulaire ou induisant la mort cellulaire (Ayala <i>et al.</i> , 2014).....	44
Figure 26: Structures des 8 aldéhydes et des 9 adduits stables correspondants	73
Figure 27: Représentation schématique de l'approche analytique des adduits à l'ADN des aldéhydes	78
Figure 28: Hydrolyse enzymatique de l'ADN	80
Figure 29: Chromatogramme en UHPLC-ESI-MS/MS du standard de calibration 100 ng/mL.....	87
Figure 30: Relation dose-réponse de l'AcrodG suite à la réaction de l'Acro avec l'ADNct	104
Figure 31: Relation dose-réponse de l'AAdG réduit suite à la réaction de l'AA avec l'ADNct.....	104
Figure 32: Relation dose-réponse du FAdG réduit suite à la réaction du FA avec l'ADNct	104
Figure 33: Relation dose-réponse du HNEdG suite à la réaction du HNE à de faibles concentrations (a) ou à des concentrations élevées (b) avec l'ADNct.....	105
Figure 34: Relation dose-réponse du CrotodG suite à la réaction du Croto avec l'ADNct.....	108
Figure 35: Relation dose-réponse du GxdG suite à la réaction du Gx avec l'ADNct	108
Figure 36: Relation dose-réponse du MDAdG réduit (a) suite à la réaction du MDA à de faibles concentrations (b) ou à des concentrations élevées (c) avec l'ADNct.....	109
Figure 37: Relation dose-réponse du CEEdG (a) suite à la réaction du MG à de faibles concentrations (b) ou à des concentrations élevées (c) avec l'ADNct.....	110

Figure 38: Relation dose-réponse du cMGdG suite à la réaction du MG à de faibles concentrations (a) ou à des concentrations élevées (b) avec l'ADNct.....	111
Figure 39: Pourcentages d'adduits aux différents mélanges équimolaires.....	112
Figure 40: Pourcentage d'inhibition de la formation de l'AcrodG en mélange équimolaire	113
Figure 41: Pourcentage d'inhibition de la formation du CrotodG en mélange équimolaire	114
Figure 42: Pourcentage d'inhibition de la formation de l'AAdG réduit en mélange équimolaire	114
Figure 43: Pourcentage d'inhibition de la formation du HNEdG en mélange équimolaire	115
Figure 44: Pourcentage d'inhibition de la formation du MDAAdG réduit en mélange équimolaire	116
Figure 45: Pourcentage d'inhibition de la formation du FAdG réduit en mélange équimolaire	116
Figure 46: Pourcentage d'inhibition de la formation du cMGdG en mélange équimolaire	117
Figure 47: Pourcentage d'inhibition de la formation du CEAdG en mélange équimolaire..	118
Figure 48: Pourcentage d'inhibition de la formation du GxdG en mélange équimolaire ..	118
Figure 49: Illustration de l'implication de la consommation tabagique dans la cancérogenèse pulmonaire (d'après Hecht, 2012).....	123
Figure 50: Structures des adduits à l'ADN identifiés dans le poumon humain. HPB, 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone (Hecht, 2012).	124
Figure 51: Vue d'ensemble de l'objectif de ce volet (adapté de Hecht, 2012).....	127
Figure 52: Comparaison des niveaux moyens de 6 adduits dans l'ADN du sang des 5 fumeurs et des 5 non-fumeurs à ceux obtenus suite à l'exposition de l'ADNct en mélange équimolaire (1 mM) d'aldéhydes.....	134
Figure 53: Comparaison des niveaux moyens des 3 autres adduits dans l'ADN du sang des 5 fumeurs et des 5 non-fumeurs à ceux obtenus suite à l'exposition de l'ADNct en mélange équimolaire (1 mM) d'aldéhydes.....	135
Figure 54: Méthodologie adoptée pour la mise en place de l'étude épidémiologique.....	147
Figure 55: Réaction de l'acide 2-thiobarbiturique (2-TBA) avec le MDA.....	151
Figure 56: Principe de détection du rapport GSH/GSSG	151

Liste des tableaux

Tableau 1: Principales Espèces Réactives de l'Oxygène (d'après Lonkar et Dedon, 2011)	11
Tableau 2: Niveaux de lésions induites par le stress oxydant dans l'ADN cellulaire et tissulaire.....	34
Tableau 3: Mécanismes de réparation des lésions de l'ADN induites par le stress oxydant (adapté de Yu <i>et al.</i> , 2016b)	48
Tableau 4: Résumé des études publiées sur l'ADN par approche adductomique en utilisant la LC-MS	63
Tableau 5: Différentes conditions de synthèse des adduits	72
Tableau 6: Temps de rétention de la dG et des adduits synthétisés durant la purification..	74
Tableau 7: Temps de rétention de la dG et des adduits synthétisés pendant la quantification et les coefficients d'extinction molaires correspondant	76
Tableau 8: Différentes conditions de synthèse des adduits marqués.....	77
Tableau 9: Paramètres de transition de masse et MRM optimisés pour chaque adduit	83
Tableau 10: Exactitude et précision inter-journalières (n = 9)	88
Tableau 11: Exactitude et précision intra-journalières (n = 5)	89
Tableau 12: Biais maximal des concentrations recalculées des étalons de calibration par rapport à la valeur nominale	90
Tableau 13: Différentes conditions de formation des adduits à partir de l'ADNct <i>in vitro</i> à 37°C et pendant 24 h	100
Tableau 14: Détection d'adduits à l'ADN extrait d'échantillons humains en lien à la fumée de tabac (d'après Ma <i>et al.</i> , 2019)	121
Tableau 15: Aldéhydes pulmonaires, adduits formés et effet pulmonaire (d'après Sapkota et Wyatt, 2015)	126
Tableau 16: Niveaux d'adduits par 10 ⁷ nucléotides normaux dans l'ADN du sang des fumeurs	131
Tableau 17: Niveaux d'adduits par 10 ⁷ nucléotides normaux dans l'ADN du sang des non-fumeurs	132
Tableau 18: Moyennes des niveaux d'adduits par 10 ⁷ nucléotides normaux dans l'ADN du sang chez les 5 fumeurs et les 5 non-fumeurs	133
Tableau 19: Caractéristiques générales de la population.....	154
Tableau 20: Comparaisons des concentrations de biomarqueurs pour les policiers	157

Tableau 21: Analyse de régression multivariée du MDA plasmatique (a) et urinaire (b) en post-exposition chez les policiers	159
--	-----

Liste des abréviations

\cdot OH : radical hydroxyle
 $^1\text{O}_2$: oxygène singulet
2,4-DNPH : 2,4-dinitrophénylhydrazine
 ^{32}P : phosphore 32
 $^3\text{O}_2$: Oxygène
4-ABP : 4-aminobiphényl
8-OHdG : 8-hydroxydésoxyguanosine
A : Adénine
AA : acétaldéhyde
Acro : acroléine
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNet : ADN du thymus de veau
ADNn et mt : ADN nucléaire et mitochondrial
AGE : produits alimentaires de glycation avancée
AGPI : acides gras poly-insaturés
AoxnE : antioxydants non enzymatiques
ARN : acide ribonucléique
BER : réparation par excision de bases
BHT : Hydroxytoluène butylé
BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive
BPDE : benzo[a]pyrène-7,8-diol-9,10-époxyde
C : Cytosine
CaCl₂ : chlorure de calcium
CapLC : chromatographie liquide capillaire
CAT : catalase
CBC : Formule sanguine
CCM : chromatographie sur couche mince
CCMH : Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
cdA : 5',8-cyclo-2'-désoxyadénosine
cdG : 5',8-cyclo-2'-désoxyguanosine
CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
ClO $^-$: Hypochlorite
CO : monoxyde de carbone
COVs : composés organiques volatils
CREAT : créatinine
Croto : crotonaldéhyde
CRP : protéine-C-réactive
CV : coefficient de variation
CVF : capacité vitale forcée
CVGR : Concentration du Volume des Globules Rouges

dA : **dAde** : désoxyadénosine
dATP : désoxyadénosine triphosphate
dC : **dCyt** : désoxycytidine
dG : **dGuo** : désoxyguanosine
DMF : *N,N*-diméthylformamide
DMSO : diméthylsulfoxyde
dR : désoxyribose
DTNB : acide 5,5'-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque)
EC : détection électrochimique
ECHA : Agence Européenne des Produits Chimiques
ECNCI : détecteur à capture d'électrons
ECRHS : enquête européenne sur la santé respiratoire
EDTA : Éthylènediaminetétraacétique
EHN : 2,3-époxy-4-hydroxynonanal
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays
EMA : Agence européenne des médicaments
EPI : équipement de protection individuelle
ERO : espèces réactives de l'oxygène
ESI : ionisation par électronébuliseur
ESR : vitesse de sédimentation
FA : formaldéhyde
Fluo : détection par fluorescence
FM : facteur de matrice
G : Guanine
GC : chromatographie en phase gazeuse
GPx : glutathion peroxydase
GR : glutathion reductase
GSH : glutathion réduit
GSSG : glutathion oxydé
GST- α : glutathion-S-Transférases-alpha
Gx : glyoxal
Gx₁-dG : N²-(carboxyméthyl)-9-(2'-désoxy- β -D-érythro-pentofuranosyl)-purine-6(9H)-one
Gx₂-dG : 5-carboxyméthyl-3-(2'-désoxy- β -D-érythro-pentofuranosyl)-5,6,7-trihydro-6,7-dihydroxyimidazo[1,2-*a*]purine-9-one
H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène
HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique
HCl : acide chlorhydrique
HILIC : chromatographie d'interaction hydrophile
HNE : 4-hydroxy-2-nonéal
HNE-DMA : HNE-diméthylacétal
HOO \cdot : Radical hydroperoxyde
HPB : 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone
HPLC : chromatographie liquide à haute performance

HR-AM : high resolution accurate mass
HRMS : spectrométrie de masse à haute résolution
HSP : Protéines de stress
IMC : indice de masse corporelle
KH₂PO₄ : le Phosphate de Potassium monobasique
LC : chromatographie liquide
LLOD : limite inférieure de détection
LLOQ : limite inférieure de quantification
LO[•] : radical alkoxy
LOO[•] : radical peroxy
LOOH : hydroperoxyde
LPO : peroxydation lipidique
m/z : rapport masse/charge
M₁dA : N⁶-(3-oxoprényl)-désoxyadénosine
M₁dC : N⁴-(3-oxoprényl)-désoxycytidine
M₁dG : pyrimido[1,2- α]purine-10(3H)-one-2'-désoxyribose
MDA : malondialdéhyde
MG : méthylglyoxal
MG-CEdG : N²-(1-carboxyéthyl)-7-1-hydroxy-2-oxopropyl-dG
Mⁿ : métaux de transition
Mⁿ⁺¹ : forme oxydée des métaux de transition
MPH : Volume Moyen des Plaquettes
MRM : Multiple Reaction Monitoring
MS : spectrométrie de masse
NaBH₃CN : cyanoborohydrure de sodium
NaCl : chlorure de sodium
NaOH : hydroxyde de Sodium
NDMA : N-nitrosodiméthylamine
NER : réparation par excision de nucléotides
NICI : ionisation chimique à ions négatifs
NNK : 4-(méthylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone
NNN : N'-nitrosonornicotine
NO[•] : Radical oxyde nitrique
NO₂[•] : Radical dioxyde nitrique
NPYR : N-nitrosopyrrolidine
O₂^{•-} : Anion Superoxyde
OH[•] : Radical hydroxyle
OHE : 4-oxo-2(*E*)-hénénal
ONE : 4-oxo-2-nonénal
ONOO⁻ : Peroxynitrite
OPdG : N²-(3-oxoprop-1-ényl)-désoxyguanosine
PdG : propano-dG : N²-(3-oxopropyl)-désoxyguanosine
PDW : Largeur de Distribution des Plaquettes
Q : quadripôle

QC : échantillon de contrôle de la qualité
RL : espèces chimiques radicalaires libres
RO[•] : Radical alkoxy
ROO[•] : Radical peroxy
ROOH : Hydroperoxy
SCE : échange de chromatide sœur
SIM : Single Ion Monitoring
SOD : superoxyde dismutase
SPE : extraction en phase solide
T : Thymidine
TBA : acide thiobarbiturique
TCMH : Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine
TP : tampon phosphate
UHPLC : chromatographie liquide à Ultra Performance
ULOQ : limite supérieure de quantification
UREE : urée
USERIA : dosage radioimmunologique enzymatique ultrasensible
VEMS : volume expiratoire maximal en une seconde
VGM : Volume Globulaire Moyen
 α -CH₃- γ -OH-PdG : α -méthyl- γ -hydroxy-1,N²-propano-2'-désoxyguanosine
 α -OH-PdG : α -hydroxy-PdG
 γ -OH-PdG : γ -hydroxy-PdG
 ϵ -dA : Ethéno-désoxyadénosine
 ϵ -dC : Ethéno-désoxycytidine
 ϵ -dG : Ethéno-désoxyguanosine

I. Chapitre 1 : De l'exposome à la compréhension mécanistique des effets induits par les aldéhydes

Le premier chapitre sera subdivisé en cinq parties. La 1^{ère} partie est consacrée à la description de l'exposome, nouveau concept intégrant la totalité des expositions (sous entendues toutes les atteintes à la santé non génétiques) durant la vie entière. La 2^{ème} partie portera sur la notion de biomarqueurs, leur typologie et leur implication dans la prédiction, la prévention et le traitement des maladies. Ensuite dans une 3^{ème} partie, sera présentée l'exposition systémique aux aldéhydes par des sources à la fois exogènes et endogènes. Elle sera suivie dans une 4^{ème} partie par le développement des effets génotoxiques induits par les aldéhydes, en traitant de manière plus ciblée l'intérêt que peut porter l'étude des adduits à l'acide désoxyribonucléique (ADN) induits par ces polluants nocifs en tant que biomarqueurs d'exposition. Dans une 5^{ème} partie, les méthodes de dosage des lésions de l'ADN seront décrites. Elles regroupent principalement les méthodes chromatographiques, enzymatiques et immunologiques.

I- Exposome : Nouveau concept pour étudier les risques sanitaires

En 2005, Chris Wild a présenté le concept du « exposome » (Wild, 2005). Il a suggéré que, conjointement avec la génomique, la métabolomique, la protéomique et la transcriptomique, nous devons également comprendre les relations entre les expositions aux produits chimiques et les maladies tout au long de la vie. Plusieurs années plus tard, Lijoy et Rappaport (Liory et Rappaport, 2011 ; Wild, 2012) ont également exploré ce concept. Ils ont souligné que l'évaluation des expositions ne devrait pas être limitée aux produits chimiques pénétrant dans le corps mais devrait également inclure les substances toxiques générées d'une manière endogène par l'inflammation, le stress oxydant, la peroxydation lipidique (LPO) et d'autres processus physiologiques (Rappaport et Smith, 2010 ; Rappaport, 2011) (Figure 1). En effet, cette notion d'exposome est apparue suite au constat d'une recrudescence de pathologies chroniques dont la notion de susceptibilité génétique ne pouvait à elle seule l'expliquer. Au final, l'exposome désigne l'intégration de l'ensemble des expositions délétères pour la santé, à la fois environnementales, comportementales et professionnelles auquel est soumis un individu tout au long de son existence.

Ce concept nécessite aujourd'hui de nombreux développements méthodologiques innovants dans l'évaluation et la traçabilité des expositions à risque cancérigène. Ces dernières deviennent de plus en plus complexes en raison des sources multiples, de leur chronicité et des faibles doses des contaminants.

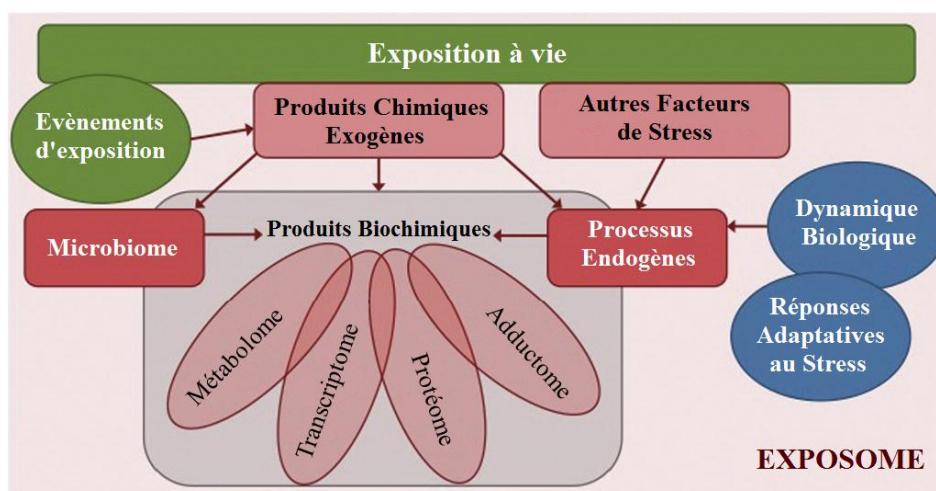


Figure 1: Définition de l'Exposome (adapté de Escher *et al.*, 2016)

La recherche liée aux dommages à l'ADN en lien avec diverses expositions aériennes à des produits chimiques a été l'une des priorités du laboratoire Aliments Bioprocédés Toxicologie Environnements (ABTE). Parmi les polluants retrouvés dans le milieu aérien, nous avons porté notre regard sur les aldéhydes qui sont des produits hautement réactifs très nocifs pour la santé. Ils sont très irritants et ont la capacité de se lier directement aux macromolécules cellulaires qui peuvent être à l'origine de dommages très délétères pour la santé humaine (Voulgaridou *et al.*, 2011). Ce chapitre mettra donc l'accent sur notre compréhension des dommages à l'ADN induits par les aldéhydes, sur la notion des biomarqueurs et sur les progrès des méthodes d'analyse qui ont considérablement modifié notre capacité à mesurer avec précision les biomarqueurs, tels que les adduits à l'ADN au cours des dernières décennies.

II- Surveillance biologique de l'exposition chez l'Homme : notion de biomarqueurs

La notion de biomarqueur est issue du domaine de l'épidémiologie moléculaire née dans les années 1980 afin de comprendre les causes de la survenue du cancer, et d'améliorer la prévention de cette maladie (Marie, 2007). La biosurveillance de l'exposition des individus aux produits cancérigènes apparaît ainsi comme un outil essentiel à la prévention, et celle-ci est permise par l'étude de tout un panel de biomarqueurs pouvant être détectés bien avant la survenue d'un cancer. La formation endogène de certains biomarqueurs peut en outre compliquer l'évaluation de l'exposition externe.

Dans le domaine de la santé, il existe plusieurs types de biomarqueurs, les biomarqueurs diagnostiques, pronostiques et prédictifs permettant respectivement de dépister une maladie, de suivre son évolution et d'évaluer la réponse au traitement.

Les étapes de validation doivent être réalisées lors d'études préliminaires, voire de transition pour faire le lien entre les approches de laboratoire et les études en population. Une validité analytique pour doser les biomarqueurs doit être opérée. Il faut s'assurer de la limite de détection de quantification, de sensibilité, de spécificité, d'exactitude et de

précision. A coté de ces critères il faudra vérifier la fiabilité de la méthode dans le temps. Un autre critère à vérifier est la validation biologique du biomarqueur. Il faudra connaître les facteurs intervenant dans les variations intra- et inter-individuelles, sa persistance dans l'organisme afin d'évaluer la fenêtre d'exposition. Aussi pour démontrer une possible association entre l'exposition, le biomarqueur et la maladie, il faudra s'attacher à explorer les critères suivants (Pleil, 2012) :

- 1- l'origine (exogène, endogène ou une réponse) ;
- 2- la fonction biologique ;
- 3- les paramètres cinétiques (absorption, distribution, métabolisme ou élimination) ;
- 4- le milieu biologique en lien avec la période d'exposition (sang, urine, salive, air expiré...).

Dans le domaine de la santé et de l'environnement, pour établir une relation de cause à effet, il est également possible d'utiliser les biomarqueurs. On distingue trois types de biomarqueurs (Perera et Weinstein, 2000 ; Pleil, 2012) (Figure 2) :

- **Les biomarqueurs d'exposition (polluant dans l'organisme)** : ils correspondent à toutes substances exogènes, métabolite ou réponse à une interaction entre un agent xénobiotique et une molécule ou cellule-cible mesurée dans un compartiment de l'organisme. On distingue ainsi la dose interne, reflétant la mesure du xénobiotique ou d'un de ses métabolites dans une matrice biologique. Cette mesure de la dose interne est pertinente et complémentaire des approches épidémiologiques. Elle permet en effet d'évaluer spécifiquement les doses avec lesquelles l'organisme est directement en contact en intégrant les mécanismes d'absorption, de distribution, de métabolisme, de bioaccumulation et d'élimination du xénobiotique, variables d'un être humain à l'autre. Pour illustrer cette catégorie nous pouvons citer la cotinine, métabolite de nicotine, bon marqueur du tabagisme actif mais aussi passif mesurable dans la salive, le sang et les urines, (Hecht, 2003 ; Kim, 2016). Dans une autre étape, il est possible de mesurer la dose biologiquement efficace qui correspond à la dose au niveau de la cible biologique telle que la détermination des adduits à l'ADN. Ils peuvent être caractéristiques d'un produit ou d'une famille de produits cancérigène (exemple, les hydrocarbures aromatiques polycycliques HAP) comme ils peuvent mettre en évidence des

dommages moins spécifiques liés par exemple à des phénomènes d'alkylation ou d'oxydation. L'interprétation des taux d'adduits doit tenir compte de leur persistance, elle même dépendante de la stabilité du produit, des systèmes de réparation et de la fréquence de renouvellement des macromolécules et de la cellule ciblées.

Il est à noter que certains auteurs dans la prévention du risque chimique englobent les adduits à l'ADN dans la catégorie de biomarqueurs d'effets précoces, à la frontière des biomarqueurs d'exposition et d'effet ; ils doivent permettre de révéler des modifications moléculaires et biochimiques à un stade subclinique, c'est à dire encore réversibles.

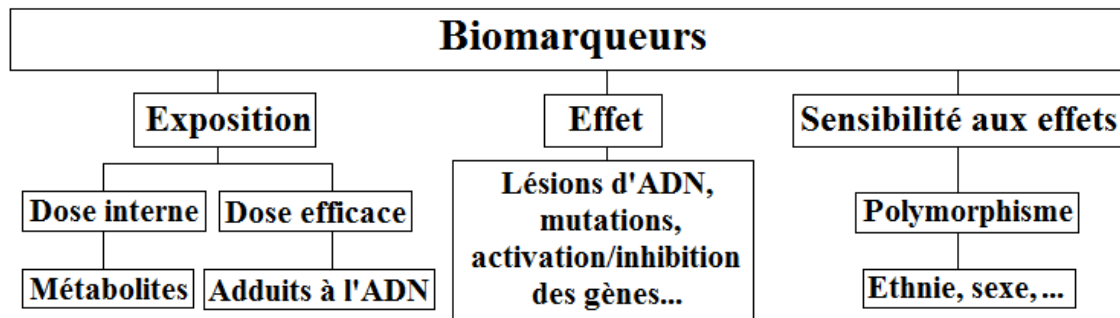


Figure 2: Classification des biomarqueurs (d'après Perera et Weinstein, 2000).

- **Les biomarqueurs d'effet (réponse de l'organisme) :** ils traduisent les conséquences physio-pathologiques de l'exposition à un polluant, ils permettent de détecter des effets biologiques plus ou moins proches de la survenue de la maladie. Elles marquent la plupart du temps des lésions irréversibles (exemple : protéines du choc thermique, enzymes du stress oxydant, les mutations somatiques, aberrations chromosomiques...).
- **Les biomarqueurs de sensibilité aux effets :** leur étude a pour but d'identifier les individus présentant une sensibilité élevée à certains polluants. Les facteurs de susceptibilité comprennent l'âge, le sexe, l'origine ethnique, le statut nutritionnel, ou l'existence de maladie prédisposante. Les paramètres les plus étudiés sont les facteurs de prédispositions génétiques et les polymorphismes de gènes impliqués dans les réponses biologiques suite à l'exposition à un facteur de risque (réparation

de l'ADN, métabolisme des xénobiotiques, systèmes immunitaires, l'inflammation...).

III- Exposition systémique aux aldéhydes

L'exposition aux aldéhydes, composante majeure de l'exposome contemporain, joue un rôle important dans la pathogenèse de maladies chroniques, comme le cancer (Wild, 2005). L'amélioration des outils d'investigation de « l'aldéhydome », la somme de tous les aldéhydes exogènes et formés de manière endogène, est nécessaire pour élucider le rôle complexe que ces composés jouent dans les événements physiopathologiques (Dator *et al.*, 2019). Les aldéhydes sont des molécules hautement réactives auxquelles l'Homme est exposé d'une façon ubiquitaire (Figure 3). Elles possèdent un pouvoir mutagène et/ou cancérigène. Parmi la multitude d'aldéhydes présents dans l'environnement et produits dans le corps, nous traiterons les aldéhydes qui sont les plus fréquemment retrouvés et étudiés dans l'environnement et le corps humain.

1. Expositions environnementales

1.1. Acroléine

L'acroléine (Acro) est produite soit par distillation à sec de graisse, soit par condensation en phase vapeur d'acétaldéhyde et de formaldéhyde ou par oxydation catalytique de propylène. L'Acro est également utilisée dans la synthèse de la méthionine. Par ses propriétés herbicides aquatiques, algicides et microbiocides, elle est retrouvée dans les produits phytosanitaires. De plus, elle est utilisée dans la fabrication du papier et du carton et de métaux, ainsi que dans la production de parfums (IARC, 1985).

L'Acro est également présente dans divers aliments et boissons, par exemple dans la bière, la canne à sucre, le pain blanc, le muscle de poitrine de poulet crue. L'Acro est formée dans les huiles de friture en surchauffe. Le nom « acroléine » dérive d'ailleurs de l'odeur âcre des huiles surchauffées (Esterbauer *et al.*, 1991). L'Acro est également connue en tant que polluant aérien urbain résultant de la combustion de combustibles fossiles, du bois, du kérosène et du coton, de la photo-oxydation du 1,3-butadiène, de la torréfaction du café, de l'extraction des huiles essentielles du bois de chêne, des gaz d'échappement, de la

fabrication d'huiles de poisson, de la pyrolyse de graisses animales et végétales, de l'usine de fabrication d'acide acrylique, des plastiques et du caoutchouc synthétique, de la fabrication de bougies, des feux de forêt et des peintures au pistolet. L'Acro est également détectée dans les eaux usées issues de ces usines (IARC, 1985 ; 2016 ; Esterbauer *et al.*, 1991). Le condensat de la fumée de cigarette contient de l'Acro qui présente un pouvoir toxique supérieur à celui du phénol (Wynder *et al.*, 1965). La fumée principale de la cigarette sans filtre contient 60 à 100 µg d'Acro/cigarette (IARC, 1986). En outre, l'Acro est l'un des principaux métabolites du cyclophosphamide, un agent chimiothérapeutique (IARC, 1985).

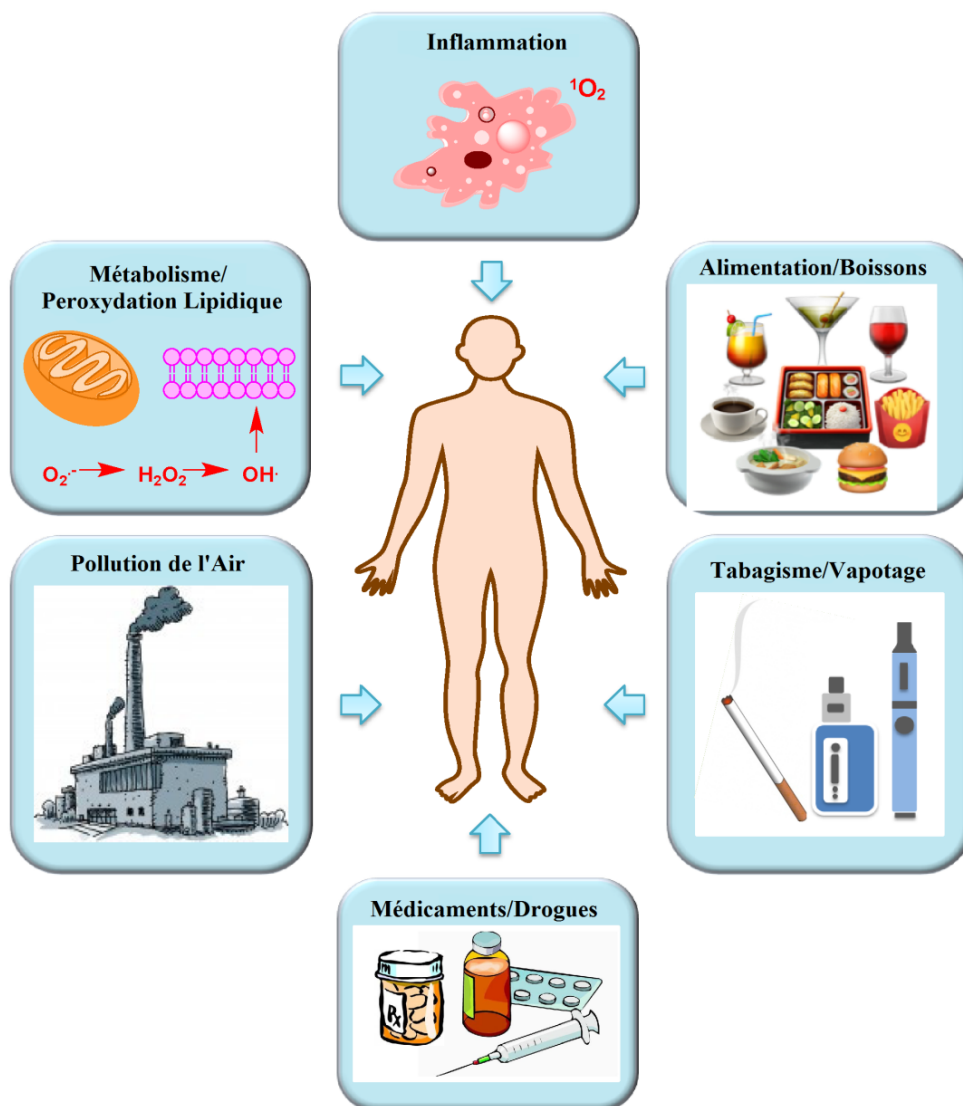


Figure 3: Exposition systémique de l'humain aux aldéhydes ; les principales sources endogènes et environnementales (adapté de Dator *et al.*, 2019)

1.2. Crotonaldéhyde

Le condensat de la fumée de cigarette contient d'autres aldéhydes volatils insaturés, tel que le crotonaldéhyde (Croto) (Wynder *et al.*, 1965). La fumée principale de la cigarette sans filtre contient de 10 à 20 µg de Croto/cigarette (IARC, 1986). Par ailleurs, le Croto est un métabolite microsomal hépatique de la N-nitrosopyrrolidine (NPYR) (Wang *et al.*, 1988). Le NPYR est présent dans la fumée de tabac, allant de 1,5 à 30 ng/cigarette commerciale avec filtre et atteignant 110 ng/cigarette commerciale sans filtre (IARC, 1986). On le trouve également dans les vapeurs de bacon cuit, dans les eaux usées de certaines usines de produits chimiques et comme contaminant à l'état de traces de divers aliments : viande et produits à base de poisson, épices et aliments pour animaux (IARC, 1978).

1.3. Acétaldéhyde

L'acétaldéhyde (AA) est produit commercialement par l'hydratation de l'acétylène, l'oxydation de l'éthanol ou l'oxydation catalytique de l'éthylène. Il s'agit d'un intermédiaire chimique principalement destiné à la fabrication d'acide acétique et à d'autres produits manufacturés tels que : les composés époxydiques, le Croto et divers acétals, les résines, les plastiques, le caoutchouc synthétique, les herbicides, les boissons alcoolisées, les produits pharmaceutiques et cosmétiques. On le trouve en tant que constituant naturel de nombreux fruits, légumes et huiles, mais il est également utilisé comme additif alimentaire. Il se produit comme intermédiaire métabolique chez les plantes supérieures et comme métabolite de l'éthanol chez l'Homme. Il est détecté dans le sang humain et le lait maternel (IARC, 1985).

L'AA est connu comme polluant ubiquitaire. Les principales sources d'émission d'AA dans l'air sont : les gaz d'échappement des moteurs à essence ou à diesel, la combustion du bois, la combustion des plastiques, la torréfaction du café, les installations de traitement des eaux usées et de nombreuses usines de fabrication. L'AA a été identifié comme constituant dans les déchets de nombreuses usines telles que le raffinage du pétrole et le traitement du charbon (IARC, 1985 ; 2016). De plus, l'AA se produit dans le condensat de la fumée de cigarette (Wynder *et al.*, 1965). La fumée principale de la cigarette sans filtre contient 0,5 à 1,2 mg d'AA/cigarette (IARC, 1986). La fumée de cigarette est une source potentiellement importante d'exposition à l'AA, atteignant environ 20 mg/jour. Par ailleurs, une boisson typique contient environ 10 g d'éthanol, qui est ensuite métabolisé en AA (Matsuda *et al.*, 2007 ; Balbo *et al.*, 2008 ; Yu *et al.*, 2010). Dans de nombreuses

études, une relation dose-réponse a été observée entre le taux des adduits induits par l'AA et la consommation de l'alcool (Balbo *et al.*, 2008).

1.4. Formaldéhyde

Le formaldéhyde (FA) est principalement utilisé dans la production de résines phénoliques, d'urée, de mélamine et de polyacétal. Il est également largement utilisé comme intermédiaire dans la fabrication de produits chimiques industriels. De plus, le FA est retrouvé directement en solution aqueuse comme désinfectant et conservateur dans de nombreuses applications (IARC, 2006). Le FA est connu comme un polluant de l'air extérieur provenant principalement des sources de combustion biogénique et de biomasse, des émissions des véhicules (IARC, 2016) et des expositions professionnelles continues et/ou à court terme, lors du vernissage des meubles et des planchers en bois, dans les industries de textiles et de vêtements et dans certains emplois tels que les embaumeurs, les pathologistes et les travailleurs du papier (IARC, 2006). La pollution de l'air intérieur par le FA provient des produits cosmétiques, de la peinture, des tapis, de la maroquinerie, de l'alimentation et de la cuisine, des panneaux de particules et autres dérivés de bois fabriqués avec des colles thermodurcissables à base de formol (Teng *et al.*, 2001 ; IARC, 2006 ; Lu *et al.*, 2010b). Le condensat de fumée de cigarette contient du FA. D'après Wynder et ses collègues (1965), cet aldéhyde volatil saturé présente une toxicité supérieure à celle du phénol. La fumée de la cigarette sans filtre contient 70 à 100 µg de FA/cigarette (IARC, 1986).

1.5. Malondialdéhyde

Le malondialdéhyde (MDA) se trouve dans les feuilles de pois et de cotonnier, mais également dans de nombreux produits alimentaires (viande de bœuf cuite, viande de poisson, huile de poisson, noix rances, huiles de légumes, matières grasses, lait...). Sa formation dans les aliments pendant la cuisson dépend de nombreux facteurs tels que le degré d'insaturation des acides gras et le mode de préparation (IARC, 1985).

1.6. 4-hydroxy-2-nonéanal

Des traces de 4-hydroxy-2-nonéanal (HNE) sont toujours présentes dans les aliments. Les chiffres trouvés se situent dans la gamme allant de 1 à 7 nmoles/g, par exemple l'huile

d'olive à 7,3 nmoles/g, l'huile de sésame grillée à 1,64 nmole/g et le poulet rôti à 0,75 nmole/g (Lang *et al.*, 1985).

1.7. Glyoxal

Le glyoxal (Gx) est un α -oxoaldéhyde et est souvent groupé avec deux α -oxoaldéhydes similaires, le méthylglyoxal et la 3-désoxyglucosone. Les sources exogènes sont principalement alimentaires, notamment la bière, le vin, le thé, le café, le yogourt, le pain, le riz, la pâte de soja, la sauce soja et l'huile. Les aliments qui ont été fermentés, rôtis, cuits au four ou frits constituent également une source riche du Gx. Les sources environnementales du Gx comprennent la fumée de cigarette, la fumée des feux de bois résidentiels, les gaz d'échappement des véhicules, le smog, le brouillard et certains produits de nettoyage ménagers. Il peut également être introduit dans l'air lors de la combustion incomplète de divers matériaux tels que le bois et le carburant (WHO, 2004 ; Aalto-Korte *et al.*, 2005 ; Lange *et al.*, 2012).

1.8. Méthylglyoxal

Il a été rapporté que le méthylglyoxal (MG) est d'origine environnementale. La fumée de cigarette est l'un des processus de combustion pouvant générer du MG (Fujioka et Shibamoto, 2006) ; l'eau de boisson peut contenir du MG en raison des traitements de purification (Camel et Bermont, 1998) ; l'eau de pluie peut absorber le MG provenant de l'air pollué et le transmettre au sol (Fu *et al.*, 2008). Le MG plasmatique peut provenir de sources exogènes, telles que le café, les boissons alcoolisées et les aliments (Nemet *et al.*, 2006 ; Wang et Chang, 2010). Presque tous les aliments et les boissons contiennent du MG, comme le décrit Vistoli et ses collègues (2013).

2. Expositions endogènes

2.1. Stress oxydant

Le stress oxydant est un syndrome multifactoriel résultant d'un déséquilibre entre la production d'espèces réactives oxydantes et les systèmes de défenses antioxydantes. Il est impliqué dans l'oxydation de certaines macromolécules cellulaires (lipides, protéines, ADN) qui peuvent être à l'origine de la mort cellulaire et par conséquent à de graves lésions tissulaires dont certaines peuvent participer à la génèse de cancer et/ou des

pathologies prédisposantes de nature inflammatoire, infectieuse et de surcharge en métaux (Haleng *et al.*, 2007 ; Lonkar et Dedon, 2011).

Parmi les acteurs impliqués dans le stress oxydant en lien avec le cancer, les espèces réactives oxydantes de l'oxygène (ERO) sont de loin les plus étudiées. Elles renferment des espèces chimiques non radicalaires et radicalaires libres (RL) (Tableau 1). Ces entités radicalaires sont caractérisées par l'existence d'un gain d'électron célibataire sur leur couche électronique la plus externe. Cette propriété leur confère une aptitude à réagir avec les macromolécules cellulaires lors des réactions radicalaires (Burton et Jauniaux, 2011).

Tableau 1: Principales Espèces Réactives de l'Oxygène (d'après Lonkar et Dedon, 2011)

Oxygène	$^3\text{O}_2$
Oxygène singulet	$^1\text{O}_2$
Anion Superoxyde	$\text{O}_2^{\bullet -}$
Radical hydroxyle	OH^\bullet
Radical hydroperoxyde	HOO^\bullet
Radical peroxyde	ROO^\bullet
Hydroperoxyde	ROOH
Radical alkoxyde	RO^\bullet
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical oxyde nitrique	NO^\bullet
Radical dioxyde nitrique	NO_2^\bullet
Peroxynitrite	ONOO^-
Hypochlorite	ClO^-

Certaines ERO peuvent être formées par réductions mono ou bi-électroniques de l'oxygène, et représentent ainsi divers états d'oxydation de l'oxygène, comprenant par ordre de réduction, l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet -}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($^\bullet\text{OH}$) (Figure 4).

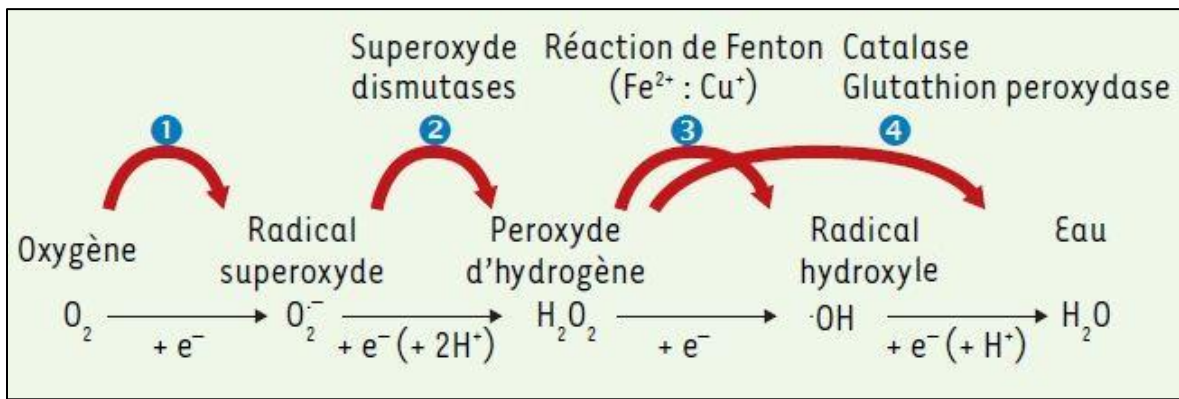


Figure 4: Différents états de réduction de l’oxygène (Migdal et Serres, 2011)

L’anion superoxyde, issu de la réduction à un électron de l’oxygène, peut être produit au cours de la respiration, ou lors de l’activation des macrophages au cours de la réponse immunitaire. Dans les conditions physiologiques, l’anion superoxyde est rapidement transformé en peroxyde d’hydrogène par dismutation. Cette réaction peut être spontanée, mais elle est le plus souvent catalysée par des enzymes appelées superoxyde dismutases (SOD). Parallèlement, l’anion superoxyde et le peroxyde d’hydrogène participent à la production de radical hydroxyle, via la réaction d’Haber-Weiss et la réaction de Fenton en présence des métaux de transition (Figures 4 et 5) (Migdal et Serres, 2011 ; Ayala *et al.*, 2014).

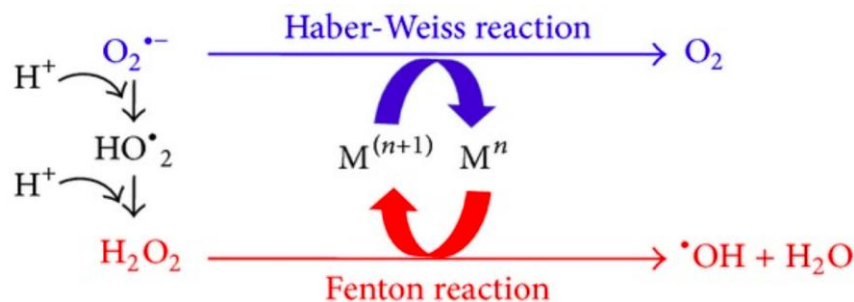


Figure 5: Réaction de Fenton et Haber-Weiss (Ayala *et al.*, 2014).

La forme réduite des métaux de transition (Mⁿ) réagit lors de la réaction de Fenton avec le peroxyde d’hydrogène (H₂O₂), entraînant la génération de OH[•]. Le radical superoxyde (O₂^{•-}) peut également réagir avec la forme oxydée de métaux de transition (Mⁿ⁺¹) lors de la réaction de Haber-Weiss conduisant à la production de Mⁿ, ce qui affecte à nouveau le cycle redox.

Parmi les RL générés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde n'est pas très réactif mais constitue un précurseur pouvant être activé en d'autres ERO alors plus réactives. Par ailleurs, la faible réactivité biologique de ce même radical permet son implication comme médiateur intra- et intercellulaire capable de réguler certaines fonctions vitales. Au contraire, d'autres radicaux, comme le radical hydroxyle sont très réactifs, et surtout avec les macromolécules cellulaires des tissus vivants, à savoir les lipides, les protéines et les acides nucléiques (Burton et Jauniaux, 2011).

Parmi les ERO décrits ci-dessus, le radical hydroxyle est sans conteste le composé le plus réactif. Cette réactivité est telle qu'elle limite sa diffusion et circonscrit donc le lieu de réaction du radical hydroxyle à son lieu de formation. Elle rend également impossible l'existence de mécanismes enzymatiques de détoxification. La formation du radical hydroxyle doit donc être prévenue grâce à l'élimination de l'ion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène par des systèmes enzymatiques spécifiques (Kurutas, 2016). Le radical hydroxyle réagit avec l'ensemble des composants cellulaires grâce à trois types de réactivité : *i*) réaction d'addition, entraînant par exemple l'hydroxylation des bases puriques et pyrimidiques ainsi que de certains acides aminés aromatiques, *ii*) complexation avec un hydrogène ou *iii*) transfert d'un électron non apparié à de nombreuses molécules, entraînant ainsi la formation de nouvelles espèces radicalaires, tel que le radical peroxyde (ROO^\bullet). Ce phénomène est impliqué dans l'initiation des réactions en chaîne responsables de la LPO. Les produits terminaux de la LPO, incluant le MDA et le HNE, sont également toxiques car ils peuvent rapidement modifier les protéines et l'ADN en formant des adduits au désoxyguanosine (dG) et désoxyadénosine (dA) (Esterbauer *et al.*, 1991 ; Migdal et Serres, 2011).

La concentration des ERO doit être régulée car elle participe au maintien d'une homéostasie redox. Le maintien d'un état redox intracellulaire déterminé est une condition essentielle au bon fonctionnement des activités cellulaires, définissant ainsi la notion d'homéostasie redox. L'ensemble des composants de la cellule participe à l'établissement de cette homéostasie. Cependant, certains sont plus importants que d'autres. Ainsi, le contrôle de l'état redox des métaux et des thiols constitue un paramètre essentiel de la régulation homéostatique (Dröge, 2002).

2.1.1. Défenses antioxydantes

Les ERO étant continuellement générées dans les cellules aérobies, des systèmes enzymatiques de défenses antioxydantes ont co-évolué avec le métabolisme cellulaire afin de prévenir leurs conséquences délétères (Kurutas, 2016). Parmi ces systèmes, les SOD, la Glutathion Peroxydase (GPx), la Glutathion reductase (GR) et les Glutathion-S-Transférases-alpha (GST- α) sont considérées comme les plus efficaces (Pan *et al.*, 2017). La détermination de ces enzymes peut par conséquent contribuer à l'évaluation du statut redox d'un individu (Kurutas, 2016).

En outre, la SOD est capable de catalyser la dismutation des anions $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 (Figure 6). De plus, les peroxydases, et notamment les GPx, catalysent la réduction de divers hydroperoxydes. Cette réduction requiert l'oxydation du glutathion réduit (GSH) en glutathion oxydé (GSSG). Ce dernier est alors régénéré grâce à la réduction catalysée par la GR, en présence du NADPH (Lubos *et al.*, 2011). De plus, le glutathion est d'une importance fondamentale dans la détoxification cellulaire de nombreux xénobiotiques et oxydants (Liu *et al.*, 2014). En effet, les principaux rôles cellulaires du glutathion se résument à ceux de : *i*) substrat des GPx, *ii*) substrats des GST, *iii*) réservoir cellulaire de groupement thiols réduits susceptibles de régénérer les groupements thiols oxydés des protéines, *iv*) piègeur des RL, et par conséquent première défense contre les RL, et *v*) tripeptide étroitement impliqué dans la réparation des dommages oxydants à l'ADN (Liu *et al.*, 2014). Il a été montré que le glutathion, à son état réduit, est présent à des concentrations variables mais généralement très élevées dans presque toutes les cellules et est l'un des principaux médiateurs critiques du statut redox de la cellule (Lubos *et al.*, 2011).

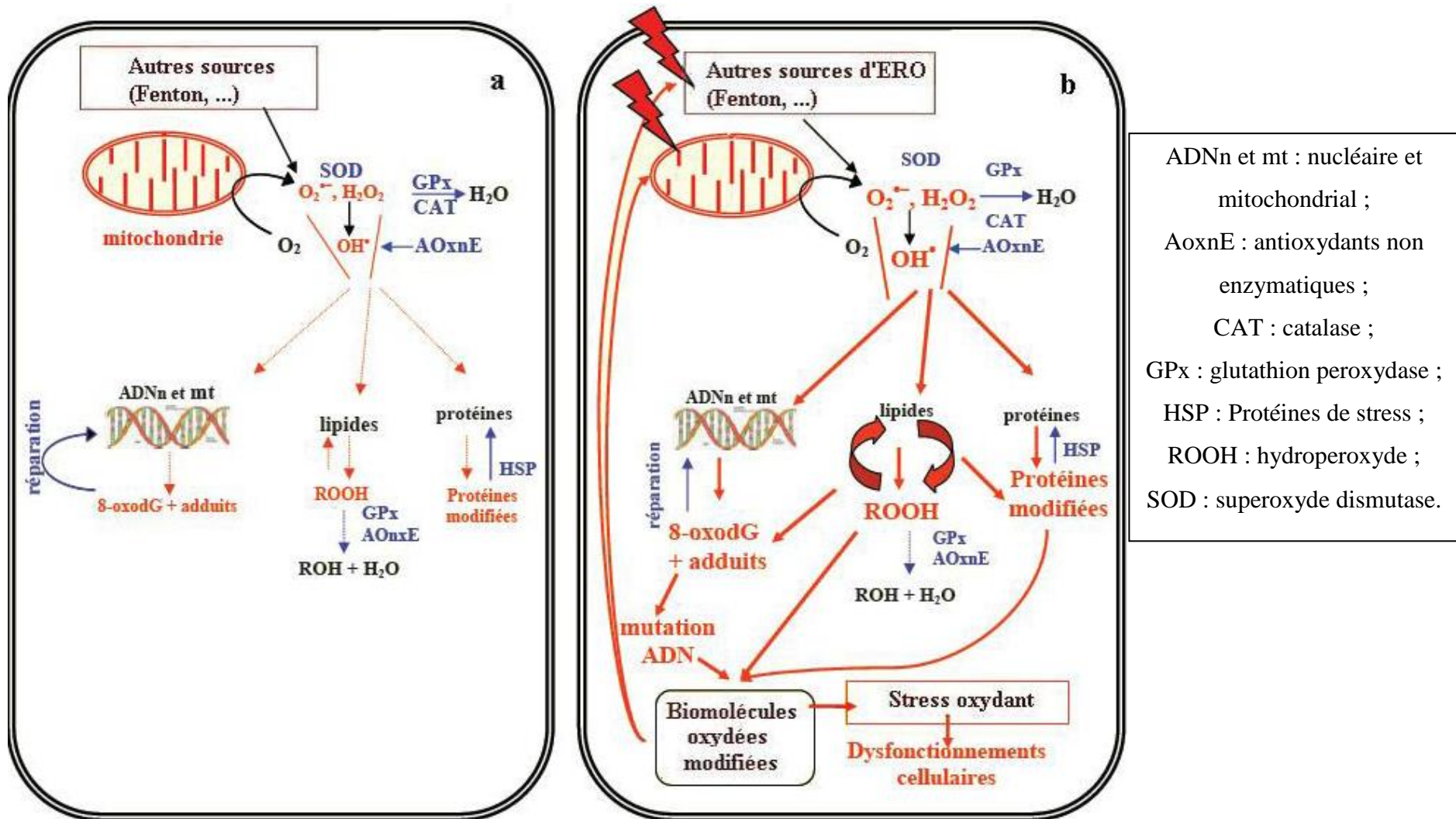
2.1.2. Effets délétères des ERO

Les ERO constituent des entités chimiques certes réactives, mais indispensables au métabolisme des êtres vivants. Malgré leur caractère nocif, la cellule les maîtrise grâce à un panel de molécules piégeuses, définies comme des antioxydants, enzymatiques ou non (Kurutas, 2016). Malheureusement, dans un type cellulaire ou un tissu précis, ce système de régulation peut être altéré ou saturé, par une surproduction massive des ERO et/ou un effondrement des défenses antioxydantes endogènes (Figure 6). Aussi le stress oxydant

résulte-t-il d'un déséquilibre de la balance pro-/anti-oxydants (Tan *et al.*, 2018). Malgré l'existence de nombreux systèmes impliqués dans la régulation de l'homéostasie cellulaire du fer, dans certaines conditions physiopathologiques, le fer s'avère catalyser la production excessive des ERO et est alors à l'origine d'un déséquilibre important de la balance pro-/anti-oxydants, ce qui résulte par conséquent en l'apparition d'un stress oxydant (Tan *et al.*, 2018). En outre, la genèse de ce stress oxydant engendre de graves conséquences délétères sur les diverses macromolécules cellulaires (Figure 7), à savoir l'ADN, les protéines et les lipides (Michel *et al.*, 2008).

La dégradation radicalaire des lipides est un phénomène permanent et ubiquitaire, encore appelé LPO (Servais, 2004). La LPO s'avère probablement être le mieux étudié des processus biologiques délétères induits par les ERO. La présence abondante de phospholipides membranaires à l'endroit même où les radicaux, et plus particulièrement les RL, sont générés, confère à ces macromolécules une sensibilité et une disponibilité importantes face aux dégradations induites par ces RL (Zhong *et al.*, 2019). L'altération des membranes par la LPO résulte généralement en la formation de nombreux composés, incluant notamment des alcanes et des carbonyles. Certains d'entre eux, notamment le MDA et d'autres dérivés lipidiques oxydés, présentent une toxicité intrinsèque et peuvent servir d'intermédiaires dans la formation de dommages radicalaires, en générant des adduits avec l'ADN (Figure 6) (Servais, 2004).

Les dommages à l'ADN induits par les ERO recouvrent plusieurs aspects : *i*) la formation d'adduits entre les dérivés lipidiques issus de la peroxydation des acides gras polyinsaturés (AGPI) et l'ADN, *ii*) la formation d'adduits entre les protéines altérées par le stress oxydant et l'ADN, *iii*) l'altération du pool de désoxyribose-phosphates, *iv*) l'hydroxylation des bases puriques et pyrimidiques de l'ADN (*e.g.* 8-OHdG), *v*) les cassures simple et double brins de l'ADN, *vi*) l'induction d'aberrations chromosomiques, et *vii*) la distorsion de la double hélice de l'ADN (Marrocco *et al.*, 2017). Les lésions à l'ADN peuvent être à l'origine d'une mutagénicité des lésions d'oxydation à l'ADN pouvant participer au processus cancérogène.



ADNn et mt : nucléaire et mitochondrial ;
 AoxnE : antioxydants non enzymatiques ;
 CAT : catalase ;
 GPx : glutathion peroxydase ;
 HSP : Protéines de stress ;
 ROOH : hydroperoxyde ;
 SOD : superoxyde dismutase.

Figure 6: Représentation schématique de la balance prooxydants/antioxydants cellulaires, en situation basale (a) et après action des aldéhydes (b). En bleu sont représentés les systèmes qui permettent de limiter les dégâts oxydatifs, et en rouge les molécules oxydées et/ou oxydantes (Servais, 2004).

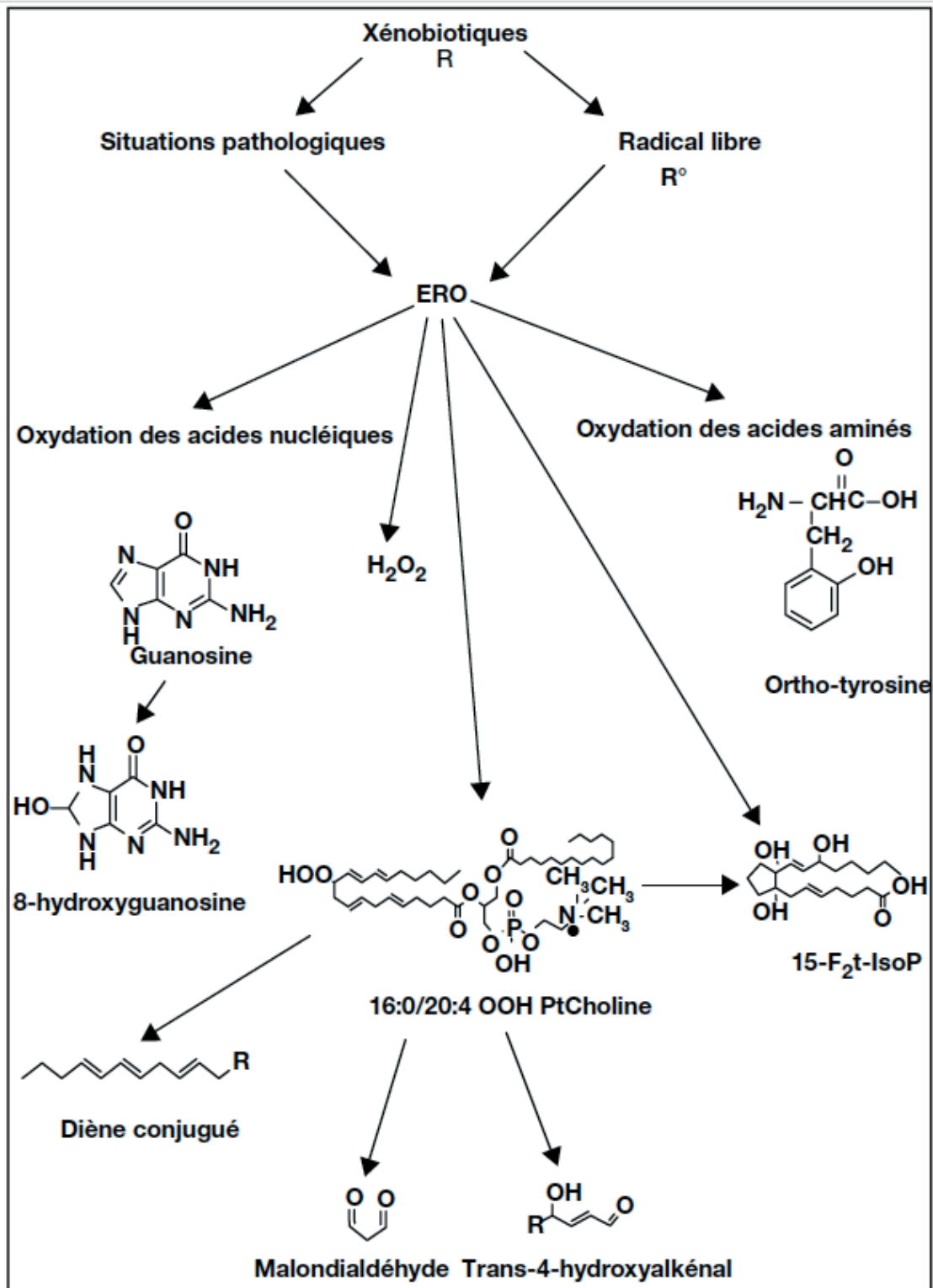


Figure 7: Schéma général des marqueurs d'oxydation des lipides, des acides aminés et des acides nucléiques au cours du stress oxydant (Michel *et al.*, 2008).

2.2. Mécanisme de la peroxydation lipidique

Le processus de la LPO peut être impliqué dans l'initiation et/ou la promotion de la cancérogenèse (Vaca *et al.*, 1988). La LPO est un processus d'attaque oxydative des lipides membranaires (Yu *et al.*, 2016a). Elle se caractérise par trois étapes différentes appelées initiation, propagation et terminaison (Figure 8).

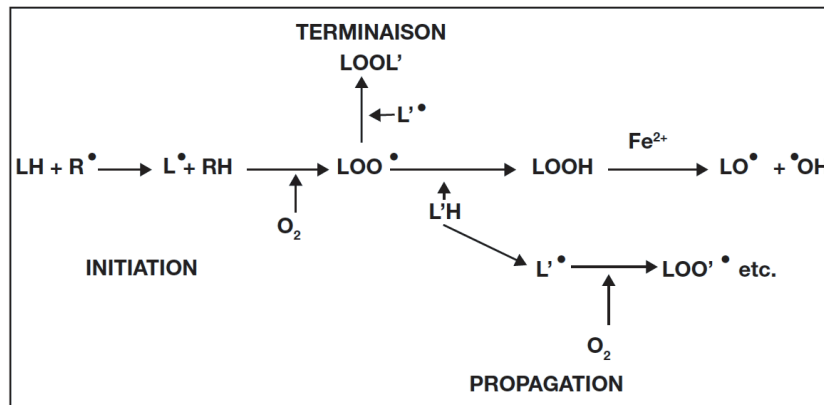


Figure 8 : Phases d'initiation, de propagation et de terminaison de la peroxydation lipidique. R^\bullet : radical initiateur (ERO) ; LH : acide gras polyinsaturé ; L^\bullet : radical lipidique ; LOO^\bullet : radical peroxyde ; LOOH : hydroperoxyde ; LO^\bullet : radical alkoxyde ; $\bullet OH$: radical hydroxyle ; O_2 : oxygène ; LOOL : produit stable (Michel *et al.*, 2008).

La phase d'initiation est due à l'attaque d'une espèce radicalaire (radicaux hydroxydes, alcoxydes, peroxydes, l'oxygène singulet ou le peroxydinitrite) suffisamment réactive pour arracher un hydrogène du groupement méthylène bis-allylique situé en α d'une double liaison (hydrogène le plus labile) d'un AGPI (LH) pour former un radical pentadiényle (radical centré sur l'atome de carbone ; $\cdot CH-$ ou L^\bullet). Ce radical se stabilise par réarrangement intramoléculaire en formant un diène conjugué capable de réagir facilement avec l'oxygène pour donner un radical peroxyde, LOO^\bullet . Ce dernier peut à son tour arracher un hydrogène d'une autre molécule d'acide gras adjacente ($L'H$), créant ainsi une réaction en chaîne (propagation) (Figure 9) ; la combinaison du radical peroxyde avec l'atome d'hydrogène conduit à la formation d'un hydroperoxyde lipidique (LOOH) qui, sous l'action des métaux (Fe^{2+} ou Cu^+), formera des radicaux alcoxydes (LO^\bullet) et hydroxydes (HO^\bullet).

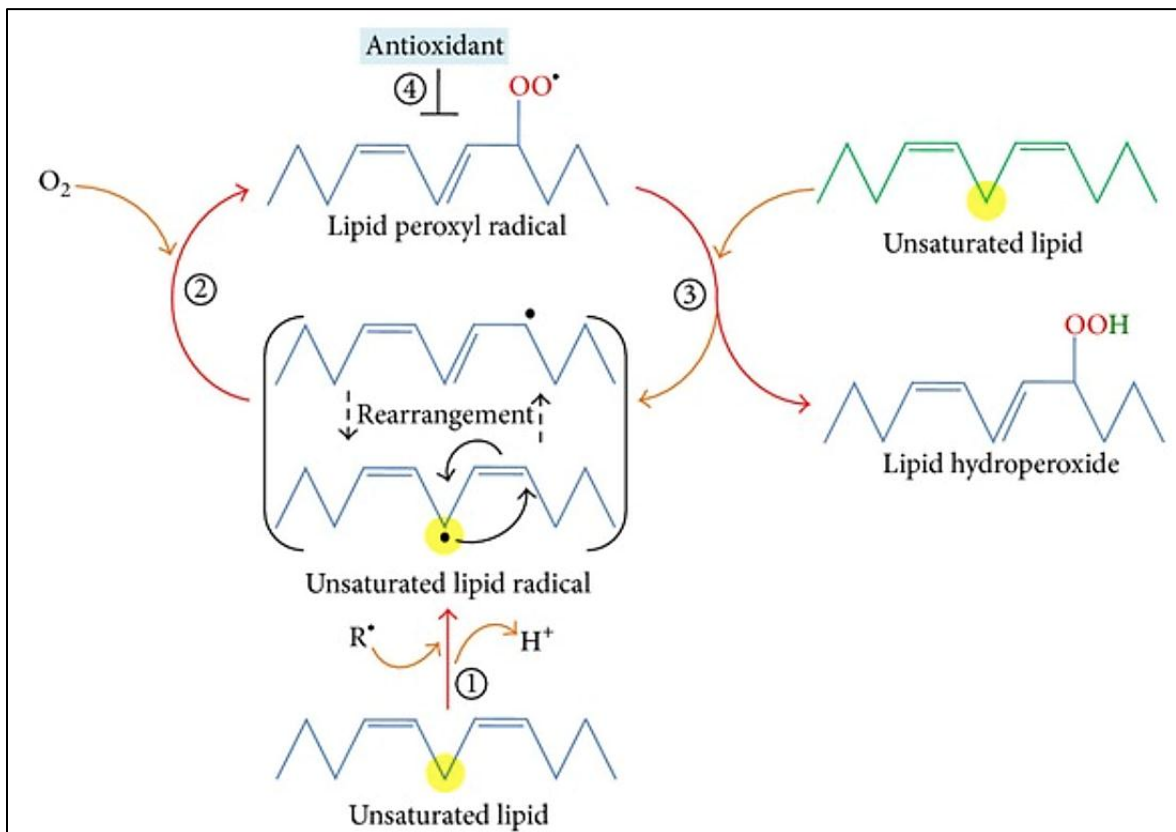


Figure 9: Processus de la peroxydation lipidique.

En initiation, les prooxydants forment le radical lipidique carboné qui tend à être stabilisé par un réarrangement moléculaire pour former un diène conjugué (étape 1). En phase de propagation, le radical lipidique réagit rapidement avec l'oxygène pour former un radical lipidique peroxy (étape 2) qui extrait un hydrogène d'une autre molécule lipidique générant un nouveau radical lipidique et de l'hydroperoxyde lipidique (étape 3). Dans la réaction de terminaison, les antioxydants donnent un atome d'hydrogène aux espèces lipidiques peroxy radicalaires, ce qui entraîne la formation de produits non radicalaires (étape 4) (Ayala *et al.*, 2014).

Les radicaux peroxydes peuvent aussi conduire à des peroxydes cycliques. Ces hydroperoxydes, que l'on appelle les « produits primaires » de la LPO, peuvent se décomposer en « produits secondaires » et « terminaux » pour former des endoperoxydes cycliques et finalement des aldéhydes comme le MDA et le HNE ou des isoprostanes. Enfin, des phases terminales de dégradation conduiront à des aldéhydes, parmi lesquels nous pouvons citer le MDA et le HNE, ou aux isoprostanes (Figure 10). Une autre voie telle que la dimérisation entre deux radicaux peroxydes peut également se produire (phase de terminaison).

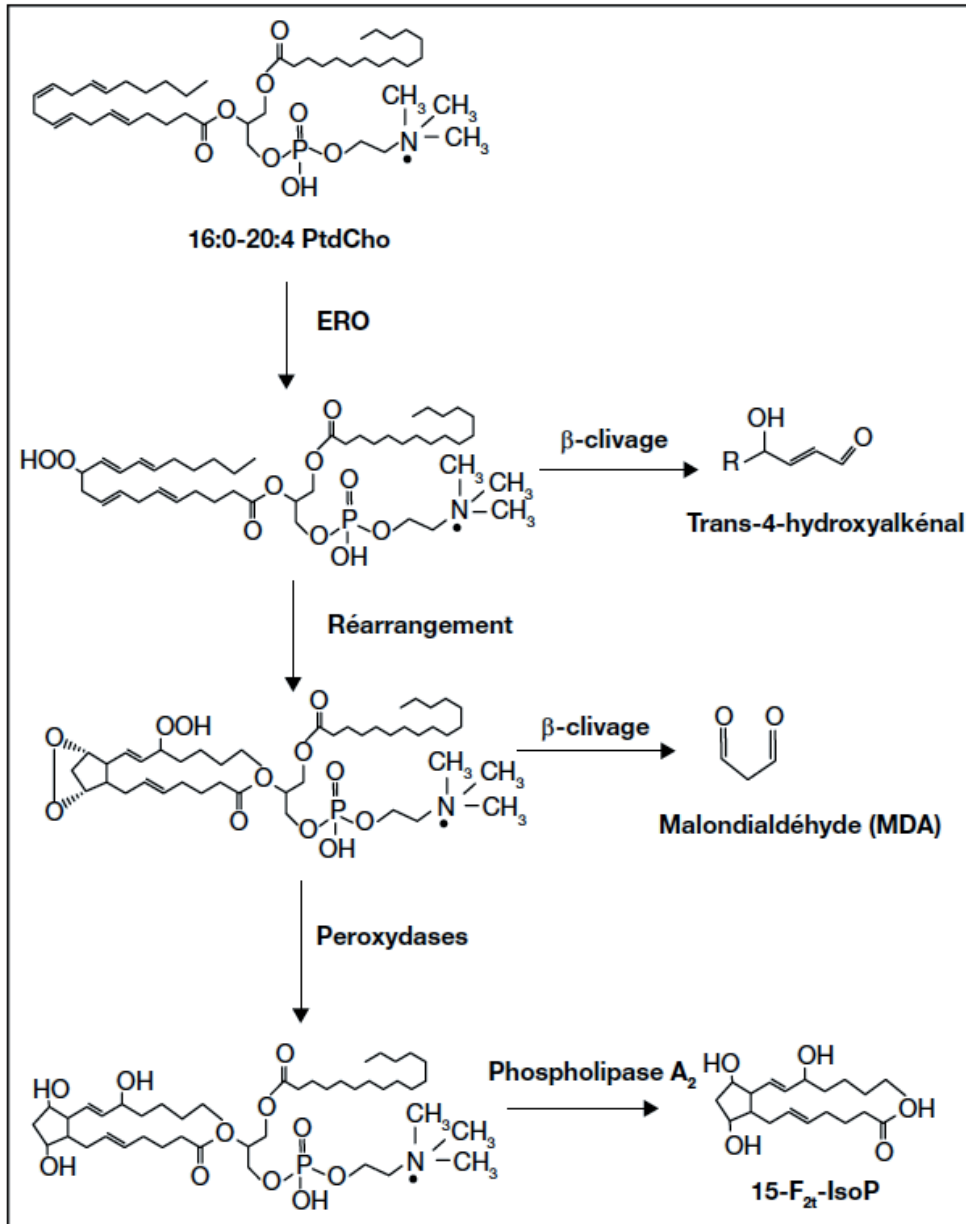


Figure 10: Schéma de formation des produits « primaires » et « secondaires » de la peroxydation lipidique à partir d'une espèce moléculaire de la phosphatidylcholine comportant en sn-2 un acide arachidonique (Michel *et al.*, 2008).

Les produits de la LPO, en particulier les produits terminaux stables, tels que des aldéhydes (MDA, HNE) ou les isoprostanes, peuvent être mesurés dans le plasma et les urines en tant que marqueurs du stress oxydant. Il faut noter que les aldéhydes constituent des produits stables comparativement aux espèces radicalaires, susceptibles de diffuser hors de la cellule et d'attaquer des cibles relativement éloignées de leur lieu de formation primaire (Figure 11).

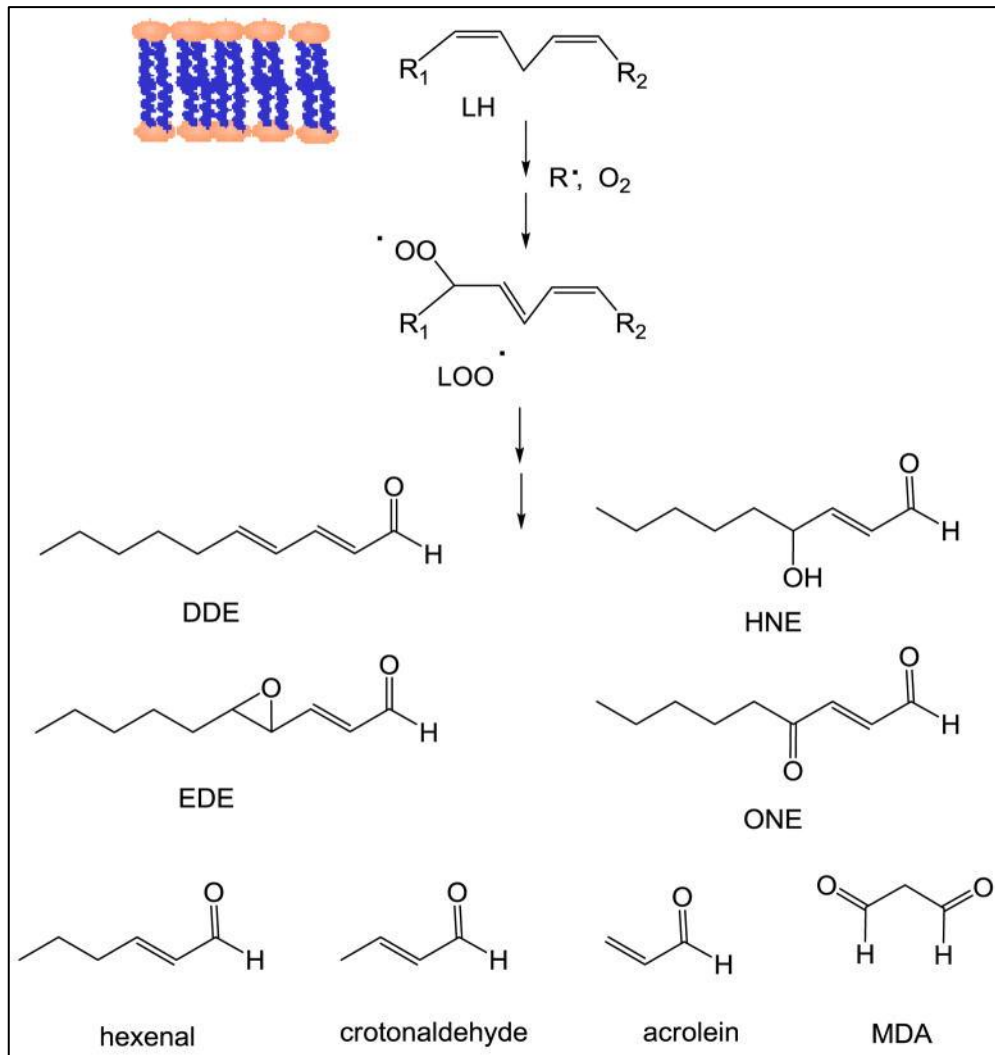


Figure 11: Principaux aldéhydes α,β -insaturés issus de la peroxydation lipidique (Cadet *et al.*, 2017).

2.3. Dérivés de la peroxydation lipidique

Des altérations chimiques et des dommages à l'ADN peuvent être produits aux différentes étapes de la LPO, à commencer par la réaction directe entre les ERO et l'ADN. La seconde possibilité est représentée par la réaction entre l'ADN et les radicaux lipidiques formés au cours de l'étape de propagation. Le troisième mécanisme majeur est représenté par la réaction de l'ADN avec la variété de produits non radicalaires de la LPO. Ces réactions conduisent à une modification des bases nucléiques et à une grave détérioration structurale de l'ADN.

Parmi les produits non radicalaires, les produits aldéhydiques tels que les aldéhydes α,β -insaturés, le HNE et le MDA, sont des composés mutagènes et induisent la formation

d'adduits à l'ADN (Akasaka et Yonei, 1985 ; Vaca *et al.*, 1988). Le processus principal conduisant à la formation d'aldéhydes est probablement la réaction dite de clivage β de radicaux alcoxy lipidiques. La concentration de ces aldéhydes endogènes est maintenue à de faibles niveaux par les systèmes de détoxification cellulaire (Esterbauer *et al.*, 1990 ; 1991). Selon Chung et ses collègues, ces aldéhydes peuvent modifier directement les protéines et l'ADN et former des adduits, mais ils peuvent également être époxydés par des oxydants cellulaires. Les époxy-aldéhydes, en particulier les énals à chaîne longue, sont plus réactifs que les énals parentaux vis-à-vis de l'ADN. Les auteurs ont rapporté que la LPO est une source endogène importante pour la formation d'adduits à l'ADN de type propano et éthéno à partir d'aldéhydes α,β -insaturés endogènes (Chung *et al.*, 1996 ; 1999). Ces adduits exocycliques sont des lésions prémutagènes efficaces et sont réparés lentement ; leurs niveaux sont dans un état stable, ce qui pourrait résulter d'une formation et d'une élimination continues par un certain nombre de facteurs. Ils augmentent en association avec des modifications chimiques, diététiques ou physiologiques conduisant au cancer (Marnett et Burcham, 1993 ; Chung *et al.*, 1999).

Collins et ses collègues (1993) ont détecté des dommages oxydatifs importants dans des lymphocytes d'individus en bonne santé. Fedtke et ses collègues (1990) ont observé de faibles taux d'adduits à l'ADN N2,3-éthénoguanine induits par le chlorure de vinyle chez des rats non traités. Ces lésions sont une cause probable de mutations qui, si elles se produisent dans des gènes appropriés, peuvent conduire au cancer. Chung et ses collègues (1999) ont examiné la formation d'adduits cycliques : l'acroléine-désoxyguanosine (AcrodG), le crotonaldéhyde-désoxyguanosine (CrotodG) et le 4-hydroxy-2-nonéna-désoxyguanosine (HNEdG) dans des conditions *in vitro* de LPO. Ces études ne sont que quelques exemples de celles qui confirment le rôle de la LPO en tant que source endogène importante pour la formation d'adduits à l'ADN d'aldéhydes.

2.3.1. Acroléine

Arif et ses collègues (2006) ont suggéré que les adduits associés à la fumée ne sont pas liés aux hydrocarbures aromatiques polycycliques typiques ni aux amines aromatiques, mais sont impliqués comme produits dérivés des aldéhydes, présents dans la fumée de cigarette à des niveaux supérieurs que les carcinogènes polyaromatiques typiques. Selon Zhang et ses collègues (2007), les quantités d'Acro sont jusqu'à 10000 fois supérieures à celles du benzo[a]pyrène dans la fumée de cigarette. Cependant, les auteurs ont lié la formation

d'adduits AcroG dans l'ADN du poumon humain non seulement au tabagisme, mais également à l'exposition à l'Acro de l'environnement ainsi qu'à la formation endogène de l'Acro par la LPO. En 1991, McDiarmid et ses collègues (1991) ont détecté de l'ADN modifié par l'Acro dans des lymphocytes de patients atteints d'un cancer précédemment traités avec le médicament anticancéreux, le cyclophosphamide. Par exemple, Nath et Chung (1994) ont retrouvé des adduits AcroG chez l'Homme et chez des rongeurs non exposés. Comme les rongeurs de cette étude n'étaient pas traités avec des agents cancérogènes, il est concevable que des facteurs endogènes tels que la LPO puissent contribuer à la formation de produit d'adduction. Plus tard, Nath et ses collègues (1996) ont suggéré que ces adduits ne sont pas des produits d'artefacts provenant de l'extraction de l'ADN compte tenu le profile spécifique par tissu et la stéréosélectivité de la détection des adduits.

2.3.2. Crotonaldéhyde

Dans des conditions physiologiques, le Croto peut modifier l'ADN en formant des adduits 1,N²-propanodésoxyguanosine (1,N²-PdG) cycliques (Chung *et al.*, 1984). Dans une étude visant à quantifier les adduits CrotoG dans le foie et le poumon humains, Zhang et ses collègues (2006) ont confirmé que les adduits CrotoG pouvaient résulter d'expositions endogènes et exogènes. Nath et Chung (1994) ont détecté des adduits CrotoG chez l'Homme et les rongeurs sans traitement carcinogène. Plus tard, Nath et ses collègues (1996) ont examiné une variété de tissus de rongeurs et d'êtres humains non traités et ont suggéré un rôle potentiel de ces adduits comme lésion endogène de l'ADN chez les deux espèces.

2.3.3. Acétaldéhyde

L'AA réagit avec les désoxynucléosides, à l'exception de la thymidine, donnant lieu à la formation d'un adduit. L'ordre de réactivité était dG > dA > dC et l'additif principal formé par la réaction de l'AA avec la dG, le N²-éthylidènedG, est instable et peut donc être stabilisé par réduction en N²-éthylidG (Vaca *et al.*, 1995a). De plus, il a été constaté une diminution significative de 28% des niveaux de N²-éthylidènedG, en tant que produit de réduction, le N²-éthylidG dans des leucocytes après quatre semaines d'arrêt du tabac (Chen *et al.*, 2007). D'autres études ont suggéré l'origine endogène de cet adduit, l'une étant la

réduction de N²-éthylidènedG et l'autre, sa formation en tant que produit mineur de l'éthylation de l'ADN (Fang *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 2006).

2.3.4. Formaldéhyde

Le FA est généré de manière endogène dans toutes les cellules vivantes à partir de la sérine, la glycine, la méthionine, l'histamine et la choline. Il est également produit à partir de certains métabolites et protéines par déméthylation. Il est présent dans le sang humain à environ 0,1 mM (Teng *et al.*, 2001 ; IARC, 2006 ; Lu *et al.*, 2009).

Le FA pénètre dans l'organisme et forme des adduits à l'ADN (Teng *et al.*, 2001 ; Lu *et al.*, 2009 ; 2010b). Des adduits FAdG exogènes et endogènes ont été détectés dans l'ADN d'origine nasal de rats exposés à diverses concentrations de FA, ce qui montre que les adduits à l'ADN endogène étaient dominants lors de faibles expositions (Lu *et al.*, 2011).

2.3.5. Malondialdéhyde

Le MDA est un produit secondaire de la LPO (Chung *et al.*, 1996). Hadley et Draper (1990) ont découvert des adduits à l'ADN formés par réaction avec le MDA dans l'urine de rats. De plus, les niveaux de ces adduits ont augmenté après l'administration du Fe ou du CCl₄, qui sont des catalyseurs bien connus de la LPO *in vivo*. Cette observation indique une origine endogène de ces adduits et constitue une preuve solide de la modification de l'acide nucléique causée par la LPO *in vivo*. Selon Esterbauer *et al.* (1991), le MDA résulte principalement de la dégradation par oxydation des AGPI comportant plus de deux doubles liaisons interrompues par du méthylène. Les précurseurs du MDA seront principalement les acides arachidoniques et l'acide docosahexaénoïque des AGPI (Figure 12).

Le MDA existe en solution aqueuse sous trois formes principales. À pH acide, la β -hydroxyacroléine devient l'espèce prédominante, réactive et électrophile, capable de réagir avec les composés nucléophiles dans une réaction d'addition de Michael pour former des adduits du MDA (Esterbauer *et al.*, 1991).

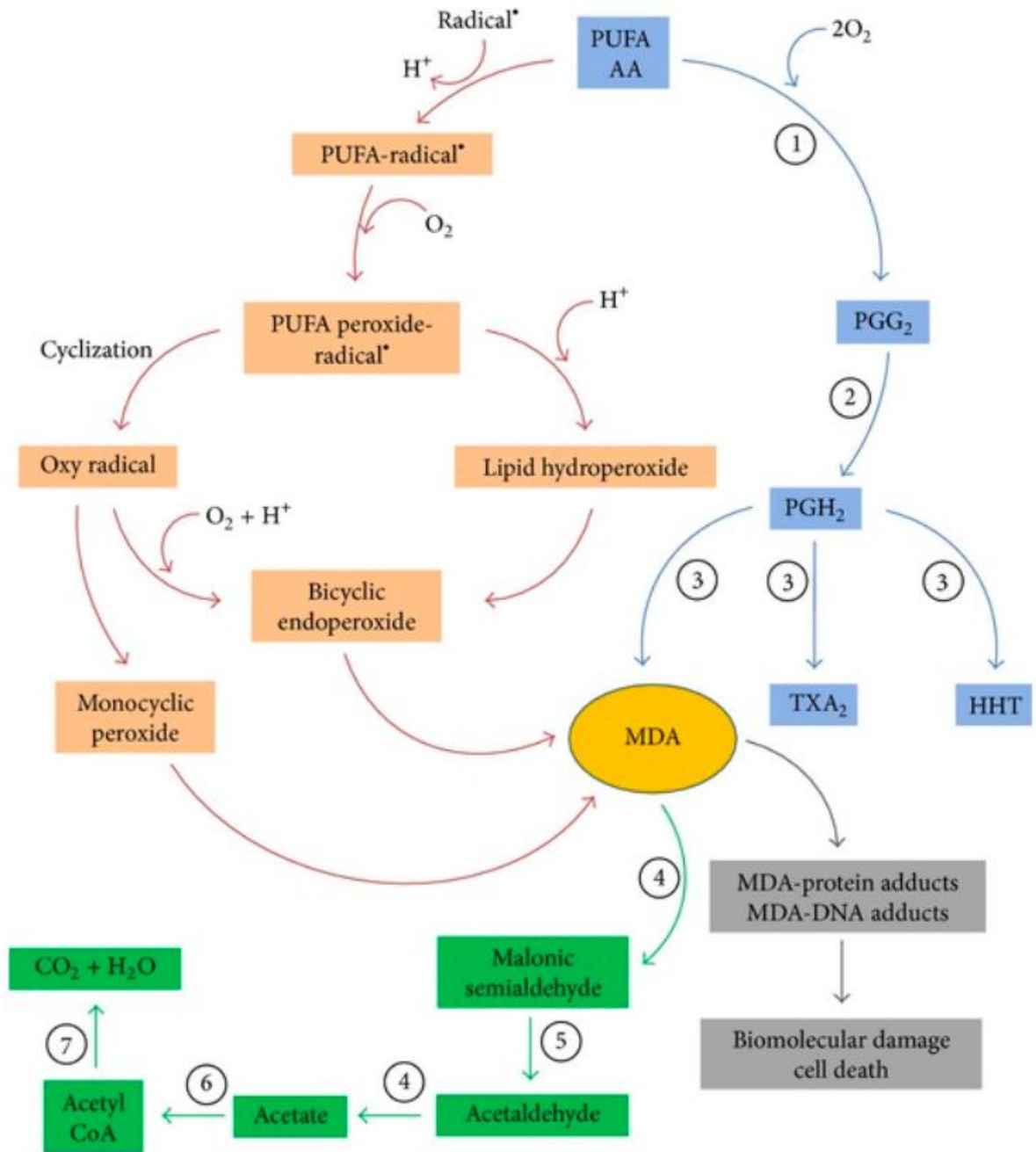


Figure 12: Formation et métabolisme du MDA.

Le MDA peut être généré *in vivo* par décomposition de l'acide arachidonique (AA) et des AGPI (PUFA) lors des processus enzymatiques au cours de la biosynthèse du thromboxane A2 (TXA2) et de l'acide 12-1-hydroxy-5,8,10-heptadéca heptadécatriénoïque (HH) (voie bleue), ou par des processus non enzymatiques par des endopéroxydes bicycliques produits au cours de la peroxydation lipidique (voie rouge). Un MDA formé peut être métabolisé par voie enzymatique (voie verte) (Ayala *et al.*, 2014).

Le MDA est présent dans les plaquettes sanguines et dans le sérum en tant que produit de la LPO et en tant que produit secondaire de la biosynthèse de la prostaglandine et du

thromboxane (IARC, 1985). Certaines équipes ont tentés d'étudier les adduits à la dG du MDA en tant que biomarqueurs du stress oxydant induit de manière endogène (Vaca *et al.*, 1992 ; 1995b). D'autres résultats ont confirmé l'importance des dommages endogènes à l'ADN, qui se produisent de manière continue par la LPO chez des individus en bonne santé et non exposés (Chaudhary *et al.*, 1994).

2.3.6. 4-hydroxy-2-nonéanal

Les 4-hydroxyalcénals ont trois groupes fonctionnels principaux, à savoir le groupe aldéhyde, la double liaison CC et le groupe hydroxy, qui peuvent participer seuls ou en séquence à des réactions chimiques avec d'autres molécules (Esterbauer *et al.*, 1991). Le HNE réagit avec la dG dans des conditions physiologiques pour donner deux paires d'adduits diastéréoisomériques. Le mécanisme proposé implique une addition de Michael nucléophile suivie d'une cyclisation rapide (Winter *et al.*, 1986).

Le HNE est généré par la LPO surtout des ω -6 AGPI (Figures 13 à 15) (Esterbauer *et al.*, 1990 ; 1991 ; Chung *et al.*, 1996 ; 1999 ; 2000). Benedetti et ses collègues (1980) ont démontré que les 4-hydroxyalcénals, en particulier le HNE, se forment lors de la peroxydation des lipides microsomaux du foie.

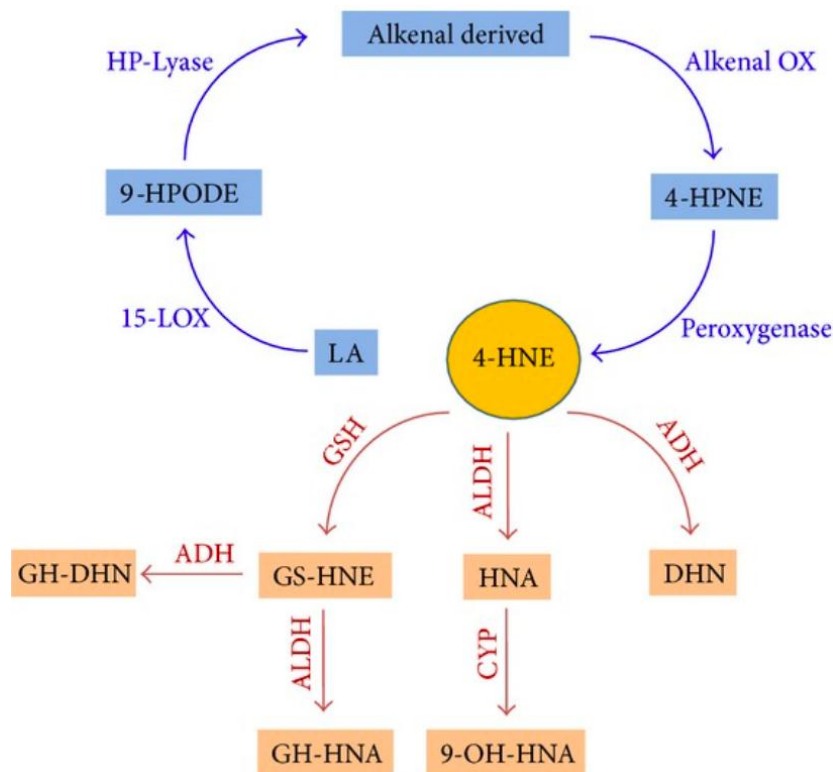


Figure 13: Production enzymatique du HNE et métabolisme.

La voie enzymatique menant au HNE comprend la lipoxygénase (LOX), l'hydroperoxyde lyase (HPL), l'alkénoxygénase (AKO) et les peroxygénases. Le métabolisme du HNE peut conduire à la formation de l'alcool 1,4-dihydroxy-2-nonène (DHN), de l'acide 4-hydroxy-2-nonénoïque (HNA), et du conjugué au glutathion (HNE-GS). La conjugaison du HNE avec le glutathion (GSH) produit du glutathionyl-HNE (GS-HNE) suivie par une réduction par l'alcool déshydrogénase (ADH-) dépendante du NADH en glutathionyl-DHN (GS-DHN) et/ou par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH-) en glutathionyl-HNA (GS-HNA). Le HNE est métabolisé par l'ALDH, qui donne le HNA, métabolisé par une oxydation catalysée par le cytochrome P450 (CYP) pour former le 9-hydroxy-HNA (9-OH-HNA). Le HNE peut également être métabolisé par l'ADH pour produire du DHN (Ayala *et al.*, 2014).

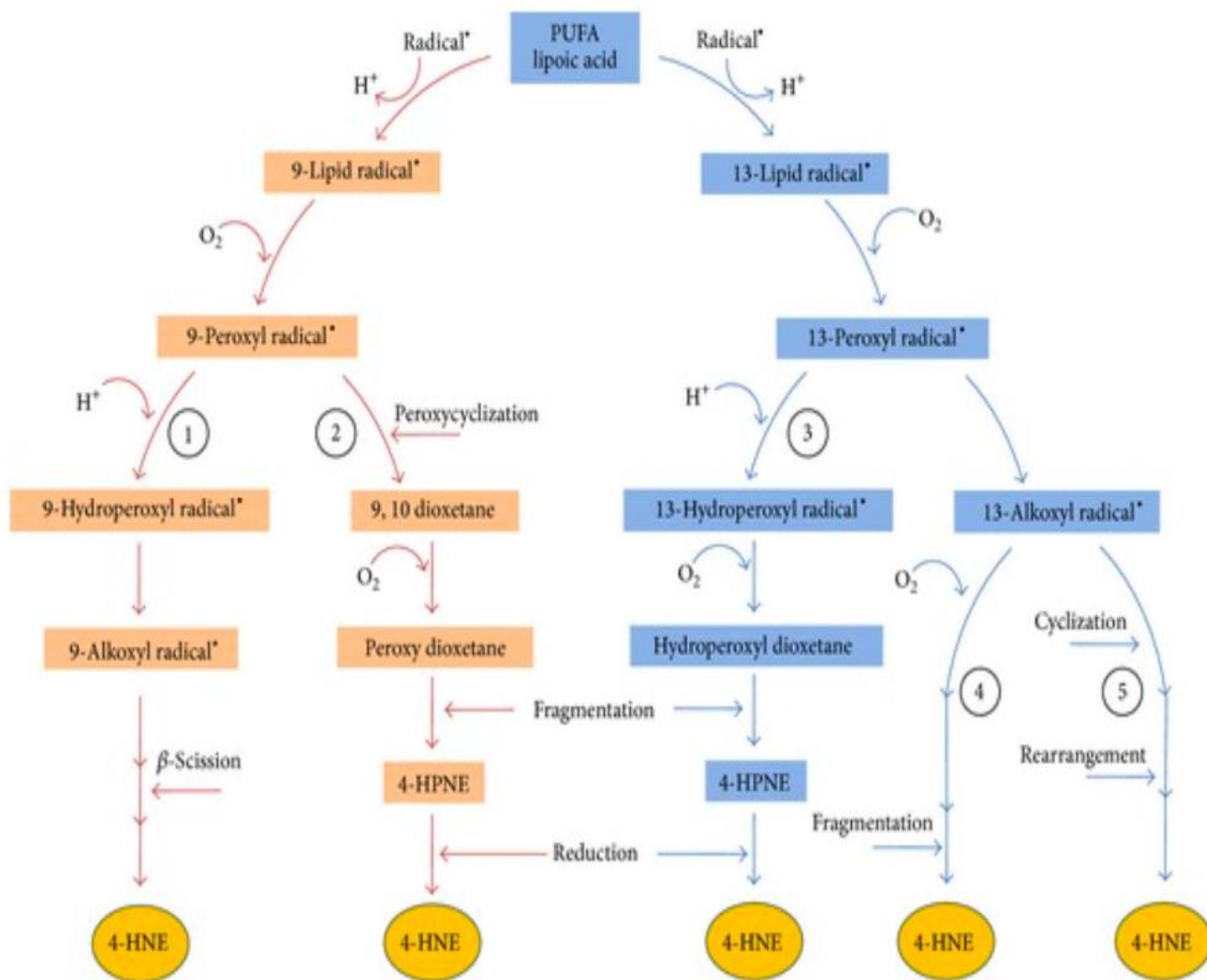


Figure 14: Production non enzymatique du HNE.

L'abstraction initiale de l'hydrogène bisallylique de l'acide lipoïque (LA) produit des radicaux gras. Formation du HNE commençant par les 9 et 13 hydroperoxyoctadécadiénoates (HPODE) (voies rouge et bleue). Le HNE est généré par la bêta-scission d'un radical hydroxyalcoxy qui est produit après la cyclisation du radical alcoxy en présence d'ions de métaux de transition et de deux molécules d'oxygène ; cette réaction implique un captage d'hydrogène (1). Le radical peroxy se cyclise pour former un dioxétane qui est oxygéné en peroxy-dioxétane fragmenté et qui, après deux captages d'hydrogène, produit du HNE (2). Le radical hydroperoxyde est oxygéné en dioxétane, qui est ensuite fragmenté pour produire le 4-hydroperoxy-2E-nonéanal (4-HPNE), un précurseur du HNE (3). Les endopéroxydes bicycliques réagissent avec un métal de transition sous forme réduite, tel que le fer (Fe^{2+}), pour former des radicaux alkoxy qui, après réaction avec l'oxygène (O_2), un captage d'hydrogène (H^+) et une fragmentation produisent le HNE (4). Un radical alcoyle après cyclisation, oxygénation, captage d'hydrogène, oxydation du métal de transition, hydrolyse et réarrangement donne le HNE (5). Avec l'acide arachidonique, les acides 11- et 15-hydroperoxyéicosatétraénoïques (HPETE) sont les précurseurs permettant de former du HNE via des mécanismes analogues (Ayala *et al.*, 2014).

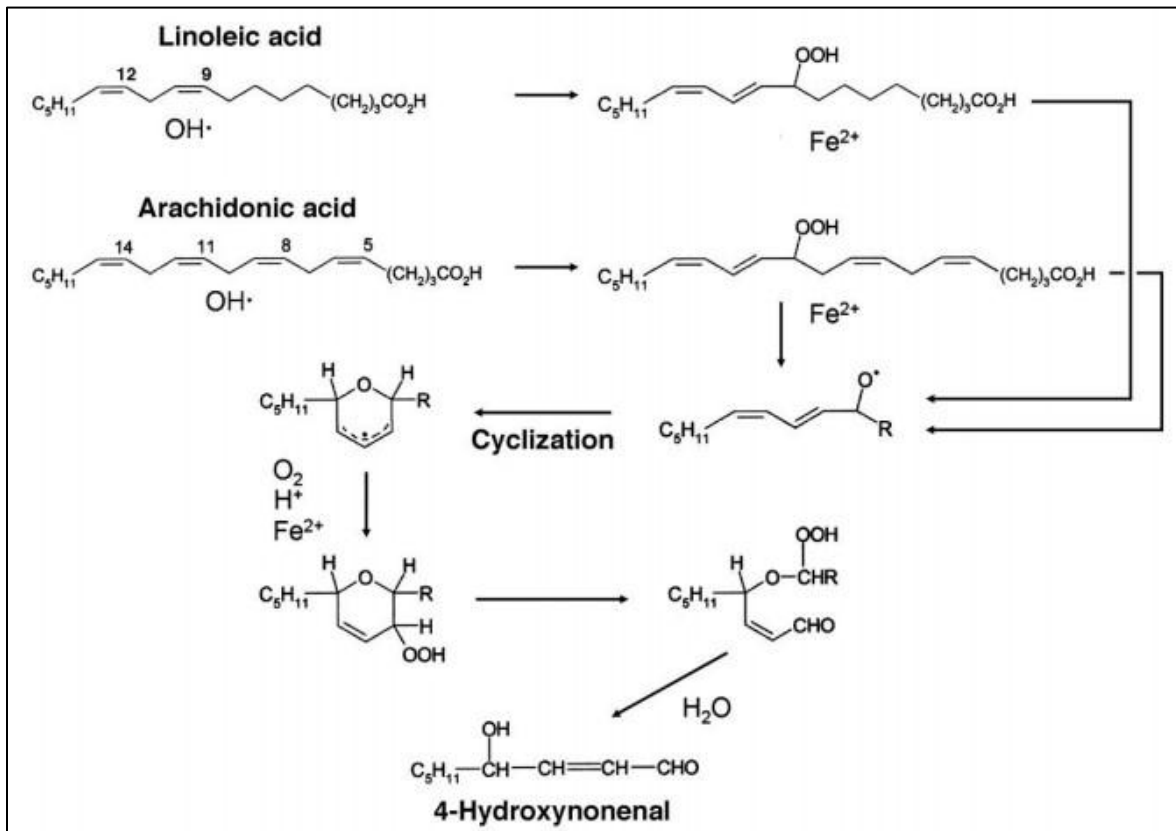


Figure 15: Mécanisme de formation du HNE par la peroxydation de l'acide arachidonique (Gentile *et al.*, 2017).

Liu et ses collègues (2006) ont observé un niveau d'équilibre d'adduits HNEdG à la fois dans la maladie d'Alzheimer et dans le tissu cérébral témoin à la suite d'une agression causée par des produits de la LPO.

Le HNE réagit facilement avec les adduits cycliques produisant de la dG dans des conditions physiologiques, soit par addition directe de Michael, comme mentionné ci-dessus, soit par l'intermédiaire de sa formation d'époxyde, le 2,3-époxy-4-hydroxynonanal (EHN). Ce dernier possède deux groupes fonctionnels chimiquement réactifs, un époxyde et un aldéhyde. Bien que l'époxydation du HNE ne se soit pas avérée *in vivo*, elle pourrait se produire avec les hydroperoxydes d'acides gras générés par la LPO ; elle pourrait également résulter de la biosynthèse des prostaglandines et/ou être médiée par des enzymes microsomales (Sodum et Chung, 1988 ; 1989 ; 1991 ; Esterbauer *et al.*, 1991).

Une très faible activité de réparation a été observée lors de la détection des adduits à l'ADN induits par le HNE. Cette observation suggère un rôle biologique majeur de ces adduits (Douki *et al.*, 2004).

Par ailleurs, le 4-oxo-2-nonéanal (ONE) est le produit majeur de la décomposition *in vitro* des 2 (S)-régioisomères de l'acide hydroperoxyde linoléique. L'ONE est plus réactif que le HNE, et réagit dans différentes manières avec divers biomolécules (Chou *et al.*, 2010 ; et pour revue : Voulgaridou *et al.*, 2011). En particulier, l'ONE forme le 2''-oxo-héptyl-substitué 1,N2-éthéno-dG, 1,N6-éthéno-dA et 3,N4-éthéno-dC (Figure 16) (Gentile *et al.*, 2017). Les adduits à l'ADN de type éthéno sont formés aussi par le 4-oxo-2(E)-hexéanal (OHE) (Chou *et al.*, 2010).

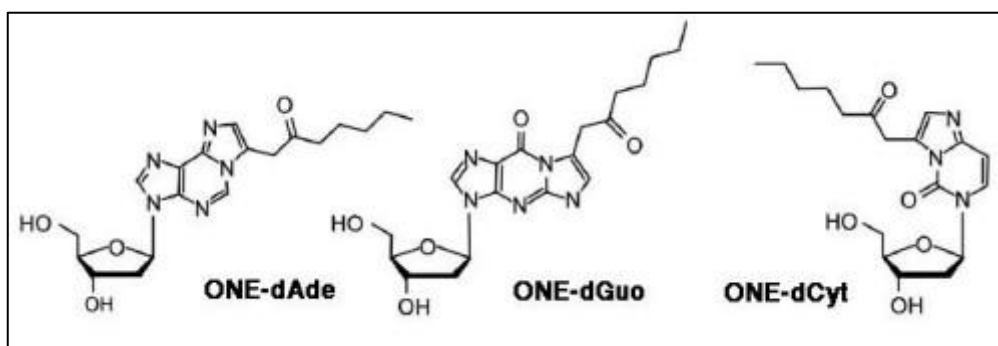


Figure 16: Structures des adduits de l'ONE : 2''-oxo-héptyl-substitué 1,N2-éthéno-dG, 1,N6-éthéno-dA et 3,N4-éthéno-dC (Gentile *et al.*, 2017)

2.3.7. Glyoxal

Le Gx est produit de manière endogène par la LPO. Il a été identifié parmi les produits d'autooxydation des acides linoléique et linoléique (Loidl-Stahlhofen et Spiteller, 1994 ; Mlakar et Spiteller, 1994) et a été détecté dans les tissus cardiaques ischémiques du porc (Dudda et Spiteller, 1996). La formation du Gx associée à la peroxydation qui se produit dans un certain nombre d'états pathologiques mérite une étude plus approfondie.

2.3.8. Méthylglyoxal

Le MG est un intermédiaire réactif du métabolisme cellulaire, omniprésent dans toutes les cellules. Il est produit dans des conditions à la fois normales lors des métabolismes des lipides (Kalapos, 1999 ; 2008) et pathologiques via plusieurs voies différentes, impliquant

à la fois des réactions enzymatiques et non enzymatiques (Silva *et al.*, 2013). Le MG est également formé *in situ* dans le plasma et peut être libéré à partir des cellules endommagées (Kalapos, 2013).

IV- Adduits des aldéhydes à l'ADN et cancérogenèse

Le modèle du processus de la cancérogenèse chimique est caractérisé par quatre phases successives : l'initiation, la promotion, la progression et l'invasion (Figure 17) (Moreau, 2006 ; Marie, 2007).

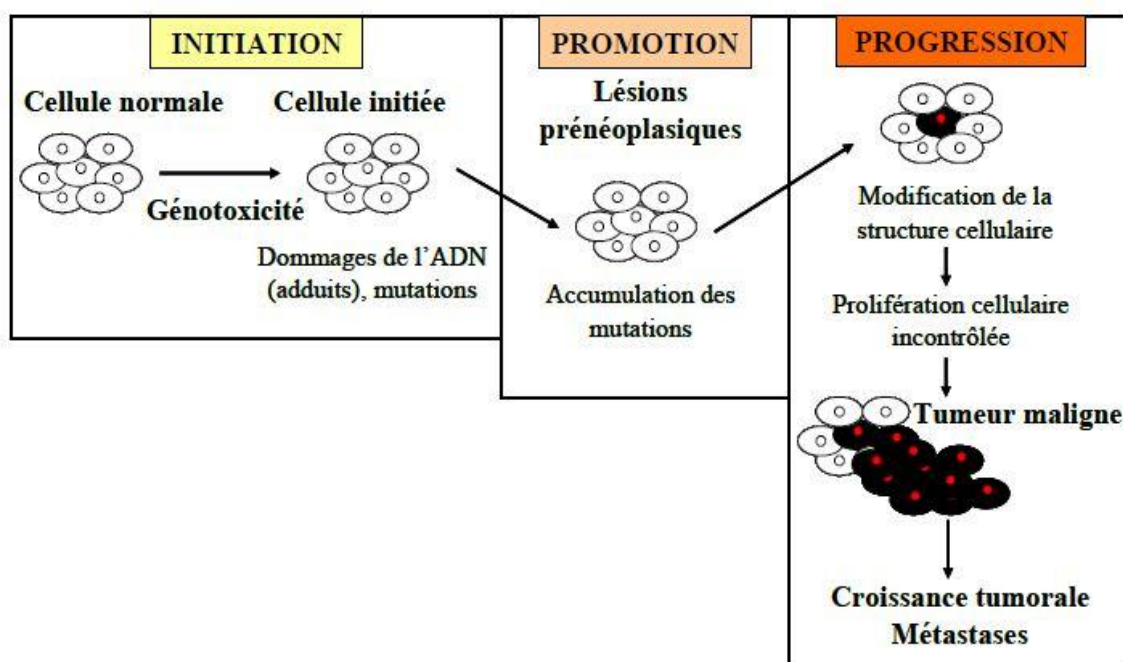


Figure 17: Processus de la cancérogenèse

- L'initiation : c'est la séquence initiale des événements de la cancérogenèse. Elle consiste à transformer une cellule normale en cellule initiée à travers le développement des défauts génétiques. C'est une étape irréversible déclenchée par l'exposition des cellules normales à un agent initiateur cancérogène. Si l'altération du matériel génétique persiste après une ou deux réplifications cellulaires, les cellules sont alors dites « initiées ».

Les phénomènes à l'origine de cette phase d'initiation sont au cœur de notre sujet de recherche.

- La promotion : c'est l'acquisition par les cellules initiées d'une autonomie de prolifération au détriment des cellules normales sous l'effet de stress (chimique ou non). Ceci conduit à la formation des lésions pré-néoplasiques (tumeurs bénignes). Cette phase, à l'inverse de l'initiation, est réversible car le retrait de la substance promotrice peut entraîner dans certains cas la régression des lésions précancéreuses. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans cette phase, la surexpression d'oncogènes, de gènes supresseurs de tumeurs (*e.g.* le gène *TP53*) et l'inhibition des capacités de communication intercellulaire des cellules initiées menant à l'échappement aux mécanismes de régulation des cellules normales etc.
- La progression : c'est le passage de la lésion pré-néoplasique à un néoplasme (tumeur maligne). Cette phase se caractérise par la croissance des cellules malignes à phénotype irréversible et par une grande instabilité génomique en lien avec l'accumulation des mutations au cours du temps.
- L'invasion : c'est le processus final de la cancérogenèse où les cellules malignes s'infiltrant dans les tissus voisins ainsi que dans d'autres tissus de l'organisme par le biais de la circulation sanguine ou lymphatique, où elles se fixent et développent des métastases.

Dans le cadre de la cancérogenèse induite par des substances chimiques, une phase d'exposition, le plus souvent chronique aux cancérogènes, est nécessaire. Les produits peuvent agir soit directement ou après activation métabolique. En effet, la plupart des substances cancérogènes nécessitent après leur entrée dans l'organisme une étape de biotransformation métabolique pour permettre l'acquisition du caractère génotoxique et une distribution vers le tissu cible. Le cancer résulte donc, d'une interaction complexe entre des facteurs exogènes de nature environnementale et des facteurs endogènes, génétiques ou acquis.

Toutefois, les aldéhydes sont des composés électrophiles hautement réactifs qui peuvent exercer directement leur rôle néfaste par le biais d'interactions avec l'ADN, via la genèse de mutations et d'aberrations chromosomiques dans des parties géniques clés impliqués dans la cancérogenèse et/ou le développement de pathologies prédisposantes.

La figure 18 montre les structures des aldéhydes communs impliqués dans la pathogénèse de multiples maladies humaines.

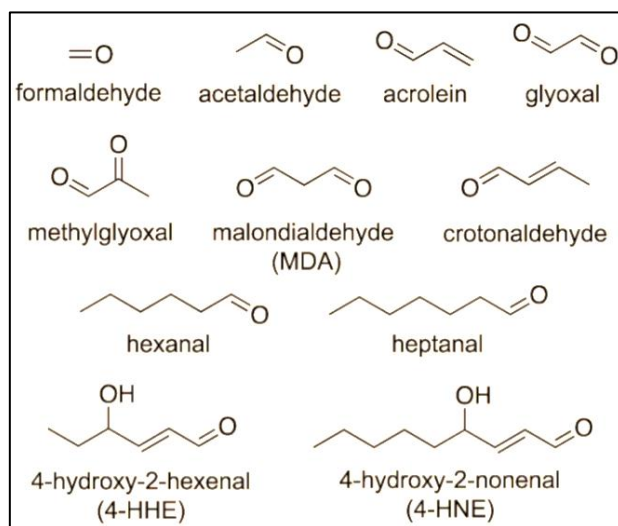


Figure 18: Structures des aldéhydes communs associés à diverses maladies humaines (Dator *et al.*, 2019).

Dans ce qui suit, nous allons développer les mécanismes d'actions cellulaires induits par les aldéhydes.

1. Stress oxydant et adduits exocycliques

Malgré l'abondance des études, la complexité des réactions entre les aldéhydes réactifs et l'ADN laisse encore de la place pour des recherches plus approfondies. Dans la figure 19 ci-dessous, sont présentés quelques adduits exocycliques formés par interaction des aldéhydes dérivés de la LPO avec l'ADN.

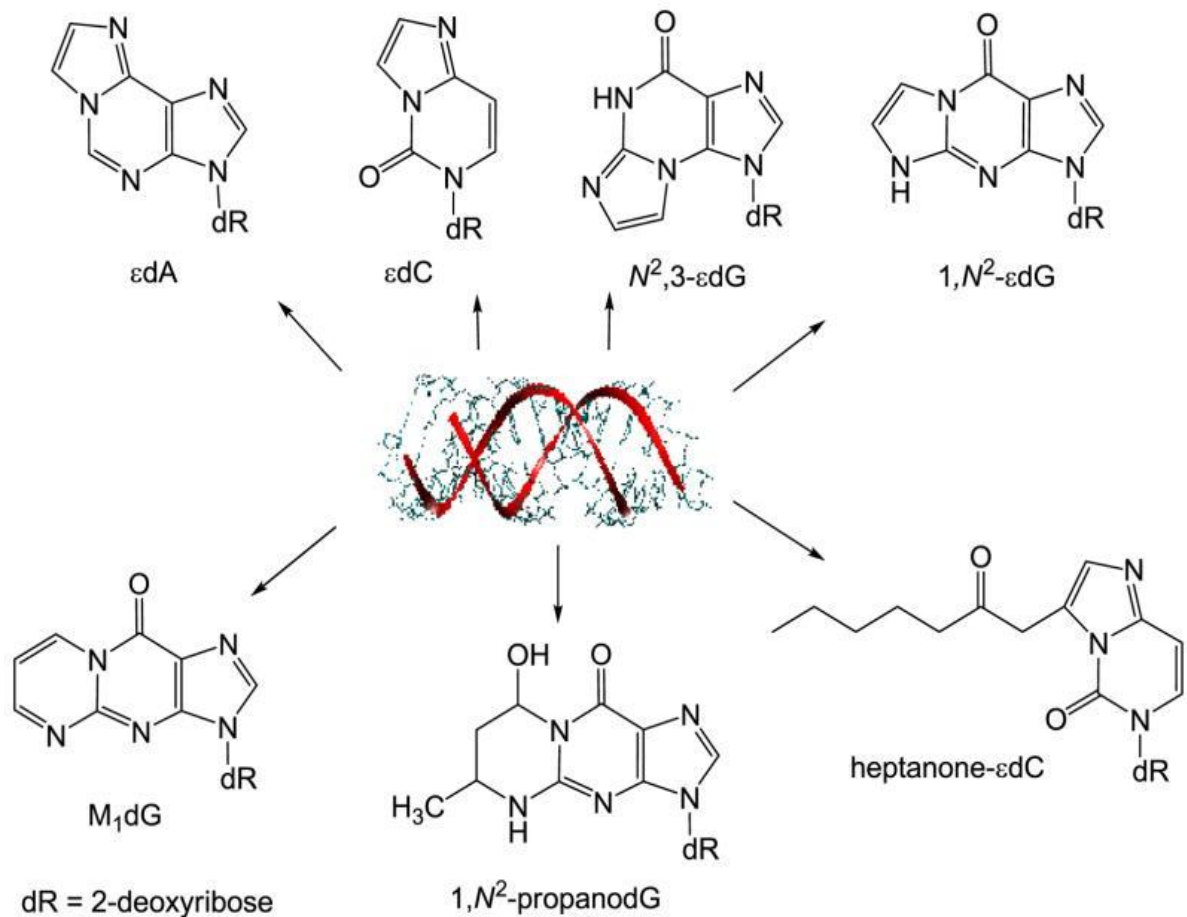


Figure 19: Principaux adduits d'aldéhydes α,β -insaturés aux bases amino-substituées de 2'-désoxyribonucléosides (Cadet *et al.*, 2017)

Le tableau 2 fournit des informations sur la détection des modifications de l'ADN induites par le stress oxydant.

Tableau 2: Niveaux de lésions induites par le stress oxydant dans l'ADN cellulaire et tissulaire

Lésions de l'ADN	Sources d'ADN	Niveaux	Références
M ₁ G/ M ₁ dG	leucocytes humains	0,029/10 ⁶ nucléosides chez les travailleurs actuels à l'amiante ; 0,045/10 ⁶ nucléosides chez les anciens travailleurs à l'amiante	Bonassi <i>et al.</i> , 2017
	humain	0,5 - 1,2/10 ⁶ nucléosides dans le foie ; 0,05 - 2,8/10 ⁶ nucléosides dans les globules blancs ;	Marnett, 1999

		0,001 - 0,5/10 ⁶ nucléosides dans le pancréas ; 0,002 - 0,56/10 ⁶ nucléosides dans le sein	
	leucocyte humain	64,9 fmol/mg d'ADN chez les fumeurs ; 56,5 fmol/mg d'ADN chez les non-fumeurs	Ma <i>et al.</i> , 2014
	foie de rat	0,52/10 ⁶ nucléosides	Chaudhary <i>et al.</i> , 1994
	muqueuse colorectale humaine	0,43/10 ⁶ nucléosides pour les hommes ; 4,6/10 ⁶ nucléosides pour les femmes	Leuratti <i>et al.</i> , 2002
εA/εdA	Tissu pulmonaire humain	0,272 - 1,79/10 ⁶ nucléosides	Monien <i>et al.</i> , 2015
	épithéliums du colon asymptomatiques humains	~0,025 - 0,065/10 ⁶ nucléosides	Bartsch <i>et al.</i> , 2002
	rats exposés à 600 ppm de chlorure de vinyle (4 h/jour pendant 5 jours)	0,21/10 ⁶ nucléosides dans le foie ; 0,65/10 ⁶ nucléosides dans les poumons ; 0,04/10 ⁶ nucléosides dans le rein	Swenberg <i>et al.</i> , 1992
	placenta humain	2,3 - 2,5/10 ⁶ nucléosides	Chen <i>et al.</i> , 1999
	Humain	0,282/10 ⁶ nucléosides dans le placenta	Chen <i>et al.</i> , 2010
	salive humaine	0,162/10 ⁶ nucléosides dans les leucocytes ; 0,22 - 2,1/10 ⁶ nucléosides	Chen et Lin, 2011
	Foie de rat (LEC)	~0,002 - 0,1/10 ⁶ nucléosides	Nair <i>et al.</i> , 2005
	rat (LEA)	0,23/10 ⁶ nucléosides dans le foie ; 0,39/10 ⁶ nucléosides dans le cerveau	Yu <i>et al.</i> , 2016a
	rat (LEC)	0,3/10 ⁶ nucléosides dans le foie ; 0,44/10 ⁶ nucléosides dans le cerveau	Yu <i>et al.</i> , 2016a
1, N ² -εG/ 1, N ² -εdG	cellules humaines IMR-90	~0,02/10 ⁶ nucléosides	Garcia <i>et al.</i> , 2011

	urine humaine	95 pg/mL pour les fumeurs ; 50 - 68 pg/mL pour les non-fumeurs	
	humain	0,085/10 ⁶ nucléosides dans le placenta	Chen <i>et al.</i> , 2010
		0,086/10 ⁶ nucléosides dans les leucocytes ;	
	salive humaine	0,68 - 7,52/10 ⁶ nucléosides	Chen et Lin, 2011
	Rat Wistar	2,47/10 ⁸ dG dans le foie ; 0,87/10 ⁸ dG dans les poumons ;	Garcia <i>et al.</i> , 2010
		2,96/10 ⁸ dG dans le cerveau	
	Rat LEA	0,11/10 ⁶ nucléosides dans le foie ; 0,15/10 ⁶ nucléosides dans le cerveau	Yu <i>et al.</i> , 2016a
	Rat LEC	0,16/10 ⁶ nucléosides dans le foie ; 0,13/10 ⁶ nucléosides dans le cerveau	Yu <i>et al.</i> , 2016a
εC/εdC	Tissu pulmonaire humain	0,169 - 1,153/10 ⁶ nucléosides	Monien <i>et al.</i> , 2015
	épithéliums du côlon asymptomatique humain	~0,015 - 0,035/10 ⁶ nucléosides	Bartsch <i>et al.</i> , 2002
	rats exposés à 600 ppm de chlorure de vinyle (4 h/jour pendant 5 jours)	0,98/10 ⁶ nucléosides dans le foie ; 0,3/10 ⁶ nucléosides dans les poumons ; 0,29/10 ⁶ nucléosides dans le rein	Swenberg <i>et al.</i> , 1992
	humain	0,441/10 ⁶ nucléosides dans le placenta 0,111/10 ⁶ nucléosides dans les leucocytes ;	Chen <i>et al.</i> , 2010
	urine humaine	104 - 105 pg/mL	Chen <i>et al.</i> , 2001
	salive humaine	0 - 1,39/10 ⁶ nucléosides	Chen et Lin, 2011
	urine humaine	0,45 nM pour les fumeurs ; 0,16 nM pour les non-fumeurs	Chen <i>et al.</i> , 2004
	Foie de rat LEC	~0,035 - 0,25/10 ⁶ nucléosides	Nair <i>et al.</i> , 2005

N2,3-εG/ N2,3-εdG	rats exposés à 600 ppm de chlorure de vinyle (4 h/jour pendant 5 jours)	1,81/10 ⁶ nucléosides dans le foie ; 0,21/10 ⁶ nucléosides dans les poumons ; 0,31/10 ⁶ nucléosides dans le rein	Swenberg <i>et al.</i> , 1992
AcrodG	leucocyte humain	0,055 - 0,143/10 ⁶ nucléosides	Yin <i>et al.</i> , 2013
		0,78/10 ⁶ nucléosides dans les leucocytes ;	Chen et Lin, 2009
		1,08/10 ⁶ nucléosides dans le placenta	
	salive humaine	0,13/10 ⁶ nucléosides	Chen et Lin, 2011
	cerveau humain	5,15/10 ⁶ nucléosides (avec la maladie d'Alzheimer) ;	Liu <i>et al.</i> , 2005
		2,8/10 ⁶ nucléosides (contrôle)	
	Tissu pulmonaire humain	0,0285/10 ⁶ nucléosides chez les fumeurs ;	Yang <i>et al.</i> , 2019
		0,025/10 ⁶ nucléosides chez les non-fumeurs	
CrotodG	cellules humaines IMR-90	~0,05/10 ⁶ nucléosides	Garcia <i>et al.</i> , 2011
	humain	0,06/10 ⁶ nucléosides dans les leucocytes ;	Chen et Lin, 2009
		0,26/10 ⁶ nucléosides dans le placenta	
	salive humaine	0 - 0,485/10 ⁶ nucléosides	Chen et Lin, 2011
	humain	14,57/10 ⁹ dG dans le foie ;	Zhang <i>et al.</i> , 2006
		19,99/10 ⁹ dG dans les poumons	
	Rat Wistar	4,61/10 ⁸ dG dans le foie ;	Garcia <i>et al.</i> , 2010
		2,25/10 ⁸ dG dans les poumons ;	
		5,66/10 ⁸ dG dans le cerveau	
	Salive humaine	2,6/10 ⁶ nucléosides chez les fumeurs	Yang <i>et al.</i> , 2019
	cellules MRC5 humaines non traitées	0,024 - 0,035/10 ⁶ nucléosides	Zhang <i>et al.</i> , 2016
FAdG réduit	Salive humaine	9,96/10 ⁶ nucléosides chez les fumeurs	Li <i>et al.</i> , 2017

2. Réactions de quelques aldéhydes dérivés de la LPO avec l'ADN et conséquences fonctionnelles

2.1. MDA

Le MDA est mutagène à la fois dans les bactéries et dans les cellules humaines, provoquant des insertions, des délétions et des substitutions de paires de bases, en particulier au niveau des paires de bases GC (Basu et Marnett, 1983 ; Marnett, 1999). Les deux carbonyles du MDA réagissent avec l'azote, formant l'adduit pyrimido [1,2- α]purine-10(3H)-one-dR, ou le MDAdG non réduit (M₁dG), qui est l'adduit le plus abondant en MDA (Marnett, 2002), tandis que les adduits à la dA et à la dC découlent de l'addition d'un groupe carbonyle avec des groupes amino exocycliques pour former le N6-(3-oxoprényl)dA (M₁dA) et le N4-(3-oxoprényl)dC (M₁dC), respectivement (Figure 20a) (Gentile *et al.*, 2017).

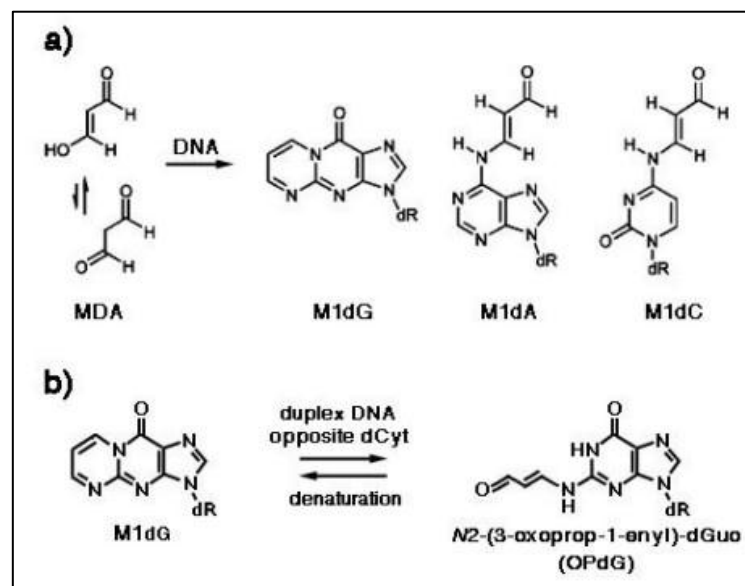


Figure 20: (a) Adduits du MDA avec la dG, la dA et la dC (b) réorganisation du M1dG lorsqu'il est placé en face de la dC dans l'ADN.

dR, désoxyribose ; M1dG, pyrimido [1,2- α] purine-10(3H)-one-dR ; M1dA, N6-(3-oxoprenyl)dA ; M1dC, N4-(3-oxoprenyl)dC. OPdG, N2-(3-oxoprop-1-ényl)dG (Gentile *et al.*, 2017).

Les adduits M₁dG ont été détectés dans les tissus d'individus en bonne santé (Marnett, 2002 ; Vaca *et al.*, 1995b ; Saieva *et al.*, 2016). Ils sont mutagènes chez les bactéries et sensibles à la réparation par excision de nucléotides. De l'ADN bactérien modifié par le MDA et répliqué dans *E. coli* comprenait des mutations M₁dG \rightarrow A et M₁dG \rightarrow T avec de faibles taux pour les mutations M₁dG \rightarrow C. Par ailleurs, il a été observé *in vitro* que la

fréquence de mutations induites par M₁dG n'était que de 1% lorsque la dC était placée en face de la lésion (Fink *et al.*, 1997 ; VanderVeen *et al.*, 2003). Il a été observé que le M₁dG placé en face de la dC subissait un réarrangement de configuration avec ouverture du cycle exocyclique en N²-(3-oxoprop-1-ényl)dG (OPdG) (Figure 20b), via une réaction de second ordre avec l'hydroxyde catalysé par le complémentaire dC (Gentile *et al.*, 2017). La chaîne propylène de l'OPdG est située dans le sillon mineur de la double hélice d'ADN, facilitant ainsi les liaisons hydrogènes de type « Watson-Crick » avec la dC (Mao *et al.*, 1999), ce qui peut expliquer pourquoi le M₁dG est faiblement mutagène (Basu et Marnett, 1983 ; Stone *et al.*, 2011).

2.2. Acroléine

L'Acro présente des propriétés mutagènes chez les bactéries et les cellules de mammifères (Marnett *et al.*, 1987), ainsi que des propriétés cancérigènes chez le rat (Cohen *et al.*, 1992). Il s'agit d'un des principaux cancers du poumon liés à la fumée de cigarette, dans la mesure où le profil de formation des adduits à l'ADN est étroitement parallèle au profil de mutation du gène *TP53* dans les cellules cancéreuses du poumon humain (Feng *et al.*, 2006). Des adduits dérivés de l'Acro ont été détectés dans l'ADN humain et de rongeur (Nath *et al.*, 1996). L'addition de Michael de l'Acro au groupe N²-amino de la dG, suivie de la fermeture du cycle, entraîne la formation du γ -hydroxy-1,N²-PdG (γ -OH-PdG) et du α -hydroxy-1,N²-PdG (α -OH-PdG) (Figure 21). Comme le M₁dG, le γ -OH-PdG subit également une ouverture de cycle lorsqu'il est placé en face de la dC, formant ainsi la N²-(3-oxopropyl)dG (PdG) (Figure 21), ce qui facilite l'appariement canonique, dit « Watson-Crick », avec la dC (De Los Santos *et al.*, 2001 ; Liu *et al.*, 2010). Ceci pourrait expliquer les faibles propriétés mutagènes du γ -OH-PdG (Stone *et al.*, 2011).

2.3. Crotonaldéhyde

L'addition du Croto à la dG produit quatre diastéréoisomères du α -CH₃- γ -OH-PdG, du fait de la présence de C chiraux, parmi lesquels ceux présentant la configuration trans du γ -OH et α -CH₃ prédominent, avec les épimères majeurs et mineurs en C8 s'interconvertissant dans l'ADN simple brin (Figure 21). Lorsque le γ -OH-PdG dérivé du Croto est placé à l'opposé de la thymidine dans l'ADN double brin, l'espèce à cycle ouvert est indétectable, comme dans l'ADN simple brin. Cependant, lorsqu'ils sont placés en face de la dC, les adduits (R/S)- α -CH₃- γ -OH-PdG subissent une ouverture du cycle incomplète pour les N²-

dG-aldéhydes et les N²-dG-aldéols (Figure 22) (Stone *et al.*, 2011).

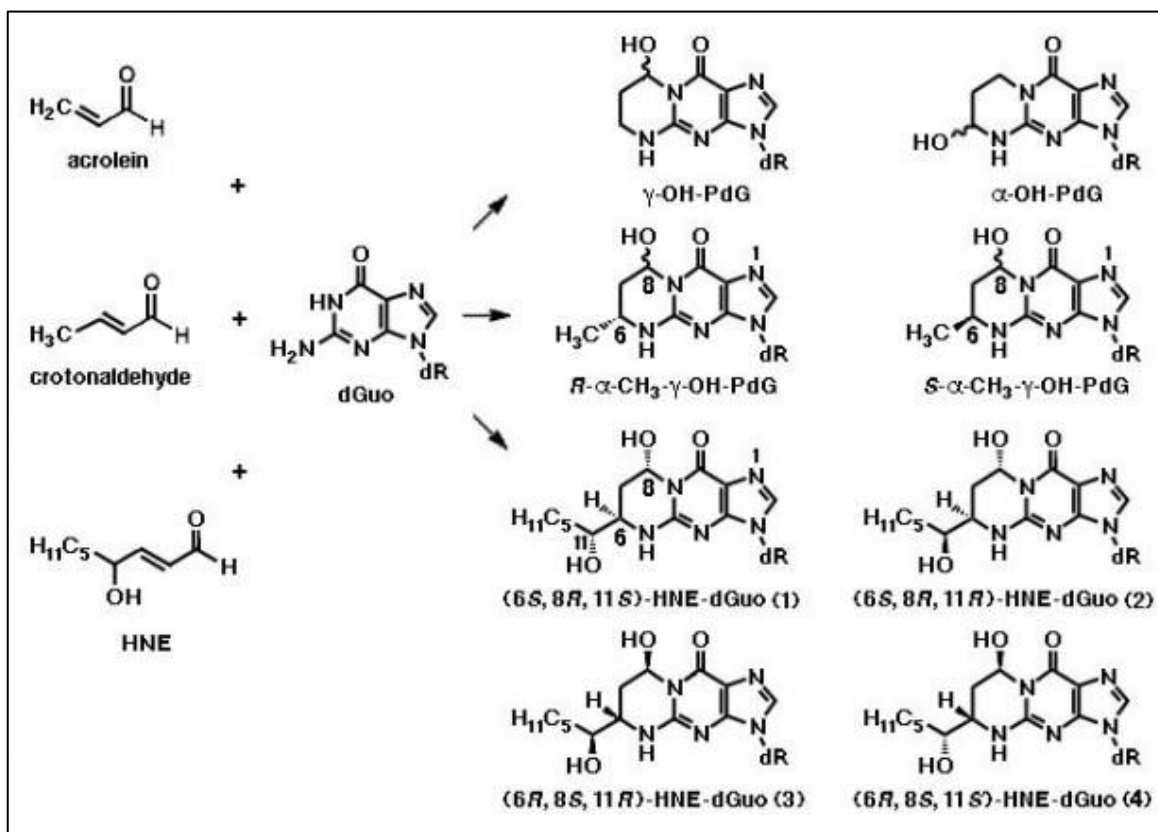


Figure 21: Adduits exocycliques 1,N²-PdG générés par réaction de l'Acro, du Croto et du HNE avec la dG dans l'ADN.

γ -OH-PdG, adduit γ -hydroxy-1,N²-PdG dérivé de l'Acro ; α -OH-PdG, adduit α -hydroxy-1,N²-PdG de l'Acro ; α -CH₃- γ -OH-PdG, adduit α -méthyl- γ -hydroxy-1,N²-PdG du Croto. Quatre diastéréoisomères de ce dernier sont formés, parmi lesquels ceux avec la configuration trans du γ -OH et du α -CH₃ sont prédominants, les épimères majeurs et mineurs en C8 s'interconvertissant dans l'ADN simple brin. En outre, il existe quatre diastéréoisomères (1 - 4) de l'adduit 1,N²-PdG du HNE (HNE-dGua), en raison de la configuration trans entre la chaîne latérale alkyle en C6 et le groupe hydroxyle en C8 et la présence du C11 chiral dans la chaîne alkyle (Gentile *et al.*, 2017).

2.4. 4-Hydroxy-2-nonéanal

Les effets génotoxiques du HNE, tels que la fragmentation de l'ADN et l'échange de chromatide sœur (SCE), ont d'abord été détectés dans une lignée cellulaire épithéliale (Brambilla *et al.*, 1986), alors que des mutations du gène HGPRT étaient induites par le HNE d'une manière dose-dépendante (Cajelli *et al.*, 1987). Les hépatocytes primaires se sont révélés les plus sensibles aux effets génotoxiques des aldéhydes dérivés de la LPO, le HNE présentant un potentiel inducteur du SCE supérieur à celui de ses deux analogues dépourvus du groupe OH (2-trans-nonéanal) ou de la double liaison OH et CC (nonanal) et

des aldéhydes avec des queues lipophiles de différentes longueurs, telles que le 4-hydroxyhexénal et le 4-hydroxyundécénal (Eckl *et al.*, 1993). Des concentrations significatives du SCE sont apparues à des concentrations de HNE inférieures à 0,1 μM , concentrations pouvant être atteintes dans des conditions physiologiques (Eckl et Esterbauer, 1989). Des effets génotoxiques du HNE, tels que des micronoyaux et des aberrations chromosomiques, ont également été observés dans les cellules endothéliales du cerveau à des concentrations $\geq 1 \mu\text{M}$ (Karlhuber *et al.*, 1997).

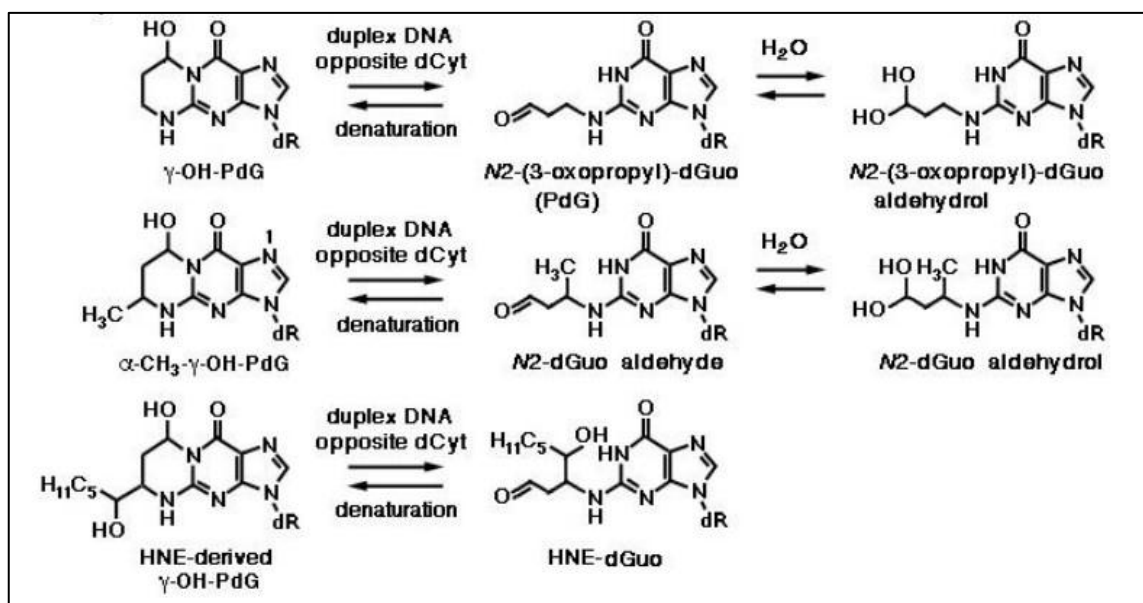


Figure 22: Réorganisation des adduits N^2 -PdG de l'Acro, du Croto et du HNE avec la dG lorsqu'elle est placée à l'opposé de la dC dans l'ADN double brin. PdG, N^2 -(3-oxopropyl)dG (Gentile *et al.*, 2017).

Divers modèles d'interaction du HNE avec l'ADN ont été décrits. L'addition de Michael du groupe N^2 -amino de la dG au HNE, suivie par la cyclisation du N^1 sur l'aldéhyde, a pour résultat quatre adduits, des diastéréomères cycliques (Figure 21). Celles-ci ont été détectées sous forme de lésions endogènes dans les tissus de rats non traités au CCl_4 et d'individus non exposés, en particulier dans le foie. Leurs niveaux fortement augmentés dans l'ADN du foie des rats F344 traités au CCl_4 ont proposé la LPO comme source probable (Chung *et al.*, 2000 ; Wacker *et al.*, 2001). Dans les monocytes humains en culture incubés avec du HNE, l'adduit $1, \text{N}^2$ -PdG du HNE (HNE-dG) a largement prédominé, par rapport à M_1 dG et aux adduits $1, \text{N}^6$ -éthéno-dA et $1, \text{N}^2$ -éthéno-dG, avec leurs dérivés substitués en 1,2-dihydroxyhéptyle discutés ci-dessous, qui ont tous été

déTECTÉS avec des rendements beaucoup plus faibles (Douki *et al.*, 2004). Il a été suggéré qu'ils pourraient jouer un rôle pathogénique dans la carcinogénèse hépatique, car les HNE formaient préférentiellement des adduits avec l'ADN au codon 249 du gène suppresseur de tumeur *TP53* humain, qui est un hot spot connu dans les carcinomes hépatocellulaires (Hu *et al.*, 2002). Des études de mutagénèse ont révélé que les adduits (6S,8R,11S) et (6R,8S,11R)HNEdG sont mutagènes : ils sont capables d'induire de faibles taux de transversions G → T et de transitions G → T. De plus, lorsque les adduits HNEdG sont placés à l'opposé de la dC dans l'ADN, le cycle exocyclique s'ouvre (Figure 22), permettant ainsi l'appariement des bases « Watson-Crick » pour l'adduit à la dG (Huang *et al.*, 2008 ; Stone *et al.*, 2011). Cependant, en cas du non appariement à la dA dans l'ADN, le (6S,8R,11S)HNEdG conserve son anneau exocyclique, une situation imitant l'incorporation incorrecte de la désoxyadénosine triphosphate dATP (transversion G → T) (Huang *et al.*, 2009).

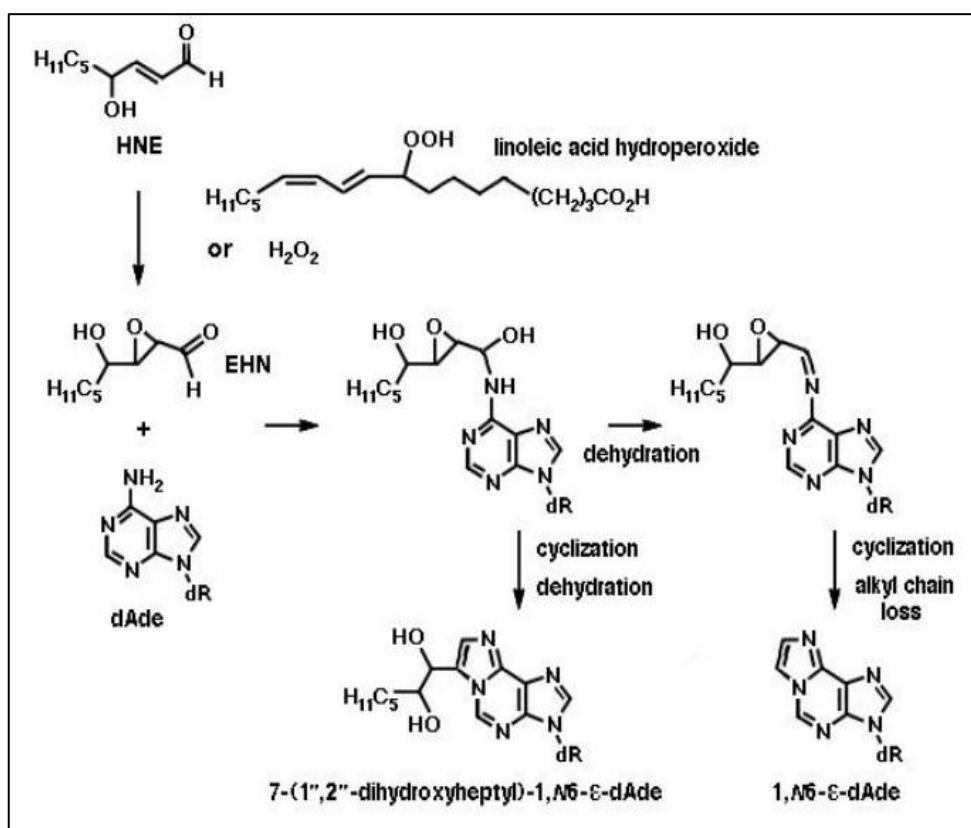


Figure 23: Éthéno-adduits exocycliques formés par la réaction de l'EHN avec la dA dans l'ADN. Lors de l'ajout de l'EHN au groupe N6 amino exocyclique du dA, il se forme un intermédiaire qui peut soit subir une cyclisation par fermeture du cycle en position N1 et déshydratation, ce qui donne le 7-(1'',2''-dihydroxyhéptyl)-1,N6-éthéno-dA, ou déshydratation en une imine, suivie d'une cyclisation et d'une perte de la chaîne latérale alkyle par une réaction de rétroaldol, donnant lieu au 1,N6-éthéno-dA (Gentile *et al.*, 2017).

Encore plus d'adduits de type éthéno sont formés par la réaction du mutagène EHN avec des nucléobases. L'EHN est généré par l'incubation du HNE avec des hydroperoxydes d'acides gras (par exemple, un 9- ou 13-hydroperoxyde de l'acide linoléique) ou du peroxyde d'hydrogène à 37°C pendant 24 h, avec des rendements de 13% et 21,5% respectivement. Dans le foie, l'EHN peut être formé également par l'action des cytochromes P450 (Chen et Chung, 1996). Il est plus réactif vis-à-vis de l'ADN que l'aldéhyde parent le HNE, formant le 1,N6-éthéno-dA et le 1,N2-éthéno-dG (Sodum et Chung, 1988 ; 1989 ; 1991 ; Esterbauer *et al.*, 1991). Les figures 23 et 24 illustrent la formation des éthéno-adduits (exocycliques) à partir de la réaction de l'EHN avec la dA, la dG et la dC dans l'ADN.

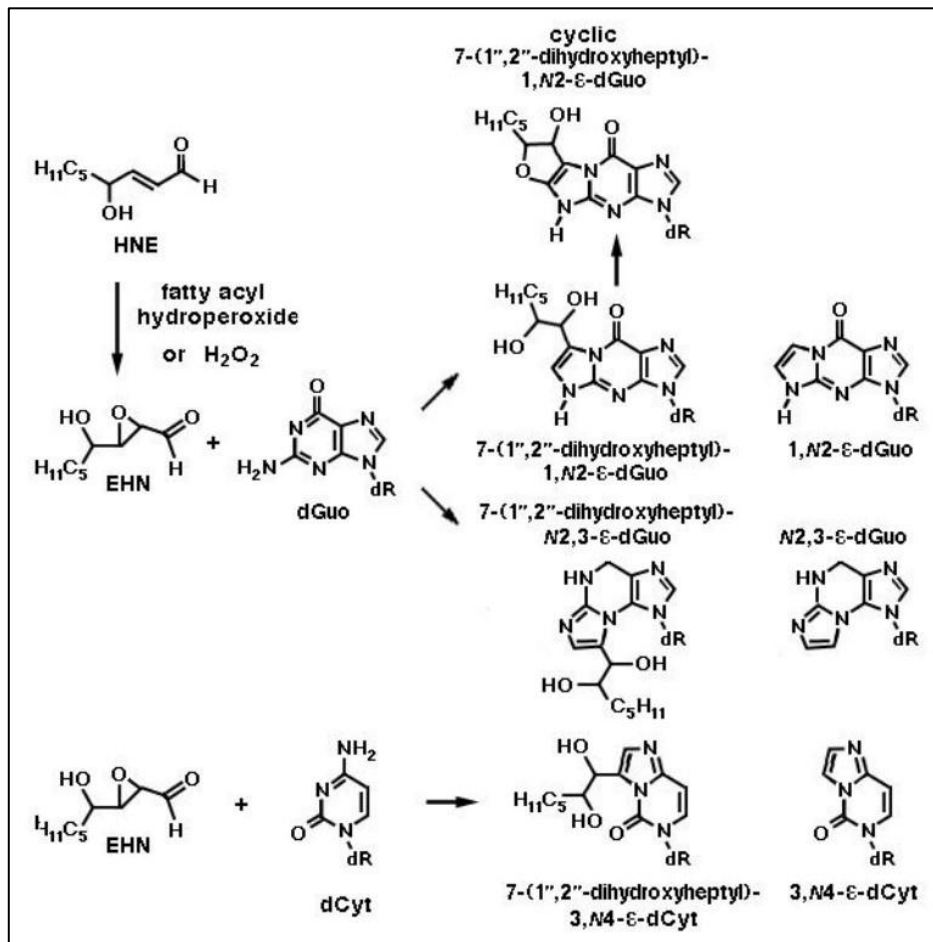


Figure 24: Éthéno-adduits exocycliques formés par la réaction de l'EHN avec la dG et la dC. Les trois réactions présentées ici se déroulent via des intermédiaires éthano (non représentés), à partir desquels des éthéno-adduits substitués au groupe alkyle sont formés par cyclisation et déshydratation, tandis que des éthéno-adduits non substitués sont formés par déshydratation, cyclisation et perte de chaîne alkyle catalysées par des bases. Notez qu'il existe un dérivé bicyclique le (7-(1'',2''-dihydrohéptyl)-1,N2-ε-dG) qui est uniquement dérivé de la réaction de

l'EHN avec la dG, par piégeage de l'imine cyclique par le groupe hydroxyle de la chaîne latérale (Gentile *et al.*, 2017).

Les éthéno-adduits exocycliques formés lors de la réaction de l'EHN avec l'ADN comprennent le 7-(1",2"-dihydroxyhéptyl)-1,N6-éthéno-dA, le 1,N6-éthéno-dA, le 1,N2-éthéno-dG, le N2,3-éthéno-dG et le 3,N4-éthéno-dC (Chung *et al.*, 1996 ; 1999).

Les 2 types d'adduits du HNE, propano et éthéno, ont été détectés en tant que lésions endogènes du foie et d'autres tissus chez l'Homme et chez des rongeurs (Chung *et al.*, 1996).

Selon le type cellulaire, les capacités d'endommagement/de réparation et les circonstances métaboliques cellulaires, le HNE peut favoriser la survie cellulaire ou induire la mort cellulaire comme le montre la figure 25. Le HNE à des niveaux physiologiques est métabolisé par voie enzymatique et à des niveaux bas joue un rôle important en tant que molécule de signalisation stimulant l'expression des gènes, augmente la capacité antioxydante et exerce une réponse adaptative ; à des niveaux moyens, les dommages aux organites et aux protéines entraînent l'induction de l'autophagie, de la sénescence ou d'un arrêt du cycle cellulaire et, à des niveaux élevés ou très élevés, favorisent la formation d'adduits et la mort cellulaire par apoptose ou nécrose, respectivement (Ayala *et al.*, 2014).

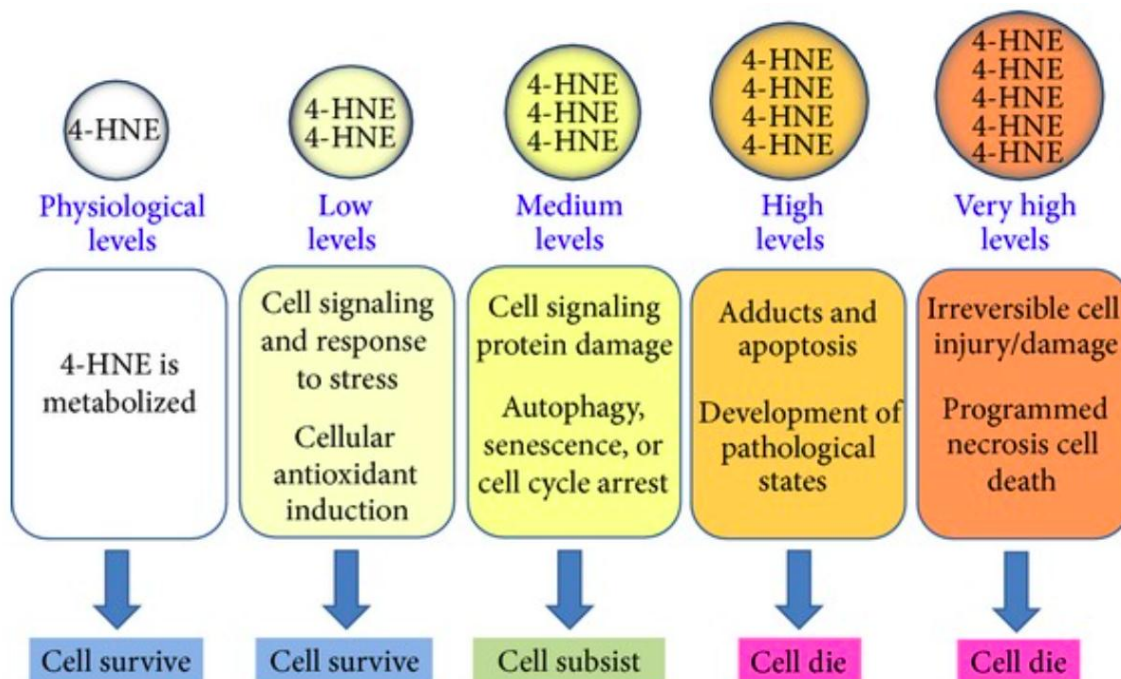


Figure 25: HNE favorisant la survie cellulaire ou induisant la mort cellulaire (Ayala *et al.*, 2014)

2.5. Glyoxal

Des taux élevés de Gx intracellulaire peuvent inhiber l'aldéhyde réductase, la glutathion réductase et les enzymes productrices du NADPH. En outre, des concentrations élevées de Gx produisent des ERO et de FA, augmentent la sensibilité des cellules au peroxyde d'hydrogène et perturbent le potentiel de la membrane mitochondriale, mettant en évidence ses effets toxiques (Shangari *et al.*, 2003 ; Shangari et O'Brien, 2004).

Ainsi nous avons pu constater, outre les apports environnementaux et alimentaires, le stress oxydant, via la peroxydation lipidique est un pourvoyeur d'aldéhydes qui peuvent former à leur tour des adduits exocycliques à l'ADN potentiellement endommageables pour la cellule mais aussi initiateur d'un processus cancérogène s'ils ne sont pas correctement éliminés.

3. Effets des aldéhydes dans l'induction de la transformation maligne des cellules normales.

Les aldéhydes interagissent avec des macromolécules grâce à leurs stabilité et réactivité élevées (pour revue : Voulgaridou *et al.*, 2011), et par conséquent diffusent dans le milieu cellulaire afin de réagir avec les protéines et le GSH cytosolique mais aussi atteindre l'ADN nucléaire (Xie *et al.*, 2016). Ils réagissent avec les nucléosides pour générer des modifications de l'ADN susceptibles de gêner les processus complexes de réplication et de transcription menant à l'apparition d'une tumeur au niveau des poumons (Sapkota et Wyatt, 2015) et de l'estomac (Matsuda *et al.*, 2013). Le « pouvoir cancérogène », ou la capacité d'induire l'apparition d'une tumeur dans l'organe cible apparaît variable selon la structure de l'aldéhyde considéré.

Aujourd'hui, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) classe le FA en tant que cancérogène (groupe 1), l'AA cancérogène possible pour l'homme (groupe 2B) mais également en tant que cancérogène lorsqu'il est associé à des boissons alcoolisées, l'Acro, le Croto, le MDA et le MG sont non classés quant à leur cancérogénicité pour l'homme (groupe 3) (IARC, 2019). En plus, ces composés sont classés par l'Agence Européenne des Produits Chimiques (ECHA, 2019) en tant que cancérogènes (FA et AA) et mutagènes possibles (FA, AA, Croto et Gx).

Par ailleurs, les différents taux de production par le biais du métabolisme rendent les concentrations d'aldéhydes dérivés de la LPO, ou d'origine exogène et de leurs adduits, dépendamment de leurs mécanismes de réparation, très variables dans les cellules tumorales. Des résultats expérimentaux ont indiqué que les concentrations de MDA et de HNE étaient augmentées dans les tissus du cancer colorectal (Skrzydłowska *et al.*, 2005 ; et pour revue : Dalleau *et al.*, 2013 ; Guéraud, 2017). Dans les tumeurs thyroïdiennes présentant un niveau élevé de stress oxydant, les contenus en HNE et en 8-OHdG étaient significativement plus élevés que dans les tissus normaux (Young *et al.*, 2010). Peluso et ses collègues (2011) ont observé des taux significativement plus élevés de M₁dG chez 22 patientes atteintes d'un cancer du sein, comparativement aux 13 témoins sains, et ont suggéré qu'une augmentation de la formation du M₁dG par rapport aux valeurs de base normales pourrait contribuer au développement du cancer.

De plus, il a été suggéré que les adduits promutagéniques d'éthéno-ADN générés au cours de l'inflammation chronique pourraient jouer un rôle moteur dans la transformation maligne. Des taux accrus de 1,N6- ϵ -dA et de 3,N4- ϵ -dC ont été détectés dans les tissus pancréatiques enflammés des patients atteints de pancréatite chronique, et des taux élevés d' ϵ -dC ont également été détectés dans la muqueuse colique de patients atteints de la maladie de Crohn (Nair *et al.*, 2006). De plus, des taux très élevés d' ϵ -dA ont été excrétés dans l'urine de patients atteints de carcinome hépatocellulaire (Nair *et al.*, 2002 ; 2010). Sur cette base, il a été suggéré que des dommages *in vivo* à l'ADN médiés par la LPO pourraient contribuer au développement du carcinome hépatocellulaire. De plus, il a été proposé que les niveaux d' ϵ -dA dans l'urine et les tissus cibles soient davantage explorés en tant que marqueur de la progression maligne des maladies inflammatoires du foie.

Il a été démontré que les quatre bases de l'ADN sont des cibles pour le HNE. La transversion G \rightarrow T au codon 249 du gène *TP53* et l'adduit HNEdG au même codon ont été rapportés dans le cancer du poumon lié à la fumée de cigarette (Hussain *et al.*, 2000 ; Hu *et al.*, 2002). De plus, l'Acro a également été rapportée comme cancérigène majeur pour les poumons et dont le potentiel carcinogène dépend non seulement de l'induction de dommages à l'ADN, mais également de l'inhibition de la réparation de l'ADN (Feng *et al.*, 2006). L'effet cancérigène du MDA est corroboré par la détection du M₁dG, le principal adduit du MDA avec l'ADN, dans des tissus humains atteints d'un cancer (Marnett, 1999 ; Leuratti *et al.*, 2002 ; Peluso *et al.*, 2011).

4. Mécanisme de réparation des lésions de l'ADN

Lorsque l'ADN est endommagé, l'organisme est capable de réparer ces lésions par la mise en place de mécanismes de réparation selon le type de dommages structurel de l'ADN (Fu *et al.*, 2012).

Toutefois, il est important d'évoquer l'efficacité des défenses enzymatiques qui peuvent être impactés par l'influence des polymorphismes des enzymes de réparation et de l'alimentation riche ou pauvre en éléments antioxydants ; ils jouent un rôle crucial. Par la suite, je ne développerai ici que les principaux mécanismes de réparation des adduits à l'ADN en lien avec la LPO.

- La réparation par excision de bases (BER) : un processus multi-enzymatique basé sur la reconnaissance et l'élimination de la lésion par des DNA-glycosylases relativement spécifiques. Cette réparation est associée aux dommages n'entraînant pas de modifications importantes dans la conformation de la double hélice d'ADN. Elle concerne ainsi les lésions de faible taille, les bases oxydées, alkylées, fragmentées et les sites abasiques. Ce système prend en charge les adduits de faible encombrement stérique qui possèdent un potentiel élevé par le déclenchement d'erreurs au cours de la division cellulaire.
- La réparation par excision de nucléotides (NER) : Contrairement à la BER, la NER concerne plus particulièrement les lésions encombrantes ou provoquant une forte distorsion de la double hélice d'ADN ; c'est le cas des lésions alkylées par des molécules exogènes de grande taille. La NER est considérée comme le système de réparation le plus ubiquitaire et le moins spécifique car il est capable d'éliminer différentes lésions sans apparentes similitudes structurales en impliquant entre 20 et 30 protéines différentes.

L'identification des mécanismes biologiques impliqués dans la réparation des adduits notamment, les adduits 1,N²-dG dérivés de l'énal a été abordée dans plusieurs études, portant principalement sur les voies de la NER et de la BER. Bien que certaines lésions puissent être réparées par l'un ou l'autre mécanisme, la NER est principalement responsable

de l'élimination des adduits d'ADN. La BER, d'autre part, élimine une variété de bases endommagées, telles que les produits de désamination, d'oxydation et d'alkylation (Minko *et al.*, 2009 ; Tudek *et al.*, 2017 ; Bukowska et Karwowski, 2018). Le tableau 3 fournit des informations sur les mécanismes de réparation des modifications de l'ADN induites par la LPO.

Tableau 3: Mécanismes de réparation des lésions de l'ADN induites par le stress oxydant (adapté de Yu *et al.*, 2016b)

Lésions/modifications de l'ADN	Mécanismes de réparation
ϵ dA	BER
ϵ dC	BER
1,N2- ϵ G/1,N2- ϵ dG	BER
N2,3- ϵ G/N2,3- ϵ dG	BER
M ₁ dG	NER
AcrodG	NER
CrotodG	NER

Toutefois, il a été observé que la 5',8-cyclo-2'-désoxyadénosine (cdA) et la 5',8-cyclo-2'-désoxyguanosine (cdG) bloquaient fortement la réplication de l'ADN dans les cellules humaines, induisant principalement une mutation A → T (pour cdA) et G → A et G → T (pour cdG) (Yagi *et al.*, 2017). Néanmoins, il reste encore beaucoup à faire pour évaluer comment des lésions de l'ADN induites par le stress oxydant altèrent l'efficacité de la réplication et de la transcription de l'ADN dans les cellules humaines.

5. Intérêt des adduits à l'ADN comme biomarqueurs d'exposition

Les lésions de l'ADN induites par le stress oxydant peuvent avoir un impact significatif sur la santé humaine, y compris sur les processus de la cancérogenèse. Des études précédentes ont porté sur l'application des adduits à l'ADN induites par la LPO comme biomarqueurs

potentiels pour l'évaluation du risque de cancer en lien avec le stress oxydant chez les humains (Bartsch et Nair, 2014).

Au cours des dernières décennies, un certain nombre d'études ont fourni des informations importantes au niveau moléculaire sur le degré de perturbation de la transmission de l'information génétique par certaines lésions de l'ADN induites par la LPO, en inhibant la réplication et la transcription de l'ADN et en induisant des mutations au cours de ces processus (Yu *et al.*, 2016b). Les données disponibles suggèrent que des adduits à l'ADN mutagènes, en particulier les adduits exocycliques du type propano pourraient être des biomarqueurs potentiels pour étudier le rôle du stress oxydant dans les maladies humaines.

Etant électrophiles, les aldéhydes ont *in vivo* généralement de courtes demi-vies en raison de leur réactivité inhérente et de leur detoxification. Elles ne pourraient donc pas être mesurées convenablement sous forme de composés libres *in vivo*. Cependant, les adduits à l'ADN sont plus stables et peuvent être mesurés pour quantifier l'exposition, notamment la dose efficace (Carlsson et Tornqvist, 2017). En outre, les différents taux de production et de métabolisme rendent les concentrations d'aldéhydes dérivés de la LPO et de leurs adduits très variables dans les cellules tumorales (Gentile *et al.*, 2017). Par exemple, des taux élevés du M₁dG peuvent être liés au développement du cancer. D'autre part, des taux de M₁dG ont été mesurés dans différents tissus humains sains, et certains paramètres tels que la fumée, l'exposition professionnelle et la pollution atmosphérique semblent jouer un rôle modulateur (Saieva *et al.*, 2016). Par ailleurs, une augmentation significative des niveaux d'AcroG a été observée chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Kottemann et Smogorzewska, 2013).

L'apport des nouvelles technologies « omiques » ouvre une nouvelle voie pour étudier l'expression de plusieurs biomarqueurs (Villata et Balbo, 2017). Récemment, le développement de la LC-MS, associée à la méthode de dilution isotopique pour l'identification et la quantification précise de multiples adduits de l'ADN (Monien *et al.*, 2015 ; Li *et al.*, 2017), a permis de mieux comprendre l'implication des lésions de l'ADN dans différentes conditions pathologiques.

Des travaux futurs devront être menés pour mieux élucider l'implication des différents types d'adduits à l'ADN induits par la LPO et de leurs niveaux dans les différents stades du cancer, ce qui apportera des connaissances importantes pour de futures applications des mesures d'adduits à l'ADN en tant que biomarqueurs d'exposition et/ou d'effet précoce.

V- Méthodes de dosage des adduits à l'ADN

Grâce aux avancés de la spectrométrie de masse (MS), à la séparation chromatographique à haute performance et à l'amélioration des outils de bioinformatique, les données acquises permettent d'accroître la sensibilité, l'identification des adduits à l'ADN spécifiques et la mise en place de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux aldéhydes.

Chez l'Homme, une faible corrélation entre les niveaux d'adduits mesurés et l'exposition est souvent rapportée. Ceci pourrait être relié au fait que, dans la plupart des études, les adduits sont mesurés de façon non spécifique par la technique du post-marquage au ^{32}P . Cette technique présente une très bonne sensibilité mais ne permet qu'une mesure globale des adduits, et il n'est souvent pas possible de connaître la nature chimique des adduits mesurés.

Par ailleurs, un inconvénient majeur des techniques immunologiques réside dans leur manque de spécificité, du fait de réactivités croisées possibles des anticorps, polyclonaux comme monoclonaux. Ce manque de spécificité est également retrouvé avec l'utilisation de la chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) à détection par fluorescence qui permet une mesure globale des adduits de la voie métabolique des composés organiques.

Par contre, la HPLC-MS/MS apparaît comme la technique de choix pour le dosage spécifique des adduits au regard de leur nature chimique. Toutefois, cette technique plus récente est actuellement peu utilisée pour les études de suivi de l'exposition chez l'Homme. L'enjeu a alors été de pouvoir atteindre des limites de détection suffisamment basses pour que les adduits puissent être détectés et quantifiés à de très faibles doses dans des échantillons biologiques.

Pourtant, l'utilisation de la MS a démontré un rôle croissant dans la détermination des adduits de l'ADN dans des échantillons biologiques avec une grande précision et de fiabilité en utilisant des méthodes de MS hautement sensibles par rapport aux autres

méthodes de détection des lésions de l'ADN existants, tels que le post-marquage au ^{32}P (Ho *et al.*, 2017), la HPLC couplée à la détection fluorescente (Moreau *et al.*, 2015) ou électrochimique (Bolin *et al.*, 2004 ; Thomas *et al.*, 2013) et les techniques basées sur les immuno-essais (Kiianitsa et Maizels, 2014).

La MS offre une meilleure caractérisation structurale des adduits. Une plus grande sélectivité dans les analyses est atteinte par l'utilisation de la MS en mode tandem. Dans une étude *in vitro*, différents adduits HAP-ADN (métabolites époxydes anti-dihydrodiol du benzo[*a*]pyrène, du benzo[*b*]fluoranthène, du dibenzopyrène et du dibenzo[*a,h*]anthracène avec l'ADN) ont été détectés en utilisant la LC-MS/MS. Dans une autre étude, des adduits exocycliques à l'ADN formés par les métabolites époxydes du 1,3-butadiène (substance chimique industrielle et environnementale classée comme substance cancérogène) ont été mis en évidence par LC-MS/MS. Malgré ces améliorations dans l'utilisation de la MS pour la détection des adduits, la principale exigence actuelle est de valider ces méthodes à la fois sur le plan analytique et dans les études d'épidémiologie moléculaire.

Étant donné que les niveaux d'adduits à l'ADN sont généralement faibles, des techniques hautement sensibles, précises, rapides et sélectives sont nécessaires pour l'analyse d'une petite quantité d'ADN. Sachant que « la détection et la quantification des adduits d'ADN chez l'être humain sont multivariées en raison de la grande variabilité entre les sujets, de l'exposition à des mélanges complexes ou d'autres facteurs de confusion tels que le régime alimentaire et le tabagisme » (Liu *et al.*, 2005), des techniques ont été mises au point pour quantifier les adduits provenant d'aldéhydes réactifs, y compris des méthodes chromatographiques et non chromatographiques (pour revue : Garner, 1998 ; Phillips *et al.*, 2000 ; Singh et Farmer, 2006 ; Farmer et Singh, 2008 ; Medeiros, 2009 ; Klaene *et al.*, 2013).

Partant de ce constat, nous préconisons en particulier la nécessité de tirer pleinement parti de cette nouvelle ère de MS pour acquérir les données les plus fiables et de la plus haute qualité possible, notamment en adductomique, comme un puissant outil bioanalytique.

1. Méthodes non chromatographiques

Ces méthodes incluent des dosages enzymatiques et immunologiques, avec une détection non chromatographique. Chaque méthode présente des points forts et des points faibles concernant la sensibilité, la sélectivité, le coût et le temps nécessaire pour chaque analyse.

1.1. Immunoassay

Les méthodes immunologiques détectent et quantifient les composés biologiquement actifs par le biais de réactions antigène-anticorps spécifiques. La sensibilité est variable d'un test à l'autre mais dans la gamme d'un adduit par 10^7 à 10^8 nucléotides normaux. Même si la sensibilité est dix fois inférieure à la méthode de post-marquage, ces tests sont précis, reproductibles, peu coûteux et permettent d'analyser environ 20 échantillons par jour. Cependant, ils nécessitent des quantités relativement élevées d'ADN et ne présentent pas de spécificité absolue en raison de la réactivité croisée des anticorps avec différents composés.

Deux types d'antigènes sont utilisés pour développer des anticorps contre l'ADN endommagé par un agent cancérogène : les antigènes ADN et les antigènes mono-adduit. L'utilisation d'un antigène spécifique dépend de sa facilité de synthèse et de l'utilisation finale de l'anticorps. Dans le cas d'une purification par immunoaffinité du nucléoside modifié à partir d'ADN digère, un antigène mono-adduit est préféré. Cependant, si l'objectif est la détection immunohistochimique des adduits dans les cellules intactes, un antigène d'ADN modifié est préférable. Après avoir généré l'anticorps et caractérisé sa sensibilité vis-à-vis de l'antigène d'origine, un test de réactivité croisée est nécessaire pour éviter les difficultés de quantification d'un antigène spécifique dans des échantillons contenant de nombreux adduits susceptibles d'être structurellement similaires (Santella, 1999).

D'autre part, il est important de valider le test particulier avant de l'utiliser sur des échantillons biologiques, souvent en utilisant une autre méthode de quantification du niveau de modification de l'ADN. Cependant, ces méthodes peuvent ne pas être disponibles pour des niveaux aussi bas ou, si elles sont disponibles, elles peuvent également comporter des incertitudes en termes de précision de la quantification (Santella, 1999).

Quant au dosage immuno-enzymatique, ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays), ce test implique généralement l'utilisation d'anticorps secondaires conjugués à la phosphatase alcaline ou à la peroxydase pour la détection des anticorps primaires et les substrats colorés, fluorescents ou radioactifs pour la détection du point final (Santella, 1999). Les adduits de l'Acro à l'ADN ont été examinés et mesurés dans l'ADN des leucocytes du sang périphérique de patients cancéreux traités au cyclophosphamide par

ELISA en utilisant la phosphatase alcaline et l'anticorps monoclonal MoAb5 spécifique de l'ADN modifié par l'Acro. Cet anticorps n'a pas provoqué de réaction croisée avec l'ADN non modifié. Le test a détecté des adduits de l'Acro à l'ADN chez 4 patients sur 12 et a montré l'absence de ces adduits chez des patients non traités. Mais les résultats de densité optique ne permettent pas d'identifier la nature précise de la modification (McDiarmid *et al.*, 1991). De même, Foiles et ses collègues (1987 ; 1989) ont développé des anticorps spécifiques pour détecter les adduits d'ADN cycliques résultant de l'exposition de l'ADN au Croto et à l'Acro. Le test impliquait une analyse ELISA, une analyse ELISA compétitive (détaillée ci-dessous) et une purification de l'hydrolysate d'ADN par HPLC avant l'analyse ELISA afin d'éviter une réactivité croisée des anticorps avec la dG. La méthode a été validée en comparant les résultats avec ceux obtenus par HPLC-fluo. La sensibilité est respectivement de 0,5 $\mu\text{mol/mol}$ dG et de 4,1 mmol/mol dG dans le cas des adduits du Croto et de l'Acro. Plus tard, Foiles et ses collègues (1990) ont utilisé le même dosage immunologique développé pour démontrer que l'Acro et le Croto forment *in vitro* des adduits avec l'ADN cellulaire. Les auteurs ont également utilisé la méthode du post-marquage au ^{32}P mise au point précédemment par Chung et ses collègues (1989) pour confirmer les résultats du dosage immunologique concernant la présence d'adduits dans les cellules traitées au Croto. En 2003, Kawai et ses collègues (2003) ont développé un anticorps monoclonal (mAb21) contre l'ADN modifié par l'Acro et ont testé la spécificité de cet anticorps par ELISA directe, avec détection colorimétrique, en utilisant l'ADN traité à l'Acro comme antigène absorbé.

Quand l'antigène est déposé au fond de la microplaque et la liaison des anticorps à cet antigène est mise en concurrence par l'antigène en solution, il s'agit de l'ELISA compétitif. Après incubation et élimination du matériel non lié, l'anticorps primaire lié est quantifié. En utilisant 50 - 100 μg d'ADN, il est possible de mesurer les taux d'addition d'un adduit/ 10^8 nucléotides (Santella, 1999). En outre, les auteurs ont également utilisé cette procédure conjointement avec la HPLC détection électrochimique (HPLC-EC) pour valider la sensibilité et la spécificité du test. Même si les niveaux d'adduit par ELISA étaient supérieurs à ceux déterminés par HPLC en raison d'un certain nombre de facteurs, il existait une bonne corrélation entre les deux méthodes. Cette combinaison a augmenté la spécificité de l'ELISA (Yin *et al.*, 1995). Kawai et ses collègues (2003) ont estimé la réactivité croisée des composés de faible poids moléculaire avec l'anticorps développé contre l'ADN modifié par l'Acro.

Dans le dosage radioimmunologique enzymatique ultrasensible (USERIA), l'antigène est synthétisé sous une forme radiomarquée (traceur) et non marquée (inhibiteur). Ce dosage repose sur la comparaison avec la courbe standard générée en mélangeant un anticorps avec un traceur et en augmentant l'addition d'inhibiteur. L'échantillon est mélangé avec un anticorps et un traceur, et la concentration en antigène est déterminée avec la courbe standard. Harris et ses collègues (1979) ont développé un dosage USERIA pour la détection des antigènes chez l'Homme. Cette méthode combine les avantages du dosage radioimmunologique et ELISA, soit une méthode 100 fois plus sensible qu'ELISA et 1000 fois plus sensible que le dosage radioimmunologique. La sensibilité mesurée de USERIA est due à la fois à l'amplification enzymatique et à la mesure des produits par des méthodes radioactives sensibles. Bien que le coût du matériel requis par USERIA soit supérieur à celui de la méthode ELISA, il est moins coûteux que celui du dosage radioimmunologique. Selon Hsu et ses collègues (1981), ce test permet de détecter 1 adduit/7 x 10⁶ nucléotides.

1.2. Méthode immunohistochimique

Cette méthode permet de détecter les dommages à l'ADN sur des cellules fixées ou des coupes de tissus. L'incubation directe du matériel fixé avec l'anticorps primaire nécessite différentes procédures visant à augmenter la sensibilité. Ces procédures améliorent la liaison des anticorps en ajoutant des enzymes capables d'éliminer les protéines histones et non histones de l'ADN (protéases) et en évitant une réactivité croisée avec les adduits de l'acide ribonucléique ARN (RNase). Ensuite, la dénaturation de l'ADN avec un traitement acide ou basique augmente l'accessibilité des anticorps aux adduits. L'évaluation des échantillons est possible de manière semi-quantitative ou qualitative. Les mesures quantitatives reposent sur la détection par immunofluorescence ou immunoperoxydase en mesurant directement l'intensité de la fluorescence ou de l'absorption du noyau, respectivement. Alors que l'évaluation qualitative utilise une estimation subjective de l'intensité de la coloration et/ou du nombre de cellules positivement colorées avec une échelle arbitraire. Cependant, il est important de mener des expériences de contrôle ou d'utiliser des anticorps non spécifiques pour démontrer la spécificité de la coloration cellulaire (Santella, 1999). Kawai et ses collègues (2003) ont été les premiers à prouver par cette méthode la formation *in vivo* d'adduits à l'ADN dérivés de l'Acro.

La méthode immunohistochimique présente des avantages remarquables, tels que sa capacité à détecter des adduits dans des types de cellules spécifiques et son applicabilité à

une petite quantité d'échantillons correspondant à 1 mL de sang comparé à 30 mL dans le test ELISA. Comme chaque méthode, celle-ci présente certaines limites en ce qui concerne la formation d'artefacts au cours du traitement de l'échantillon et la réactivité croisée entraînant des erreurs de quantification. Cette méthode est moins sensible que l'ELISA compétitif (Santella, 1999 ; Kawai *et al.*, 2003).

1.3. Dosage par immunotransfert ISB (Immuno-dot blot/immunitaire)

Cette méthode met en évidence les adduits à l'ADN immobilisé sur de la nitrocellulose. Tout d'abord, l'ADN est incubé avec l'anticorps primaire, puis lavé puis incubé avec l'anticorps secondaire marqué par une enzyme. Des substrats contenant des produits colorés ou chimioluminescents sont utilisés (Santella, 1999). Bien que la nature précise de la modification de l'ADN de l'Acro n'ait pas été identifiée, cette méthode était suffisamment sensible pour détecter les adduits à l'ADN de l'Acro chez 6 sur 12 patients cancéreux traités au cyclophosphamide (McDiarmid *et al.*, 1991). De plus, des adduits du type MDA-ADN ont été détectés à l'aide de cette méthode avec une limite de détection de 0,2 adduits/10⁷ bases à partir de 1 µg d'ADN/échantillon (Leuratti *et al.*, 2002).

2. Méthodes chromatographiques

En utilisant la détection chromatographique, plusieurs techniques ont été développées pour la détection et la quantification des adduits exocycliques d'aldéhydes. L'évolution des méthodes de la technique du post-marquage au ³²P à l'incorporation de la chromatographie en phase liquide (LC) et de la MS a permis une avancée remarquable en termes de sensibilité, en particulier dans les études épidémiologiques.

2.1. Post-marquage au ³²P

La méthode du post-marquage au ³²P a été introduite pour la première fois par Gupta, Reddy et Randerath en 1982 au Baylor College of Medicine de Houston lors de l'analyse des adduits exocycliques des carcinogènes aromatiques non radioactifs. La procédure de cette méthode commence par la digestion de l'ADN modifié en 3'-mononucléotides, puis par l'incorporation du ³²P dans ce dernier, après, une élimination des nucléotides normaux est nécessaire afin que les nucléotides marqués au ³²P puissent être séparés par chromatographie sur couche mince échangeuse d'anions (polyéthylèneimine-cellulose) et détectés par autoradiographie. Cette méthode a permis de réaliser des progrès remarquables

dans la biosurveillance des adduits à l'ADN dans les études humaines en raison de sa polyvalence et de sa sensibilité extrême (1 adduit/ 10^7 - 10^8 nucléotides) (Gupta *et al.*, 1982). La première étude, utilisant une méthode du post-marquage au ^{32}P , visant à détecter *in vivo* les adduits propano-cycliques a été réalisée en 1989, lorsque Chung et ses collègues (1989) ont traité des rats avec de la N-nitrosopyrrolidine et des souris avec du Croto. Mais la méthode de la chromatographie sur couche mince (CCM) utilisée par Gupta et ses collègues (1982) n'était pas applicable à cette étude, car les adduits détectés dans cette dernière sont plus polaires que les adduits aromatiques et ne peuvent donc pas être retenus sur des plaques de CCM en cellulose. Par conséquent, les auteurs ont modifié la méthode décrite par Gupta et ses collègues en introduisant la HPLC afin d'obtenir des fractions enrichies en adduits avant le marquage. Une méthode en CCM à quatre dimensions a également été développée pour retenir les adduits en utilisant des systèmes de solvants optimaux. La sensibilité est considérablement augmentée pour détecter 1 adduit/ 10^9 nucléotides. Cette méthode présentait certains inconvénients, tels que sa spécificité pour les adduits exocycliques position N2, la quantification étant difficile due aux pertes possibles lors de l'étape de la purification par HPLC et l'inefficacité du marquage des adduits.

Pour la première fois en 1992, Vaca et ses collègues (1992) ont rapporté la détection d'adduits formés par la réaction de l'ADN avec le MDA *in vitro* et *in vivo*. Les auteurs visaient dans leur étude à adapter la technique du post-marquage au ^{32}P pour la détection de faibles niveaux d'adduits à l'ADN. Pour l'étude *in vitro*, ils ont appliqué une digestion enzymatique suivie d'une purification par HPLC ou d'une digestion à la nucléase P1 de nucléotides normaux avant le marquage. Une combinaison des deux procédures a été choisie pour analyser les adduits formés *in vivo*. Six adduits/ 10^6 nucléotides ont été analysés dans cette étude.

Cependant, l'incorporation de la LC par Nath et ses collègues en combinaison avec le post-marquage au ^{32}P offrait l'avantage de pouvoir effectuer une récupération pour une analyse ultérieure, la détection simultanée des adduits exocycliques d'éthéno et de propano : les adduits AcroG, CrotoG, 1,N2-édG et d'autres adduits apparentés dans un échantillon d'ADN, et la séparation des stéréomères des adduits. La méthode du post-marquage au ^{32}P présente de nombreuses limitations pour améliorer la quantification et l'identification ; le test s'appuyait sur la HPLC en phase inverse pour l'enrichissement en adduits avant le marquage et pour la quantification et l'identification après le marquage, en utilisant des standards d'addition synthétiques de ces adduits exocycliques (Nath et Chung, 1994 ; Nath

et al., 1994 ; 1996). Un niveau équivalent à 5 ou 15 adduits/10⁸ nucléotides a été analysé (Nath *et al.*, 1994) ; ce niveau est comparable à ceux observés dans les études *in vivo* (Nath et Chung, 1994 ; Nath *et al.*, 1996). Plus tard, Nath et ses collègues (1996) ont modifié la méthode précédente pour augmenter la sensibilité en minimisant les pics d'interférence, en améliorant l'efficacité du marquage, en obtenant de meilleures estimations de la récupération et en raccourcissant la durée du test. Cette méthode nécessite moins de 50 µg d'échantillon d'ADN, un avantage important pour les études chez l'Homme. En utilisant la même méthode, Chung et ses collègues (1996) ont identifié des adduits cycliques. La comigration des adduits radiomarqués avec des standards synthétiques en HPLC en phase inverse a fourni la preuve de l'identité des adduits. De manière similaire, ils ont identifié *in vivo* des adduits au HNE endogènes avec une limite de détection de 1 adduit par 10⁹ bases (Chung *et al.*, 2000). Cette méthode peut détecter les stéréomères des adduits CrotoG, AcroG et HNEdG avec une sensibilité élevée, mais elle présente des taux de récupération faibles et une efficacité médiocre à la suite de multiples et longues étapes en HPLC et en CCM.

En 1995, Vaca et ses collègues (1995b) ont détecté les adduits MDAdG chez l'Homme en utilisant la méthode du post-marquage au ³²P précédemment mise au point (Vaca *et al.*, 1992) en combinaison avec la digestion par la nucléase P1 et la séparation par HPLC en phase inverse. En 1997 et pour la première fois, le N²-éthylG a été quantifié dans les granulocytes et les lymphocytes de patients alcooliques en utilisant la méthode du post-marquage au ³²P en combinaison avec la HPLC en phase inverse (Fang *et al.*, 1997). Wacker et ses collègues (2000) ont également mis au point une méthode du post-marquage au ³²P avec une sensibilité d'environ 21 adduits/10⁹ nucléotides en présence de matrice d'ADN pour la détection *in vivo* d'adduits HNEdG. Une autre méthode du post-marquage au ³²P a été développée avec une limite de détection de 3 adduits/10⁹ nucléotides. Des adduits du type CrotoG ont été détectés *in vivo* dans différents organes de rats après des gavages uniques de fortes doses de Croto ou après des gavages répétés de faibles doses (Budiawan *et al.*, 2000).

Aucune de ces études n'a permis de détecter des adduits enals dérivés simultanément d'aldéhydes à chaîne courte et à chaîne longue. Pan et ses collaborateurs (2006) ont donc amélioré une méthode mise au point antérieurement par le post-marquage ³²P (Nath *et al.*, 1994 ; Chung *et al.*, 2000) pour permettre la détection des adduits de l'Acro, du Croto, du pentenal, de l'heptenal et du HNE dans un seul échantillon d'ADN *in vitro*. La méthode implique l'extraction en phase solide, en remplaçant la HPLC et la CCM, pour

l'enrichissement en adduits avant et après le marquage, et en convertissant les cinq adduits PdG en dérivés à cycle ouvert en les traitant avec du borohydrure de sodium afin de confirmer les identités et de quantifier les adduits. Les auteurs ont également appliqué cette méthode *in vivo* et la limite de détection a atteint 9 adduits/10⁹ dG (Pan *et al.*, 2006).

2.2. Chromatographie en phase gazeuse - spectrométrie de masse

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la MS (GC-MS) décrite au début des années 1980, implique une étape d'hydrolyse de l'ADN, le plus souvent une hydrolyse acide pour obtenir un mélange de bases (Dizdaroglu, 1984). Les composés présents dans ce mélange, sont soumis à une étape de dérivation pour augmenter leur volatilité. Ravanat et ses collaborateurs (1995) ont amélioré la technique en introduisant une étape de purification par HPLC avant la dérivation. Les bases oxydées sont ainsi séparées des bases normales. L'introduction d'étalons internes isotopiques est nécessaire avant l'hydrolyse ou la digestion. Un inconvénient de cette technique concerne la stabilité des bases modifiées dans des conditions d'hydrolyse acide. Ainsi, la stabilité de chaque lésion à détecter doit être vérifiée avant toute analyse. Douki et Ames (1994) ont utilisé la GC-MS pour déterminer les adduits *in vitro* du Croto, de l'Acro et de nombreux autres aldéhydes non saturés. Le taux d'adduits était dans le même intervalle que celui obtenu en HPLC-EC. Des adduits à l'ADN (N2,3-éthénoguanine) induits par le chlorure de vinyle ont été déterminés quantitativement par GC-MS par ionisation chimique à ions négatifs (GC-NICI-MS) en mode de surveillance d'ions sélectionnés (SIM). La limite de détection était de 6 adduits/10⁸ paires de bases. Chaudhary et ses collègues (1994) ont détecté des adduits du dG formés par réaction avec du MDA après leur conversion en dérivés de pentafluorobenzyle par GC couplée à un détecteur à capture d'électrons (GC-ECNCl/MS). La quantification a été effectuée en mode SIM par rapport à un standard interne. La limite de sensibilité était d'environ 2 adduits/10⁸ paires de bases à partir de 300 µg d'ADN.

2.3. Chromatographie en phase liquide - Détection électrochimique

Cette méthode analytique a été introduite pour la première fois par Floyd et ses collaborateurs (1986). Le principe est basé sur la mesure du courant entre deux électrodes, ce courant étant créé par l'oxydation des molécules si le potentiel appliqué est suffisant. Son utilisation est limitée aux composés à faible potentiel d'oxydation. Dans un adduit du type N²-propano, la position N2 est déjà une énéamine secondaire, ce qui rend le composé

électroactif et compatible avec une détection EC sans modification préalable requise. Un autre avantage est le pouvoir hydrophobe élevé des adduits 1,N²-propano permettant une séparation efficace des adduits des sous-produits polaires d'hydrolyse et des bases non modifiées (Douki et Ames, 1994). Park et ses collègues (1989) ont signalé la détection de nombreux adduits induits par une exposition *in vitro* à l'Acro et à d'autres mutagènes endogènes par HPLC-EC en phase inverse. Après exposition, l'ADN a été isolé et hydrolysé enzymatiquement, suivi d'une hydrolyse thermique acide ou neutre. La sensibilité a atteint 1 adduit/10⁵ - 10⁶ bases. Goda et Marnett (1991) ont mis au point une méthode d'analyse quantitative des adduits du M₁G par HPLC-EC. Après exposition au MDA, l'ADN a été réduit et hydrolysé puis extrait par SPE avant analyse par HPLC-EC. La principale limite de cette méthode est la production d'artefacts de bases oxydées conduisant à une surestimation du niveau des adduits. L'extraction de l'ADN est donc une étape essentielle. Plus tard, Douki et Ames (1994) ont décrit une méthode basée sur l'hydrolyse acide de l'ADN suivie d'une séparation par HPLC-EC en phase inverse pour déterminer *in vitro* les adduits du HNE, du Croto, de l'Acro et de nombreux autres aldéhydes insaturés. La limite de détection a été estimée à environ 1 pmol.

La HPLC-EC offre une ultra-sensibilité et une grande sélectivité ; seuls les composés capables de s'oxyder au potentiel spécifique appliqué donneront une réponse. D'autres avantages sont la facilité de synthèse ou d'obtention d'étalons, la simplicité de l'analyse et le fait que les désoxynucléosides normaux n'interfèrent pas car ils ne sont pas électrochimiquement actifs, à l'exception de la dG (Park *et al.*, 1989).

2.4. Chromatographie en phase liquide - Détection fluorescence

Chung et ses collègues (1984) ont utilisé cette technique pour identifier les adduits 1,N²-PdG formés lors de la réaction de l'Acro et du Croto avec la dG. Les limites de sensibilité de la méthode de détection par fluorescence auraient été dépassées si des concentrations d'Acro et de Croto nettement inférieures avaient été utilisées. Selon les auteurs, il faut des méthodes plus sensibles permettant la détection de ces adduits dans les conditions d'essais de mutagénicité ou d'exposition *in vivo* comme par exemple le post-marquage au ³²P.

2.5. Chromatographie en phase liquide - spectrométrie de masse

Depuis les années 1980, de nombreuses études ont été menées en utilisant la LC-MS pour détecter et quantifier les adduits aux aldéhydes. La HPLC-MS/MS permet une détection

précise et simultanée de nombreux types d'adduits à l'ADN et la séparation de mélanges complexes de diastéréomères. Elle présente également une information structurale et une identification avec d'excellentes limites de détection (Inagaki *et al.*, 2003 ; Douki *et al.*, 2004).

En 1986, Winter et ses collègues (1986) ont détecté *in vitro* des adduits provenant de la réaction entre le HNE et la dG, en utilisant une HPLC en phase inverse et une MS en mode tandem. Plus tard, ces adduits exocycliques ont également été détectés et quantifiés par HPLC à ionisation par électrobuliseur ou ESI (Electrospray Ionization) couplée MS en mode tandem (HPLC-ESI-MS/MS) en mode de surveillance de réactions multiples (MRM) (Douki *et al.*, 2004).

Wang et ses collègues (2000) ont identifié par LC-ESI-MS trois nouveaux types d'adduits d'ADN stables formés par l'AA, l'un d'entre eux étant l'adduit 1,N²-PdG. N²-éthylidG n'était détectable que pour une concentration relativement élevée en AA, ce qui reflète en partie la sensibilité limitée des méthodes d'analyse. Cette technique a été combinée à la dépurination de l'ADN en tant que processus de prétraitement et n'a pas permis de séparer les différents diastéréoisomères de l'adduit. Elle a été appliquée uniquement *in vitro* et sa sensibilité était finalement 35 fois inférieure à celle de la méthode de post-marquage au ³²P (Inagaki *et al.*, 2003). Une autre méthode en LC-ESI-MS/MS a été établie pour quantifier les adduits CrotodG dans le foie et le poumon humain, en utilisant une colonne de 5 µm et un étalon interne marqué à l'isotope stable. Cette méthode exigeait une grande quantité d'ADN requise pour atteindre la sensibilité souhaitée (Zhang *et al.*, 2006), mais l'introduction de la nano-ESI-MS couplée à une HPLC à nano-écoulement (Liu *et al.*, 2005) augmente la concentration du pic, de sorte qu'une faible quantité d'ADN est nécessaire pour augmenter la sensibilité.

Une méthode très sensible de quantification a été développée par dilution isotopique en LC capillaire couplée à la spectrométrie de masse par le biais de source nano ESI (CapLC-nanoESI-MS/MS) pour l'analyse quantitative de l'AcrodG dans des hydrolysats d'ADN en mode MRM. L'utilisation d'une colonne LC de 100 µm visait à augmenter la sensibilité par rapport aux colonnes classiques, sans compromettre la robustesse et la capacité du système. Cette méthode nécessitait une petite quantité d'ADN par rapport à la méthode du post-marquage au ³²P pour quantifier les adduits à l'ADN, un avantage important pour l'étude d'échantillons humains. Cette méthode a utilisé des standards internes et a fourni une sensibilité d'environ 1 AcrodG/10⁶ nucléosides (Liu *et al.*, 2005). Un an plus tard, cette

méthode a été utilisée pour détecter et quantifier les adduits exocycliques endogènes dérivés du HNE dans le tissu cérébral humain pour la première fois *in vivo* avec une petite quantité d'ADN (1 - 2 µg) et des étalons internes. Cette méthode est une alternative à la méthode du post-marquage au ^{32}P avec une sensibilité comparable (40 lésions/ 10^9 nucléosides d'ADN) mais sans utiliser de radio-isotopes (Liu *et al.*, 2006).

Une méthode en LC-ESI-MS/MS a été développée en mode MRM positif pour la quantification du N²-éthylidènedG par la quantification du N²-éthylidG dans d'ADN traité avec le cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN), extrait du foie humain, en utilisant des étalons internes fraîchement préparés (Wang *et al.*, 2006). Un an plus tard, la même méthode était utilisée pour analyser le N²-éthylidG dans 2 µg d'ADN de leucocytes humains (Chen *et al.*, 2007). Un autre avantage de cette méthode est sa spécificité de détection assurant l'identité de l'analyte, sa précision et son exactitude à l'aide d'étalons internes.

Une méthode en LC-ESI-MS/MS en mode positif a été mise au point, utilisant la technologie de vannes « online column-switching » pour la détermination des adduits N²-éthylidG après réduction au cours de l'hydrolyse enzymatique d'échantillons d'ADN exposés *in vitro* à concentration différente d'AA ou à la fumée de cigarette. Par conséquent, l'échantillon d'ADN hydrolysé peut être analysé directement sans qu'il soit nécessaire de prévoir une étape de prépurification. Cinquante µg d'ADN hydrolysé ont été nécessaires sur la colonne pour l'analyse et la limite de détection a atteint 2 fmol (Singh *et al.*, 2009).

D'autre part, les adduits AcrodG ont été analysés quantitativement en LC-ESI-MS/MS sur des colonnes capillaires (1 adduit/ 10^7 nucléotides) (Zhang *et al.*, 2007). En comparaison avec la méthode de Liu et ses collaborateurs (2005), cette méthode n'implique pas la configuration d'une source de nanospray pour le spectromètre de masse. Elle pourrait détecter à la fois, le α - et le γ -OH-AcrodG, tout en sachant que le γ -OH-AcrodG est le principal adduit détecté à l'aide de la méthode du post-marquage au ^{32}P couplée à la HPLC, alors que les très faibles niveaux du α -OH-AcrodG empêchait la détection de ces adduits à l'aide du post-marquage.

Une méthode de chromatographie capillaire UHPLC-ESI-MS/MS a été développée pour détecter simultanément des adduits du FA endogènes et exogènes à partir de 50 µg d'ADN. La purification des adduits a été effectuée sur un système de HPLC en phase inverse et les adduits ont été quantifiés par un spectromètre de masse triple-quadrupôles. Cette méthode

repose sur l'utilisation du FA marqué par [$^{13}\text{CD}_2$] (Lu *et al.*, 2010a). Un an plus tard, les auteurs décrivent un procédé amélioré de la nano-UHPLC-ESI-MS/MS avec l'utilisation du même isotope [$^{13}\text{CD}_2$]-FA. Le N²-hydroxyméthylDG a été convertie en N²-méthylDG l'adduit stable après incubation de l'ADN isolé avec du NaBH₃CN. Après digestion enzymatique, les fractions ont été collectées par HPLC, séchées et analysées par nano-UHPLC-ESI-MS/MS. Cette méthode permet la détection simultanée des adduits du FA à la fois endogènes et exogènes. Elle est 10 fois plus sensible que la méthode précédemment mise au point (Lu *et al.*, 2011).

La détection simultanée de multiples adduits à l'ADN dans des échantillons humains est désormais possible après le développement d'une technologie MSⁿ à haute résolution et d'une spécificité impressionnante pour la détection simultanée de 18 adduits dans l'ADN hépatique de souris traitées avec un carcinogène du tabac (Balbo *et al.*, 2014). En 2010, 11 adduits provenant du stress oxydant ont été détectés simultanément dans divers échantillons d'autopsie humaine (Chou *et al.*, 2010). La méthode développée en UHPLC-MS/MS à dilution isotopique en mode positif par Monien et ses collègues (2015) permet la détection simultanée de 16 adduits à l'ADN structurellement et chimiquement diversifiés dérivés de l'exposition à des agents cancérigènes d'origine alimentaire et environnementale ainsi que d'électrophiles endogènes produits par la LPO, y compris les adduits du MDA et des 2,3-époxyaldéhydes. La limite de détection des adduits formés par le MDA et les 2,3-époxyaldéhydes était respectivement comprise entre 0,43 - 0,63 et 16,9 - 179 adduits/10⁸ nucléosides (Monien *et al.*, 2015).

Le domaine de l'adductomique de l'ADN a été récemment passé en revue par Villalta et Balbo (2017). Le tableau 4 résume les analyses de l'adductomique de l'ADN basées sur la LC-MS effectuées à ce jour.

Tableau 4: Résumé des études publiées sur l'ADN par approche adductomique en utilisant la LC-MS

Approche	Instrument	Type d'échantillon	Type/Origine d'adduit	Points forts	Points faibles	Détails	Références
CNL	DF-EB/Q	Réaction avec les nucléosides	PGE ^c (produit chimique industriel)	Haute résolution, Premier exemple d'analyse d'ADN par adductomique	Modèle simpliste	Nucléoside ayant réagi avec un produit chimique d'intérêt	Claereboudt <i>et al.</i> , 1990
		Standards synthétiques	Arylamine (produit chimique industriel)	Rapport préliminaire sur l'adductomique de l'ADN		Analyse des étalons de synthèse uniquement	Bryant <i>et al.</i> , 1992
		Réaction <i>in vitro</i>	PhIP ^a (aliments)	Comparaison faite avec le post-marquage au ³² P		-	Rindgen <i>et al.</i> , 1995
		Réaction <i>in vitro</i> et tissus animaux	IQ ^b (aliments)	Premier exemple d'ionisation nanospray		-	Gangl <i>et al.</i> , 1999
	Triple Quad	Cellules irradiées (monocyte humain)	Induites par les rayonnements	Un exemple d'analyse des adduits dus à l'exposition à des rayonnements	Mesure de la masse nominale et manque de données de fragmentation	-	Regulus <i>et al.</i> , 2004
		Réaction <i>in vitro</i>	HAP (exposition environnementale/ industrielle)	Analyse de données automatisée		Petite gamme de masse (500 - 650 Da)	Singh <i>et al.</i> , 2010
		Réaction avec l'oligonucléotide	PGE ^c , SO ^d (produits chimiques industriels)	-		Limité aux oligonucléotides	Yao et Feng, 2016
		Cellules traitées (à partir de follicules ovariens)	HAP ^e (exposition environnementale/ industrielle)	-		-	Yao <i>et al.</i> , 2016
Pseudo-CNL		Tissu pulmonaire humain	Criblage de toutes les modifications de l'ADN	Analyse des données cartographiques d'Adductome	-	Kanaly <i>et al.</i> , 2006	

Approche	Instrument	Type d'échantillon	Type/Origine d'adduit	Points forts	Points faibles	Détails	Références
		Poumon humain et tissu œsophagien	Criblage de toutes les modifications de l'ADN	Sept adduits détectés sans ambiguïté		-	Kanaly <i>et al.</i> , 2007
		Divers tissus humains	induits par la LPO (Endogène)	Adduits dérivés de la LPO chez l'Homme		-	Chou <i>et al.</i> , 2010
		champignons de Paris, levure de bière	Aliments	-		Seulement 7 transitions de MRS par injection	Spilsberg <i>et al.</i> , 2010
		Cellules traitées (hamster chinois)	Composés positifs au test des micronoyaux	Première comparaison avec le test des micronoyaux		-	Kato <i>et al.</i> , 2011
		Muqueuse gastrique humaine	LPO (endogène)	-		-	Matsuda <i>et al.</i> , 2013
		bactéries du sol	Criblage de toutes les modifications de l'ADN	Première étude adductomique de l'ADN bactérien		-	Kanaly <i>et al.</i> , 2015
DD-MS ²		Cellules traitées (lymphocyte T humain immortalisé)	Melphalan (médicament de chimiothérapie)	Premier exemple d'acquisition de données spectrales MS ²	Pas de données de fragmentation MS ³ , données de masse précises non rapportées	-	Van Den Drissche <i>et al.</i> , 2004
MS ^E (HRAM)	Q-TOF	Tissu pulmonaire de la souris	Nanoparticules magnétiques	Première application des données MS ^E	Pas de données MS ² or MS ³ data, des données de masse précises limitées au 10 mmu	-	Ishino <i>et al.</i> , 2015
Analyse complète (HRAM)	Orbitrap	tissu tumoral du colon humain	Lié à l'alimentation	-	-	Base de données d'adduits liés à l'alimentation, hydrolyse acide donnant lieu à des	Hemeryck <i>et al.</i> , 2015

Approche	Instrument	Type d'échantillon	Type/Origine d'adduit	Points forts	Points faibles	Détails	Références
						adduits à la nucléobase	
		Digestes <i>in vitro</i> de viande de microbiote	Liés à l'alimentation	-	-	Méthodologie utilisée développée dans Hemeryck <i>et al.</i> , 2015	Hemeryck <i>et al.</i> , 2016
DD-CNL-MS ³	Ion Trap	Cellules traitées (hépatocytes humains) Foie de rat Cellules buccales humaines	4-ABP ^f , MeIQx ^g Composants du tabac	Échantillons humains examinés, Premier exemple d'acquisition de données MS ³	Aucune mesure de masse précise	-	Bessette <i>et al.</i> , 2009
		Cellules traitées (adénocarcinome du côlon humain)	Illudin S (produit naturel chimiothérapeutique)	-		Méthode similaire à celle utilisée par Bessette <i>et al.</i> , 2009	Pietsch <i>et al.</i> , 2013
DD-CNL-MS ³ (HRAM)	Orbitrap	Tissu hépatique de souris	Constituants du tabac	Combinaison du HRAM, MS ³ et nanospray	Purification étendue d'échantillons et injections multiples	-	Balbo <i>et al.</i> , 2014
		Cellules traitées (adénocarcinome du colon humain)	Médicament alkylant de l'ADN	Première approche ciblée	-	-	Stornetta <i>et al.</i> , 2015
		Tissu pulmonaire de souris	Adduits endogènes	Acquisition de données HRAM MS ³	-	-	Carra' <i>et al.</i> , 2017

^a 2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP) ; ^b 2-amino-3-méthylimidazo [4,5-f] quinolone (IQ) ; ^c éther phényl glycidyle (PGE) ; ^d Styrène-7,8-oxyde (SO) ; ^e Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ; ^f 4-aminobiphényle (4-ABP) ; ^g 2-amino-3,8-diméthylimidazo [4,5-f] quinoxaline (MeIQx).

Partant de ce qui a été décrit précédemment, il est important de mentionner brièvement les défis à soulever pour la détection des adduits. L'analyse adductomique de l'ADN *in vitro* peut fournir des informations utiles sur un système biologique donné. Toutefois, nous estimons que l'objectif ultime devrait être d'analyser des échantillons humains.

i) Sélectivité : L'analyse ciblée des adduits à l'ADN, bien qu'elle soit généralement réalisée avec une instrumentation triple quadripôle, s'appuie sur des standards internes marqués isotopiquement stables. Alors que les approches MSⁿ ou les stratégies HR-MS peuvent être utiles pour les applications *in vitro* - où les expositions sont bien définies et généralement à des niveaux plus élevés - et nécessaires pour fournir la certitude requise pour une analyse *in vivo* des adduits à l'ADN en l'absence d'étalons internes.

ii) Sensibilité : L'un des principaux facteurs limitant la sensibilité au dépistage des modifications de l'ADN est la quantité d'ADN disponible pour l'analyse, ce qui est particulièrement vrai dans les échantillons de sang humain ou de biopsie, mais peut également s'appliquer aux tumeurs, où les échantillons sont précieux. Pour l'analyse traditionnelle basée sur MS², le signal de fond est directement lié à la complexité chimique et limite la possibilité de détecter des adduits de faible niveau. La préparation des échantillons doit être parfaitement optimisée grâce à l'utilisation de l'ionisation nanospray.

iii) Quantification : Une quantification absolue précise par LC-MS nécessite l'utilisation d'étalons internes marqués d'un isotope stable des analytes d'intérêt. Cela n'est pas possible dans le cas de la surveillance ciblée de l'adductomique de l'ADN portant sur des centaines d'adduits à la fois. Une stratégie de quantification relative a récemment été démontrée (Klaene *et al.*, 2016).

iv) Facilité de l'analyse des données : Le développement de logiciels pour l'analyse de données ont été concentrés sur la protéomique, la métabolomique, la lipidomique, etc., et n'ont pas été orientés vers l'adductomique de l'ADN. L'analyse HR-MSⁿ conviendrait peut-être mieux à l'identification d'adduits inconnus et au criblage d'un grand nombre d'adduits connus (Villata et Balbo, 2017).

VI- Objectifs de la thèse

Le cancer est une maladie chronique multifactorielle. De nombreux facteurs génétiques, hormonaux et environnementaux peuvent concourir à son développement en agissant à différentes phases du développement. La part attribuable aux facteurs comportementaux et environnementaux dans l'étiologie du cancer est évaluée à 35% (Danaei *et al.*, 2005 ; Lewandowska *et al.*, 2019). Cependant l'évaluation des effets des composés génotoxiques et leur lien avec le risque de cancer est rendue actuellement très difficile en raison de la multiplicité des expositions sous forme de mélanges complexes de composés généralement présents à très faibles concentrations. Les aldéhydes font partie des facteurs environnementaux mais aussi des produits générés de manière endogène via la LPO lors de pathologies inflammatoires prédisposantes qui peuvent jouer un rôle dans la survenue de cancer.

Dans notre monde contemporain, l'Homme est constamment exposé à ces produits ubiquitaires et ceci dès la vie *in utero*. Ils sont très réactifs et présentent une activité électrophile remarquable vis-à-vis des macromolécules cellulaires (protéines et ADN). Aussi dans le cadre du concept de l'exposome, le suivi de biomarqueurs pertinents d'effets précoces de composés génotoxiques est actuellement décrit comme un outil pratique pertinent pour mieux évaluer le risque cancérigène associé à ces expositions multiples.

Récemment, la LC-MS/MS est devenue une méthode de choix pour la quantification des nucléosides modifiés tels que les adduits à l'ADN.

Afin de contribuer à une meilleure connaissance du concept de l'exposome et aux développements méthodologiques dans l'évaluation et la traçabilité des expositions aux aldéhydes, nous nous sommes proposés de :

- Développer une nouvelle méthode sensible par la chromatographie en phase liquide à ultra-performance couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem (UHPLC-ESI-MS/MS), permettant la détection et la quantification simultanées de 9 adduits exocycliques dérivés de 8 principaux aldéhydes exogènes et endogènes,

potentiellement cancérigènes : le FA, l'AA, l'Acro, le Croto, le MDA, le HNE, le Gx et le MG (Chapitre 2).

- Valider la méthode conformément à la directive de l'Agence européenne des médicaments (European Medicines Agency, EMA) sur la validation des méthodes bioanalytiques (Chapitre 2).
- Valider la méthode par une approche *in vitro* avec l'exposition en milieu liquide aux 8 aldéhydes seuls ou en mélange équimolaire afin de vérifier la formation des adduits exocycliques et identifier un profil pertinent (Chapitre 3).
- Rechercher le profil d'adduits au sein de l'ADN de sang humain à la fois chez des fumeurs et non-fumeurs. Notre hypothèse est de vérifier l'existence d'une variation de ce profil d'adduits exocycliques à l'ADN chez une population d'individus non malades exposés ou pas aux aldéhydes générés par la consommation de cigarettes avec le laboratoire de biologie clinique et l'unité de tabacologie du CHU UCL Namur en Belgique (Chapitre 4).
- Mettre en place une étude d'épidémiologie moléculaire pour explorer la pertinence et la validité de ce profil d'adduits exocycliques en tant que biomarqueurs d'exposition et/ou d'effet précoce aux aldéhydes chez des policiers libanais fortement exposés à la pollution urbaine de Beyrouth au Liban avec le laboratoire L2GE, équipe Microbiologie/Tox-EcoTox de l'Université Libanaise (Chapitre 5).

La validation de la méthode analytique sera présentée sous forme d'article accepté après révisions mineures pour publication dans *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Annexe I).

II. Chapitre 2 : Mise au point de la méthode d'analyse par UHPLC-MS/MS

Le deuxième chapitre sera subdivisé en 4 parties. Après un état de l'art, la 2^{ème} partie présentera la préparation des standards des 9 adduits induits par 8 aldéhydes ainsi que leurs homologues marqués qui serviront comme des étalons internes. Ensuite, la 3^{ème} partie sera consacrée en premier lieu à la mise au point de la méthode de dosage par UHPLC-MS/MS, à la préparation des étalons de calibration et des échantillons de contrôle de la qualité, à leur réduction et leur hydrolyse et, en deuxième lieu aux différentes étapes visant à la validation de la méthode selon des recommandations internationales. Ceci sera suivi par les résultats confirmant la validation totale de la méthode. Ce chapitre sera clôturé par une discussion sur l'intérêt apporté par la méthode développée et validée en vue d'autres méthodes préalablement publiées sur le dosage des adduits à l'ADN comme étant biomarqueurs d'exposition à la pollution de l'air et au stress oxydant.

I- Etat de l'art

Plusieurs adduits à l'ADN d'aldéhydes exogènes et endogènes ont été liés à diverses maladies, dont le cancer, et pourraient donc servir de biomarqueurs d'exposition et du processus cancérigène précoce. Ces biomarqueurs ont été identifiés comme cruciaux dans l'étude de l'exposome.

Étant donné que les adduits jouent un rôle important dans la génotoxicité des aldéhydes et se produisent à de très faibles concentrations *in vivo*, une méthode de quantification de ces adduits sensible et précise est nécessaire pour l'analyse d'une petite quantité d'ADN extraite à partir des échantillons humains. Récemment, la LC-MS/MS est devenue la méthode de choix pour la quantification des nucléosides modifiés tels que les adduits à l'ADN. Les deux principaux avantages du développement de la LC-MS/MS sont *i*) la possibilité de fournir tous les adduits exocycliques avec, dans ce cas, un gain de sensibilité par rapport à la méthode de référence le post-marquage au ^{32}P et *ii*) la proposition des méthodes de criblage pour identifier tout adduit à l'ADN.

Dans ce chapitre, nous présentons une nouvelle méthode sensible que nous avons développée et validée en utilisant la dilution isotopique en UHPLC-ESI-MS/MS, permettant la détection et la quantification simultanées de 9 adduits exocycliques dérivés des aldéhydes exogènes et endogènes, à savoir le FA, l'AA, l'Acro, le Croto, le MDA, le HNE, le Gx et le MG. La méthode a été validée conformément à la directive de l'Agence européenne des médicaments (EMA) sur la validation des méthodes bioanalytiques. Le but de cette étude est de pouvoir analyser le plus d'échantillons possible dans le minimum de temps et avec le plus de sensibilité possible. Cette étude vise également à établir des profils d'adduits exocycliques à l'ADN et peut servir dans des approches adductomiques.

II- Préparation des adduits

1. Réactifs

Les aldéhydes sont des composés volatils, hautement réactifs, et des agents cancérigènes et mutagènes connus. Ces composés ont été manipulés sous une sorbonne et à l'aide d'un équipement de protection individuelle (EPI) approprié.

La dG a été obtenue auprès d'Alfa Aesar. La [$^{13}\text{C}_{10}$, $^{15}\text{N}_5$] dG a été achetée chez Toronto Research Chemicals. L'Acro, le Croto, l'AA, le FA (37% dans l'eau), la solution de Gx (40% dans l'eau), la solution de pyruvaldéhyde (40% dans l'eau), le 4-hydroxynonéal-diméthylacétal (HNE-DMA), le 1,1,3,3-tétraéthoxypropane, le cyanoborohydrure de sodium (NaBH_3CN), l'ADN de thymus du veau (ADNct), la phosphatase alcaline I de l'intestin du veau, la phosphodiesterase I, la désoxyribonucléase II de type V de rate bovine et la nucléase P1 de *Penicillium Citrinum* ont tous été achetés auprès de Sigma-Aldrich. La phosphodiesterase II SPH a été obtenue auprès de Worthington Biochemical Co. Le phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4) a été acheté chez Fluka. L'eau, le méthanol, l'acide acétique glacial et l'acétonitrile ont tous été de qualité LC-MS et obtenus auprès de VWR.

2. Préparation des solutions mères

La solution de HNE a été préparée selon les instructions du fournisseur Sigma en faisant évaporer 1 ml du HNE-DMA sous un léger courant d'azote à la température ambiante, puis en ajoutant 1 ml de HCl froid (1 mM) et en agitant pendant 30 min à 4°C. La solution contient 5 mg de HNE (0,032 mmol) à un pH d'environ 3.

Le MDA a été obtenu par hydrolyse de 2,2 g de 1,1,3,3-tétraéthoxypropane (0,01 mole) avec 100 ml de HCl (0,1 M). Le mélange a été chauffé à 40°C pendant 40 min, puis le pH a été ajusté à 4,5 (Seto *et al.*, 1983). La solution est à 0,1 M de MDA.

Un mélange d'étalons internes a été préparé à 0,32 ng/ml de HNEdG marqué et à 1,6 ng/ml de tous les autres adduits marqués. Les solutions de dopage et leurs dilutions ont été préparées quotidiennement pour les expériences de validation. Toutes les solutions ont été stockées à -80 ° C.

2.1. Préparation des Adduits Standards

Les adduits standards ont été synthétisés selon des études précédentes (tableau 5). En résumé, la dG a été incubée avec l'aldéhyde dans un tampon phosphate (TP) sous agitation douce.

Tableau 5: Différentes conditions de synthèse des adduits

Adduit	Quantité de dG (mmol)	Quantité d'aldéhyde (mmol)	Volume du TP (mL)	Conditions d'incubation	Concentration du TP et pH	Références
AcrodG	0,2	2	20	37°C, 24 h	25 mM pH 7	Chung <i>et al.</i> , 1984
CrotodG	0,2	1	20	37°C, 24 h	25 mM pH 7	Chung et Hecht, 1983
AAdG	0,2	22,5	20	37°C, 24 h	25 mM pH 7	Wang <i>et al.</i> , 2000
FAdG	0,2	5,5	20	37°C, 24 h	25 mM pH 7	Cheng <i>et al.</i> , 2003
HNEdG	0,0064	0,032	1	37°C, 16 h	25 mM pH 7	Winter <i>et al.</i> , 1986
MDAdG	0,25	1,00	100	37°C, 10 days	0,1 M, pH 4,3	Seto <i>et al.</i> , 1983
GxdG	0,94	7,67	50	37°C, 90 min	0,1 M, pH 7	Chung et Hecht, 1985
cMGdG	0,03	0,06	20	25°C, 15 min	50 mM, pH 9,5	Shuck <i>et al.</i> , 2018
CEdG	0,03	0,03	20	25°C, 72 h	50 mM, pH 9,5	Shuck <i>et al.</i> , 2018

2.2. Réduction des adduits instables

Les adduits formés suite à la réaction de la dG avec le FA, l'AA et le MDA sont instables à l'état de désoxynucléosides, ce qui nécessite une étape supplémentaire de réduction. Chaque solution a été réduite juste après l'incubation par addition de NaBH₃CN et laissée au repos pendant 30 min à température ambiante. Un deuxième aliquot de NaBH₃CN a ensuite été ajouté et le mélange a été incubé à 37°C pendant 30 min. Cette procédure a été répétée une 2^{ème} fois comme décrit par Wang et ses collaborateurs (2000). L'ajout de NaBH₃CN conduit à la formation de N²-éthylidG, de N²-méthylidG et de 5,6-dihydro-M₁dG, les adduits stables de l'AA, du FA et du MDA, respectivement (Wang *et al.*, 2000 ; Lu *et al.*, 2010a ; Ma *et al.*, 2014). Par ailleurs, il est important de préciser que la réduction par NaBH₃CN n'a pas

modifié les adduits des 6 autres aldéhydes ou apporté la formation artéfactuelle d'autres adduits dans le milieu avant le dosage.

Les structures des aldéhydes et des adduits stables correspondants sont présentées dans la figure 26 ci-dessous.

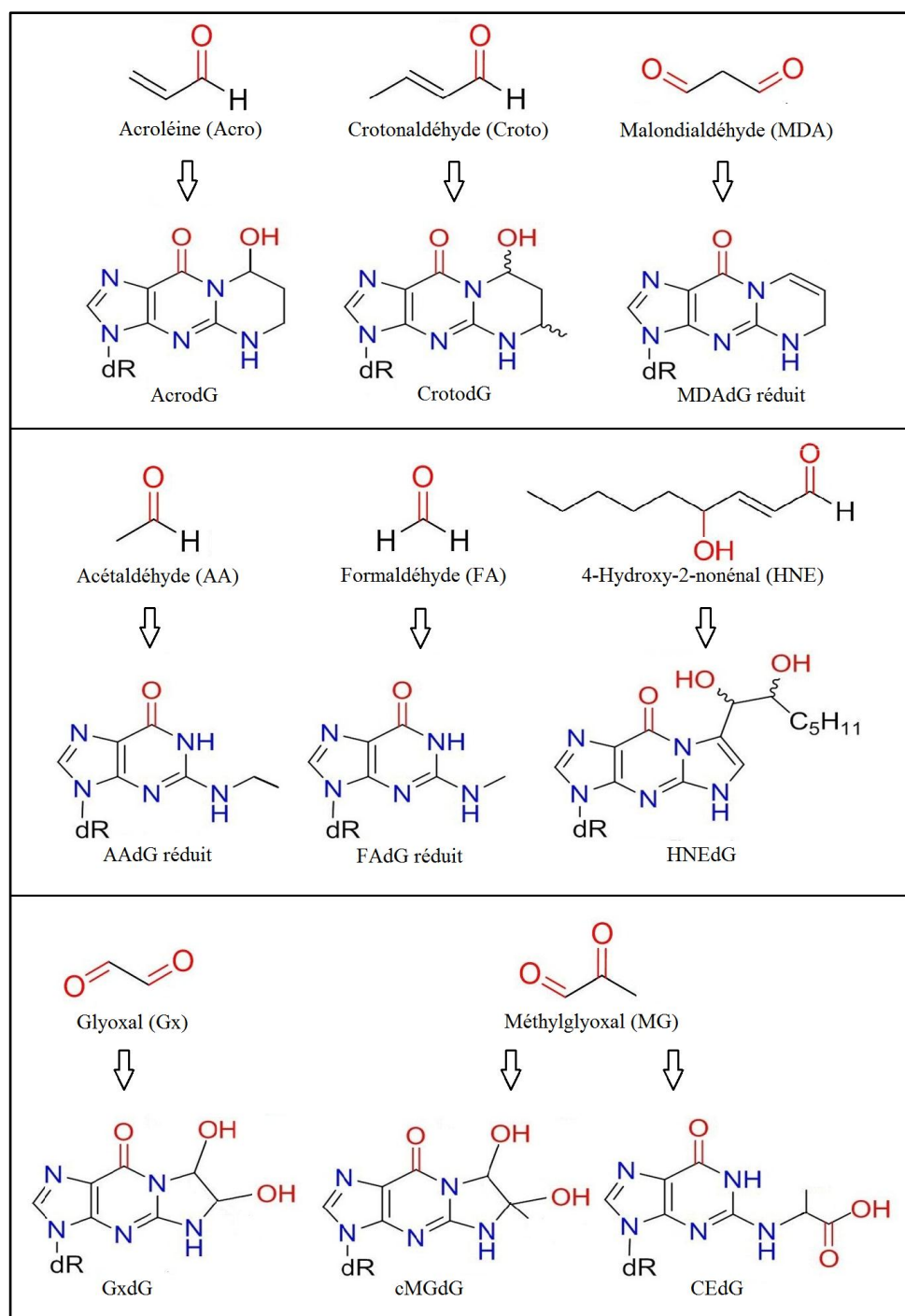


Figure 26: Structures des 8 aldéhydes et des 9 adduits stables correspondants
AcrodG, CrotoG, HNEdG, CEdG et cMGdG possèdent plusieurs stéréoisomères dépendant du site de cyclisation de l'aldéhyde avec la dG et de la configuration R/S aux différents stéréocentres.

2.3. Purification des adduits standards

La purification des adduits synthétisés a été réalisée par LC-UV selon différents systèmes (détaillés plus tard dans le paragraphe III-3 du chapitre 2). L'AcrodG, le FAdG, le MDAdG et le GxdG ont été purifiés selon le système 1 ; la dG a été éluée à 18 min, les isomères de l'adduit AcrodG ont été élués à des temps de rétention de 22,09 - 22,87 et 23,97 min, le N²-méthylG a été élué à 24,8 min, le 5,6-dihydro-M₁dG à 27,1 min et le GxdG à 15,7 min.

Tableau 6: Temps de rétention de la dG et des adduits synthétisés durant la purification

Adduits	Système de Purification	Temps de rétention de dG (min)	Temps de rétention de l'adduit (min)
AcrodG	1	18	22,09
			22,87
			23,97
CrotodG	2	8,7	11,25
			11,41
AAdG réduit	3	18	30,2
FAdG réduit	1	18	24,8
HNEdG	4	9	12,07
			12,2
			12,34
MDAdG réduit	1	18	27,1
GxdG	1	18	15,7
cMGdG	6	20,9	23,6
			24,6
CEdG	5	18	25
			25,9
			26,47
			27,12

Considérant les isomères de l'adduit CrotodG, ils ont été purifiés sur le système 2 ; la dG a été éluée à 8,7 min et les isomères du CrotodG ont été élués aux temps de rétention de 11,25 et 11,41 min. La purification de N²-éthylG a été effectuée sur le système 3 ; la dG a été éluée à 18 min et le N²-éthylG a été élué à 30,2 min. En outre, les isomères de l'adduit HNEdG ont été purifiés sur le système 4 ; la dG a été éluée à 9 min et les HNEdG ont été

élués aux temps de rétention de 12,07 à 12,2 et de 12,34 min. La purification des adduits CEdG a été effectuée sur le système 5 ; la dG a été élue à 18 min et les isomères du CEdG ont été élués à 25 ; 25,9 ; 26,47 et 27,12 min. Considérant la purification de l'adduit cMGdG, elle a été effectuée sur le système 6 ; la dG a été élue à 20,9 min et les isomères du cMGdG ont été élués aux temps de rétention de 23,6 et 24,6 min. Les temps de rétention de la dG et des adduits synthétisés ainsi que les systèmes de purification correspondant sont présentés dans le tableau 6. Les fractions contenant chaque adduit ont été combinées, suivies d'une concentration au Speedvac[®] et une quantification en LC-UV.

2.4. Quantification des adduits standards

La quantité et la pureté de chaque adduit synthétisé ont été vérifiées par LC-UV avec les mêmes conditions chromatographiques que leur purification, à l'exception du cMGdG et du HNEdG quantifiés sur les systèmes 5 et 7, respectivement. Connaissant les temps de rétention des adduits, les aires des pics ont été notées. Les isomères de l'adduit HNEdG ont été élués au temps de rétention de 8,25 à 8,38 min et de 8,75 min ; ceux du cMGdG ont été élués à 19,9 et 20,44 min. La quantité de chaque adduit purifié a été calculée selon l'équation 1 : $C_i = A_i / \epsilon_i k$ (A : aire du pic de l'adduit ; ϵ : coefficient d'extinction molaire de l'adduit ; k : constante de la réponse de l'instrument). Tout d'abord, ϵ de la dG a été calculé à de différentes longueurs d'onde allant du 253 à 260 nm. Pour cette raison, 2 séries de concentrations en dG (0,01 à 0,1 mM) ont été préparées dans de l'eau et dans un mélange eau/méthanol (50:50 v/v). A l'aide d'un spectrophotomètre, l'absorbance de chaque solution a été mesurée à toutes les longueurs d'onde. Des graphiques de l'absorbance en fonction de la concentration en dG ont été tracés pour obtenir la pente de la droite d'étalonnage et déterminer la valeur de ϵ de la dG à chaque longueur d'onde dans l'eau et dans le mélange eau/méthanol (50:50 v/v) en divisant la pente par la longueur d'onde selon la loi de Beer-Lambert. Pour chaque longueur d'onde, la moyenne des ϵ trouvée dans les deux matrices a été choisie pour le reste du calcul.

En LC-UV, une solution de dG (1 mM) a été injectée avec tous les systèmes de quantification des adduits et la surface de la dG a été notée pour calculer « k » en utilisant ϵ de la dG à chaque longueur d'onde selon l'équation 1. La moyenne de toutes les valeurs de k calculées a été ensuite utilisée pour quantifier les adduits synthétisés par LC-UV et pour déterminer la pureté de chaque solution en utilisant le coefficient d'extinction de chaque adduit. Les temps de rétention de la dG et des adduits synthétisés suivant chaque système de quantification et les coefficients d'extinction molaires correspondant sont présentés dans le tableau 7.

Tableau 7: Temps de rétention de la dG et des adduits synthétisés pendant la quantification et les coefficients d'extinction molaires correspondant

Adduits	Systèmes de quantification	Temps de rétention de dG (min)	Temps de rétention de l'adduit (min)	Longueur d'onde maximale (nm)	Coefficient d'extinction molaire (ϵ)	Références
AcrodG	1	18	22,09	259	16800	Zhang <i>et al.</i> , 2007
			22,87			
			23,97			
CrotodG	2	8,7	11,25	260	15600	Zhang <i>et al.</i> , 2006
			11,41		15700	
AAdG réduit	3	18	30,2	254	15000	Wang <i>et al.</i> , 2006
FAdG réduit	1	18	24,8	254	15000	Singh <i>et al.</i> , 2009
HNEdG	7		8,25	259	15100	Wacker <i>et al.</i> , 2000
			8,38			
			8,75			
MDAdG réduit	1	18	27,1	253	16400	Seto <i>et al.</i> , 1983
GxdG	1	18	15,7	254	11000	Kasai <i>et al.</i> , 1998
cMGdG	5	18	19,9	254	11000*	Kasai <i>et al.</i> , 1998
			20,44			
CEdG	5	18	25	255	12300	Synold <i>et al.</i> , 2008
			25,9			
			26,47			
			27,12			

* : le coefficient d'extinction molaire du GxdG a été utilisé pour déterminer la concentration en adduit cMGdG.

2.5. Préparation des standards marqués isotopiquement

Tous les standards marqués ont été synthétisés en petites quantités comme décrit dans le tableau 8. En bref, une solution à 1 mg/mL [$^{13}\text{C}_{10}$, $^{15}\text{N}_5$]dG a été incubée avec chaque

aldéhyde sous agitation constante à 37°C. Pour chaque adduit marqué synthétisé, 3 solvants ont été testés et le choix entre le TP, le *N,N*-diméthylformamide (DMF) et le diméthylsulfoxyde (DMSO) a été effectué en fonction du meilleur rendement et de la meilleure pureté de la synthèse de ces adduits. En vu d'éviter la polymérisation des aldéhydes dans le milieu, un léger courant d'azote était nécessaire juste avant l'incubation pour chasser l'O₂. Les adduits [¹³C₁₀, ¹⁵N₅]AAdG, [¹³C₁₀, ¹⁵N₅]FAdG et [¹³C₁₀, ¹⁵N₅]MDAdG synthétisés ont été réduits immédiatement par ajout de NaBH₃CN comme décrit dans le paragraphe II-2.2 de ce chapitre pour obtenir les adduits stables [¹³C₁₀, ¹⁵N₅]N²-éthylidG, [¹³C₁₀, ¹⁵N₅]N²-méthylidG et 5,6-dihydro-[¹³C₁₀, ¹⁵N₅]M₁dG, respectivement.

Tableau 8: Différentes conditions de synthèse des adduits marqués

Adduit marqué au [¹³C₁₀, ¹⁵N₅]	Quantité de [¹³C₁₀, ¹⁵N₅]dG (μmol)	Quantité d'aldéhyde (mmol)	Volume final (μL)	Condition d'incubation	Solvant
AcrodG	0,071	0,599	200	37°C, 24 h	DMSO
CrotodG	0,035	0,241	200	37°C, 24 h	TP 25 mM pH 7
AAdG	0,018	0,891	200	37°C, 24 h	TP 25 mM pH 7
FAdG	0,035	3,63	200	37°C, 24 h	TP 25 mM pH 7
HNEdG	0,035	0,003	200	37°C, 24 h	TP 25 mM pH 7
MDAdG	0,071	0,004	200	37°C, 24 h	TP 0,1 M, pH 4,3
GxdG	0,035	0,436	200	37°C, 90 min	DMF
cMGdG	0,071	0,033	200	37°C, 15 min	TP 50 mM, pH 9,5
CEdG	0,071	0,033	200	37°C, 72 h	TP 50 mM, pH 9,5

Les standards marqués ont été purifiés en LC-UV sur les mêmes systèmes que leurs homologues. Les fractions contenant chaque adduit marqué ont été combinées et concentrées au Speedvac[®] jusqu'à avoir un volume final de 200 μL approximativement. L'absence d'adduits non marqués a été vérifiée en LC-MS/MS ce qui correspond à la pureté de [¹³C₁₀, ¹⁵N₅]dG. La concentration finale de chaque adduit marqué a été évaluée par rapport à une solution à 100 ppb de leurs homologues non marqués.

III- Mise au point de la méthode de dosage

Les étapes de la préparation et l'analyse de l'ADN sont généralement présentées comme suit : tout d'abord, l'ADN est isolé de l'échantillon (des tissus, des cellules ou du sang) et ensuite, hydrolysé en nucléosides en utilisant un mélange d'enzymes ou en des nucléobases par traitement à l'acide modéré. Lorsque des enzymes sont utilisées, elles sont souvent éliminées par précipitation en utilisant un solvant organique ou en utilisant une cartouche filtrante. Les sels et autres substances hydrophiles sont généralement éliminés par extraction en phase solide ou par collecte de fractions sur une colonne HPLC. Les échantillons résultants sont concentrés par séchage et reconstitution en un petit volume et, analysés en LC-MS.

Le protocole de notre approche analytique pour les adduits à l'ADN induits par les aldéhydes est illustré dans la figure 27 ci-dessous.

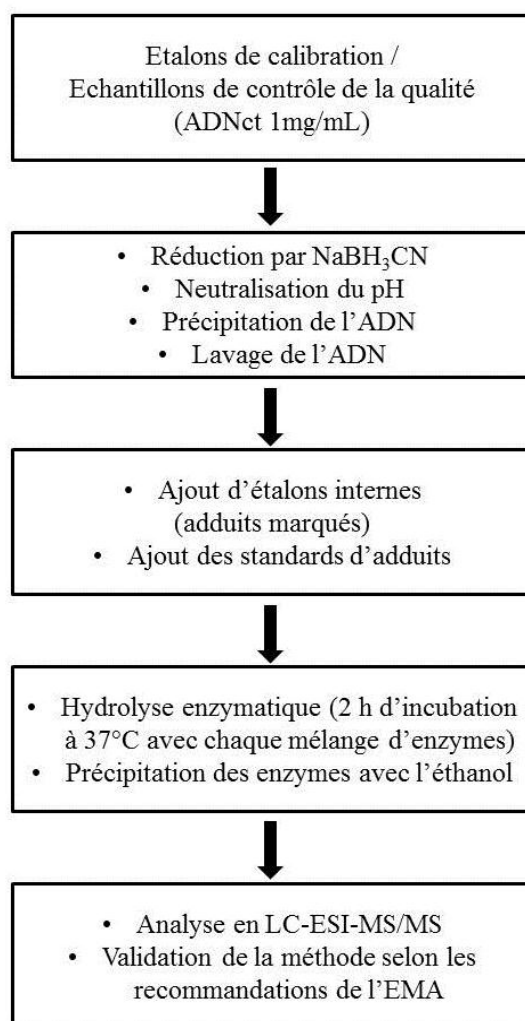


Figure 27: Représentation schématisée de l'approche analytique des adduits à l'ADN des aldéhydes

1. Préparation des étalons de calibration et des échantillons de contrôle de la qualité

Des étalons de calibration et des échantillons de contrôle de la qualité (QC) ont été préparés avec de l'ADN du thymus de veau (ADNct) à 1 mg/mL dans l'eau. Des aliquots de 50 µg d'un seul lot d'ADNct ont été réduits par addition du NaBH₃CN comme décrit ci-dessus. Le pH a été neutralisé par addition de 10 µL de NaOH (0,1 M). De l'éthanol a ensuite été ajouté à la solution et bien mélangé par retournement jusqu'à ce que l'ADN soit visible, puis centrifugé à 10000 rpm pendant 10 min à 4°C. L'ADN a été lavé avec 1 ml d'éthanol/eau (70:30 v/v) et centrifugé à nouveau à 10000 rpm pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a été éliminé et le culot a été séché au Speedvac[®], puis dissous dans 50 µL d'eau ultrapure. A tous les aliquots, 25 µL du mélange d'étalons internes ont été ajoutés. Des étalons de calibration à des concentrations de 0,25 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 ; 100 ; 175 et 250 ng/mL ont été préparés en ajoutant au mélange du blanc de matrice et d'étalons internes, 25 µL de différentes solutions mères. Pour déterminer la précision et l'exactitude inter- et intra-journalière, des échantillons de QC ont été préparés de la même manière à 4 niveaux, à la limite inférieure de quantification (LLOQ QC ; 5 ng/ml pour le GxdG, le cMGdG et le CEEdG et 0,25 ng/ml pour les 6 adduits restant), QC bas (0,4 ng/ml pour 6 adduits et 10 ng/ml pour le GxdG, le cMGdG et le CEEdG), QC moyen (2,5 ng/ml pour le MDAdG et 80 ng/ml pour les 8 autres adduits) et QC haut (80 ng/ml pour le MDAdG et 200 ng/mL pour les 8 autres adduits).

2. Hydrolyse enzymatique

Après dopage pour préparation des étalons de calibration et des QC, l'ADN a été hydrolysé enzymatiquement (Figure 28) par addition de 0,5 µL de phosphodiesterase II (0,1 U/µL), 0,5 µL de désoxyribonucléase II de rate de bovin (10 U/µL) et 1 µL de nucléase P1 de *Penicillium Citrinum* (1 U/µL) et 10 µL du tampon MNPDE (acide succinique et CaCl₂, pH 6). Le mélange a été incubé sous agitation douce pendant 2 heures à 37°C. Une seconde étape consistait à ajouter 0,2 µL de phosphatase alcaline (23 U/µL), 1 µL de phosphodiesterase I (0,03 U/µL) et 14 µL du tampon Palk 10X (EDTA et Trizma base, pH 8). De nouveau, le mélange a été incubé sous agitation douce pendant 2 heures à 37°C. La réaction est arrêtée par l'ajout de 8 µL de HCl (0,1 M), 13,5 µL de NaCl (5 mM) et de l'éthanol pour la précipitation des enzymes. Le mélange a été centrifugé à 10000 rpm pendant 10 min à 4°C. Le surnageant a été transféré dans un nouveau tube et évaporé à sec. L'ADN hydrolysé a été

reconstitué dans 20 μL d'eau de qualité HPLC et transféré dans des flacons HPLC contenant des inserts à faible volume pour l'analyse en LC-MS/MS. Le culot restant après hydrolyse est repris à l'eau ultrapure et dosé au NanoDrop™ (spectrophotomètre NanoDrop™ 2000 de Thermo Fisher Scientific) pour vérifier le bon fonctionnement de l'hydrolyse.

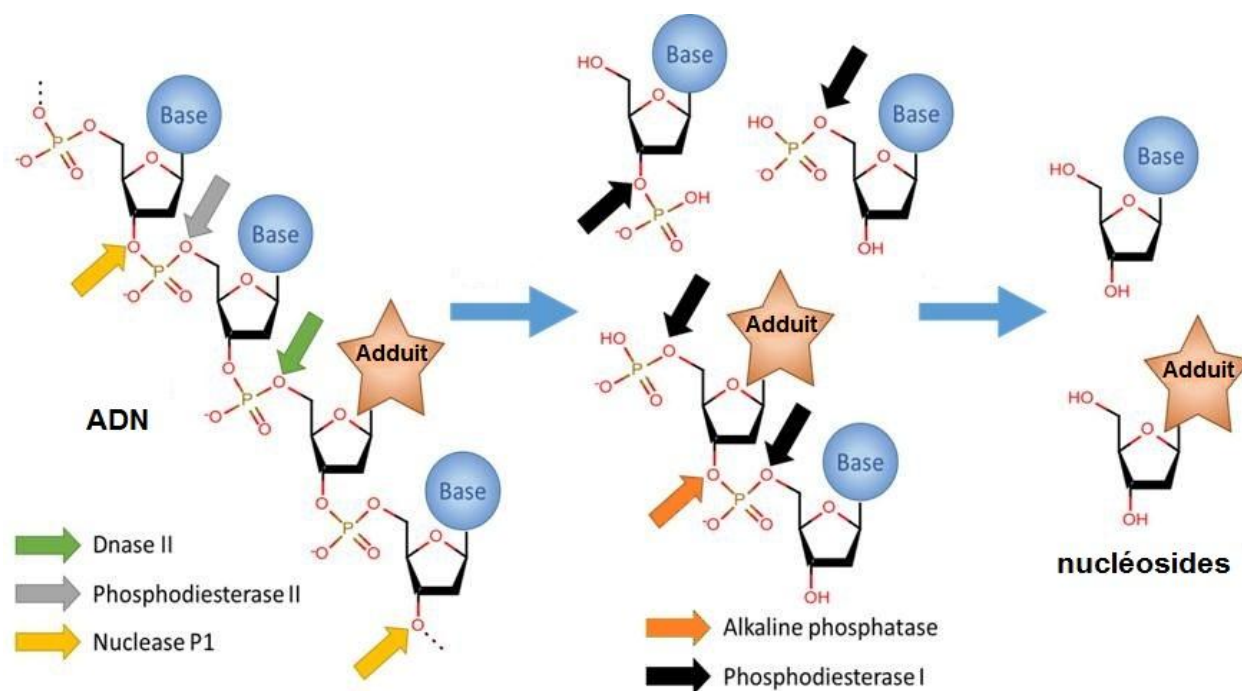


Figure 28: Hydrolyse enzymatique de l'ADN

3. Chromatographie liquide

La purification et la quantification des standards synthétisés ont été effectuées sur un système UHPLC Shimadzu équipé de 2 pompes Nexera X2 LC-30AD, d'une unité de dégazage DGU-20A5R et d'un détecteur UV/Vis prominence SPD-20A. L'instrument était équipé d'un injecteur Rheodyne et d'un four à colonne Varian ProStar. La colonne analytique utilisée pour la purification et la quantification des étalons était la colonne Atlantis® T3 OBD™ Prep 100Å, 10 x 250 mm, 5 μm (Waters, Irlande). Les phases mobiles étaient de l'eau (A) et du méthanol pur (B). La température de la colonne a été maintenue à 50°C et le débit était de 2 ml/min.

Différents systèmes de gradient d'élution ont été adaptés pour purifier et quantifier les adduits synthétisés :

- Le système 1 démarre avec 2% de B, suivi d'un gradient linéaire allant jusqu'à 20% de B à 15 min, maintenu pendant 5 min, suivi de 10 min à 80% de B, puis rééquilibré aux conditions de départ pendant 5 min. Le détecteur UV est réglé à 254 et 259 nm.
- Le système 2 démarre avec 20% de B, suivi d'un gradient linéaire allant jusqu'à 80% de B à 10 min, maintenu pendant 5 min, puis rééquilibré aux conditions de départ pendant 5 min. Le détecteur UV est réglé à 254 et 260 nm.
- Le système 3 démarre avec 2% de B, suivi d'un gradient linéaire allant jusqu'à 20% de B après 15 min, maintenu pendant 5 min, suivi d'un gradient linéaire allant jusqu'à 80% de B pendant 10 min, maintenu pendant 5 min et ensuite rééquilibré aux conditions de départ pendant 5 min. Le détecteur UV est réglé à 254 nm.
- Le système 4 démarre avec 20% de B, suivi d'un gradient linéaire allant jusqu'à 80% de B à 5 min, maintenu pendant 10 min, puis rééquilibré aux conditions de départ pendant 5 min. Le détecteur UV est réglé à 259 nm.
- Le système 5 démarre avec 2% de B, suivi d'un gradient linéaire allant jusqu'à 20% de B après 15 min, maintenu pendant 15 min, suivi d'un gradient linéaire allant jusqu'à 90% de B après 40 min, maintenu pendant 10 min, puis rééquilibré aux conditions de départ pendant 10 min. Le détecteur UV est réglé à 255 nm.
- Le système 6 démarre avec 2% de B, suivi d'un gradient linéaire allant jusqu'à 15% de B à 15 min, maintenu pendant 10 min, suivi de 5 min à 80% de B, puis rééquilibré aux conditions de départ pendant 5 min. Le détecteur UV est réglé à 254 nm.
- Le système 7 consiste en une élution isocratique de 80% de B. Le détecteur UV est réglé à 259 nm.

Le système UHPLC couplé au spectromètre de masse était équipé d'un module Shimadzu CBM-20A communications bus module, de 2 unités de dégazage DGU-20A_{5R}, d'un four à grande visibilité CTO-20AC, d'un auto-échantillonneur Nexera X2 SIL-30AC et de 2 pompes Nexera X2 LC-30AD. La colonne analytique utilisée pour la séparation des analytes était une colonne phase inverse C₁₈ Acquity UPLC[®] HSS C18 SB 1,0 x 150 mm, 1,8 μm (Waters, Irlande) avec les solvants suivants : la phase mobile A, acide acétique à 0,1% dans l'eau et la phase mobile B, acide acétique à 0,1% dans un mélange méthanol/acétonitrile (50:50 v/v). La température de la colonne a été maintenue à 50°C et le débit à 0,2 mL/min en utilisant un volume d'injection de 2,5 μL. Le gradient de la pompe d'élution augmente de 5% B jusqu'à 80% B en 2,5 min, maintenu pendant 1,5 min, puis rééquilibré aux conditions de départ pendant 3 min. Le temps total d'analyse est de 7 min.

4. Conditions de spectrométrie de masse

Le système de séparation s'interface avec une MS à triple quadripôle (LCMS-8030Plus, Shimadzu, Japon). La source d'ionisation par électrospray a été réglée en mode positif comme suit : débit de gaz de séchage, 10 L/min ; débit de gaz nébuliseur, 3 mL/min ; tension de cône, -4500 V ; température de source, 280°C et température de la ligne de désolvation, 150°C. L'azote était utilisé à la fois pour la nébulisation et la désolvation. De l'argon de haute pureté a été utilisé comme gaz de collision.

Chaque étalon a été vérifié individuellement par spectrométrie de masse en mode scan et analysé au moins trois fois en mode SIM avec un volume d'injection de 1 μL. Les ions pseudo-moléculaires correspondant à chaque étalon ont été caractérisés par leur m/z ($[M+H]^+$). Les énergies de collision ont été réglées à 10, 20 et 30 V pour le balayage des ions fils. Un MRM a ensuite été adopté pour optimiser les transitions des étalons. Les deux transitions les plus intenses ont été sélectionnées pour chaque standard en vue de son identification et sa quantification et une transition pour chaque étalon interne marqué. La fragmentation principale pour tous les adduits était de -116 amu et -121 amu, correspondant à la perte de la dR et de la dR marquée, respectivement. Les paramètres de transition de masse et MRM optimisés sont présentés dans le tableau 9.

Tableau 9: Paramètres de transition de masse et MRM optimisés pour chaque adduit

Aldéhydes	Adduits	Q1	Q3	Energie de collision (eV)
Acro	AcrodG	324,1	208,1	-11
			190,2	-28
	AcrodG marqué	339	218	-11
Croto	CrotodG	338	222,1	-13
			178,1	-27
	CrotodG marqué	353	232	-13
AA	AAdG	296,1	180,2	-11
			163,1	-31
	AAdG réduit marqué	311	190	-11
FA	FAdG	282,1	166	-10
			149,1	-32
	FAdG réduit marqué	297	176	-10
HNE	HNEdG	424	308,2	-13
			152,2	-27
	HNEdG marqué	439	318	-13
MDA	MDAdG	306,1	190,1	-11
			135,1	-39
	MDAdG réduit marqué	321	200	-11
Gx	GxdG	326,1	210	-11
			164,2	-29
	GxdG marqué	341	220	-11
MG	cMGdG	340,2	224,1	-10
			152,1	-32
	cMGdG marqué	355	234	-10
	CEdG	340,1	224	-12
			177,9	-18
CEdG marqué	355	234	-12	

5. Validation

La validation de la méthode développée a été effectuée, conformément aux directives de l'Agence européenne des médicaments (EMA) sur la validation des méthodes bioanalytiques (EMA, 2011), pour la sélectivité, la contamination, les limites de quantification, la précision et l'exactitude inter- et intra-journalières, les effets matriciels et la linéarité.

Étant donné que les adduits d'ADN formés par les aldéhydes sont naturellement présents dans l'ADN, l'étalonnage par gamme matrice avec une correction par les étalons internes a été sélectionné dans cette méthode. Les solutions d'étalons ont été ajoutées à un seul lot d'ADNct réduit comme décrit dans le paragraphe II-2.2 de ce chapitre. Une quantité suffisante d'ADN réduit homogène a été utilisée pour toutes les solutions de validation afin d'éviter la variabilité des résultats due à l'inhomogénéité.

5.1. Sélectivité

La première étape de la validation de la méthode consiste à évaluer la sélectivité de la méthode. Cette dernière devrait être capable de différencier les analytes d'intérêt et les SI des composants endogènes de la matrice. Un étalon interne devrait être utilisé et devrait de préférence être un standard associé avec un temps de rétention proche de celui de l'analyte. Il doit être ajouté à la fraction à analyser au début de l'expérience et doit avoir une forme appropriée, particulièrement adaptée à la détection par MS. L'analyte doit éluer au temps de rétention caractéristique de l'étalon correspondant dans les mêmes conditions expérimentales. Les critères d'identification, spécifiés dans la décision de la Commission n° 2002/657/CE, consistent également en la présence de 4 points d'identification : les transitions de l'ion précurseur et 2 ions fils (Commission Decision No. 2002/657/EC).

5.2. Contamination

La contamination a été évaluée en injectant du méthanol après la limite supérieure de quantification (ULOQ). Les pics des analytes ne devraient pas dépasser 20% de la LLOQ et 5% pour les étalons internes.

5.3. Limites de quantification

La limite inférieure de quantification (LLOQ) est la plus faible concentration d'analyte dans un échantillon pouvant être quantifiée. Sachant que la matrice contient presque tous les analytes, les aires des pics des étalons de calibration les plus bas des courbes d'étalonnage de

l'ADN ont été prises en compte pour une analyse de régression et la LLOQ a été définie comme l'étalon de calibration le plus bas avec une précision acceptable (< 20%).

5.4. Exactitude et précision

Pour déterminer l'exactitude et la précision intra-analyse (intra-journalière) et entre analyses (entre les journées), les échantillons de QC ont été analysés selon 4 niveaux (LLOQ QC, QC bas, QC moyen et QC haut) par rapport aux courbes d'étalonnage. Pour déterminer la précision intra-journalière, un minimum de 5 échantillons par QC a été analysé en un seul cycle et les concentrations obtenues ont été comparées à la valeur nominale (en pourcentage). La précision à l'intérieur du cycle était exprimée par le coefficient de variation (CV) entre les mesures individuelles répétées de l'analyte. Alors que les QC d'au moins 3 analyses effectuées sur au moins 2 jours différents ont été évalués et un calcul similaire à celui décrit ci-dessus a vérifié l'exactitude et la précision entre les analyses. Les critères d'acceptation pour les analyses à la fois inter- et intra-journalières étaient de $\pm 20\%$ pour LLOQ QC et de $\pm 15\%$ pour les autres niveaux de QC.

5.5. Effets de matrice

Les effets de matrice ont été étudiés en calculant le rapport des pentes des courbes d'étalonnage des analytes en présence de la matrice aux pentes des courbes d'étalonnage des analytes en l'absence de la matrice. Pour cette raison, des étalons de calibration aux mêmes niveaux de concentration ont été préparés en ajoutant à l'eau 25 μL du mélange d'étalons internes et 25 μL de différentes solutions mères d'étalons. Les courbes d'étalonnage ont été obtenues en traçant l'aire du pic de chaque analyte par rapport aux concentrations des standards. Par conséquent, le rapport des deux pentes exprimait le facteur de matrice (FM). En outre, le FM normalisé étalon interne a également été calculé en divisant le FM de l'analyte par le FM de l'étalon interne, de la même manière que ci-dessus, mais en traçant l'aire du pic de chaque analyte sur son étalon interne marqué correspondant.

5.6. Linéarité

Afin de déterminer la linéarité de la méthode, des étalons de calibration ont été préparés dans une matrice (l'ADNct) pour une gamme allant de 0,25 ng/mL à 250 ng/mL. L'analyse a été réalisée en plusieurs fois ; plus de trois essais de validation ont été construits pour établir une courbe d'étalonnage dans l'ADN acceptable pour chaque adduit au moins trois jours de

validation. Le logiciel Shimadzu LabSolutions (version 5.86 SP1) a été utilisé pour tracer les courbes d'étalonnage et calculer les concentrations en adduits. Les courbes d'étalonnage ont été obtenues en traçant le ratio des aires des pics de chaque analyte sur son étalon interne marqué correspondant par rapport aux concentrations des étalons de calibration. Les concentrations recalculées des étalons de calibration doivent être comprises dans une gamme de $\pm 15\%$ de la valeur nominale, à l'exception de la LLOQ pour laquelle elles doivent être comprises dans une gamme de $\pm 20\%$. Au moins 75% des étalons de calibration, avec au moins six niveaux d'étalons, devraient satisfaire à ce critère.

6. Résultats

La méthode développée a été validée en termes de sélectivité, d'absence de contamination, de limites de quantification, de précision et exactitude inter- et intra-journalières, des effets de la matrice et de linéarité.

6.1. Sélectivité

La méthode est capable de différencier les analytes d'intérêt et les étalons internes des composants endogènes de la matrice puisqu'une forme marquée par un isotope stable a été utilisée pour chaque analyte en tant qu'étalon interne, ce qui convient particulièrement à la détection par MS. Il a été ajouté à la matrice d'ADN au début de l'expérience avant l'étape d'hydrolyse et avait un temps de rétention très proche de l'analyte correspondant. De plus, les analytes ont été identifiés par la présence de 4 points de confirmation : l'ion précurseur et les 2 ions fils figurant dans une transition de quantification et une seconde transition de confirmation pour chaque analyte. La figure 29 montre le chromatogramme du standard de calibration 100 ng/mL.

6.2. Contamination

Aucun pic chromatographique significatif supérieur à 20% de la réponse à la LLOQ et à 5% de la réponse de l'étalon interne n'a été détecté lors de l'analyse des adduits et des étalons internes dans une injection de méthanol après l'injection de l'ULOQ. Ces résultats confirment l'absence de contamination.

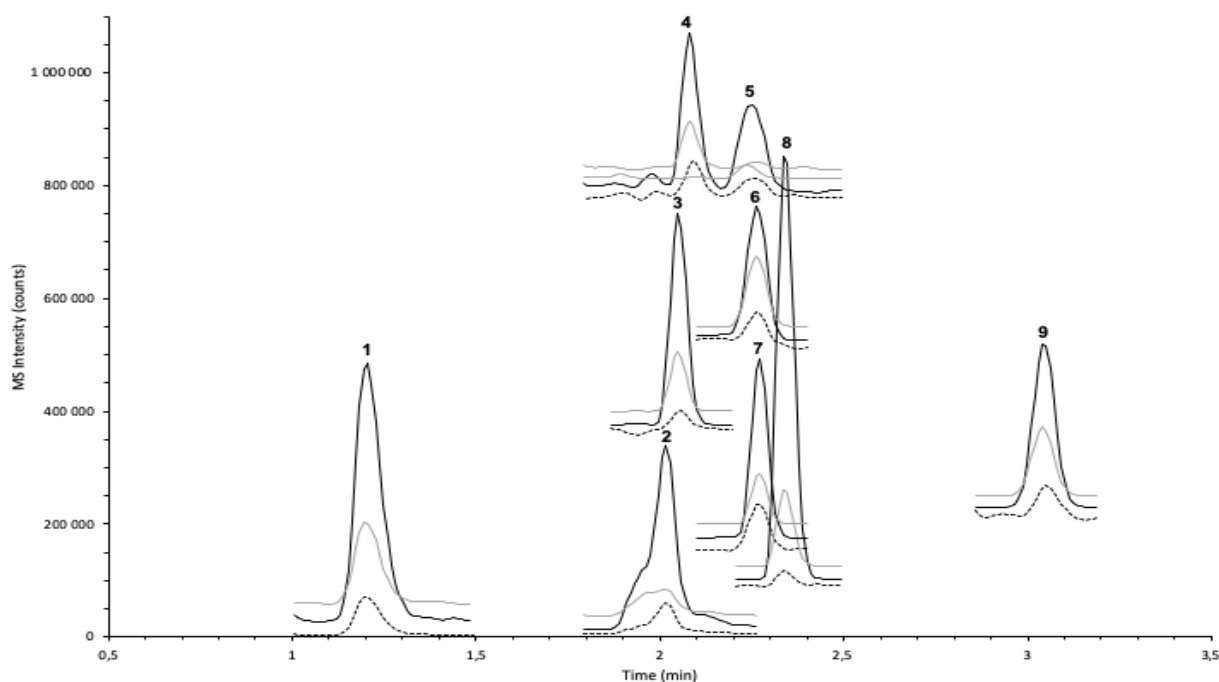


Figure 29: Chromatogramme en UHPLC-ESI-MS/MS du standard de calibration 100 ng/mL. Pour chaque pic, les lignes pointillées correspondent aux étalons internes marqués au $^{15}\text{N}_5$, $^{13}\text{C}_{10}$, les lignes noires et grises correspondent à la 1^{ère} et 2^{ème} transition en MRM dans le tableau 9. Pic : 1. GxdG, 2. AcrodG, 3. FAdG réduit, 4 et 5. CEEdG, 6. CrotodG, 7. AAdG réduit, 8. MDAdG réduit, 9. HNEdG.

6.3. Exactitude et précision

L'exactitude et la précision ont été déterminées pour chaque adduit par l'évaluation des QC dans une seule analyse et entre trois analyses différentes. Elles étaient toutes comprises entre $\pm 20\%$ pour LLOQ QC et $\pm 15\%$ pour les autres niveaux de QC, comme le montrent les tableaux 10 et 11 pour les évaluations inter- et intra-journalières, respectivement.

6.4. Limites de quantification

La LLOQ des six adduits suivants : l'AcrodG, le CrotodG, l'AAdG réduit, le FAdG réduit, le HNEdG et le MDAdG réduit est 0,25 ng/mL. Alors que le CEEdG, le cMGdG et le GxdG ont été quantifiés à partir de 5 ng/mL. Les valeurs de la précision et l'exactitude ne dépassaient pas $\pm 20\%$.

6.5. Effets de matrice

Le CV du FM normalisé étalon interne ne dépassait pas $\pm 14\%$ pour tous les adduits sauf pour le FAdG réduit, pour lequel le FM normalisé étalon interne variait de $\pm 41\%$. Par

conséquent, nous avons choisi de quantifier les adduits par rapport aux étalons de calibration préparés dans la matrice d'ADN et dopés de la même quantité d'étalons internes.

Tableau 10: Exactitude et précision inter-journalières (n = 9)

Adduits	Inter-journalières (n = 9)		Concentration			
			LLOQ QC	QC bas	QC moyen	QC haut
AcrodG	Exactitude	% min	-18,59	-14,91	-12,71	-8,68
		% max	18,86	14,90	2,95	14,25
	Précision	CV	16,17	13,14	5,18	8,61
CrotodG	Exactitude	% min	-8,56	-11,23	-11,19	-2,41
		% max	18,05	13,73	9,83	12,32
	Précision	CV	8,80	10,31	7,48	5,28
AAdG réduit	Exactitude	% min	-15,42	-14,95	-6,89	-8,12
		% max	18,67	14,23	2,88	5,51
	Précision	CV	14,17	11,33	2,98	4,44
FAdG réduit	Exactitude	% min	-11,38	-14,98	-7,21	2,80
		% max	10,46	14,62	8,68	13,71
	Précision	CV	7,37	11,73	5,95	6,43
HNEdG	Exactitude	% min	-19,14	-11,41	-14,99	-8,26
		% max	15,48	12,28	6,67	14,66
	Précision	CV	12,03	8,50	7,76	8,29
MDAdG réduit	Exactitude	% min	-18,97	-10,75	-12,08	-14,86
		% max	19,11	14,08	7,66	14,32
	Précision	CV	13,17	8,97	6,90	11,86
GxdG	Exactitude	% min	-17,03	-13,43	-12,07	-14,90
		% max	14,74	14,46	14,48	7,21
	Précision	CV	9,29	10,88	11,27	8,69
cMGdG	Exactitude	% min	-12,34	-11,73	-13,10	-13,75
		% max	14,03	14,20	13,11	11,06
	Précision	CV	8,17	9,11	8,63	9,31
CEdG	Exactitude	% min	-17,47	-14,40	-12,15	-8,94
		% max	13,75	14,56	11,85	14,46
	Précision	CV	10,16	10,20	7,62	7,86

Tableau 11: Exactitude et précision intra-journalières (n = 5)

Adduits	Intra-journalières (n = 5)		Concentration			
			LLOQ QC	QC bas	QC moyen	QC haut
AcrodG	Exactitude	% min	-18,59	-14,91	-7,36	-7,45
		% max	13,84	14,82	3,13	14,25
	Précision	CV	16,03	13,01	4,12	7,91
CrotodG	Exactitude	% min	-7,23	-11,23	-1,91	7,97
		% max	15,53	12,84	12,28	14,75
	Précision	CV	7,81	9,53	5,45	2,20
AAdG réduit	Exactitude	% min	-14,98	-14,95	-1,21	-4,23
		% max	19,38	9,09	2,36	5,51
	Précision	CV	13,23	10,72	1,37	4,07
FAdG réduit	Exactitude	% min	-5,03	-13,73	-5,79	0,40
		% max	12,75	14,46	8,68	13,71
	Précision	CV	6,83	11,46	5,69	6,22
HNEdG	Exactitude	% min	-20,00	-11,41	-10,58	-5,16
		% max	-1,89	12,28	6,67	9,15
	Précision	CV	9,13	8,45	7,66	6,19
MDAdG réduit	Exactitude	% min	-18,97	-10,65	-8,14	-13,30
		% max	6,95	5,23	7,51	12,45
	Précision	CV	11,74	6,02	6,56	11,49
GxdG	Exactitude	% min	-5,31	-4,47	-12,07	-13,26
		% max	10,24	5,33	13,92	1,90
	Précision	CV	5,59	3,54	11,13	7,85
cMGdG	Exactitude	% min	-5,18	-11,73	-13,10	-9,68
		% max	3,68	8,66	5,28	9,56
	Précision	CV	3,56	8,19	7,23	8,14
CEdG	Exactitude	% min	-10,98	-8,23	0,97	-3,66
		% max	12,19	13,10	11,85	5,20
	Précision	CV	9,20	8,11	4,50	3,49

6.6. Linéarité

La linéarité a été évaluée par le biais de trois cycles de validation. Dans chaque cas, une courbe d'étalonnage dans l'ADNct a été établie par analyte, tracée en fonction de son étalon interne marqué correspondant. Cependant, nous avons choisi d'utiliser le [$^{13}\text{C}_{10}$, $^{15}\text{N}_5$]FAdG pour établir la linéarité de l'AAdG sachant que son étalon interne correspondant était toujours utilisé pour identifier l'adduit. De manière similaire, le [$^{13}\text{C}_{10}$, $^{15}\text{N}_5$]CrotodG a servi à établir la linéarité du GxdG et du cMGdG et, leurs homologues marqués ont permis de déterminer le temps de rétention des adduits. Toutes les courbes d'étalonnage ont été linéaires pondérées de 1/X et les concentrations recalculées des étalons de calibration, avec un minimum de six niveaux, se situaient dans les limites de $\pm 15\%$ de la valeur nominale (les valeurs maximales sont indiquées dans le tableau 12), à l'exception de la LLOQ pour laquelle elles étaient comprises dans les $\pm 20\%$. La linéarité a été obtenue pour une gamme allant de 0,25 ng/mL à 250 ng/mL pour l'AcrodG, le CrotodG, l'AAdG réduit et le FAdG réduit. Alors que, pour le MDAdG réduit, elle couvrait une gamme allant de 0,25 ng/mL à 100 ng/mL. Et pour le GxdG, le cMGdG et le CEEdG, la linéarité a été déterminée de 5 ng/mL à 250 ng/mL.

Tableau 12: Biais maximal des concentrations recalculées des étalons de calibration par rapport à la valeur nominale

Adduits	Biais maximal
AcrodG	14,45
CrotodG	13,56
AAdG réduit	14,62
FAdG réduit	13,65
HNEdG	14,84
MDAdG réduit	14,64
GxdG	14,74
cMGdG	14,99
CEEdG	14,98

IV- Discussion

Étant donné l'implication des adduits exocycliques à l'ADN dans la biosurveillance de l'évaluation du risque, de nombreuses méthodes en UHPLC-ESI-MS/MS ont été mises au point pour leur détection et leur quantification simultanées. Churchwell *et al.* (2002) ont mis au point une méthode de quantification simultanée de 4 adduits dont l'un est l'adduit non réduit du MDA, tandis que Yin *et al.* (2013) ont réussi à séparer et à quantifier les adduits de l'Acro à la dG, la dC et la dA ainsi que leurs isomères. De même, Zhang *et al.* (2016) ont développé une méthode pour quantifier les deux diastéréoisomères du CrotodG. Seize adduits à l'ADN ont été analysés simultanément dans des échantillons de biopsie pulmonaire humaine, la plupart d'entre eux étant des éthéno-adduits avec un adduit exocyclique correspondant à l'adduit non réduit du MDA (Monien *et al.*, 2015). Toutes ces méthodes utilisaient des étalons internes marqués de chaque adduit de manière isotopique, mais à notre connaissance, aucune d'entre elles n'était entièrement validée conformément aux directives internationales.

Pour cette raison, nous avons synthétisé des étalons d'adduits comme décrit dans de nombreuses études antérieures et leurs homologues marqués isotopiquement ont été préparés de la même manière, mais à petite échelle. Les adduits synthétisés sont chimiquement stables lorsqu'ils sont présents dans l'ADN ; cependant, ceux formés par l'AA, le FA et le MDA sont considérés instables une fois l'ADN est hydrolysé en 2'-désoxynucléosides (Wang *et al.*, 2000). Pour cela, l'étape de réduction en utilisant NaBH₃CN était essentielle pour quantifier les adduits instables via la quantification de leurs adduits correspondants réduits (Wang *et al.*, 2006).

Le choix de la colonne, le solvant en LC, le type et la concentration du tampon sont tous des aspects critiques pour une bonne chromatographie, mais aussi pour améliorer la sensibilité de la MS (Yin *et al.*, 2013 ; Guo et Turesky, 2016). Un des points les plus critiques dans le développement de la méthode est la séparation des adduits d'ADN des quatre nucléosides normaux. En effet, même si une détection par MS est utilisée, la différence typique de concentrations entre les nucléosides normaux et les adduits d'ADN est comprise entre 10⁶ et 10⁹. Dans cette situation, un léger recouvrement des pics chromatographiques correspondant à l'adduit à l'ADN avec ceux des nucléosides normaux entraînera une grave suppression de l'ionisation des adduits à l'ADN. Ainsi, le développement de protocoles analytiques spécifiques pour la quantification des adduits d'oxydation en LC-ESI-MS/MS a évolué

rapidement ces dernières années et a généré des progrès scientifiques significatifs (Churchwell *et al.*, 2002). La plupart des méthodes de séparation des adduits d'aldéhydes à l'ADN décrites dans la littérature utilise la chromatographie en phase inverse sur une colonne C₁₈. La méthode utilisant une colonne UHPLC de particules inférieures à 2 µm (Zhang *et al.*, 2016) permet une séparation rapide, tandis que les colonnes HPLC supérieures à 2 µm entraînent un temps d'analyse plus long, généralement autour de 30 min (Churchwell *et al.*, 2002 ; Singh *et al.*, 2009 ; Lu *et al.*, 2011).

Afin d'accroître la sensibilité des méthodes, certains auteurs ont introduit la commutation de colonne en ligne, la séparation capillaire, et le nanoESI permettant de détecter un adduit dans 10⁹ nucléotides à l'aide de 1 à 10 µg d'ADN (Klaene *et al.*, 2013). Cette approche a été utilisée avec succès pour déterminer les adduits à l'ADN dérivés du stress oxydant et de la LPO (Singh et Farmer, 2006). Churchwell *et al.* (2002) ont rapporté l'analyse simultanée de quatre adduits d'ADN dérivés de la LPO et du stress oxydant dans des hydrolysats d'ADN de 100 µg ou moins, en utilisant une préparation d'échantillons en ligne couplée à la LC-MS. Cette méthode a permis de quantifier les adduits à des niveaux inférieurs à un adduit dans 10⁸ nucléotides normaux dans du tissu hépatique de rat et humain normal non traité. Singh *et al.* (2009) ont mis au point une méthode sensible en LC-MS/MS à commutation de colonne en ligne qui a permis la détection, en fonction de la dose, de l'AAAdG réduit dans l'ADN exposé à la fumée de cigarette de cannabis. Dans une étude précédente, la quantité de FAdG non réduit dans l'ADN nasal de rats exposés au [¹³CD₂]FA avait été quantifiée par une méthode très sensible de nano-UHPLC-MS/MS avec une limite de détection de 20 amol sur une préconcentration en ligne avec une colonne analytique C₁₈ (Lu *et al.*, 2011). Néanmoins, ces techniques conduisent à de longs temps d'analyse (jusqu'à 50 min) dus à la technique préconcentration en ligne et au long temps de rétention en LC capillaire. Yin *et al.* (2013) ont rapporté l'effet d'additifs en phase mobile pour la détection des adduits de l'Acro à l'ADN par LC-ESI-MS/MS par chromatographie en phase inverse. Dans leur rapport, l'optimisation de l'additif dans la phase mobile a augmenté les intensités ESI-MS de 2,3 à 8,7 fois. Zhang *et al.* (2016) ont également signalé l'influence de l'additif sur les adduits CrotodG. Ils ont développé une approche sensible pour la quantification précise des adduits CrotodG en utilisant une analyse UHPLC-MS/MS par dilution isotopique sur une colonne C₁₈ (2,1 mm de large x 50 mm, 1,8 µm). Les limites de détection (LLOD, S/N = 3) et de quantification (LLOQ, S/N = 10) ont été estimées à environ 50 amol et 150 amol, respectivement. En utilisant cette méthode, les deux diastéréoisomères des adduits CrotodG ont été détectés dans une lignée de cellules humaines non traitées à une fréquence de 0,24 - 0,35 adduits par 10⁷

nucléotides. Il est intéressant de noter que le bicarbonate d'ammonium semble être le meilleur choix pour la séparation des stéréoisomères des adduits de l'Acro et du Croto par rapport à l'acide formique et à trois tampons volatils d'ammonium (Yin *et al.*, 2013 ; Zhang *et al.*, 2016).

Récemment, la chromatographie d'interaction hydrophile (HILIC) a gagné en intérêt, en tant qu'alternative à la chromatographie en phase inverse, car ce mode chromatographique est capable de séparer des composés organiques hydrophiles et polaires (Murakami *et al.*, 2018). Trois colonnes disponibles dans le commerce, contenant trois types différents de phases stationnaires possédant différents types de groupes fonctionnels (aminopropyle, dihydroxypropyle et carbamoylé) liés à la surface de la silice, ont été examinées pour la séparation de quatre désoxynucléosides normaux avec les deux adduits à l'ADN en utilisant la phase mobile optimisée pour la détection en ESI-MS. Outre la capacité de séparation des composés hydrophiles, les phases mobiles utilisées dans la séparation HILIC sont généralement riches en solvants organiques, et cette composition de solvant convient pour améliorer l'efficacité de l'ionisation dans le processus ESI en améliorant l'efficacité de la désolvatation (Sentkowska *et al.*, 2016). Une amélioration de la sensibilité pour une variété de composés dans HILIC-ESI-MS/MS a été rapportée par comparaison à la LC-ESI-MS/MS en phase inverse (Periat *et al.*, 2014). Néanmoins, pour obtenir une bonne séparation, le gradient devait durer au moins 20 min pour éluer dG (Murakami *et al.*, 2018). Un autre inconvénient de l'utilisation de HILIC est le long temps nécessaire pour équilibrer la colonne après le gradient. Cela conduit à des temps d'analyses longs incompatibles avec un grand nombre d'échantillons.

Ainsi, nous avons sélectionné la colonne Acquity UPLC® HSS C18 SB (1,0 x 150 mm, 1,8 µm) pour notre séparation. Cette colonne UHPLC est une silice synthétique de haute résistance, greffée avec C₁₈, qui permettait une analyse de durée d'exécution de 7 min avec une bonne séparation des adduits à l'ADN des nucléosides normaux (Figure 29). Dans ce travail, l'objectif était de permettre une méthode rapide pour l'analyse simultanée d'adduits à l'ADN formés à partir de 8 aldéhydes dédiés à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Ainsi, pour obtenir une meilleure sensibilité, nous avons mis en place la séparation en combinant plusieurs pics correspondant à des isomères du même produit d'addition dans un pic, de l'acide acétique à 0,1% (v/v) a été choisi comme additif dans les deux phases mobiles après comparaison avec d'autres concentrations de cet acide et de l'acide formique. Le gradient d'élution a été ajusté pour minimiser le temps d'analyse sans perdre la résolution et la sensibilité des pics.

En ce qui concerne l'optimisation des conditions spectrométriques de masse dans notre étude, la transition la plus intense a été celle de la perte du fragment dR et de dR marquée pour tous les adduits et tous les standards internes, respectivement. Cela correspondait aux études précédentes. Il a été choisi pour la quantification des adduits en injectant 2,5 μL d'échantillons ou d'étalons de calibration à partir de 50 μg d'ADN. Dans les méthodes précédemment développées, 15 μL étaient injectés à partir de 20 μg de solution d'ADN (Yin *et al.*, 2013) ; ces conditions ont été améliorées à 2 μL d'une solution d'ADN à 5 μg (Zhang *et al.*, 2016).

Notre méthode est la première à quantifier simultanément 9 adduits d'ADN à partir d'aldéhydes en établissant la gamme de calibration dans l'ADN. En effet, toutes les méthodes publiées utilisant des courbes d'étalonnage préparaient leurs étalons dans de l'eau. La LLOQ a été déterminée pour l'AcroG à 0,25 ng/ml, ce qui correspond à un niveau de 2,4 adduits pour 10^7 nucléotides normaux. Liu *et al.* (2005) ont quantifié l'AcroG à partir de 0,02 ng/ml, sachant que leur méthode ne détectait qu'un seul adduit à l'aide d'une courbe d'étalonnage dans l'eau. La sensibilité de détection a été améliorée d'un facteur 5 lorsque le bicarbonate d'ammonium a été utilisé pour détecter simultanément 4 adduits de l'Acro avec la dG, la dC et la dA (Yin *et al.*, 2013). Dans la même publication, un effet de matrice de 80% a été évalué sur quelques échantillons. Lors de la validation de notre méthode, en ajoutant les adduits d'ADN au début de la procédure de préparation des échantillons, les effets de matrice et les récupérations d'extraction ont été évalués sur des courbes d'étalonnage comprises entre 14% et 41%, soulignant la nécessité de quantifier à partir des calibrateurs extraits d'ADN. Par conséquent, des étalons de calibration préparés dans la matrice d'ADN ont été utilisés pour quantifier les adduits. De même, en comparant avec des études antérieures, notre méthode validée est moins sensible que d'autres méthodes, car ces dernières utilisaient des étalons de calibration dans l'eau. Les LLOQ des adduits CrotoG, HNEdG, AAdG réduit, FAdG réduit et MDAdG réduit étaient de 2,3, 1,8, 2,6, 2,7 et 2,5 par 10^7 nucléotides normaux, respectivement correspondant à 0,25 ng/ml pour chaque adduit dont l'ordre de grandeur est au moins équivalent à celui des études précédentes si la sensibilité instrumentale est prise en compte (Churchwell *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2006 ; Singh *et al.*, 2009 ; Lu *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2016). Nous avons dû augmenter la LLOQ pour les 3 adduits restants GxdG (LLOQ = 5 ng/mL correspondant à 47,5 adduits par 10^7 nucléotides normaux), cMGdG et CEdG (LLOQ = 5 ng/mL correspondant à 45,5 adduits par 10^7 nucléotides normaux) car ils sont présents dans l'ADN à une concentration plus élevée, ce qui

diminue la précision et l'exactitude. Mais cela signifie que des niveaux plus élevés de ces adduits pourraient être présents dans l'ADN.

En conclusion, notre méthode est la toute première méthode validée permettant de détecter et de quantifier simultanément 9 adduits exocycliques à l'ADN formés à partir de 8 aldéhydes. Elle peut être facilement étendue à la quantification d'autres adduits dans l'avenir.

III. Chapitre 3 : Etude *in vitro* des adduits à l'ADN des aldéhydes

Le troisième chapitre sera subdivisé en 2 grandes parties. La 1^{ère} sera consacrée au protocole expérimental qui décrit le traitement de l'ADNct avec 8 aldéhydes (Acro, Croto, AA, FA, MDA, HNE, Gx et MG) seuls ou en mélange équimolaire pour obtenir un profil d'adduits dépendant de la concentration en aldéhydes. Dans cette partie, nous décrirons la méthodologie utilisée pour étudier les différents adduits exocycliques à l'ADN dans ce contexte acellulaire. L'ADN modifié a été analysé en utilisant la méthode UHPLC-MS/MS validée, développée dans le chapitre précédent.

Les résultats de profils d'adduits engendrés par l'exposition de cet ADNct nu aux aldéhydes séparément et en mélanges équimolaires seront présentés et discutés dans la 2^{ème} partie.

La LPO est l'une des conséquences du stress oxydant. Il en résulte une dégradation oxydative des AGPI capables d'endommager les membranes cellulaires et provoquer la mort cellulaire. Les conséquences de la LPO sont la formation d'hydroperoxydes instables qui produisent à leur tour les aldéhydes hautement réactifs saturés et α,β -insaturés électrophiles, notamment l'Acro, le MDA, le HNE, le Gx et le MG. Avec le FA et l'AA, la plupart d'entre eux se trouvent dans l'air ambiant, à l'exception du MDA et du HNE, qui sont principalement formés par la voie oxydative endogène.

Comme il a été déjà mentionné dans les premiers chapitres, les aldéhydes sont bien connus pour former des adduits exocycliques à l'ADN. Si ces lésions ne sont pas réparées ou mal réparées elles peuvent induire des mutations dans les gènes impliqués dans la cancérogenèse. Un ensemble de données a montré le rôle du stress oxydant dans la cancérogenèse via cette voie.

Dans un contexte de multiexpositions chroniques et variées, la mesure des adduits exocycliques à l'ADN apparaît donc comme un biomarqueur de choix pour évaluer l'exposition de l'Homme aux aldéhydes. L'approche « adductomique » semble être une approche judicieuse et innovante. En effet, elle offre la possibilité de rechercher plusieurs adduits, avec des spécificités connues au cours d'une même analyse, pour établir des profils d'adduits à l'ADN en lien avec l'individu et son environnement.

Dans notre approche et dans un premier temps, nous avons opté pour une présélection des adduits à l'ADN induits par les aldéhydes principalement présents dans la fumée de tabac et ceux induits de manière endogène par la LPO. Ils sont regroupés dans la figure 26 (Chapitre II, paragraphe II-2.2). Tous peuvent induire un ensemble d'adduits exocycliques à l'ADN potentiellement mutagènes voire cancérogènes comme nous l'avons pu citer dans le chapitre I (Maekawa *et al.*, 2006 ; Nair *et al.*, 2007) .

Il convient donc, dans un second temps, de valider notre méthode LC-MS/MS afin de détecter et de quantifier simultanément les 9 adduits exocycliques à l'ADN sélectionnés (AcrodG, CrotodG, AAdG réduit, FAdG réduit, HNEdG, MDAdG réduit, GxdG, cMGdG et CEEdG). Notre stratégie analytique a été conçue pour établir les profils d'adduits exocycliques à l'ADN dans un premier temps dans un ADN nu exposé aux aldéhydes *in vitro* puis de rechercher dans une deuxième étape ce profil dans de l'ADN de cellules sanguines prélevés

chez des personnes saines exposées ou pas aux aldéhydes via la consommation de cigarette. Cette dernière étape sera développée dans le chapitre 4. L'approche *in vitro* en milieu liquide a été délibérément élaborée pour à la fois se rapprocher des conditions sanguines mais également garantir une concentration en aldéhydes stable dans le temps étant donné la forte volatilité et réactivité de ces produits.

I- Partie expérimentale

Cette étude a consisté à exposer de l'ADNct acellulaire aux aldéhydes, seul au départ, afin de vérifier la formation *in vitro* des adduits étudiés et visualiser la réponse de chaque adduit dépendante de la concentration en aldéhyde dans une exposition acellulaire. Dans un 2^{ème} temps, nous avons effectué une exposition de l'ADNct acellulaire à un mélange équimolaire des 8 aldéhydes en prenant des concentrations croissantes.

1. Exposition acellulaire aux aldéhydes

Dans des tubes Eppendorf[®] safe-lock de 600 µl de volume, l'ADN du thymus de veau (ADNct) a été modifié par réaction avec chaque aldéhyde dans des conditions adéquates, comme décrit dans des études antérieures avec de légères modifications comme présenté dans le tableau 13 ci-dessous. Les tubes ont été bien sertis et les conditions ont été ajustées pour minimiser la partie aérienne dans les tubes afin de réduire l'évaporation des aldéhydes et garantir une concentration en aldéhydes stable dans le temps. L'ADNct (1 mg/mL) a été incubé avec différentes concentrations de l'Acro allant de 0,05 à 25 mM dans du tampon phosphate (TP, 25 mM, pH 7) pendant 24 h à 37°C avec une agitation continue (Kawai *et al.*, 2003). De même, l'ADNct (1 mg/mL) a été incubé avec du Croto (0,005 à 25 mM) (Chung *et al.*, 1989 ; Budiawan *et al.*, 2000), de l'AA (0,05 à 25 mM) (Wang *et al.*, 2000 ; Singh *et al.*, 2009), du FA (0,05 à 25 mM) (Arif *et al.*, 2006) et du HNE (0,005 à 25 mM) (Douki et Ames, 1994) dans 25 mM de TP (pH 7) pendant 24 h à 37°C sous agitation lente. L'ADNct (1 mg/mL) a été incubé avec du Gx (0,005 à 25 mM) dans du TP 100 mM (pH 7) pendant 24 h à 37°C en rémuant (Kasai *et al.*, 1998 ; Olsen *et al.*, 2005). Alors que le MDAdG a été formé lors de la réaction acide du MDA (0,005 à 50 mM) avec de l'ADNct (1 mg/mL) dans du TP 100 mM (pH 4,3) pendant 24 h à 37°C sous agitation douce (Vaca *et al.*, 1992). Au contraire, l'ADNct (1 mg/mL) a réagi avec du MG (0,005 à 25 mM) dans un tampon basique (TP 50 mM, pH 9,5) pendant 24 h à 37°C sous une agitation continue (Dennehy et Loeppky, 2005).

L'ADN modifié a été précipité avec du NaCl (5 M) et de l'éthanol froid. Le mélange a été homogénéisé par retournement pour que le culot d'ADN soit visible, puis centrifugé à 10000 rpm pendant 10 min à 4°C. L'ADN a été lavé avec de l'éthanol à 70% et centrifugé encore

une fois suivant les mêmes paramètres cités ci-dessus. Après l'élimination du surnageant, le culot a été évaporé à sec au Speedvac[®] et dissous dans 600 µL d'eau ultrapure.

Tableau 13: Différentes conditions de formation des adduits à partir de l'ADNct *in vitro* à 37°C et pendant 24 h

Aldéhyde	Concentrations de l'aldéhyde (mM)	Concentration du TP (mM)	pH du TP	Références
Acro	0,05 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 et 25	25	7	Kawai <i>et al.</i> , 2003
Croto	0,005 ; 0,05 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 et 25	25	7	Chung <i>et al.</i> , 1989 ; Budiawan <i>et al.</i> , 2000
AA	0,05 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 et 25	25	7	Wang <i>et al.</i> , 2000 ; Singh <i>et al.</i> , 2009
FA	0,05 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 et 25	25	7	Arif <i>et al.</i> , 2006
MDA	0,005 ; 0,01 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 2,5 ; 5 ; 10 ; 20 ; 30 ; 40 et 50	100	4,3	Vaca <i>et al.</i> , 1992
HNE	0,005 ; 0,05 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 et 25	25	7	Douki et Ames, 1994
Gx	0,005 ; 0,05 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 et 25	100	7	Kasai <i>et al.</i> , 1998 ; Olsen <i>et al.</i> , 2005
MG	0,005 ; 0,05 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 ; 10 et 25	50	9,5	Dennehy et Loeppky, 2005

2. Exposition acellulaire aux mélanges équimolaires d'aldéhydes

Sous agitation constante, l'ADNct (1 mg/mL) ont été incubés avec des mélanges équimolaires (1, 10 et 20 mM) des 8 aldéhydes (Acro, Croto, AA, FA, MDA, HNE, Gx et MG) dans un tampon phosphate (25 mM, pH 7) à 37°C pendant 24 h dans des tubes Eppendorf[®] safe-lock de volume 600 µL. Après l'incubation, l'ADN a été précipité, lavé et repris dans 600 µL d'eau ultrapure comme décrit ci-dessus (Chapitre III, paragraphe I-1).

3. Analyse des adduits formés par la méthode validée en UHPLC-ESI-MS/MS

L'ADNct, modifié par les aldéhydes pris séparément ou en mélanges équimolaires, a été réduit par addition du NaBH₃CN comme décrit dans le chapitre II paragraphe II-2.2. La quantité d'ADN modifié a été dosée par spectroscopie UV au NanoDrop™, ensuite des aliquots de 50 µg de l'ADN modifié ont été hydrolysés en présence d'étalons internes marqués comme décrit dans le chapitre II paragraphe III-2. L'ADN restant après hydrolyse (non hydrolysé) a été quantifié au NanoDrop™ pour évaluer le rendement de l'hydrolyse et déterminer la quantité de l'ADN hydrolysé. Ce dernier a été analysé en UHPLC-ESI-MS/MS selon la méthode de dosage développée et validée décrite dans le chapitre précédent. La quantité de chaque adduit à l'ADN a été quantifiée par rapport aux courbes de calibration tracées. Des QC ont été analysés entre les échantillons de l'exposition *in vitro* pour vérifier les temps de rétention, la reproductibilité et la performance de l'instrument.

Le niveau d'adduits à l'ADN a été calculé à l'aide de la formule suivante (Li *et al.*, 2017) :

$$\text{Niveau d'adduits relatif} = \frac{(\text{Concentration de l'adduit à l'ADN} / \text{MM de l'adduit})}{(\text{Concentration de l'ADN} / \text{MM moyenne des bases})}$$

Avec une masse moléculaire (MM) moyenne en bases = 3240, les résultats obtenus ont été multipliés par 10⁷ et les niveaux d'adduits ont été exprimés en adduits/10⁷ nucléotides normaux.

II- Résultats et discussion

Le but de notre étude n'était pas de tester un effet spécifique d'un aldéhyde donné au niveau de l'ADN mais bien d'explorer à terme dans des études en population l'exposition systémique aux aldéhydes via l'étude de leurs propriétés d'adduction. Il est toutefois important de préciser que les études portant sur la mutagenèse des aldéhydes restent complémentaires et indispensables dans le cadre d'une évaluation du risque cancéreux. En effet, pour un adduit donné, l'analyse des différents isomères dans les études de mutagenèse est importante. A titre d'exemples, il a été décrit que le (R/S)- α -OH-PdG, un isomère de l'AcroG, possède des propriétés mutagènes plus importantes que le γ -OH-PdG, le principal isomère retrouvé *in vivo* (Liu *et al.*, 2010). Les erreurs de codage sont plus fréquentes avec le (6S,8S)-CrotodG qu'avec le (6R,8R)-CrotodG (Zhang *et al.*, 2006). De même, les isomères du HNEdG ayant une des deux stéréochimies (6S,8R,11S) et (6R,8S,11R) sont plus mutagènes que les adduits (6S,8R,11R) et (6R,8S,11S) (Minko *et al.*, 2009).

1. Analyse de l'ADN du thymus de veau traité avec des aldéhydes

Profil basal de l'ADN nu de calf thymus non traité (ADNct)

L'analyse par UHPLC-MS/MS de l'ADNct nu non traité a révélé la présence d'un niveau basal d'adduits. Ce niveau a eu pour conséquence d'influencer les LLOQ de la méthode. La quantification des adduits présents en faible quantité s'en est trouvée entre autre affectée. Le traitement de l'ADNct avec des doses faibles (< 0,05 mM) d'Acro, d'AA et de FA n'a pas pu conduire à la formation d'adduits à des niveaux quantifiables en raison des LLOQ élevées de la méthode. Et le traitement de l'ADNct avec 0,005 mM de HNE n'a pas entraîné une élévation du niveau de HNEdG, mais un seuil apparent qui se situait dans une plage similaire aux niveaux détectés dans l'ADNct témoin ($2,79 \pm 0,15$ adduits par 10^7 nucléotides normaux). Nous pouvons considérer que ce niveau basal a posé une limite à notre quantification car au final, seuls les niveaux d'adduits induits par l'Acro, l'AA, le FA et le HNE ont pu être mesurés à partir des concentrations supérieures à 0,05 mM. Néanmoins ce résultat obtenu dans l'ADN du thymus de veau est à prendre en compte lorsqu'on comparera les niveaux obtenus *in vitro* avec ceux obtenus dans l'ADN humain.

Les concentrations d'AcroG et de HNEdG détectés dans l'ADNct après une exposition de 24 h à 0,05 mM à 37°C étaient de $7,29 \pm 0,22$ et $3,12 \pm 0,27$ adduits par 10^7 nucléotides normaux, respectivement. Les concentrations d'AAAdG et de FAdG réduits étaient de $4,71 \pm$

0,81 et $3,50 \pm 0,27$ adduits par 10^7 nucléotides normaux, respectivement. Par contre pour les autres aldéhydes, le Croto, le MDA, le Gx et le MG, l'augmentation du niveau d'adduits induits a été constatée dès l'incubation de l'ADNct à la concentration de 0,005 mM. Nous avons ainsi pu obtenir à cette concentration $4,68 \pm 0,38$ de CrotoG et $25,14 \pm 4,47$ de MDAdG réduits par 10^7 nucléotides normaux. Ces niveaux restent faibles par comparaison avec ceux des adduits du Gx et du MG ; en effet, ces derniers étaient de l'ordre de $147,8 \pm 12,04$ adduits par 10^7 nucléotides normaux pour le GxdG et de $506,46 \pm 24,98$ adduits par 10^7 nucléotides normaux pour le CEdG. Les niveaux de cMGdG détectés étaient aussi proches de ceux de CEdG ($416,19 \pm 33,36$ adduits par 10^7 nucléotides normaux). Ces résultats, les niveaux élevés même à faible concentration d'aldéhydes, corroborent avec ceux obtenus par Thornalley et ses collaborateurs (2010) dans des conditions physiologiques.

Analyse des courbes dose-réponse pour chaque adduit

A des concentrations croissantes, nous avons obtenu pour l'ensemble des adduits 3 types de courbes dose-réponse : une courbe linéaire classique, une courbe polynomiale ou une courbe en forme de cloche. Le traitement *in vitro* de l'ADNct avec différentes concentrations d'Acro, d'AA et de FA (0,05 à 25 mM) pendant 24 h dans du tampon phosphate (pH 7) maintenu à 37°C a donné lieu à des droites dose-réponse linéaires pour la formation de leurs adduits stables avec respectivement des $r = 0,9954$, $0,9978$ et $0,9893$ (Figures 30 à 32). Les niveaux d'adduits ont augmenté après le traitement de l'ADNct à partir de 0,05 mM pour chacun des aldéhydes. Les concentrations ont été choisies sur la base d'études antérieures (Wang *et al.*, 2000 ; Kawai *et al.*, 2003 ; Arif *et al.*, 2006 ; Singh *et al.*, 2009), mais aussi en tenant compte des concentrations endogènes reportées chez l'Homme. Ainsi, la concentration endogène du FA dans le sang humain de sujets non exposés est d'environ 0,1 mM (IARC, 2006). Dans notre étude, cette concentration a montré la formation d'adduits lors de la réaction de l'ADNct avec le FA. Ceci confirme bien une possible adduction endogène. De même, la concentration en AA a pu être dosée dans le sang total de quatre sujets humains normaux à jeun (IARC, 1985). Elle s'élevait à 1,30 μ M. Dans notre approche *in vitro*, nous n'avons pas pu atteindre cette concentration, trop faible pour nos conditions expérimentales ! Par contre, d'autres auteurs ont tenté de mesurer des taux d'AAdG réduits, par un système LC-MS/MS équipé par une vanne de commutation de colonne en ligne, après réaction de l'ADNct (2 mg/mL) avec 0,001 à 100 mM d'AA. Ils ont observé une réponse linéaire seulement à partir de 0,5 mM d'AA dans leur étude (Singh *et al.*, 2009). Dans notre approche les premiers niveaux induits à 0,05 mM d'AA s'élevaient à $4,71 \pm 0,81$ adduits par 10^7

nucléotides normaux contre $2,89 \pm 0,13$ adduits par 10^7 nucléotides normaux à 0,5 mM d'AA dans l'étude de Singh et ses collaborateurs (2009) qui ont exposé de l'ADNct à l'AA pendant 48 h à 37°C. Cette comparaison nous permet de montrer que nos conditions expérimentales maintiennent une bonne sensibilité.

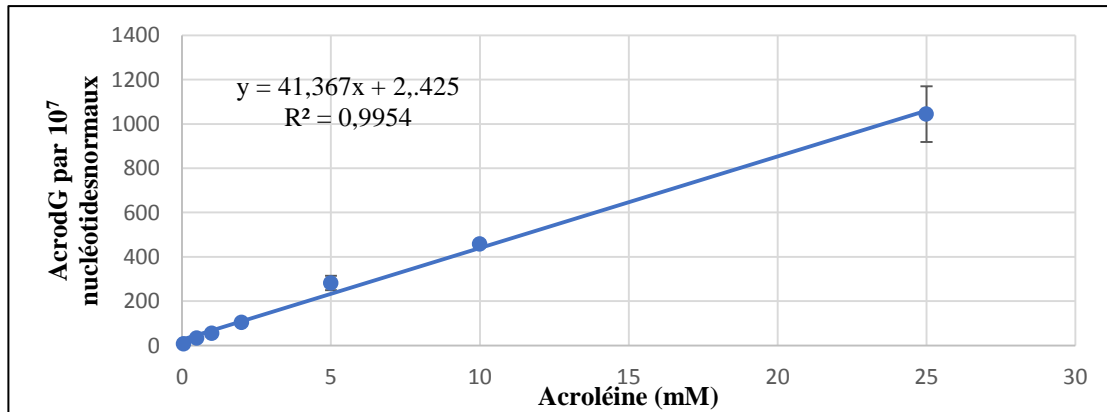


Figure 30: Relation dose-réponse de l'AcrodG suite à la réaction de l'Acro avec l'ADNct

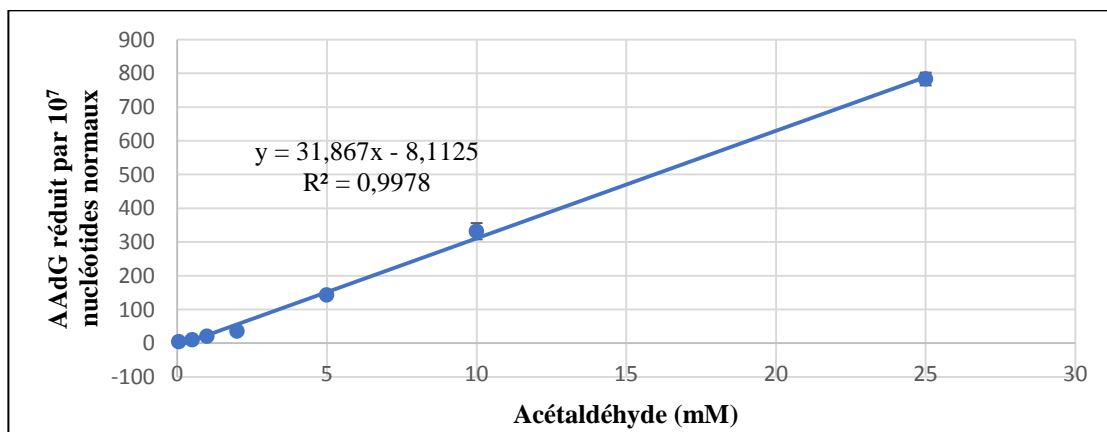


Figure 31: Relation dose-réponse de l'AAdG réduit suite à la réaction de l'AA avec l'ADNct

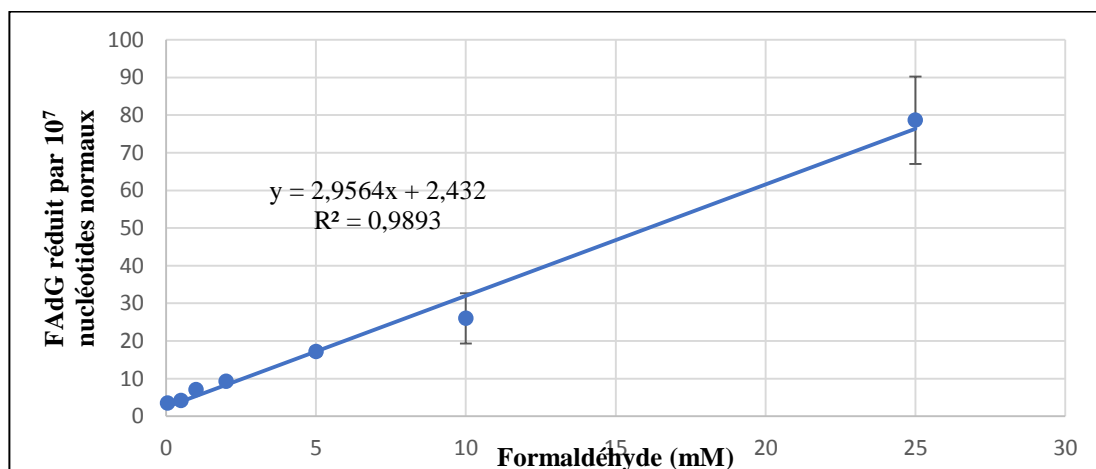


Figure 32: Relation dose-réponse du FAdG réduit suite à la réaction du FA avec l'ADNct

De même, lors de la réaction de l'ADNct avec de faibles concentrations de HNE (0,05 à 2 mM), une augmentation linéaire en fonction de la dose a été obtenue pour le HNEdG (Figure 33a). Au delà de 2 mM, les niveaux de HNEdG ont augmenté lentement en fonction des concentrations croissantes de HNE (2 à 25 mM) (Figure 33b). Ce changement peut être dû à l'encombrement de la longue chaîne alkyle du HNE qui aurait gêné la réactivité de l'aldéhyde vis-à-vis de la dG (Sodum et Chung, 1991). Il est à noter que pour le HNE, principalement produit de manière endogène, les analyses les plus intéressantes sont celles obtenues à faibles doses. Elles sont plus proches de la réalité. En effet, les concentrations de HNE ont été retrouvées en dessous du 0,1 μ M au niveau physiologique dans de nombreux tissus ainsi que dans le sérum (Esterbauer *et al.*, 1991). Ces résultats conforteraient donc l'hypothèse d'un niveau basal d'adduits produit de manière endogène est possible chez l'Homme. D'ailleurs dans la littérature, il est souvent mentionné que le risque d'adduction à l'ADN, soit l'activité promutagène du HNE, est plus fréquent à faible concentration et qu'à plus forte concentration c'est l'activité cytotoxique du HNE qui prévaut (Dalleau *et al.*, 2013).

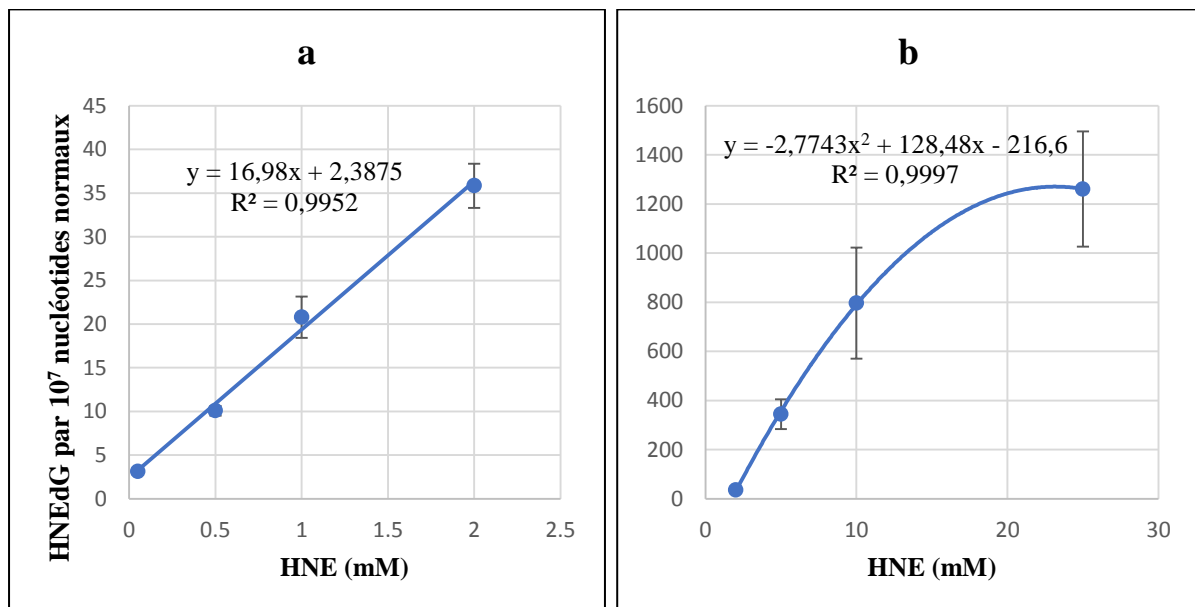


Figure 33: Relation dose-réponse du HNEdG suite à la réaction du HNE à de faibles concentrations (a) ou à des concentrations élevées (b) avec l'ADNct

Après une incubation de l'ADNct avec différentes concentrations de Croto, de Gx, de MDA et de MG retrouvées dans des études antérieures (Chung *et al.*, 1989 ; Kasai *et al.*, 1998 ; Budiawan *et al.*, 2000 ; Dennehy et Loepky, 2005 ; Olsen *et al.*, 2005), l'activité d'adduction a donc été étudiées à partir de 0,005 mM. L'ensemble des réponses est présenté

dans les figures 34 à 38. Mise à part le CrotodG avec lequel on observe une légère accélération de la réactivité aux plus fortes concentrations, les courbes en forme de cloche obtenues avec le Gx, le MDA et le MG affichent des réactivités fortement dépendantes des doses.

Concernant la concentration de GxdG, elle diminue lorsque l'ADNct est exposé à 25 mM de Gx. Ce résultat s'oppose avec des études précédentes qui montraient une augmentation dose-réponse du GxdG après traitement de 1 mg/mL d'ADNct avec du Gx (0,01 - 200 mM) pendant 15 h (Dennehy et Loeppky, 2005 ; Thornalley *et al.*, 2010). Cela pourrait être expliqué par le fait qu'à une concentration élevée et après 24 h d'incubation, le GxdG ait pu se transformer en d'autres adduits, récemment identifiés. Ils s'agiraient dans cette hypothèse de produits issus de la réaction de la dG avec le Gx dans des conditions physiologiques. En effet, la forme ouverte du GxdG N²-(carboxyméthyl)-9-(2'-désoxy-β-D-érythro-pentofuranosyl)-purine-6(9H)-one (Gx₁-dG) apparaît après 24 h de réaction et l'adduit 5-carboxyméthyl-3-(2'-désoxy-β-D-érythro-pentofuranosyl)-5,6,7-trihydro-6,7-dihydroxyimidazo[1,2-a]purine-9-one (Gx₂-dG) est produit par réaction du GxdG avec une deuxième molécule de Gx. Ces adduits ont été tous deux observés. Deux réactions chimiques expliquent leur formation ; la première concerne l'adduit GxdG qui après ouverture du cycle du GxdG forme Gx₁-dG, et la deuxième s'effectue par l'addition d'une 2^{ème} molécule de Gx sur une molécule de GxdG pour former le Gx₂-dG (Pluskota-Karwatka *et al.*, 2008). Ces adduits nouvellement identifiés n'ont pas été étudiés dans notre travail.

Pour le MDA, une diminution lente est constatée (Figure 36c) à fortes concentrations (10 à 50 mM) alors qu'elle est précédée d'une augmentation aux faibles concentrations de MDA (0,005 à 10 mM) (Figure 36b). Dans la littérature, l'adduit du MDA est plutôt étudié sous sa forme non réduite M₁dG. Nous avons vérifié que la réduction n'influçait pas le type de réponse. En effet, nous avons eu le même type de courbe avec ou sans réduction (données non présentées). Des travaux ont déjà montré qu'à concentrations croissantes, le MDA en milieu aqueux subit une auto-condensation de type « aldol » conduisant à la formation de dimères et de trimères du MDA (Esterbauer *et al.*, 1991). Ceci expliquerait la formation de moins d'adduits à des concentrations élevées. Concernant la partie ascendante du MDA₁dG aux très faibles concentrations, nous pouvons supposer comme pour les aldéhydes précédents qu'il existe une induction basale endogène du MDA. En effet, le MDA a été trouvé à des concentrations de 3,42 ± 0,94 μM dans le sérum des hommes et de 3,10 ± 0,62 μM dans celui des femmes (IARC, 1985). Même si ces concentrations sont légèrement inférieures aux concentrations de MDA étudiées dans notre modèle acellulaire, elles restent très proches. Ce

qui suggère qu'une faible variation dans cette échelle de concentrations de MDA peut être préjudiciable pour la cellule avec le risque d'une augmentation du niveau d'adduits *in vivo* (Esterbauer *et al.*, 1991).

Une dose-réponse similaire a été observée pour la formation du CEdG après exposition d'ADNct au MG à des concentrations comprises entre 0,005 et 25 mM de MG. Au-delà de 0,05 mM, il persiste une diminution de la réactivité du MG. La réaction de l'ADN avec un excès de MG a probablement entraîné la formation d'un nouveau produit correspondant à l'addition de 2 équivalents de MG, le N²-(1-carboxyéthyl)-7-1-hydroxy-2-oxopropyl-dG (MG-CEdG) comme l'ont déjà constaté Shuck et ses collaborateurs (2018). Un phénomène de saturation est possible. Cependant, la réponse de formation du CEdG dans l'ADNct observée par Thornalley et ses collègues (2010) suivait une courbe ascendante avec l'augmentation de la concentration jusqu'à 100 mM mais dans des conditions d'exposition plus courte (15 h). Il est à noter que ces auteurs trouvent un niveau basal plus faible que le notre, ceci peut être relié à la qualité de l'ADNct commercial. Le deuxième adduit du MG étudié, le cMGdG, a montré une augmentation jusqu'à 1 mM de MG suivie d'une augmentation lente au-delà de cette concentration. Cette forme est probablement due aussi à la formation du MG-CEdG à des concentrations élevées voire de saturation. Pour Thornalley et ses collègues (2010), le cMGdG semble être l'adduit majoritaire et le niveau d'adduits que nous avons obtenu corrobore avec celui obtenu par ces auteurs, contrairement au CEdG.

L'ensemble de ces premiers résultats obtenus *in vitro* montre que les aldéhydes présentent des activités d'adduction vis-à-vis de la dG, différentes selon leur structure chimique notamment la longueur de la chaîne carbonée et les concentrations d'exposition. Et ceci lorsqu'ils sont seuls dans un contexte dénué de toute la machinerie cellulaire pour réparer, et éliminer les xénobiotiques.

Pour continuer d'étudier leur réactivité dans un modèle acellulaire et de se rapprocher des conditions d'expositions réelles chez l'Homme c'est-à-dire à de faibles concentrations et en mélange, nous avons approfondi notre étude pour la recherche des réponses induites par le mélange équimolaire.

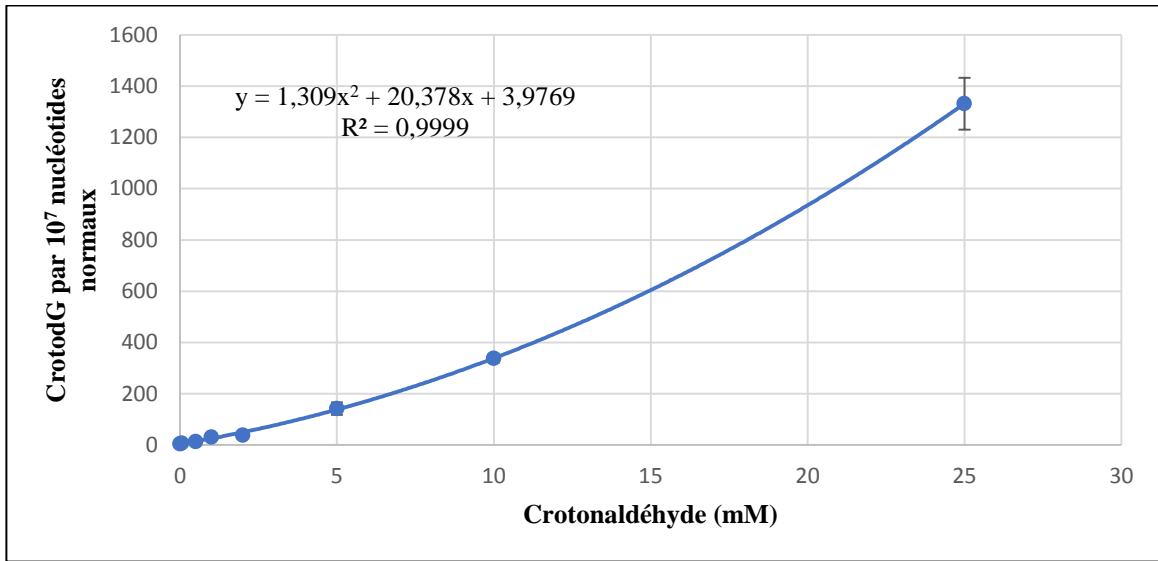


Figure 34: Relation dose-réponse du CrotoG suite à la réaction du Croto avec l'ADNct

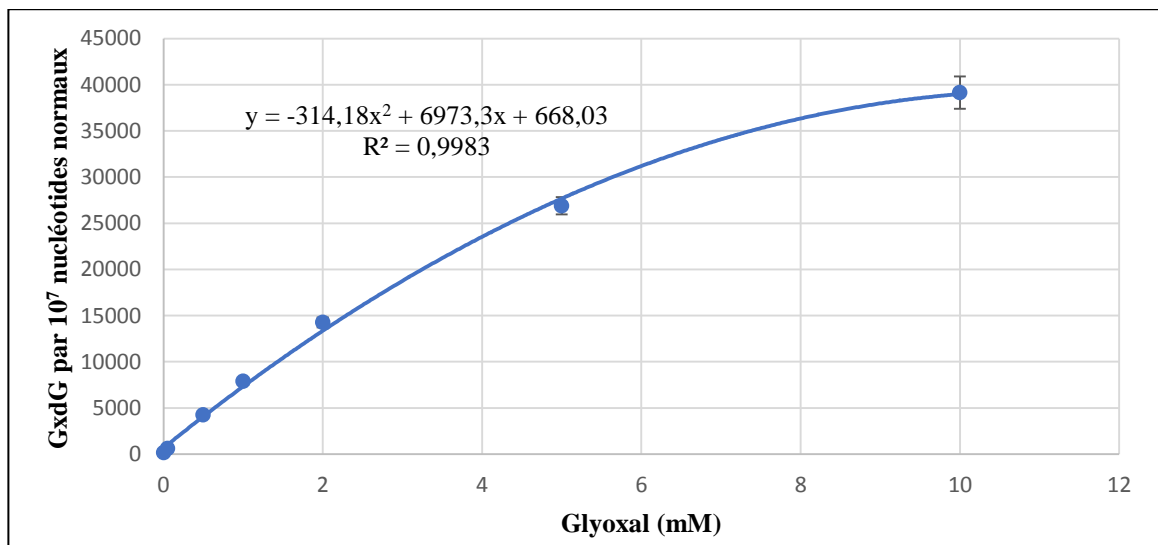


Figure 35: Relation dose-réponse du GxdG suite à la réaction du Gx avec l'ADNct

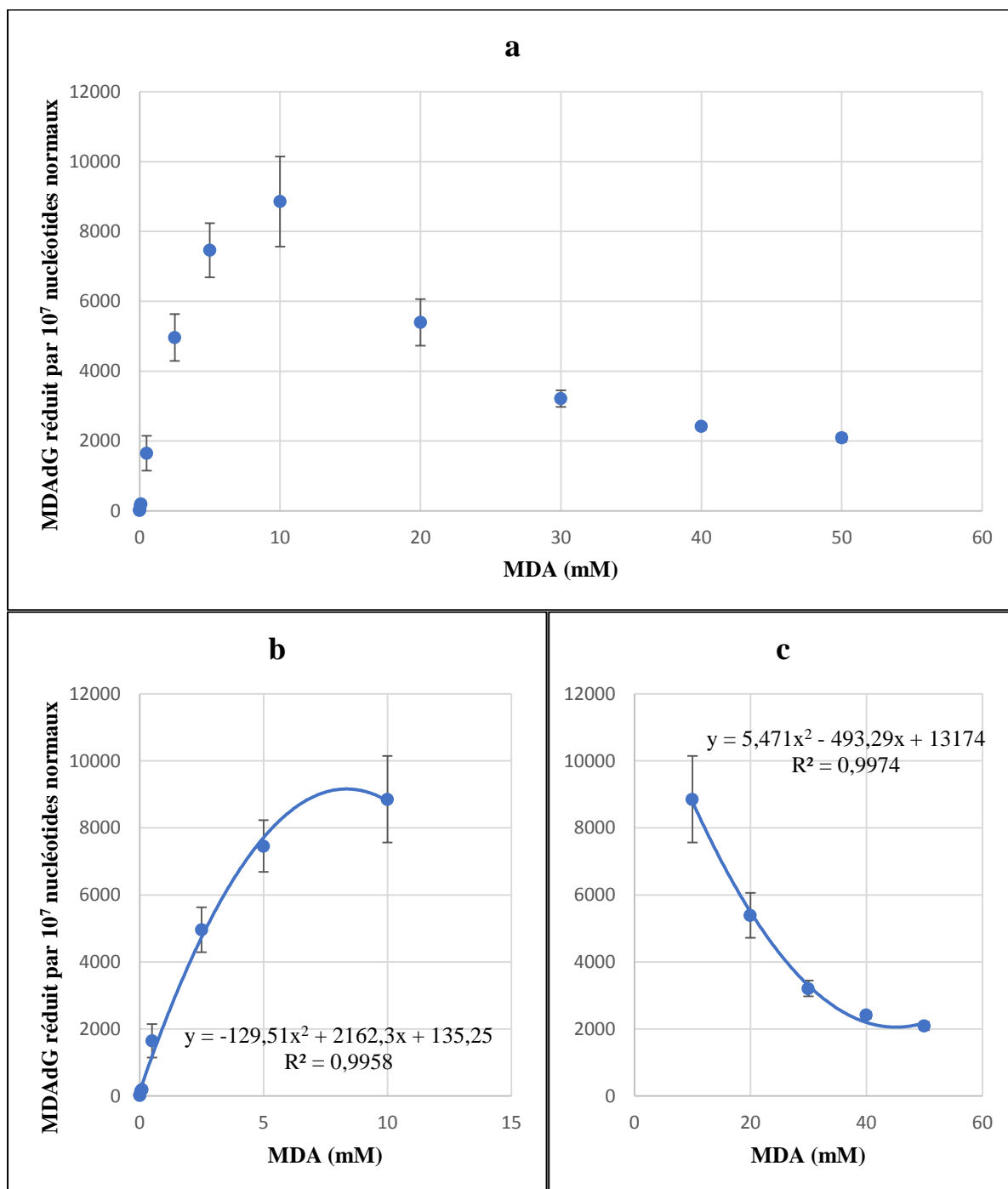


Figure 36: Relation dose-réponse du MDAdG réduit (a) suite à la réaction du MDA à de faibles concentrations (b) ou à des concentrations élevées (c) avec l'ADNct.

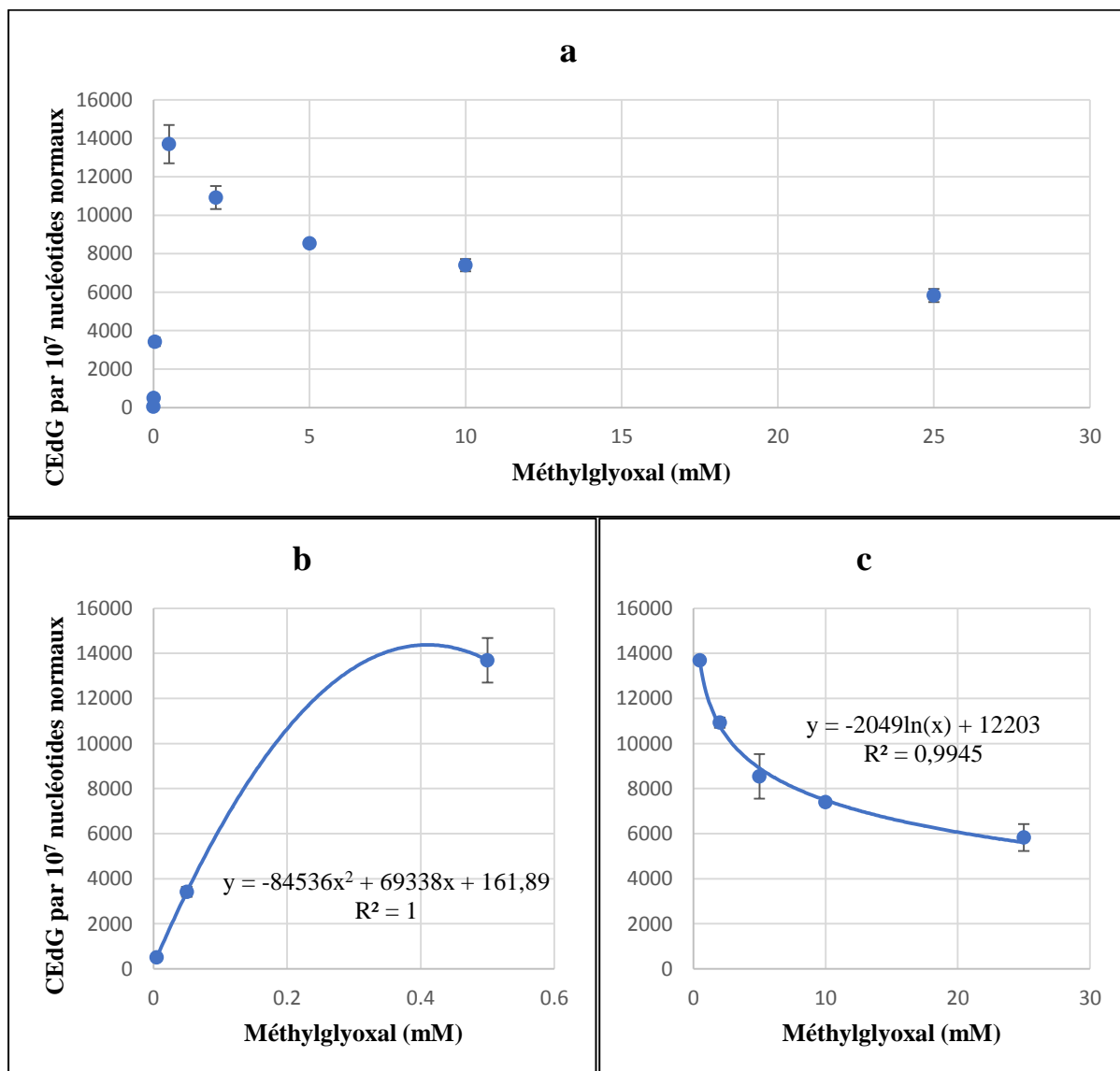


Figure 37: Relation dose-réponse du CEdG (a) suite à la réaction du MG à de faibles concentrations (b) ou à des concentrations élevées (c) avec l'ADNct.

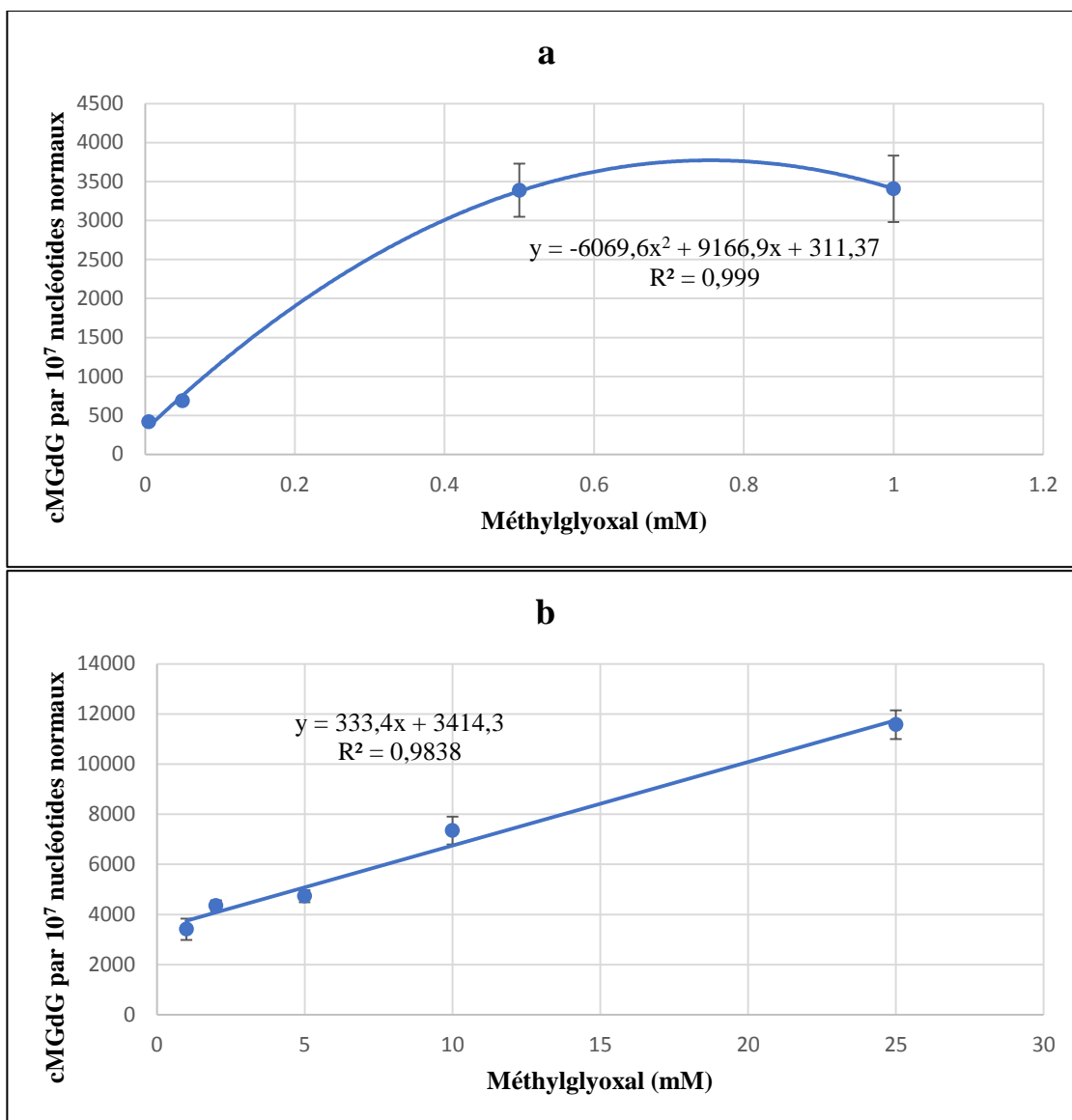


Figure 38: Relation dose-réponse du cMGdG suite à la réaction du MG à de faibles concentrations (a) ou à des concentrations élevées (b) avec l'ADNct.

2. Analyse de l'ADN du thymus de veau traité avec des mélanges équimolaires d'aldéhydes

Les relations dose-réponse pour les 8 adduits ont été étudiées dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment (tampon phosphate (pH 7) à 37°C pendant 24 h), mais pour des mélanges équimolaires concentrés entre 1 à 20 mM. Comme attendu, les concentrations des adduits dans l'ensemble ont été beaucoup plus faibles que celles induites par chaque aldéhyde pris séparément ; ce qui suppose une inhibition globale de la réactivité des aldéhydes vis-à-vis de l'ADN lorsqu'ils sont en mélange.

Compte tenu des taux d'adduits élevés du Gx et du MG, nous avons traité ces 3 adduits séparément des 6 autres. Dans la figure 39, nous pouvons constater que la répartition et les pourcentages d'adduits aux différents mélanges équimolaires sont différents de l'ADNc non exposé. Il est intéressant de constater que plus la concentration du mélange équimolaire augmente, plus le taux d'adduits dérivés de l'Acro, de l'AA, du Croto, du FA, du MDA et du HNE augmente. Il est possible comme décrit précédemment que la longueur de la chaîne carbonée puisse influencer la réactivité des aldéhydes vis-à-vis de l'ADN. A la plus faible concentration, 1 mM, celle la plus proche des conditions réelles chez l'Homme, nous pouvons constater un ordre de réactivité suivant : Acro > Croto > HNE > AA > MDA > FA. Par contre aux plus fortes concentrations en équimolarité, l'ordre devient : Acro > AA > MDA > Croto > HNE > FA. Dans ces conditions expérimentales, l'Acro reste l'aldéhyde le plus réactif. Ce résultat est appuyé par d'autres études qui montrent que l'Acro en mélange est plus réactive vis-à-vis de la dG *in vitro* que le Croto, ainsi que le HNE (Chung *et al.*, 1984 ; Sodum et Chung, 1991). Les auteurs ont également observé que la réactivité des énaIs vis-à-vis de la dG dans l'ADN était inversement proportionnelle à la longueur de la chaîne alkyle. L'AA et le MDA ont une chaîne plus courte que le Croto, ce qui justifierait le fait que les deux aldéhydes ont été plus réactifs vis-à-vis de la formation d'adduits dans cette étude.

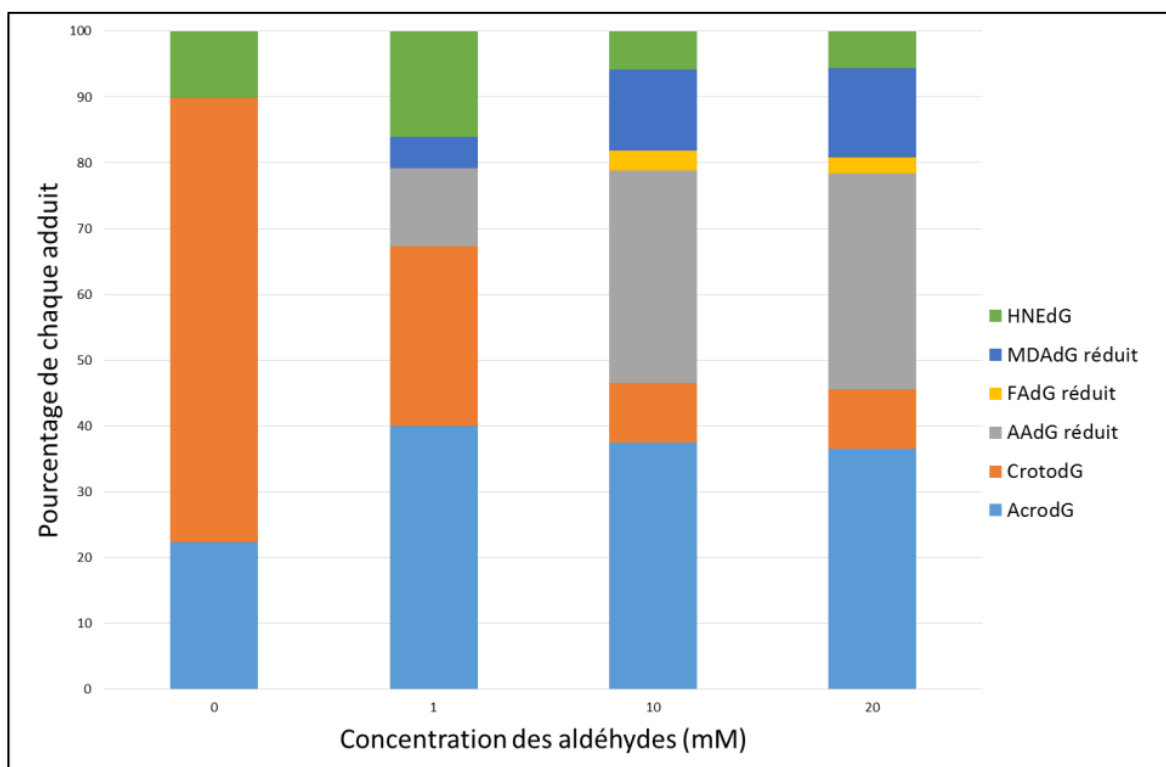


Figure 39: Pourcentages d'adduits aux différents mélanges équimolaires

Pour mieux affiner l'étude de réactivité des aldéhydes en mélange équimolaire, nous avons procédé au calcul des inhibitions de la formation d'adduits induits par les aldéhydes en mélange, en prenant comme référence (100%) les taux d'adduits formés après exposition de l'ADNct à l'aldéhyde seul.

Comme le montrent les figures 40 à 43, la répartition des histogrammes montrant le pourcentage d'inhibition en mélange équimolaire de l'AcrodG, de l'AAdG réduit, du CrotoDg et du HNEdG est similaire. L'inhibition de la réactivité des aldéhydes vis-à-vis de l'ADN pourrait être en lien avec les concentrations du mélange étant donné que l'inhibition est plus faible aux faibles concentrations. En effet, il est possible que les aldéhydes réagissent entre eux pour former un nouveau produit présentant une activité électrophile vis-à-vis de l'ADN plus faible, ou au contraire une électrophilie déportée sur d'autres bases de l'ADN non recherchées dans notre étude. Il a été démontré que les adduits des aldéhydes peuvent se lier de manière covalente avec l'adénine, la cytosine et la thymidine (Kawai *et al.*, 2003 ; Fu *et al.*, 2014).

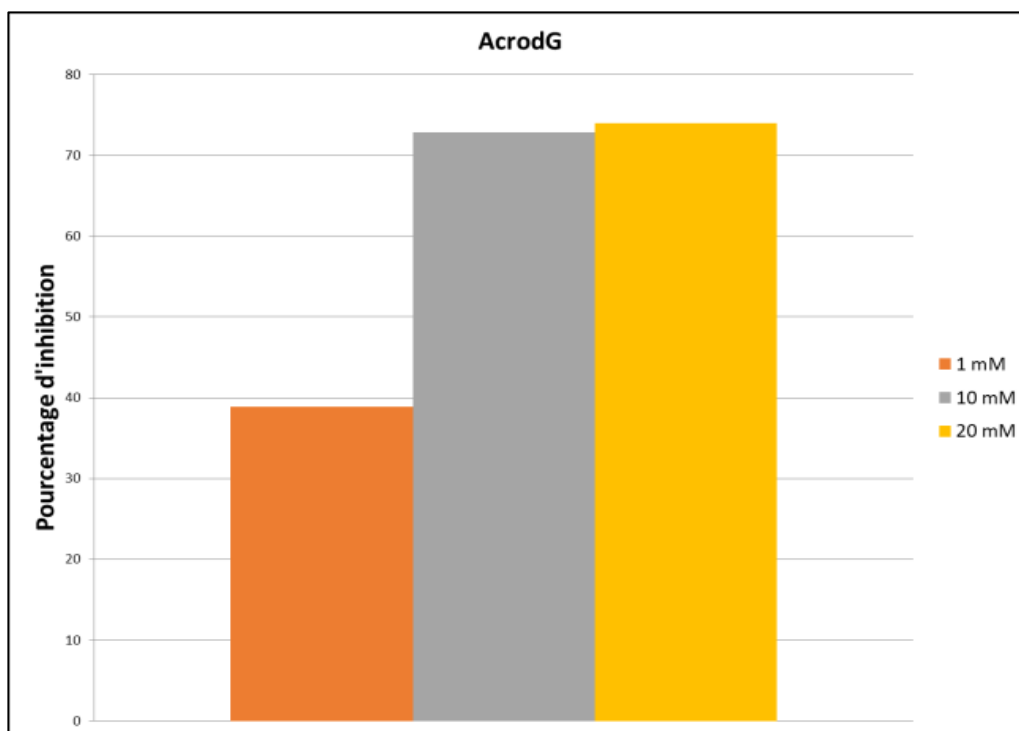


Figure 40: Pourcentage d'inhibition de la formation de l'AcrodG en mélange équimolaire

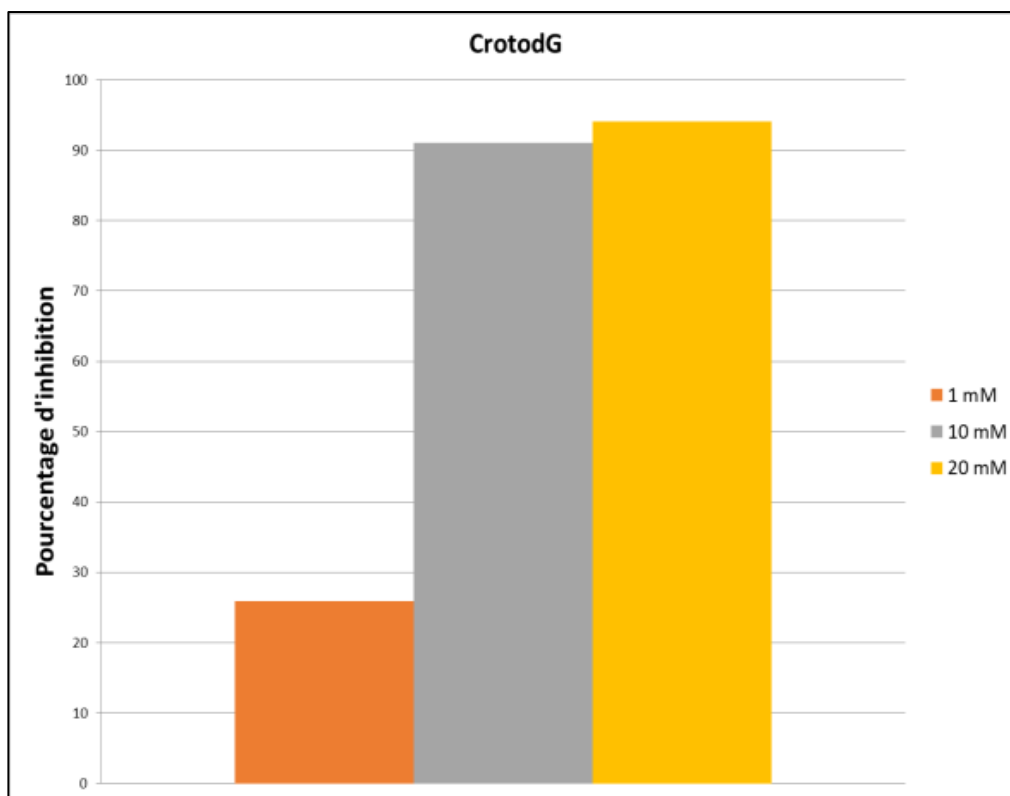


Figure 41: Pourcentage d'inhibition de la formation du CrotodG en mélange équimolaire

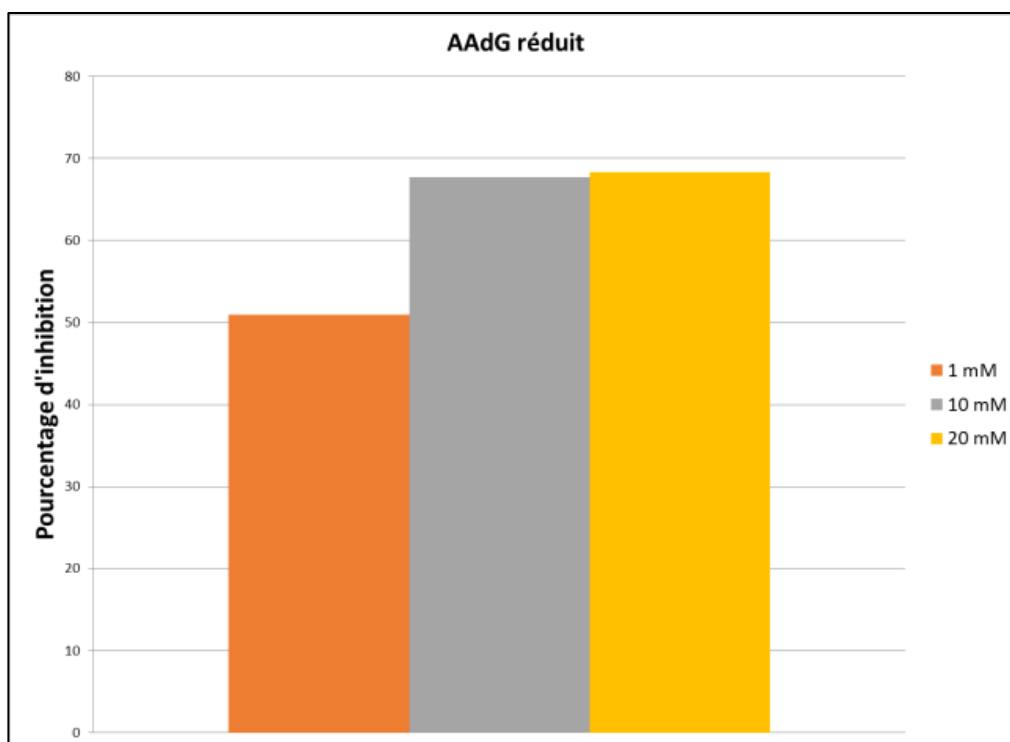


Figure 42: Pourcentage d'inhibition de la formation de l'AAdG réduit en mélange équimolaire

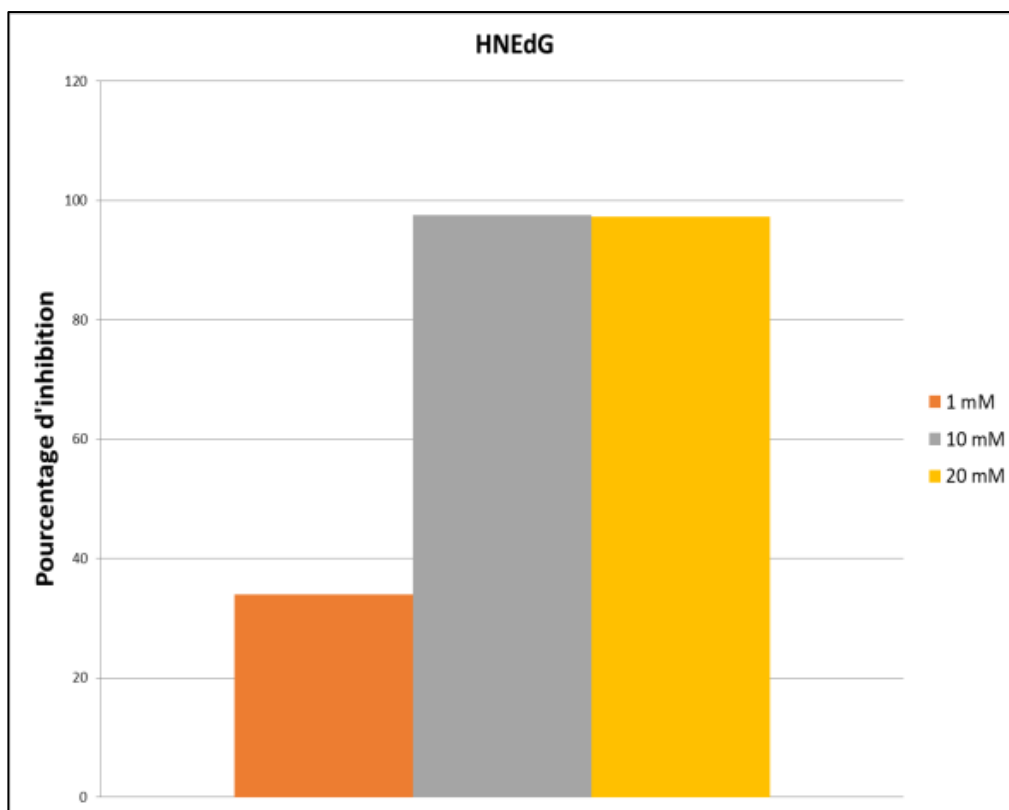


Figure 43: Pourcentage d'inhibition de la formation du HNEdG en mélange équimolaire

Concernant le MDA, on observe que le pourcentage d'inhibition de la formation de l'adduit réduit (Figure 44) est inversement proportionnel à l'augmentation de la concentration en équimolarité. Cette relation inverse abonde les résultats observés lorsque le MDA est seul. Plus la concentration d'exposition à l'ADN nu est importante moins de MDAdG est formé. Quant à la perte d'adduction à faible concentration, celle-ci tend à suggérer une forte compétition entre le MDA avec les autres aldéhydes vis-à-vis de la dG mais également une forte réactivité du MDA avec les autres aldéhydes pour former d'autres adduits (Voulgaridou *et al.*, 2011). Esterbauer et ses collaborateurs (1991) ont rapporté une diminution de la réactivité du MDA par rapport aux aldéhydes α,β -insaturés dans des conditions physiologiques.

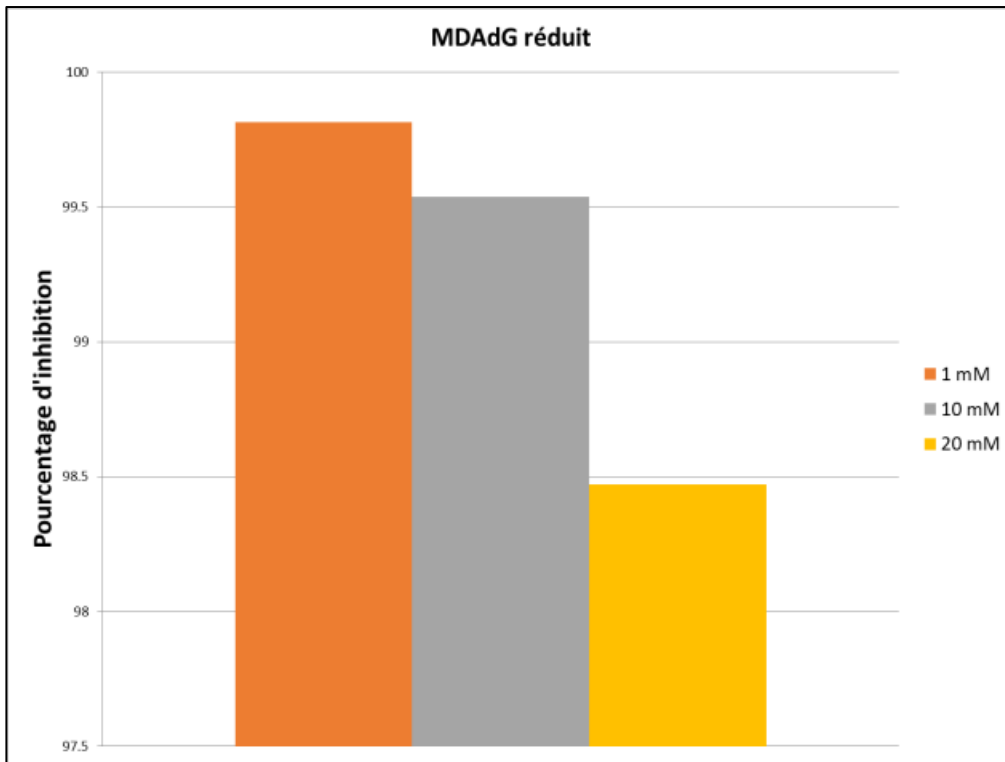


Figure 44: Pourcentage d'inhibition de la formation du MDAdG réduit en mélange équimolaire

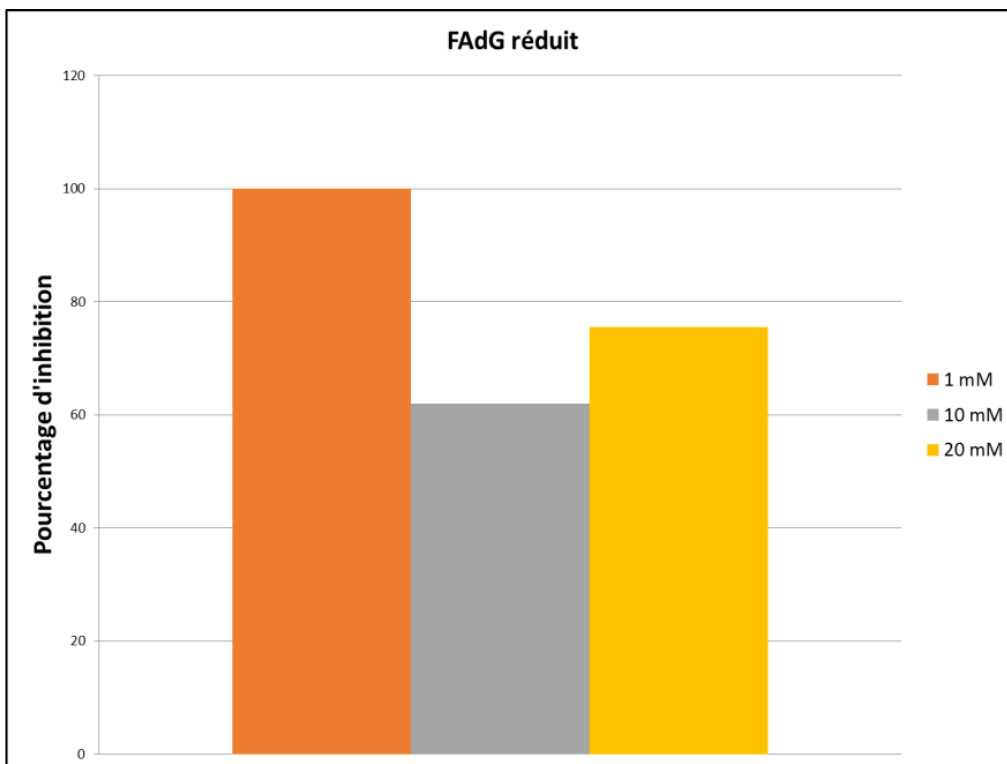


Figure 45: Pourcentage d'inhibition de la formation du FAdG réduit en mélange équimolaire

Le mélange d'aldéhydes a affecté la réponse associée au FA, car les concentrations de FAdG réduit n'étaient pas quantifiables lorsque la concentration du mélange équimolaire était à 1 mM (Figure 45). Ceci peut être dû à une condensation possible du FA et de l'AA pour former l'Acro (Nielsen et Houlihan, 1968) qui, à son tour réagit avec l'ADN pour générer les différents isomères de l'AcrodG. En outre, le FA a plus tendance à former des cross-links quand il est incubé avec l'ADNct en présence de l'AA (Cheng *et al.*, 2003 ; Yu *et al.*, 2015). Quant aux niveaux de cMGdG, ceux-ci n'étaient pas quantifiables dans cette expérience d'où le taux d'inhibition rapporté dans la figure 46, égale à 100%. Comme le montrent les figures 46 et 47, le MG induit des adduits mais en forme ouverte (le CEEdG) plutôt que fermée (le cMGdG).

Il est intéressant de pouvoir superposer tous les résultats obtenus avec le MDAdG et le CEEdG qui semblent adopter les mêmes comportements en terme de réactivité vis-à-vis de l'ADN.

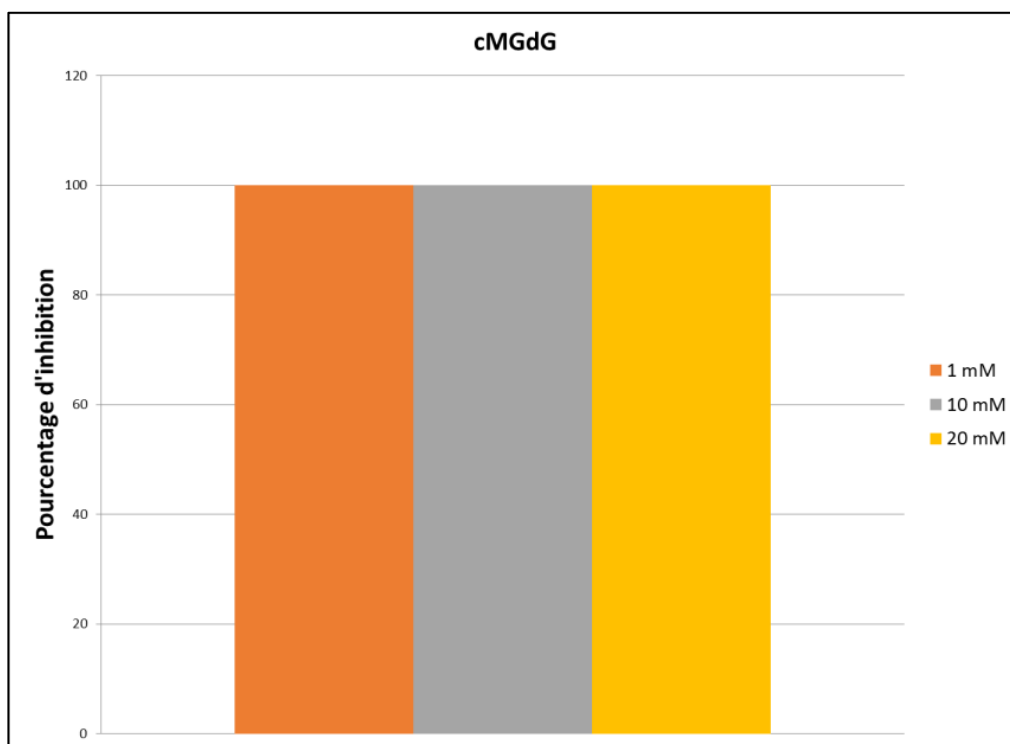


Figure 46: Pourcentage d'inhibition de la formation du cMGdG en mélange équimolaire

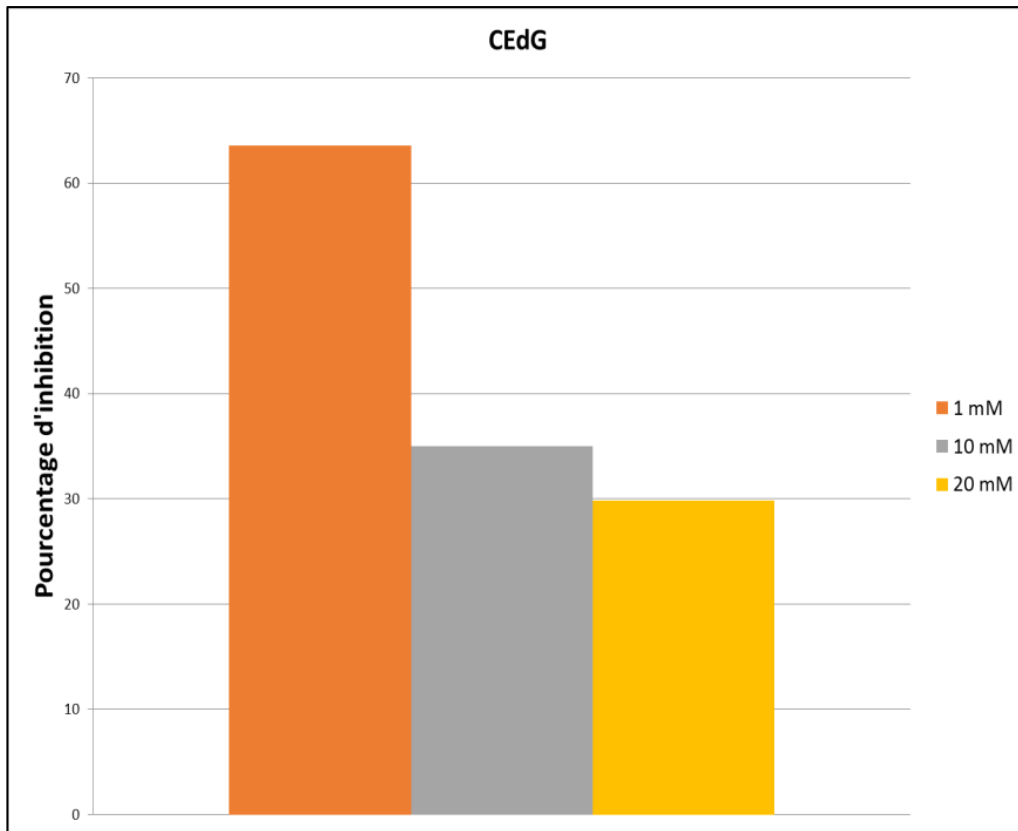


Figure 47: Pourcentage d'inhibition de la formation du CEdG en mélange équimolaire

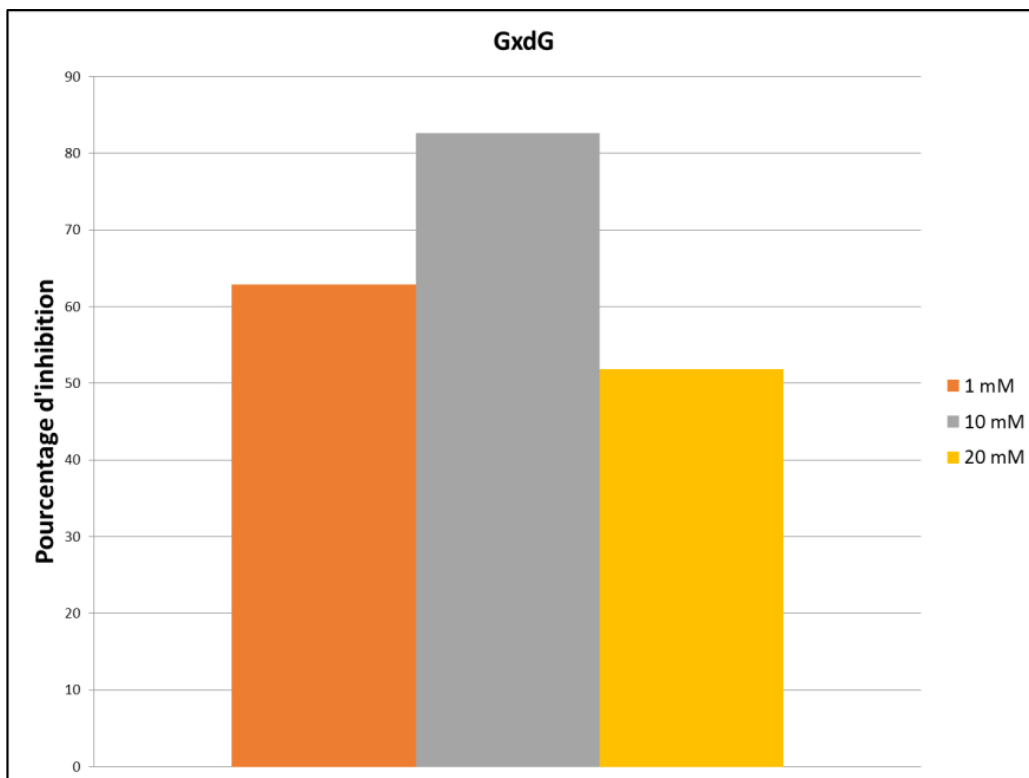


Figure 48: Pourcentage d'inhibition de la formation du GxdG en mélange équimolaire

En ce qui concerne l'adduit induit par le Gx, comme le montre la figure 48, le mélange cause une inhibition maximale à 10 mM.

Il serait intéressant de poursuivre d'autres études sur cette catégorie d'adduits induits par des mélanges avec d'autres produits vus qu'ils n'ont pas encore été documentés dans la littérature, à nos connaissances.

Ces premiers résultats *in vitro* révèlent que les aldéhydes en milieu liquide seuls ou en mélange préservent une forte réactivité électrophile vis-à-vis de l'ADN et notamment de la dG. Ce qui signifie que dans une matrice biologique, telle que le sang ou autre tissu, si ces produits ne sont pas dégradés, ils peuvent interagir avec d'autres macromolécules de la cellule tout particulièrement l'ADN génomique de l'Homme. C'est pourquoi, il serait intéressant dans une autre étude *in vitro* de poursuivre ces travaux en exposant des cellules humaines (lignée ou culture primaire).

Dans le cadre de ce travail de thèse, nous avons, dans un second temps, étudié ces profils d'adduits dans l'ADN prélevé du sang de fumeurs parce qu'il est connu que la fumée de cigarette contient une majorité de ces aldéhydes en mélange et qu'elle-même, par son action irritante, peut induire des dommages à l'ADN en lien avec la production d'aldéhydes via la LPO.

IV. Chapitre 4 : Etude de l'exposition tabagique sur le profil d'adduits exocycliques

Le quatrième chapitre sera subdivisé en 5 parties. Les 1^{ère} et 2^{ème} parties présenteront respectivement l'objectif et la méthodologie adoptée pour étudier l'influence de la consommation tabagique, sur le profil d'adduits exocycliques à l'ADN. La 3^{ème} partie sera consacrée au protocole expérimental depuis l'extraction de l'ADN des échantillons de sang humain jusqu'à l'analyse de l'ADN réduit et hydrolysé en UHPLC-MS/MS avec la méthode validée après ajout des étalons internes. Ensuite, dans la 4^{ème} partie, les résultats des premiers profils d'adduits exocycliques à l'ADN obtenus à partir de prélèvements sanguins de fumeurs seront présentés et comparés à ceux d'un groupe de non-fumeurs inclus également dans cette étude. Une dernière partie sera consacrée à la discussion des résultats obtenus par comparaison aux études antérieures ayant observé ou pas des différences significatives des taux d'adduits entre fumeurs et non-fumeurs. Pour la majorité de ces études n'étaient concernés qu'un adduit voire 2 ou 3.

Justification du choix de l'ADN de fumeurs pour l'étude du profil des 9 adduits exocycliques à l'ADN

Des études épidémiologiques ont établi une relation de cause à effet entre l'usage de la cigarette et plusieurs cancers notamment le cancer du poumon, du foie, du nasopharynx, de l'oropharynx et du larynx (Poirier *et al.*, 2019). Le nombre de cigarettes fumées, les pratiques d'inhalation, la durée et le début précoce du tabagisme sont autant des facteurs de risque critiques pour la dépendance au tabac que pour l'augmentation de risque de cancer (Centers for disease control and prevention, 2010). Des milliers de produits chimiques contenus dans la fumée de tabac ont pour certains des propriétés cancérigènes connues. Ils peuvent agir directement ou après une activation métabolique via la formation d'intermédiaires réactifs très électrophiles capables de générer des altérations génomiques (Tonini *et al.*, 2013). C'est le cas des adduits à l'ADN retrouvés dans différents tissus humains comme le montre le tableau 14. Les dommages oxydatifs à l'ADN et la LPO générés par des intermédiaires oxydés stables peuvent être également induits par la fumée de cigarette (Cao *et al.*, 2016). En outre, une teneur élevée en carbonyles, tels que l'Acro, le HNE, le FA, l'AA, le propanal et le MDA a déjà été retrouvée dans la fumée de cigarette (Fujioka et Shibamoto, 2006 ; Sampson *et al.*, 2014).

Tableau 14: Détection d'adduits à l'ADN extrait d'échantillons humains en lien à la fumée de tabac (d'après Ma *et al.*, 2019)

Adduits à l'ADN	Source	Tissu
Adduits relâchant HPB	NNK, NNN	Cellules buccales
Adduits encombrants	HAP, autres produits chimiques aromatiques et non polaires	Leucocytes, poumon
BPDE- <i>N</i> ² -dG	Benzo[<i>a</i>]pyrène	Cellules buccales, expectorations, poumons, leucocytes, lymphocytes, amygdales, oropharynx, gencive, prostate
4-ABP-C8-dG	4-ABP	Vessie, sein
4-ABP-C8-dA	4-ABP	Vessie
4-ABP- <i>N</i> ² -dG	4-ABP	Vessie
<i>O</i> ⁶ -méthyl dG	NNK, NDMA, autres agents de méthylation	Poumon
7-Méthylguanine	NNK, NDMA, autres agents de méthylation	Poumon, urine
3-Méthyladénine	NNK, autres agents de méthylation	Urine

1-Méthyladénine	NNK, autres agents de méthylation	Urine
Adduits de méthyle ADN phosphate	NNK, autres agents de méthylation	Poumon
3-Éthyladénine	Agents d'éthylation inconnus	Urine, salive
7-Éthylguanine	Agents d'éthylation inconnus	Urine, Leucocytes, salive
O ² -éthylthymidine	Agents d'éthylation inconnus	Leucocytes, salive
O ⁴ -éthylthymidine	Agents d'éthylation inconnus	Leucocytes, salive
N ³ -éthylthymidine	Agents d'éthylation inconnus	Leucocytes, salive
AcrodG	Acro	Cellules buccales, expectorations, poumon, salive, vessie, foie
N ⁶ -hydroxyméthyl-dA	FA	Salive
N ² -hydroxyméthyl-dG	FA	Salive
N ² -éthylidènedG	AA	Salive, Leucocytes, cellules buccales
CrotodG	Croto, AA	Cellules buccales, expectorations, poumon, urine
M ₁ dG	MDA	Leucocytes, épithélium nasal
1,N ⁶ -éthéno-dA	HNE	Urine
3,N ⁴ -éthéno-dC	HNE	Urine

Abréviations : HPB : 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone, NNK : 4-(méthylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, NNN : N'-nitrosornicotine, HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique, BPDE : benzo[a]pyrène-7,8-diol-9,10-époxyde, 4-ABP : 4-aminobiphényle, NDMA : N-nitrosodiméthylamine, Acro : acroléine, FA : formaldéhyde, AA : acétaldéhyde, Croto : crotonaldéhyde, MDA : malondialdéhyde, HNE : 4-hydroxy-2-nonénal.

La fumée de tabac : une source d'aldéhydes inducteurs d'adduits exocycliques à l'ADN

Dans la cancérogenèse pulmonaire l'adduction reste un événement clé initiateur (Figure 49) (Hecht, 2012). Il a été démontré que l'induction du cancer pulmonaire augmente en fonction de l'augmentation des adduits à l'ADN promutagènes et diminue lorsque la formation de ces adduits est bloquée (Lee H. *et al.*, 2015). Actuellement, la littérature très abondante sur le sujet continue par des études quantitatives sur les adduits à l'ADN d'explorer le rôle de la fumée de tabac dans les mécanismes étiologiques du cancer. Il n'en reste pas moins qu'à ce jour, un nombre réduit d'adduits à l'ADN ont été structurellement caractérisés dans les poumons de fumeurs. Quelques structures de ces adduits identifiés sont illustrées dans la figure 50. Nous pouvons d'ores et déjà constater la présence d'adduits qui pourraient être induits par les aldéhydes issus du tabac mais aussi de la LPO.

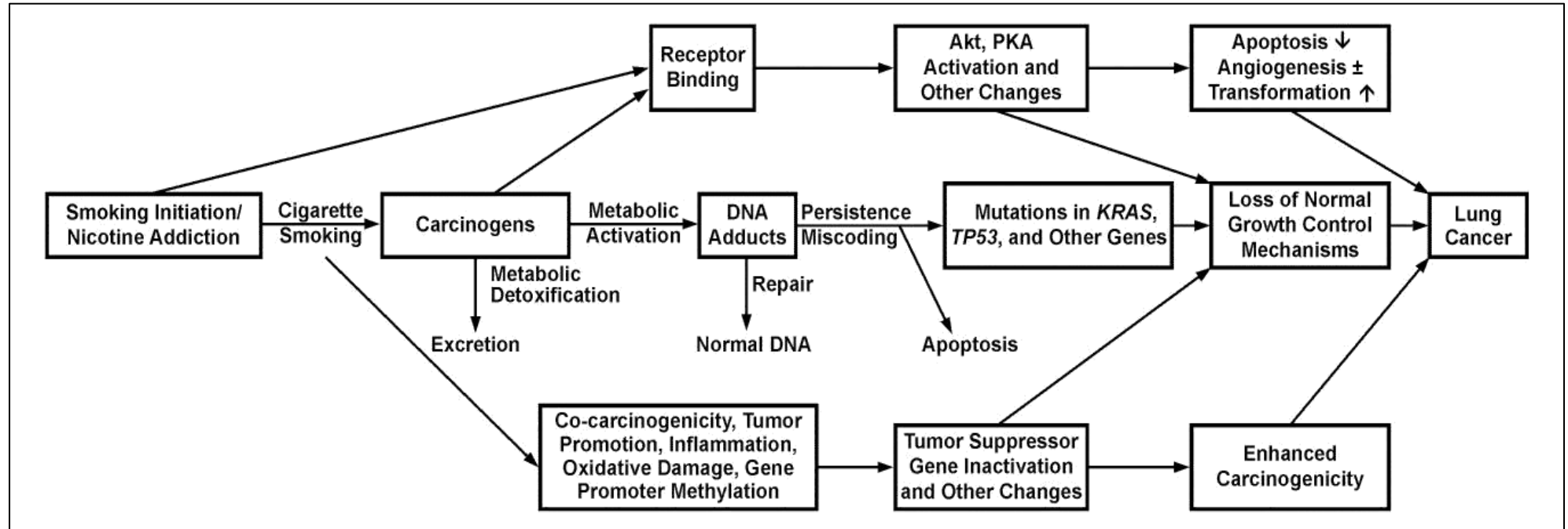


Figure 49: Illustration de l'implication de la consommation tabagique dans la cancérogenèse pulmonaire (d'après Hecht, 2012).

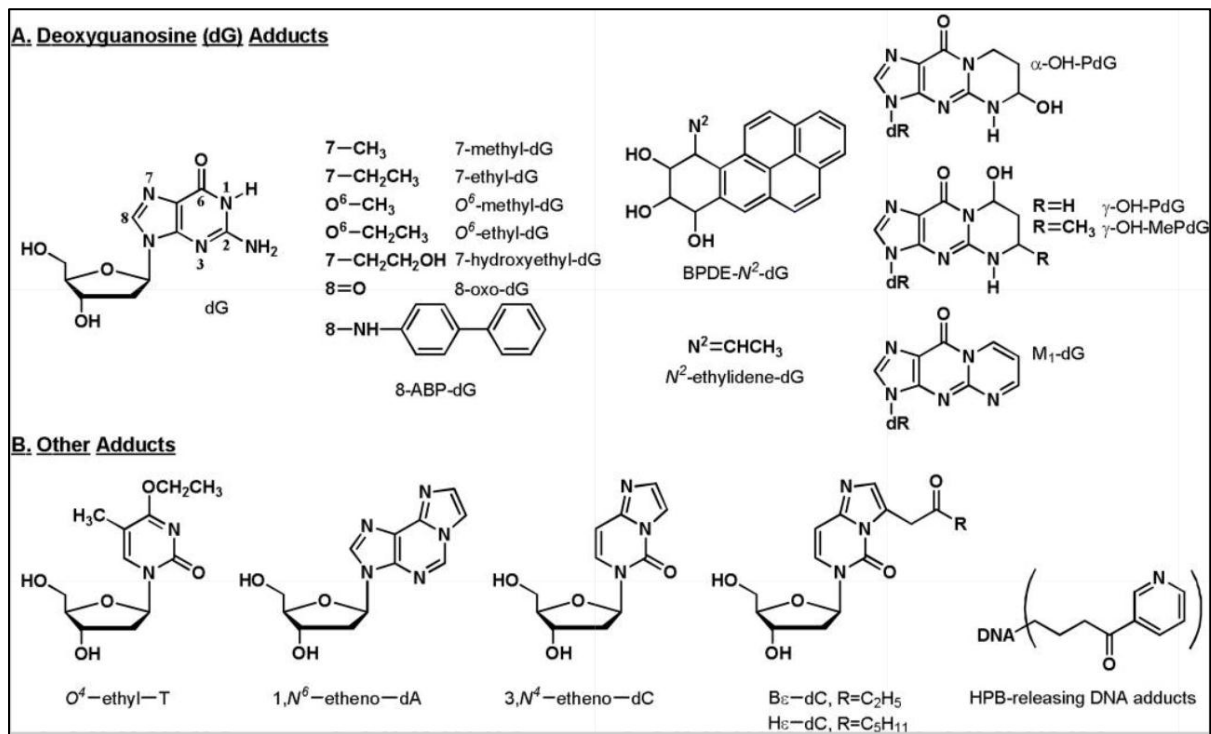


Figure 50: Structures des adduits à l'ADN identifiés dans le poumon humain. HPB, 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone (Hecht, 2012).

En effet, les 7-méthyl-dG, 7-éthyl-dG, O⁶-méthyle-dG et O⁶-éthyle-dG sont principalement formés par action directe des agents de méthylation ou d'éthylation dans la fumée de cigarette ou après activation métabolique des nitrosamines ; le 7-hydroxyéthyl-dG pourrait provenir de la réaction de l'oxyde d'éthylène avec l'ADN, alors que le 8-oxo-dG est un dérivé connu des dommages oxydatifs. Le 8-ABP-dG est un produit d'activation métabolique du 4-aminobiphényle. Le BPDE^{N2}-dG résulte de la réaction du BaP-7,8-diol-9,10-époxyde avec l'ADN. Le N²-éthylidenedG est formé par la réaction de l'AA avec l'ADN. Le α-OH-PdG et le γ-OH-PdG sont des produits de la réaction de l'Acro avec l'ADN alors que le γ-OH-Me-PdG provient de la réaction du Croto avec la dG. Le M₁dG résulte de la réaction du MDA avec la dG. Le O⁴-Ethyl-T se forme lors de la réaction d'un agent d'éthylation avec de la thymidine, tandis que le 1,N⁶-éthéno-dA, le 3,N⁴-éthéno-dC, le B_ε-dC et le H_ε-dC sont principalement des produits de la LPO. Récemment outre le poumon des niveaux significativement élevés d'adduits à l'ADN liés au tabagisme ont été détectés dans les cellules du lavage bronchoalvéolaire de l'épithélium bronchique de fumeurs (Hecht *et al.*, 2016). Sont

principalement mis en cause les aldéhydes sélectionnés dans notre étude à savoir l'Acro, le MDA, le FA et le Croto (Hecht, 2017).

Par ailleurs, concernant le stress oxydant, les aldéhydes α,β -insaturés réactifs générés à la suite de la LPO semblent contribuer au développement des pathologies en raison de la modification de biomolécules (Sousa *et al.*, 2017). Dans le poumon, les produits réactifs de la LPO se dégradent très lentement, ce qui entraîne une plus grande accumulation de ces produits et la formation de nombreux adduits et lésions tissulaires (Mol *et al.*, 2017 ; Weng *et al.*, 2018). Le tableau 15 décrit brièvement les implications pathologiques majeures des aldéhydes au niveau du poumon, en lien pour certaines avec le stress oxydant.

Parmi les différents aldéhydes contenus dans la fumée de cigarette, l'AA est présent à des concentrations très élevées (environ 920 μg par cigarette) (Sapkota et Wyatt, 2015), ce fort taux pourrait être mis en lien avec les éthéno-adduits régulièrement retrouvés dans les poumons de fumeurs. Des études récentes tentent à démontrer le rôle prépondérant des aldéhydes par rapport aux produits cancérigènes du tabac à la fois par des études quantitatives des adduits spécifiques mais aussi par l'analyse du spectre mutationnel du gène *TP53*. La quantité d'aldéhydes, y compris l'Acro dans la fumée de tabac, est 1000 fois supérieure à celle des HAP et des nitrosamines (IARC, 2004 ; Grigoryeva *et al.*, 2015). Il a été découvert que, dans les cellules épithéliales bronchiques humaines, la distribution des dommages à l'ADN au sein du gène *TP53*, est proche de celle retrouvée dans les tumeurs pulmonaires en lien avec le tabac, mais elle serait surtout induite à la fois par les HAP mais aussi par l'Acro (Weng *et al.*, 2018 ; Sarkar, 2019) et non par les nitrosamines de la fumée de tabac telles que la 4-(méthylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) et la N'-nitrosonornicotine (NNN) (Liston *et al.*, 2001, Toyooka *et al.*, 2003). Par ailleurs, dans une étude récente chez la souris, il a été démontré que le principal adduit retrouvé dans le poumon de souris exposée à la fumée de tabac était le γ -OH-PdG dérivé de l'Acro et non les adduits (6R, 8R)- α -Me- γ -OH-PdG dérivé de l'AA et du Croto présents en minorité (Weng *et al.*, 2018). Parallèlement ces mêmes auteurs ont également démontré que la fumée de tabac interfère sur la persistance de ces adduits en inhibant la réparation par excision de nucléotide et de base (NER et BER), notamment en réduisant les niveaux des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN.

Au vu de ces résultats l'Acro semblerait jouer un rôle prépondérant dans la cancérogenèse pulmonaire liée au tabac.

Tableau 15: Aldéhydes pulmonaires, adduits formés et effet pulmonaire (d'après Sapkota et Wyatt, 2015)

Aldéhydes	Source	Effet Pulmonaire
AA		Stress oxydant
MDA	Alcool	BPCO, asthme, emphysème
HNE	Fumée de cigarette	Légère irritation respiratoire
Acro	Toxiques environnementaux	Libération de cytokine pro-inflammatoire
FA		Effet épigénétique et génétique
Adduits	Aldéhydes Impliqués	Effet Pulmonaire
Adduit à l'ADN	AA,	mutation de paire de bases
	MDA,	cancérogenèse
	FA	Risque accru de mutation
Adduit Hybride		Induction de chimiokine pro-inflammatoire
	AA, MDA	Inhibition de la fermeture des plaies des cellules épithéliales bronchiques
		Augmentation de l'afflux de neutrophiles

Abréviations : AA : acétaldéhyde, MDA : malondialdéhyde, HNE : 4-hydroxy-2-nonénal, Acro : acroléine, FA : formaldéhyde, BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive.

I- Objectif de l'étude

Pour étudier l'influence du tabac sur le profil des adduits exocycliques à l'ADN nous avons mis en place une étude pilote chez des fumeurs et un groupe contrôle de non-fumeurs. Nous nous sommes intéressés à identifier les principaux types d'adduits à l'ADN chez des sujets exposés à la fumée de tabac (Figure 51).

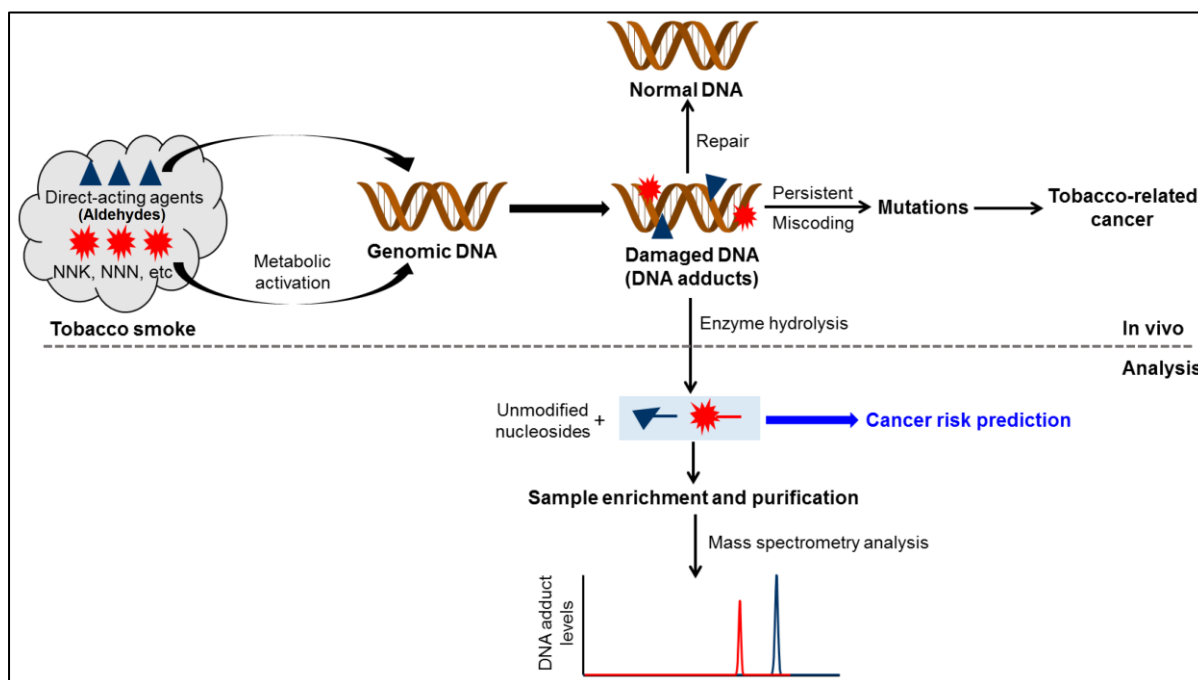


Figure 51: Vue d'ensemble de l'objectif de ce volet (adapté de Hecht, 2012)

Le protocole général pour mesurer les adduits à l'ADN consiste à isoler l'ADN d'échantillons biologiques, à l'hydrolyser à l'aide d'un cocktail d'enzymes, à la purification des échantillons hydrolysés et à l'enrichissement des adduits à l'ADN, puis à leur analyse par diverses techniques telles que la spectrométrie de masse. L'objectif ultime est de quantifier ces adduits d'ADN liés à la fumée de tabac mais aussi à la LPO dans des échantillons biologiques humains et d'intégrer les résultats dans des études épidémiologiques afin d'évaluer et de valider leur rôle dans la prédiction du risque de cancer.

II- Méthodologie

Nous sommes partis d'une étude clinique déjà initiée par le Pr. Laurence GALANTI avec qui Mathilde Lechevrel collabore. Cette étude clinique a été mise en place au sein du laboratoire de biologie clinique et l'unité de tabacologie du CHU UCL Namur en Belgique.

Elle a été approuvée par le comité éthique de l'établissement. Le principal objectif de cette étude est d'évaluer l'état de stress oxydant et la fonction endothéliale de sujets fumeurs et de suivre l'évolution de ces paramètres lors de l'arrêt du tabac avec ou sans substitution nicotinique.

En effet, la fumée de tabac a des effets nocifs pour la santé, en particulier sur le système artériel en favorisant le stress oxydant et en agissant sur la fonction endothéliale. Le rôle spécifique de la nicotine dans ces phénomènes reste encore peu investigué. La nicotine est cependant une des principales médications prescrites dans l'aide au sevrage tabagique voire pour une diminution des risques chez le fumeur. Le stress oxydant peut être évalué par différents paramètres biologiques et la fonction endothéliale par échographie ou pléthysmographie.

Les critères d'inclusion de l'étude sont les patients en consultation de tabacologie pour sevrage tabagique et les patients de plus de 18 ans, ayant complété leur accord de participation à l'étude. Le nombre atteint projeté est de 50 individus. Un ensemble de données cliniques est disponible. Il concerne la date de naissance, le sexe, la taille, le poids, les médications, les antécédents médicaux/chirurgicaux, le régime alimentaire, le statut tabagique et les dépendances au tabac.

Dans ce projet les paramètres biologiques sont ceux intervenant dans l'évaluation du stress oxydant et ceux concernant l'imprégnation aux composés de la fumée de tabac. Un test fonctionnel basé sur les examens échographiques branchiaux est opéré. Le protocole est le suivant :

- La prise en charge des patients fumeurs se fait selon la procédure classique d'une consultation de tabacologie.
- Lors de la visite initiale, les objectifs de l'étude leur sont expliqués par le médecin tabacologue. Un consentement éclairé est signé.
- Lors de cette visite et des visites de suivi, la fonction endothéliale est évaluée dans le service de cardiologie et une prise de sang et la récolte d'un échantillon d'urine sont réalisées au centre de prélèvement du laboratoire.
- Les données cliniques sont récoltées par le médecin lors de la consultation. Ces données ainsi que les résultats des tests fonctionnels seront enregistrés dans un fichier

créé par un médecin investigateur du laboratoire en collaboration avec le responsable de l'Unité de Support Scientifique (USS).

Dans le cadre de mon travail, nous avons demandé un amendement supplémentaire au comité d'éthique pour obtenir un échantillon sanguin supplémentaire en vue de quantifier les adduits exocyclique à l'ADN avant et après sevrage tabagique et de les inscrire dans les paramètres biologiques étudiés, et d'inclure des personnes non fumeuses pour notre étude pilote. Cet amendement a été accepté (NUB : B039201316167).

Dés le début de mes expérimentations, il s'est avéré que cet objectif ne pourrait être atteint en raison du nombre de recrutement insuffisant et du manque de temps pour une analyse fine des paramètres biologiques en lien avec les données cliniques avec une puissance statistique suffisante. Aussi nous nous sommes arrêtés sur l'analyse de 5 échantillons sanguins fumeurs et 5 non-fumeurs.

III- Partie expérimentale

1. Échantillons de sang humain

Cinq échantillons de sang humain provenant de fumeurs et cinq provenant de non-fumeurs ont été obtenus de l'unité de tabacologie du CHU UCL Namur asbl, Belgique. L'approbation éthique de l'étude a été obtenue du comité d'éthique du CHU UCL Namur Godinne (NUB : B039201316167). Des échantillons de sang ont été prélevés sur des non-fumeurs et des fumeurs avant de cesser de fumer lors de leur première visite à l'unité. Le sang veineux a été recueilli dans un tube BD Vacutainer[®] revêtu par pulvérisation de K₂EDTA. Immédiatement après la collecte, les tubes ont été placés et ensuite stockés à -80°C jusqu'au jour où les analyses ont été effectuées.

2. Extraction d'ADN à partir du sang humain

L'ADN a été extrait du sang à l'aide du kit Macherey-Nagel (Macherey-Nagel, Nucleobond[®] CB 100, réf. 740508). En travaillant sur de la glace, 5 ml de sang ont été mélangés à 5 ml de tampon G1 et 15 ml de ddH₂O. Le mélange a été homogénéisé en inversant le tube 6 à 8 fois et incubé sur de la glace pendant 10 min. Ensuite, le mélange a été centrifugé à 4°C pendant 15 min à 3500 rpm. Le surnageant a été jeté et un culot rouge a été visible. Le culot a été mis

en suspension dans 1 ml de tampon G1 et 3 ml de ddH₂O et centrifugé à nouveau avec les mêmes paramètres cités ci-dessus. Pour éliminer la contamination par l'ARN, le culot presque blanc a été complètement remis en suspension dans 5 ml de tampon G2 par vortex pendant 15 à 30 secondes, puis 100 µL de protéinase K (20 mg/ml) ont été ajoutés et le mélange a été incubé à 50°C. Après 60 min d'incubation, 5 ml de tampon N2 ont été ajoutés et le mélange a été vortexé à la vitesse maximale pendant 15 secondes. L'ADN a été purifié à l'aide de la colonne NucleoBond[®] AXG 100 équilibrée avec 2 mL de tampon N2. L'échantillon a été chargé dans la colonne et lavé à trois reprises avec 4 ml de tampon N3. L'ADN a été élué de la colonne avec 5 ml de tampon N5 et, 3,5 ml d'isopropanol ont été ajoutés à la solution qui a été bien mélangée par retournement puis incubée pendant 30 à 60 min à température ambiante et centrifugée à 4°C pendant 25 min à 15000 rpm. Après avoir jeté le surnageant, le culot fortement salé a été lavé avec de l'éthanol froid à 70% et centrifugé à 4°C pendant 10 min à 10000 rpm. Séché au Speedvac[®], l'ADN extrait a été dissous dans 100 µL d'eau ultrapure. La pureté de l'ADN extrait a été vérifiée par spectroscopie UV à 260 nm en NanoDrop[™].

L'ADN extrait à partir des 10 échantillons de sang humain a été réduit, quantifié, hydrolysé et analysé en UHPLC-MS/MS comme décrit dans le chapitre II.

3. Analyse statistique des données des échantillons

L'évaluation statistique des données de l'ADN du sang humain a été réalisée à l'aide du test Shapiro-Wilk (logiciel SAS version 9.4) afin de comparer les niveaux d'adduits dans l'ADN des fumeurs et des non-fumeurs. Le niveau de signification statistique était $p < 0,05$. Les corrélations de Pearson et de Spearman ont été utilisées pour établir des corrélations entre les niveaux d'adduits et les marqueurs liés au tabagisme (le nombre de cigarettes consommées par jour, le délai de la dernière cigarette fumée, le niveau de CO dans l'air exhalé et la concentration de cotinine dans l'urine).

IV- Résultats

Les niveaux des adduits détectés dans 10 échantillons d'ADN de sang humain provenant de fumeurs et de non-fumeurs sont présentés dans les tableaux 16 et 17, respectivement.

Tableau 16: Niveaux d'adduits par 10^7 nucléotides normaux dans l'ADN du sang des fumeurs

Echantillon d'ADN humain	F1	F2	F3	F4	F5
Sexe	M	F	M	F	M
Age	40	42	61	55	40
Status de fumeur	Fumeur	Fumeur	Fumeur	Fumeur	Fumeur
Nombre de cig/jour	20	15	25	30	13
délaï de la dernière cig. fumée (h)	2	1	3	2,5	2,25
CO (ppm)	11	19	12	16	32
µg de cotinine/ g de créatinine	1202,53	2686,98	487,18	3003,04	2314,56
AcrodG	2,68 ± 0,54	6,90 ± 1,02	4,79 ± 0,48	4,13 ± 0,99	11,36 ± 3,33
CrotodG	48,71 ± 3,35	47,51 ± 7,38	47,97 ± 2,58	76,90 ± 2,29	39,33 ± 5,66
AAdG réduit	3,94 ± 0,44	5,96 ± 1,51	19,75 ± 7,01	11,30 ± 0,68	9,15 ± 1,43
FAdG réduit	12,66 ± 0,53	21,06 ± 2,78	12,60 ± 2,64	25,25 ± 1,55	17,42 ± 2,56
MDAdG réduit	7,38 ± 1,54	10,61 ± 3,09	25,26 ± 7,87	26,21 ± 2,87	12,98 ± 2,09
HNEdG	1,24 ± 0,21	1,43 ± 0,01	0,72 ± 0,01	1,73 ± 0,23	1,08 ± 0,07
GxdG	108,13 ± 17,53	163,78 ± 15,64	83,55 ± 3,21	224,25 ± 16,41	345,42 ± 22,20
CEdG	148,56 ± 18,93	194,00 ± 17,84	88,47 ± 4,92	254,76 ± 26,32	127,86 ± 33,73
cMGdG	501,12 ± 47,68	506,27 ± 80,32	381,23 ± 41,76	649,19 ± 43,40	547,32 ± 52,85

De manière globale, tous les adduits ont été détectés et quantifiés dans l'ADN des 5 fumeurs. Pour les non-fumeurs, ils ont été détectés mais pour certains difficilement quantifiables. Cela concerne en particulier l'AcroG, le CrotoG et le cMGdG.

Des différences ont été remarquées dans les niveaux d'adduits entre fumeurs et non-fumeurs à l'exception de l'adduit MDAAdG réduit. Aussi nous avons procédé à une analyse statistique pour vérifier si ces différences étaient significatives. Par cette approche nous avons ainsi observé les résultats suivants.

Le niveau moyen d'AcroG pour tous les échantillons d'ADN de fumeurs était de $5,97 \pm 1,69$ adduits par 10^7 nucléotides normaux, alors que cet adduit n'était ni quantifiable ni détectable dans les 5 échantillons d'ADN des non-fumeurs. Cette différence entre les niveaux d'AcroG était statistiquement significative entre fumeurs et non-fumeurs ($p = 0,0079$).

Tableau 17: Niveaux d'adduits par 10^7 nucléotides normaux dans l'ADN du sang des non-fumeurs

Echantillon d'ADN humain	NF1	NF2	NF3	NF4	NF5
Sexe	M	F	F	M	F
Age	29	38	53	32	54
Status de fumeur	Non-fumeur	Non-fumeur	Non-fumeur	Non-fumeur	Non-fumeur
AcroG	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CrotoG	n.d.	4,12 \pm 2,24	3,18 \pm 1,86	n.d.	1,10 \pm 0,15
AAdG réduit	1,80 \pm 1,10	n.d.	0,11 \pm 0,55	7,00 \pm 3,07	n.d.
FAdG réduit	3,32 \pm 0,80	0,81 \pm 0,39	0,68 \pm 0,25	4,86 \pm 2,95	0,10 \pm 0,15
MDAAdG réduit	12,34 \pm 1,05	17,30 \pm 4,51	13,91 \pm 2,64	18,40 \pm 5,83	4,58 \pm 0,91
HNEdG	0,29	0,34 \pm 0,03	0,26	0,41	0,47 \pm 0,13
GxdG	14,41 \pm 5,96	6,14 \pm 1,80	2,94 \pm 0,66	12,25 \pm 3,46	3,07
CEdG	66,63 \pm 12,15	13,40 \pm 5,64	138,16 \pm 37,81	4,24 \pm 9,75	39,91 \pm 7,10
cMGdG	472,35 \pm 182,70	85,41 \pm 22,06	55,78 \pm 22,19	n.d.	25,61 \pm 11,22

Le niveau moyen de CrotodG pour tous les échantillons d'ADN des fumeurs ($52,08 \pm 7,19$ adduits par 10^7 nucléotides normaux) était significativement supérieur à celui retrouvé chez les non-fumeurs ($2,8 \pm 0,77$ adduits par 10^7 nucléotides normaux) ($p = 0,0079$). De même, les niveaux moyens de FAdG et d'AAdG réduits ainsi que de HNEdG étaient plus élevés dans l'ADN des fumeurs (tableau 18) que ceux des non-fumeurs et ceci de manière significative ($p = 0,0052$, $p = 0,0238$ et $p = 0,0079$, respectivement).

Tableau 18: Moyennes des niveaux d'adduits par 10^7 nucléotides normaux dans l'ADN du sang chez les 5 fumeurs et les 5 non-fumeurs

	Moyennes des niveaux d'adduits par 10^7 nucléotides normaux dans l'ADN du sang de			
	n = 5 fumeurs		n = 5 non-fumeurs	
AcrodG	5,97	$\pm 1,69$	n.d.	
CrotodG	52,08	$\pm 7,19$	2,80	$\pm 0,77$
AAdG réduit	10,02	$\pm 3,07$	2,97	$\pm 1,80$
FAdG réduit	17,80	$\pm 2,74$	1,95	$\pm 1,02$
MDAdG réduit	16,49	$\pm 4,34$	13,31	$\pm 2,73$
HNEdG	1,24	$\pm 0,19$	0,35	$\pm 0,04$
GxdG	185,03	$\pm 52,40$	7,76	$\pm 2,65$
CEdG	162,73	$\pm 31,99$	52,47	$\pm 26,87$
cMGdG	517,03	$\pm 48,21$	159,79	$\pm 104,90$

Concernant les adduits du MDA, le niveau moyen de MDAdG réduit était légèrement supérieur dans l'ADN des fumeurs ($16,49 \pm 4,34$ adduits par 10^7 nucléotides normaux), dans l'ADN des non-fumeurs il s'élevait à $13,31 \pm 2,73$ adduits par 10^7 nucléotides normaux ; aucune différence significative n'a donc pu être observée entre les niveaux de MDAdG réduit entre l'ADN des fumeurs et des non-fumeurs ($p > 0,05$).

Les niveaux d'adduits du Gx et du MG étaient les plus abondants dans tous les échantillons. Néanmoins les moyennes calculées de quantités d'adduits dans l'ADN des fumeurs étaient beaucoup plus élevées que celles retrouvées dans les échantillons d'ADN des non-fumeurs.

Ces différences étaient statistiquement significatives ($p = 0,0196$, $p = 0,0184$ et $p = 0,0159$ pour le GxdG, le CEdG et le cMGdG, respectivement).

Les aldéhydes sont en mélange dans les condensats de fumée. Aussi dans une deuxième étape, nous avons comparé les niveaux moyens d'adduits dans les 2 groupes à ceux obtenus après exposition de l'ADNct au mélange équimolaire d'aldéhydes à 1 mM, détaillée dans le chapitre précédent (Figures 52 et 53).

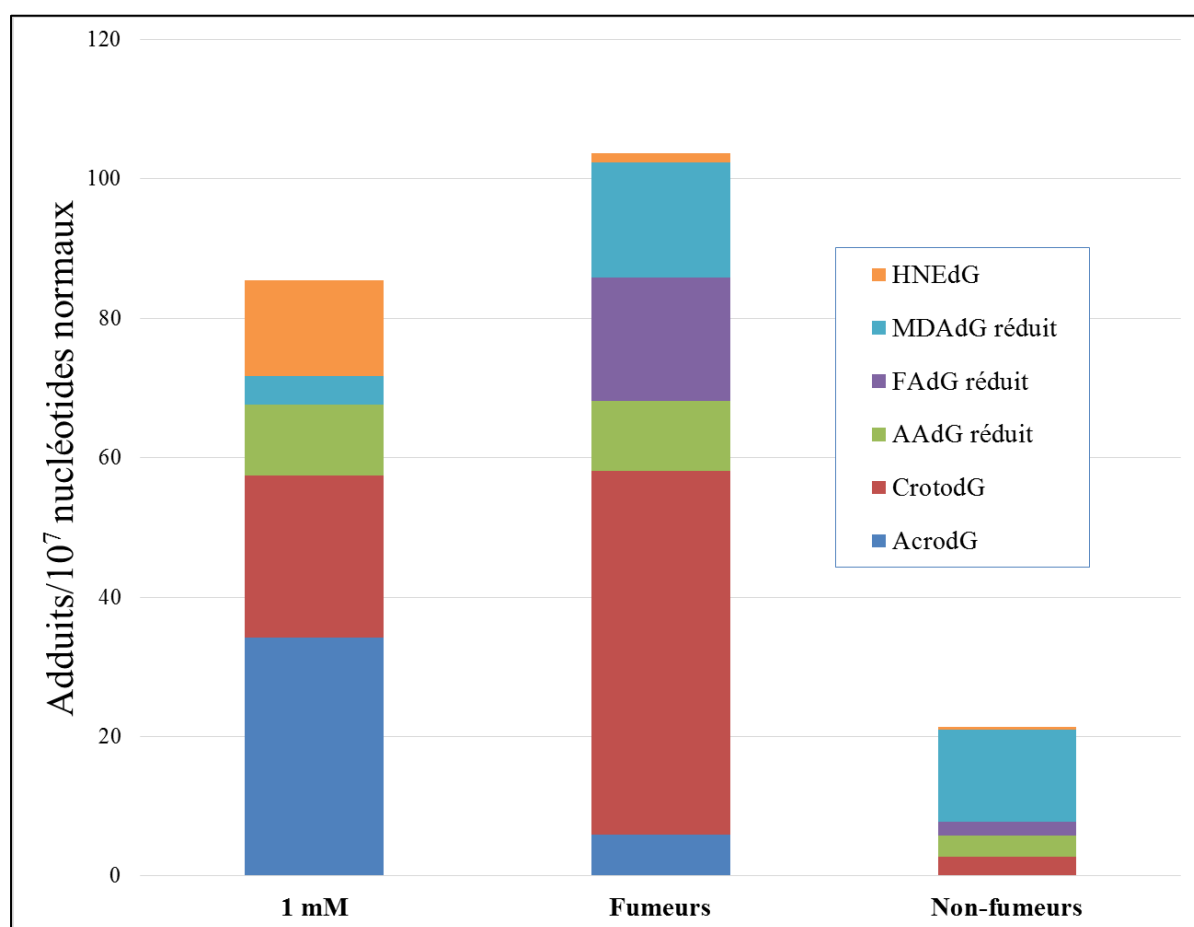


Figure 52: Comparaison des niveaux moyens de 6 adduits dans l'ADN du sang des 5 fumeurs et des 5 non-fumeurs à ceux obtenus suite à l'exposition de l'ADNct en mélange équimolaire (1 mM) d'aldéhydes

L'intérêt porté par cette comparaison est d'observer le profil de ces adduits dans 2 matrices différentes mais liquides. En terme de réactivité, nous pouvons observer, en mélange équimolaire à 1 mM ou au sein de l'ADN humain, que tous les adduits induits par les aldéhydes sont retrouvés dans les échantillons humains mais avec des niveaux différents. Le niveau moyen total d'adduits des aldéhydes, en excluant le GxdG, le CEdG et le cMGdG,

dans l'ADN des fumeurs dépasse celui de l'ADNct modifié *in vitro* avec le mélange équimolaire des 8 aldéhydes à 1 mM tandis que, dans l'ADN des non-fumeurs la réponse est inversée (Figure 52). Or, ce n'est pas le cas dans la figure 53, le niveau moyen total des 3 autres adduits dans l'ADN humain, que ce soit des fumeurs ou pas, est beaucoup plus faible que celui dans l'ADNct malgré la présence du cMGdG uniquement dans l'ADN des fumeurs. De même pour le FAdG réduit, il a été quantifiable dans l'ADN humain des 2 groupes mais non pas dans l'ADNct. En outre, nous pouvons remarquer que les niveaux de HNEdG et d'AcroG sont beaucoup plus faibles dans les échantillons humains par comparaison à ceux mesurés dans l'ADNct modifié.

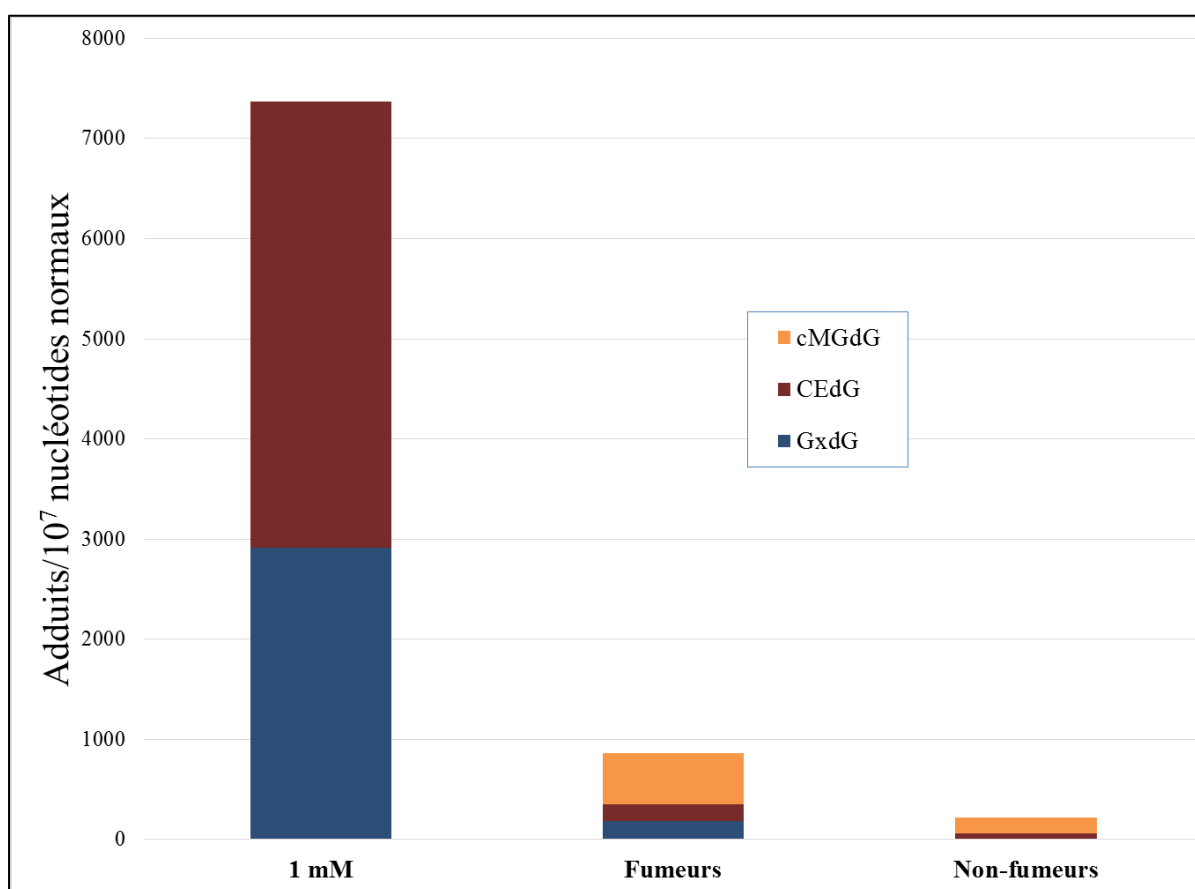


Figure 53: Comparaison des niveaux moyens des 3 autres adduits dans l'ADN du sang des 5 fumeurs et des 5 non-fumeurs à ceux obtenus suite à l'exposition de l'ADNct en mélange équimolaire (1 mM) d'aldéhydes

Dans une dernière analyse, nous avons recherché l'existence ou pas de corrélations significatives entre les adduits et les données tabagiques (nombre de cigarettes/jour, délais de la dernière cigarette fumée, niveau de CO et concentration de cotinine urinaire).

Nous avons ainsi observé des corrélations linéaires entre les niveaux d'AcrodG et de CO ($r = 0,96560$, $p = 0,0076$) et entre les niveaux de GxdG et de CO ($r = 0,92904$, $p = 0,0224$). De plus, une corrélation linéaire a été obtenue entre le niveau de FAdG réduit et la concentration de cotinine urinaire ($r = 0,93053$, $p = 0,0218$). Aucune corrélation significative n'a été observée entre le niveau de MDAdG réduit et les données sur le tabagisme. Les niveaux de CrotodG ont été corrélés au nombre de cigarettes fumées/jour ($r = 0,9000$, $p = 0,0374$). Tandis que le niveau d'AAdG réduit a été corrélée au délai de la dernière cigarette fumée avant la collecte de sang ($r = 0,9000$, $p = 0,0374$). La concentration de cotinine urinaire a été également corrélée aux niveaux de HNEdG ($r = 0,9000$, $p = 0,0374$), de CEEdG ($r = 0,9000$, $p = 0,0374$) et de cMGdG ($r = 0,9000$, $p = 0,0374$).

V- Discussion

L'application de la méthode développée en UHPLC-ESI-MS/MS sur des échantillons biologiques fait partie des recommandations internationales de validation des méthodes analytiques. Nous avons, par la suite, appliqué notre méthode sensible et précise sur un petit nombre d'échantillons d'ADN extrait du sang humain provenant de sujets fumeurs et non-fumeurs pour permettre l'identification du profil des 9 adduits exocycliques à l'ADN et leur quantification. Ce profil a donc été établi pour chacun des sujets. Mais ce qui est intéressant pour notre étude et qui devra faire l'objet d'une confirmation sur un plus grand nombre d'échantillons est la variation significative des profils observée entre les 2 populations non malades : exposée ou non à la fumée de cigarette. Par ailleurs, quelques données d'exposition tabagique ont pu être recueillies. Au sein du groupe des fumeurs, nous avons pu établir des corrélations entre les niveaux d'adduits générés et les marqueurs tabagiques suggérant fortement le lien entre l'exposition exogène aux aldéhydes apportés par le tabac et la présence des adduits exocycliques.

Les principaux résultats de cette étude ont donc été marqués par une différence significative dans les profils d'adduits exocycliques à l'ADN extrait des cellules sanguines de sujets fumeurs et non-fumeurs. Cette variation s'est traduite en particulier par une augmentation des niveaux d'adduits d'ADN dérivés d'aldéhydes apportés certainement en partie par le tabac. Comme il a été mentionné en introduction, la fumée de cigarette contient de nombreux composés organiques volatils (COVs) toxiques pour la santé humaine (Sampson *et al.*, 2014) et notamment les aldéhydes qui présentent des taux bien supérieurs à ceux des HAP et des nitrosamines (Carmella *et al.*, 2009). Dans notre étude, le statut tabagique des 5 fumeurs a été estimé par le nombre de cigarettes consommées quotidiennement et de marqueurs liés au tabagisme, notamment la concentration de cotinine, le principal métabolite de la nicotine dans l'urine et, le niveau de CO dans l'air expiré, méthode immédiate et non invasive (Hecht, 2003 ; Deveci *et al.*, 2004 ; Kim, 2016). Il est à noter que les expositions alimentaires ou environnementales peuvent contribuer un peu à la charge corporelle de ces biomarqueurs du tabagisme. Comme indiqué précédemment, nos résultats ont fourni des niveaux de cotinine dans les urines des fumeurs à des concentrations supérieures à 100 µg/g de créatinine (seuil de tolérance entre fumeurs et non-fumeurs) avec des concentrations médianes de 2315 µg/g de créatinine (Goniewicz *et al.*, 2011 ; Paci *et al.*, 2018). Ce biomarqueur peut être lié au nombre de cigarettes qui reste élevé pour chaque fumeur (valeur médiane de 20 cig/jour, 13 -

30 cig/jour). Dans notre étude, en tenant compte du nombre de cigarettes consommées quotidiennement et en estimant les quantités de composés déjà présentes dans les condensats de fumée de tabac fournis par le CIRC, les fumeurs sont certainement exposés à des concentrations élevées pouvant aller du μg au mg d'aldéhydes. Elles incluent le FA, l'AA, le Croto et l'Acro (IARC, 1986).

Concernant l'impact de cette exposition, la littérature relate que ces aldéhydes endommagent l'ADN par réaction avec le groupe amino exocyclique des bases dans divers tissus humains. Ils peuvent par ce mécanisme entraîner la formation de lésions promutagènes et augmenter le risque de développer un cancer (pour revue, Voulgaridou *et al.*, 2011 ; Sapkota et Wyatt, 2015 ; Hecht, 2017). En effet, des adduits exocycliques à l'ADN induits par des aldéhydes α,β -insaturés ont déjà été détectés à des niveaux significativement élevés dans les cellules broncho-alvéolaires ainsi que dans des épithélia bronchique et pulmonaire de fumeurs (Hecht *et al.*, 2016). Des données récentes obtenues chez la souris suggèrent que la cancérogénicité du FA, de l'AA, du Croto et de l'Acro dans le poumon et la vessie seraient prépondérantes à celles des autres carcinogènes de la fumée. Les mécanismes étudiés et avancés ont porté sur la présence des adduits exocycliques à l'ADN dans ces tissus, sur l'inhibition de la réparation de l'ADN et sur une prévention de l'activation métabolique des autres procarcinogènes du tabac comme les HAP (Weng *et al.*, 2018). Indépendamment de leur capacité d'adduction à l'ADN, les aldéhydes sont capables de se lier aux protéines et d'altérer leurs fonctions (Xie *et al.*, 2016). Aussi, ces résultats concordent avec nos résultats, qui montrent une différence significative entre les niveaux de tous les adduits exocycliques de l'ADN chez les fumeurs avec ceux mesurés chez les non-fumeurs, à l'exception du MDAdG réduit.

L'effet génotoxique des aldéhydes, résultant d'une exposition exogène ou de la LPO, est connu pour être modulé par la concentration de ces produits et de leur disponibilité *in situ*, elles mêmes dépendantes de leur forte réactivité mais aussi de la présence des mécanismes de défense anti-oxydante, des enzymes de réparation de l'ADN et du lipide initialement ciblé par la peroxydation (Voulgaridou *et al.*, 2011). Dans les poumons, les réactifs de la LPO se dégradent très lentement, ce qui entraîne une plus grande accumulation de ces réactifs et la formation de nombreuses lésions tissulaires, y compris des adduits (Mol *et al.*, 2017 ; Weng *et al.*, 2018). Dans cette situation, les aldéhydes peuvent s'accumuler différemment dans le corps et cibler certains tissus. Dans les voies respiratoires, chez l'homme, la cellule buccale est le premier type cellulaire exposée à la fumée de cigarette, suivie des cellules épithéliales bronchiques et des macrophages dans les poumons. Dans des conditions d'exposition au tabac, les niveaux d'adduits réduits d'ADN dérivés du FA ont été détectés par LC-ESI-

MS/MS, dans des échantillons de salive de fumeur à des niveaux moyens de $99,6 \pm 75,7$ adduits par 10^7 nucléotides normaux (Li *et al.*, 2017). Ces niveaux sont bien supérieurs à ceux mesurés dans les leucocytes des fumeurs de notre étude ($17,80 \pm 2,74$ par 10^7 nucléotides normaux). Dans une autre étude avec la même méthode analytique, le CrotoDg a été détecté dans des échantillons de salive de fumeurs ($n = 16$) à 26 ± 21 adduits par 10^7 nucléotides normaux (Yang *et al.*, 2019). Weng *et al.*, par une approche immunochimique, ont détecté de manière significative le CrotoDg dans les cellules buccales humaines ($p < 0,0001$) et dans les expectorations ($p < 0,05$) à des niveaux plus élevés chez les fumeurs ($n = 33$ et $n = 22$, respectivement) par rapport aux non-fumeurs ($n = 17$ et $n = 8$, respectivement) (Weng *et al.*, 2018). En ce qui concerne les adduits dérivés de l'Acro, ces auteurs ont obtenu une augmentation significative dans les échantillons de fumeurs par rapport aux échantillons de non-fumeurs, dans la salive ($p < 0,0001$) et dans les expectorations ($p = 0,0093$). Dans le tissu pulmonaire, plusieurs études ont également détecté ces adduits, mais sans aucune différence significative entre les sujets exposés ou non à la fumée de tabac (Singh *et al.*, 2009 ; Weng *et al.*, 2018). De manière similaire, plusieurs études utilisant les méthodes LC-ESI-MS ont analysé l'AcroDg dans l'ADN des leucocytes humains et la salive après exposition à la fumée de cigarette (Zhang *et al.*, 2011 ; Li *et al.*, 2017). Au contraire, les niveaux d'AcroDg dans notre étude sont nettement plus élevés chez les fumeurs que chez les non-fumeurs. Nous suggérons une raison pour expliquer nos résultats par rapport aux études précédentes : le moment choisi pour l'échantillonnage ; il peut influencer la formation, la persistance d'adduits induits par les aldéhydes dans les leucocytes humains et, par conséquent, le niveau de détection. Il est possible que les niveaux élevés d'exposition aux aldéhydes dans les leucocytes proviennent de la consommation cumulée de cigarettes mais également de la dernière cigarette fumée dans les 12 dernières heures avant l'examen médical, comme l'indiquent les marqueurs liés au tabagisme : la consommation de cigarette dans un bref délai avant la consultation ($2,15 \pm 0,74$ h) et la mesure du CO ($18,00 \pm 8,46$ ppm) dans l'air expiré.

Par ailleurs, il est bien connu qu'une consommation excessive de sucres alimentaires pourrait interférer avec le métabolisme des lipides. La glycation est initiée par une réaction d'addition nucléophile entre le groupe amino libre d'une protéine, un lipide ou un acide nucléique et le groupe carbonyle des monosaccharides (Aragno et Mastrocola, 2017). Notamment, chez les animaux, les effets métaboliques d'une restriction calorique ont été atténués par l'enrichissement alimentaire en MG, ce qui montre que les produits alimentaires de glycation avancée (AGE) peuvent induire un stress oxydant (Cai *et al.*, 2008). Le GxdG différerait

significativement entre les fumeurs et les non-fumeurs. Les taux de Gx et de MG ont été observés dans le plasma des diabétiques (Lapolla *et al.*, 2003). Il est bien connu que la nicotine influence le métabolisme du glucose en augmentant la production du cortisol, une hormone hyperglycémiant dans le sang (Tweed *et al.*, 2012). Le tabagisme est un facteur de risque de diabète de type 2. Le taux élevé de GxdG pourrait être lié indirectement à l'activité hyperglycémique de la nicotine du tabac.

L'absence de variation dans les niveaux de MDAdG réduit entre les deux groupes est cohérente avec les études précédentes qui n'ont rapporté aucune relation significative avec le tabagisme, mais plutôt avec des facteurs tels que le régime alimentaire, les habitudes de vie et l'inflammation chronique (Everett *et al.*, 2001 ; Leuratti *et al.*, 2002). Dans notre étude les données sur la santé et l'alimentation n'étaient pas disponibles. Néanmoins, comme observé précédemment dans deux études, les adduits à l'ADN induits par le MDA ont été détectés dans de l'ADN de leucocytes humains de sujets en bonne santé à des niveaux allant de 0,0004 à 0,915 MDAdG réduit/ 10^7 nucléotides normaux (n = 25) et $0,62 \pm 0,12$ M₁dG/ 10^7 nucléotides normaux (n = 10) mais sans aucune corrélation évidente avec le tabagisme (Rouzer *et al.*, 1997 ; Ma *et al.*, 2014). Dans une autre étude sur l'exposition professionnelle à l'amiante, des taux plus élevés de M₁dG ont été observés dans les leucocytes de gros fumeurs (> 40 sachets/an, n = 12) par rapport aux non-fumeurs (n = 136), mais pareillement aucune différence n'a été observée chez les fumeurs modérés (20,1 à 40 paquets/an, n = 29), fumeurs légers (0,1 à 20 paquets/an, n = 20) et non-fumeurs (Bonassi *et al.*, 2017). Dans une autre étude cas-témoins réalisée en Thaïlande sur les effets du régime alimentaire aux niveaux du dosage de M₁dG chez les travailleurs des zones industrielles, aucune différence n'a été observée entre les fumeurs (n = 46) et les non-fumeurs (n = 17) parmi ces travailleurs (Peluso *et al.*, 2012). Cependant, dans le groupe témoin, les niveaux d'adduits étaient significativement plus élevés chez les fumeurs (n = 64) que chez les non-fumeurs (n = 53) (Peluso *et al.*, 2012). Ce qui est intéressant de noter c'est que ces auteurs ont observé une association inverse significative entre le M₁dG et la consommation de fruits et légumes chez les témoins. Les effets bénéfiques de ce régime alimentaire semblent être dus à ses composants essentiels, tels que les antioxydants et les polyphénols présents dans les fruits, les légumes, le vin et l'huile d'olive (Saieva *et al.*, 2016).

Une relation significative entre un marqueur spécifique lié au tabagisme et les niveaux de tous les adduits à l'ADN induits par les aldéhydes n'a pas été observée chez les fumeurs dans notre étude. Même si des corrélations significatives entre le CrotodG et le nombre de

cigarettes, le FAdG réduit, le HNEdG, le CEEdG et le cMGdG avec la concentration de cotinine urinaire, le GxdG et l'AcrodG avec le niveau de CO et, l'AAAdG réduit avec le délai de la dernière cigarette fumée, ont été observées, il pourrait être incorrect d'établir une relation entre un type d'adduit exocyclique à l'ADN et un marqueur spécifique d'exposition au tabagisme actif. Plusieurs raisons peuvent être citées : *i*) des données sont disponibles pour une petite population trop faible pour la puissance des tests statistiques *ii*) les paramètres de clairance cinétique de chaque adduit sont inconnus pour la plupart des échantillons et, *iii*) les données épidémiologiques concernant le régime et le stress oxydant endogène sont inconnus et, par conséquent, les interactions entre tous les agents ne sont pas intégrées. Le fait que nous ayons une relation significative avec un marqueur spécifique lié au tabac, mais pas tous, tend à exclure qu'un seul biomarqueur ne soit pas suffisant. La disponibilité d'un profil de biomarqueurs d'exposition serait nécessaire pour intégrer un ensemble d'expositions simultanées.

Les aldéhydes sont présents en mélange dans la fumée de cigarette (Wynder *et al.*, 1965). Bien qu'il soit important de rappeler de l'implication des mécanismes de réparation des lésions d'ADN dans les cellules eucaryotes notamment les NER et BER et l'absence de ceux-ci dans les modèles acellulaires (Minko *et al.*, 2009 ; Tudek *et al.*, 2017 ; Bukowska et Karwowski, 2018), la comparaison entre le profil de plusieurs adduits exocycliques à l'ADN obtenus *in vitro* et celui retrouvé dans l'ADN humain montre une similarité en terme de réactivité. Tous les adduits étudiés sont présents dans l'ADN humain avec des niveaux différents selon les expositions. Ces résultats tendent à souligner que l'organisme humain est exposé de manière systémique aux aldéhydes et que ces derniers peuvent opérer leur activité électrophile dans les cellules sanguines.

L'ordre décroissant général des composés carbonylés dans la fumée de tabac est : AA (1110 - 2101 µg/cig) > Acro (238 - 468 µg/cig) > FA (87 - 243 µg/cig) > Croto (40 - 50 µg/cig) > MDA (18,9 - 36 µg/cig), MG (13,4 - 59,6 µg/cig) > Gx (1,93 - 6,98 µg/cig) (Fujioka et Shibamoto, 2006). Ceci pourrait expliquer les niveaux relativement faibles de CEEdG et GxdG dans les échantillons humains, que ce soient des fumeurs ou pas.

En ce qui concerne les principaux aldéhydes présents dans la fumée de cigarette l'Acro et le Croto, nous avons constaté que plus la concentration équimolaire était élevée, plus AcrodG prédominait sur CrotodG. Or ce n'est pas le cas pour les fumeurs de notre étude : l'AcrodG est à un niveau inférieur à celui du CrotodG, mais si l'on prend la littérature dans le cadre d'une exposition chronique à la fois chez l'homme et chez l'animal, ce sont les adduits

induits par l'Acro qui prédominent. Weng *et al.* (2018) ont découvert que les adduits induits par l'Acro sont majoritaires par rapport à ceux induits par le Croto dans le poumon de souris. Le gène suppresseur de tumeurs *TP53* est fréquemment muté dans les tumeurs du poumon de fumeurs. Feng *et al.* (2006) a montré *in vitro* que la distribution de l'AcrodG sur le gène *TP53* était similaire à celle décrite dans les tumeurs du poumon humain. Pour expliquer nos résultats divergents de l'AcrodG de ceux des autres études, il est possible que l'électrophilie de l'Acro se soit déportée sur d'autres bases de l'ADN, ce qui peut expliquer les faibles taux d'AcrodG. En effet, des adduits de l'Acro à la dA et à la dC ont déjà été retrouvés à la fois dans la lignée cellulaire A549 et dans des leucocytes humains, dont certains peuvent être présents à des niveaux comparables à ceux de l'AcrodG prédominant (Yin *et al.*, 2013). Ceci est sans tenir compte du type de tabac consommé en Belgique et sa composition en Acro et Croto d'où l'intérêt d'explorer sur d'autres populations.

Par ailleurs, le HNEdG est resté à des niveaux bas dans les échantillons humains, que ce soit des fumeurs ou non. Une explication souvent avancée dans la littérature est que le HNE est hautement toxique vis-à-vis de la cellule. Il est extrêmement réactif surtout vis-à-vis des protéines plasmatiques avec lesquelles il peut se lier de manière covalente, surtout s'il n'est pas pris en charge au préalable par le GSH cytosolique. Dans ces conditions il y a peu de HNE qui atteignent le noyau pouvant expliquer le peu de dommages causés à l'ADN (Xie *et al.*, 2016). A l'inverse, les niveaux relativement forts de l'AAdG et le FAdG réduits pourraient être dus à la proportion des aldéhydes correspondants dans la fumée de tabac mais aussi à la faible réactivité de l'AA avec le GSH et les protéines cytosoliques et à la cytotoxicité modérée du FA. Cette faible réactivité avec les éléments cytoplasmiques leur permet de diffuser dans le noyau, induisant des dommages substantiels à l'ADN (Xie *et al.*, 2016).

Malgré les faibles effectifs, les résultats de l'étude actuelle soulèvent des questions intéressantes sur la possibilité que les faibles niveaux d'adduits exocycliques à l'ADN chez les individus en bonne santé pourraient correspondre à un profil basal et que les niveaux élevés chez les fumeurs non malades seraient considérés comme un biomarqueur d'exposition spécifique au tabac. Cependant, le niveau d'adduits dans l'ADN des leucocytes peut signifier la présence des aldéhydes dans le sang issus de la formation endogène des adduits et de l'exposition environnementale. La relation constante entre les niveaux d'adduits liés significativement à une consommation tabagique suggère que la détection des adduits FAdG réduit, AAdG réduit, CrotodG, AcrodG et HNEdG chez des individus sains et non-fumeurs

peut représenter partiellement des quantités de base liées à une exposition endogène en lien avec la LPO. La LPO est un processus physiologique cellulaire qui a un effet bénéfique sur la promotion de la prolifération cellulaire et de la survie en fonction de la concentration intracellulaire d'aldéhydes. Un dépassement d'une concentration à l'état d'équilibre des espèces dérivées de la LPO entraîne un risque de dommages cellulaires par l'inactivation de diverses enzymes et l'inhibition de la synthèse de l'ADN et des protéines (Valko *et al.*, 2007). Collins et ses collègues (1993) ont déjà détecté des dommages oxydatifs importants dans les lymphocytes d'individus en bonne santé. Par ailleurs, des données de la littérature ont indiqué que la LPO et les dommages oxydatifs sur l'ADN générés par des intermédiaires oxydés stables peuvent représenter également les effets oxydatifs induits par la fumée de cigarette (Cao *et al.*, 2016). Des niveaux élevés de carbonyles tels que l'Acro, le HNE, le FA, l'AA, le propanal et le MDA ont été mesurés dans la fumée de cigarette (Fujioka et Shibamoto, 2006 ; Sampson *et al.*, 2014 ; Sapkota et Wyatt, 2015). Les aldéhydes réactifs α,β -insaturés générés par la LPO pourraient contribuer ainsi aux pathologies liées au stress oxydant en raison de la modification de biomolécules autre que le cancer (Sousa *et al.*, 2017).

Pour conclure, la méthode UHPLC-MS/MS validée s'est révélée suffisamment sensible et précise pour mesurer au cours d'une même analyse dans l'ADN du sang humain, les 9 adduits exocycliques à l'ADN dérivés des 8 principaux aldéhydes exogènes et endogènes.

Si les objectifs du départ n'ont pu être atteints en raison du nombre de recrutements insuffisant mais aussi du manque de temps pour une analyse fine des prélèvements biologiques en lien avec les données cliniques avec une puissance statistique suffisante, ces premiers résultats restent très encourageants. Ils pourront être enrichis ultérieurement avec l'analyse d'autres échantillons actuellement stockés au congélateur -80°C. Il sera d'ailleurs intéressant de vérifier également l'impact du sevrage tabagique sur l'évolution de ce profil d'adduits exocycliques dans les échantillons sanguins prélevés chez le même patient lors des séances d'accompagnement au sevrage à un mois d'intervalle.

La méthode ainsi développée pourra être utilisée dans l'avenir dans les approches adductomiques, en particulier pour évaluer les dommages à l'ADN attribuables au stress oxydant. Parallèlement, il sera essentiel de consolider l'utilisation de ces profils d'adduits exocycliques à l'ADN comme biomarqueurs d'exposition spécifiques aux aldéhydes présents dans d'autres environnements que ceux pollués par le tabac. C'est pourquoi, nous avons mis en place une étude sur des policiers exposés à la pollution urbaine.

V. Chapitre 5 : Etude en milieu professionnel de différents biomarqueurs pour le suivi de l'exposition aux aldéhydes en milieu urbain

Le cinquième et dernier chapitre de ce manuscrit sera consacré en majorité à la description de l'étude en milieu professionnel et à la méthodologie adaptée. La partie expérimentale comportera la caractérisation de la population et de son exposition aux aldéhydes, les questionnaires établis et renseignés pendant l'étude, les prélèvements et les tests effectués, les protocoles de dosage de différents biomarqueurs (du stress oxydant, de génotoxicité et du tabagisme passif) pour le suivi de l'exposition aux aldéhydes en milieu urbain. Les résultats obtenus suite au dosage de quelques biomarqueurs effectué jusqu'à présent seront présentés et discutés à la fin de ce chapitre. L'ensemble sera suivi d'une discussion générale s'ouvrant vers de nouvelles perspectives.

I- Objectif de l'étude

Malgré l'intérêt croissant de ces dernières années pour la mise en évidence de l'éventuel effet de l'exposition aux aldéhydes sur les marqueurs de génotoxicité, il n'existe actuellement, à nos connaissances, aucune étude en population pour l'évaluation des effets génotoxiques des aldéhydes exogènes. Ces effets ont été documentés dans les tissus nasaux de rongeurs et de primates après une exposition par inhalation du FA. Dans les études publiées précédemment, on observe une grande variabilité en fonction de l'âge, des expositions et des modes de vie (Lu *et al.*, 2010a ; 2010b ; Wang *et al.*, 2013 ; Schroeter *et al.*, 2014 ; Lima *et al.*, 2015 ; Yu *et al.*, 2015 ; Lai *et al.*, 2016). Toutefois, les mécanismes biochimiques exacts impliqués dans la carcinogénèse induite par les aldéhydes ne sont pas clairs et font l'objet de recherches approfondies.

La qualité de l'air est une préoccupation environnementale majeure en milieu urbain, en particulier à cause des effets potentiels sur la santé des personnes résidants à proximité de sources de contamination. Les polluants atmosphériques, notamment les COVs tel que le FA, induisent un stress oxydant et sont des sources importantes des ERO qui interagissent avec l'ADN, les protéines et les lipides, entraînant la LPO (Altemose *et al.*, 2017 ; Kwon *et al.*, 2018 ; Montero-Montoya *et al.*, 2018). Une augmentation des niveaux d'adduits résulte de cette production des sous-produits réactifs de la LPO. La pertinence des adduits dans le processus cancérogène est due à leur capacité à bloquer la réplication et à induire des mutations de paires de bases. Les mutations et les modifications de la méthylation de l'ADN sont des caractéristiques importantes de la cancérogénèse, et des études cliniques ont en effet montré qu'une augmentation des niveaux d'adduits, *e.g.* M₁dG, pouvait être liée au développement du cancer et à la progression tumorale (Grigoryeva *et al.*, 2015 ; Ceppi *et al.*, 2017).

Afin d'identifier les impacts potentiels sur la santé associés à l'exposition aux aldéhydes exogènes, nous avons mené une étude au Liban, afin d'évaluer différents biomarqueurs du stress oxydant, inflammatoires et de génotoxicité chez des policiers travaillant à proximité du trafic routier. En raison de la forte densité de la population et de l'augmentation du nombre de véhicules, la vitesse de la circulation urbaine à Beyrouth est très lente et le policier responsable de la circulation a besoin de rester longtemps au carrefour des routes principales

pour guider le trafic. Les émissions du parc automobile est l'une des principales sources de polluants atmosphériques dans les zones urbaines du Liban et la police de la circulation est l'une des populations les plus exposées à la pollution atmosphérique comme le montrent nos études publiées précédemment (Borgie *et al.*, 2014 ; 2015a ; 2015b). D'autres études antérieures ont confirmé que les agents de la police de la circulation étaient exposés à des niveaux beaucoup plus élevés de polluants atmosphériques, tels que le benzène que les policiers de bureau (Fustinoni *et al.*, 2004 ; Han et Naehner, 2006 ; Sapkota *et al.*, 2006 ; Arayasiri *et al.*, 2010).

Dans cette optique, nous avons mené une étude épidémiologique afin d'explorer la relation entre l'exposition environnementale et les biomarqueurs du stress inflammatoire, du stress oxydant et des dommages à l'ADN chez les agents de la circulation au Liban. La présente étude ajoutera de preuves de potentielles associations entre les niveaux des aldéhydes et les marqueurs de réponses génotoxiques chez l'Homme.

II- Méthodologie

Une étude épidémiologique a été mise en place au Liban sous la direction du Pr. Zeina DAGHER au sein du laboratoire L2GE, équipe Microbiologie/Tox-EcoTox de l'Université Libanaise. Le principal objectif de cette étude était d'évaluer l'état du stress oxydant et de rechercher une association entre les émissions du parc automobile, notamment l'exposition aux aldéhydes exogènes et donc, endogènes, et l'augmentation subséquente des biomarqueurs d'effet génotoxique précoce et du risque du cancer.

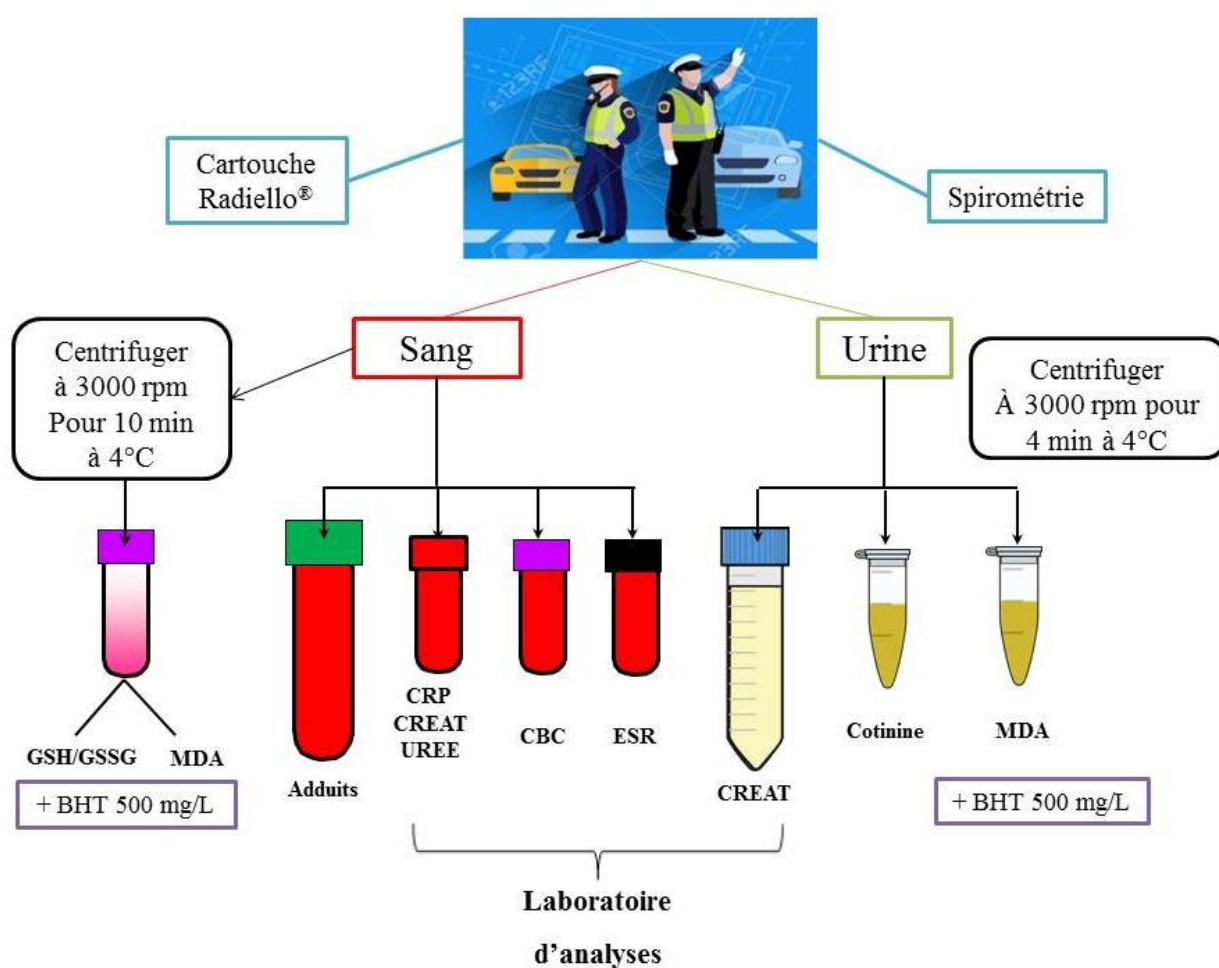


Figure 54: Méthodologie adoptée pour la mise en place de l'étude épidémiologique

Abréviations : CBC, Complete Blood Count ou Formule sanguine ; ESR, Erythrocyte Sedimentation Rate ou vitesse de sédimentation ; MDA, malondialdéhyde ; BHT, Hydroxytoluène butylé ; CREAT, créatinine ; CRP, protéine-C-réactive ; UREE, urée ; GSH, glutathion réduit ; GSSG, glutathion oxydé.

III- Partie expérimentale

1. Caractérisation de la population

L'objectif est de réaliser une étude épidémiologique longitudinale au Liban sur 100 policiers non-fumeurs pendant une période d'exposition de 5 jours (avec des prélèvements en pré- et post-exposition). Tous les policiers recrutés lors de cette étude devaient répondre aux critères suivants : *i*) tous les participants étaient des hommes ; *ii*) avaient exercé la profession de policier pendant au moins un an ; *iii*) sans antécédents de cancer, de maladies du rein ou du cœur et *iv*) sans exposition antérieure à un cancérigène connu. Au total, 110 policiers ont répondu à notre recrutement et 99 policiers ont terminé l'étude. Les policiers travaillaient aux intersections des routes principales en service et nous avons pris en compte le temps de service cumulé aux intersections.

Cette étude a été approuvée par le Comité d'éthique pour la recherche de l'Université Libanaise. Tous les participants ont été informés de l'étude et ont signé le formulaire de consentement conformément aux directives du comité d'éthique local.

2. Questionnaires général et quotidien

Tous les participants ont rempli un questionnaire quotidien et un général plus détaillé saisi une fois le sujet termine l'étude. Le questionnaire quotidien porte surtout sur leur activité quotidienne et leur éventuelle exposition au tabagisme passif ou à d'autres sources d'aldéhydes en plus de leur exposition aux émissions du trafic routier. Ce questionnaire a été établi en se basant sur la méthodologie de collection des données d'activité contextuelles et temporelles (en anglais, *time-activity diary*) adaptée dans plusieurs études antérieures (Topinka *et al.*, 2007 ; Morabia *et al.*, 2009 ; Gurung et Bell, 2012 ; Prasad *et al.*, 2013).

Le dernier jour les policiers ont rempli un questionnaire général personnel comportant des renseignements sur les caractéristiques individuelles, des informations pratiques telles que le nombre d'années de service et la durée moyenne d'activité en plein air chaque année. Ce questionnaire a été établi en se basant sur les questionnaires de l'enquête européenne sur la santé respiratoire (ECRHS) et du CIRC. Des informations sur les facteurs confondants potentiels, telles que le tabagisme, les habitudes de consommation d'alcool, le régime alimentaire, les médicaments et les habitudes d'exercice ont également été obtenues (une copie des 2 questionnaires en annexes).

3. Prélèvements et traitement des échantillons

Les prélèvements ont été réalisés en 2 points (pré- et post-exposition) pour tous les marqueurs sauf pour le bilan sanguin. En pré-exposition, juste la créatinine urinaire a été mesurée dans une perspective de rapporter le MDA urinaire par gramme de créatinine. Quant à la clairance rénale, elle sera évaluée à partir de la créatinémie connaissance l'âge, le sexe et le poids. Le bilan sanguin est réalisé en point unique après le travail.

4. Test de la fonction pulmonaire

Nous avons surveillé la fonction pulmonaire *c.-à-d.* le ratio du volume expiratoire maximal en une seconde (VEMS) (ou FEV *en anglais*) sur la capacité vitale forcée (CVF) (ou FVC *en anglais*). Il s'agit d'une mesure de la quantité d'air expiré avec force en une seconde par rapport à la quantité totale d'air pouvant être expiré de force avec une respiration complète. La quantité d'air expirée en une seconde est également enregistrée en fonction de la quantité totale d'air que le sujet peut expirer. Sur la base du nombre de CVF calculé pour l'âge et la taille, le rapport de ces 2 valeurs est ensuite évalué. De même, le Débit Expiratoire Moyen entre 25 et 75% de la CVF (ou FEF₂₅₋₇₅, Forced Expiratory Flow *en anglais*) a été évalué. Ce test a été réalisé par spiromètre portatif piloté par PC, Easy on-PC (NDD, Liban).

5. Caractérisation de l'exposition aux aldéhydes

La caractérisation de l'exposition aux aldéhydes au niveau de la zone respiratoire a été évaluée par les cartouches Radiello 165. Chaque policier porte une cartouche pendant la période d'activité et pour 5 jours d'exposition. Les cartouches ont été analysées par HPLC-UV et selon les instructions du kit. Cette procédure a pour objet d'évaluer le taux d'aldéhydes auxquels un policier stationné sur la route est exposé en utilisant des cartouches Radiello[®] diffusives et spécifiques pour les aldéhydes. Le dispositif Radiello[®] est constitué d'une cartouche interne de silice imprégnée de 2,4-dinitrophénylhydrazine (2,4-DNPH) contenue dans un corps externe poreux et cylindrique. Les aldéhydes-hydrazines formées dans la cartouche sont d'abord, éluées avec de l'acétonitrile ensuite, la solution est filtrée avant analyse en HPLC-UV. Parmi les aldéhydes adsorbés sur la cartouche, on s'intéresse le plus, dans notre étude, sur 4 aldéhydes : le FA, l'AA, l'Acro et le benzaldéhyde. Selon cette méthode, les temps de rétention obtenus sont de 2,6 ; 6,4 ; 8,8 ; 14,8 et 26 min pour la 2,4-DNPH, le FA, l'AA, l'Acro et le benzaldéhyde respectivement. L'injection des différents points de la gamme étalon attribue à la quantification des aldéhydes présents dans l'air et à

évaluer par la suite les seuils d'exposition quotidienne et la toxicité de ces aldéhydes pour l'Homme et en particulier pour les policiers qui gèrent le trafic routier au Liban. Il faut vérifier la présence et l'abondance du pic chromatographique de 2,4-DNPH ; sinon, la cartouche pourrait être saturée. A noter qu'après exposition, les cartouches maintenues bien fermées à 4°C sont stables pendant 60 jours tandis qu'après élution de la cartouche, la solution obtenue, bien bouchée et conservée à 4°C, est stable pendant au moins 42 jours.

6. Marqueurs biologiques

6.1. Bilan sanguin et créatinine urinaire

Les dosages suivants ont été réalisés au Centre Médical Saint Joseph sous la direction du Dr. Makram BOUSTANY (Beyrouth, Liban) : la formule sanguine (automate Horiba, Yumizen, H2500), la vitesse de sédimentation (ESR) (lecteur vacuette, SRS 20/II, Grenier bio-one), la protéine-C-réactive (CRP) (kit CRPL3, # 04956842, Cobas c 501, Roche), l'urée (kit UREAL, #04460715, Cobas c 501, Roche), la créatinine sanguine et la créatinine urinaire (kit CREP2, # 03263991, Cobas c 501, Roche).

6.2. Biomarqueurs du stress oxydant

6.2.1. MDA urinaire et plasmatique

Les échantillons ont été complétés par du BHT pour éviter toute formation spontanée du MDA dans le milieu. Cette procédure a pour objet d'évaluer la concentration du MDA dans l'urine et le plasma après des prélèvements humains. Le dosage est réalisé par HPLC-UV. En milieu acide et à chaud (95°C), la réaction d'une mole de MDA avec 2 moles d'acide thiobarbiturique (TBA) produit un adduit rouge (TBA)₂-MDA, la base de schiff (Figure 55). Le complexe est facilement élué par un solvant organique comme le KH₂PO₄/méthanol. La détection est effectuée à 532 nm. L'injection des différents points de la gamme étalon montre que le blanc dans cette manipe donne un pic au même temps de rétention que l'analyte et que cette méthode est linéaire de 0 à 5 µM (r = 0,9998). Selon cette méthode, le temps de rétention obtenu est de 2,6 min. La limite de détection de la technique utilisée est de 0,128 µM selon l'article de référence (Agarwal et Chase, 2002).

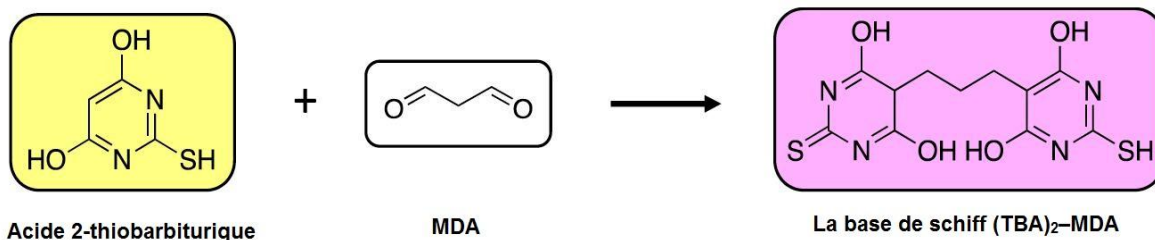


Figure 55: Réaction de l'acide 2-thiobarbiturique (2-TBA) avec le MDA.

Le 2-TBA réagit avec le MDA pour former un produit coloré mesuré par spectrophotométrie à 532 nm. L'intensité du produit coloré reflète le niveau de la peroxydation lipidique dans l'échantillon.

6.2.2. GSH/GSSG plasmatique

Le glutathion est un composé tripeptidique existant dans l'organisme impliqué dans l'antioxydation comme substrat enzymatique de la glutathion peroxydase, de la glutathion S-transférase, de la thiol transférase, etc. Le glutathion est généralement présenté sous forme réduite (GSH), mais le GSH est converti en une forme oxydée (GSSG) par stimulation du stress oxydant. Par conséquent, le rapport GSH/GSSG a été ciblé en tant qu'indice de stress oxydant. Ce rapport est effectué en suivant les instructions du fournisseur du kit (Kit, réf. 38185, Sigma). Le GSH dans un échantillon peut être éliminé en ajoutant le réactif de masquage fourni par le kit (Figure 56).

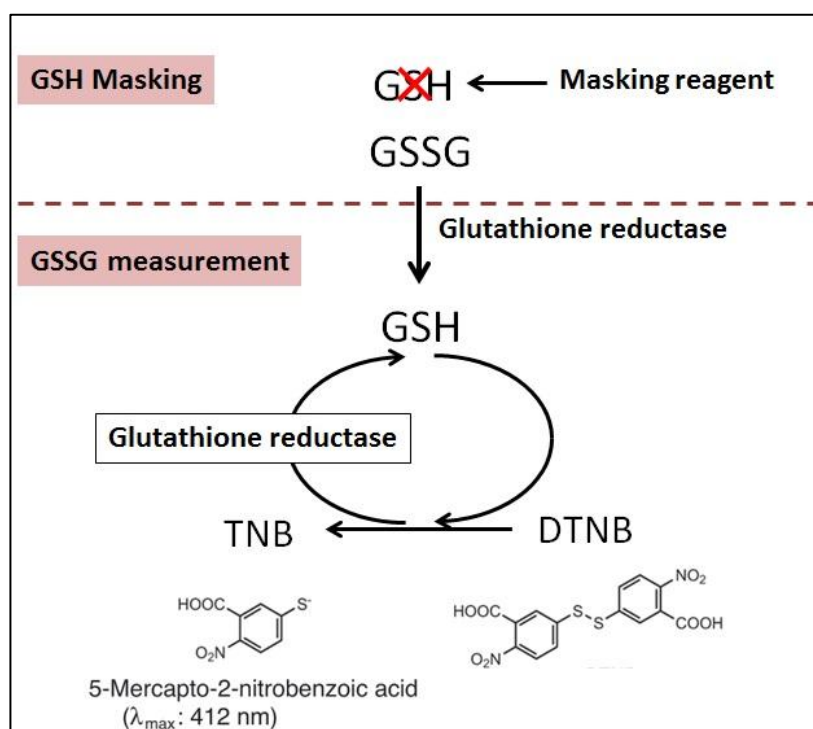


Figure 56: Principe de détection du rapport GSH/GSSG

Par conséquent, le GSSG dans l'échantillon peut être déterminé de manière sélective en mesurant l'absorbance ($\lambda_{\text{max}} = 412 \text{ nm}$) dérivée d'une réaction colorimétrique du DTNB (acide 5,5'-dithiobis (acide 2-nitrobenzoïque)) couplée au système de recyclage enzymatique. La quantité de GSH peut également être déterminée en soustrayant la quantité de GSSG de la quantité totale de glutathion.

6.3. Biomarqueurs de génotoxicité

Quatre tubes héparine de 5 mL ont été prélevés en pré et post-exposition pour chaque sujet. Après extraction de l'ADN à partir de 5 mL de sang total et réduction comme décrit dans le chapitre IV pour préserver la stabilité des adduits, les échantillons ont été stockés à -80°C en vue de l'analyse adductomique.

6.4. Biomarqueurs du tabagisme passif

Cette procédure a pour objet d'évaluer la concentration de la cotinine, le métabolite de la nicotine, dans les urines des fumeurs actifs ou passifs par HPLC-UV, en utilisant une méthode d'extraction en phase solide (SPE), afin d'apprécier l'intensité de l'imprégnation tabagique sachant que la cotinine est un marqueur spécifique du tabac.

6.4.1. Détermination de LLOD et LLOQ de la méthode de dosage de la cotinine urinaire

Cette procédure a pour objet de vérifier la méthode utilisée pour le dosage de la cotinine urinaire. Cette méthode est une combinaison de 2 méthodes différentes publiées par Fukumoto (2005) et Zouani *et al.* (2011). Il faut tout d'abord, déterminer les LLOD et LLOQ par la méthode des 10 blancs. Etant donné que le temps de rétention de la cotinine est de 18 min et après injection des 10 blancs d'urine, les LLOD et LLOQ de la technique utilisée ont été de 0,034 et 0,04 $\mu\text{g/mL}$, respectivement. Pour quantifier donc la cotinine dans les échantillons urinaires, il faut calculer les concentrations par rapport soit à la gamme étalon (dans du méthanol) soit à la gamme matrice (dans de l'urine). Pour faire le choix entre les 2 gammes, il est recommandé de mesurer les taux de recouvrement de la cotinine selon les conditions d'extraction et les paramètres chromatographiques choisis.

6.4.2. Validation partielle de la méthode de dosage de la cotinine urinaire

Cette procédure a pour objet de valider partiellement la méthode utilisée pour le dosage de la cotinine urinaire vu que cette méthode est une combinaison de 2 méthodes différentes déjà publiées (Fukumoto, 2005 ; Zouani *et al.*, 2011). Pour quantifier l'analyte dans les échantillons, il faut calculer la concentration par rapport, soit à la gamme étalon soit à la gamme matrice. Pour faire le choix entre les 2 gammes, il faut mesurer les taux de recouvrement de la cotinine et le coefficient de variation sous les conditions d'extraction et les paramètres chromatographiques choisis. L'injection des différents points de la gamme étalon montre que cette méthode est linéaire de 0,4 - 80 µg/mL ($r = 0,9993$). Pour calculer le taux de recouvrement, il faut calculer la concentration réelle de cotinine dopée dans l'échantillon. Les coefficients de variation ont été acceptables et les taux de recouvrement ont été aux alentours de 100%. Alors, pour quantifier les analytes dans les échantillons, nous pouvons calculer les concentrations par rapport à la gamme étalon seule.

7. Analyse statistique

L'analyse statistique des données était faite sur SPSS version 21. Les variables catégorielles furent représentées en termes de fréquences et de pourcentages, alors que pour les variables continues les moyennes, les écart-types et les quartiles étaient montrées. Le test de Spearman (Spearman's rank correlation coefficient) était utilisé pour étudier la corrélation entre les variables continues ne suivant pas de distribution normale. Le test de Student (Independent Samples T test) était utilisé pour comparer les moyennes de deux groupes. Enfin, une régression logistique avec la méthode backward LR était réalisée pour étudier les facteurs qui prédisent le changement du MDA plasmatique et urinaire. Le niveau de signification statistique était $p < 0,05$.

IV- Résultats

1. Caractéristiques générales de la population

L'âge, le poids, la taille, l'indice de masse corporelle (IMC), les années de travail, le temps d'exposition, le bilan sanguin, la fonction pulmonaire et les niveaux d'exposition individuelle aux aldéhydes sont présentés dans le tableau 19.

Tableau 19: Caractéristiques générales de la population

a. Description des sujets de l'étude

Paramètre	Moyenne	Ecart-type	Minimum	Maximum
Taille (cm)	177,25	8,83	155,00	200,00
Poids (Kg)	82,24	12,43	50,00	114,00
IMC	26,2	3,98	20,8	28,5
Age (ans)	35,49	10,36	19,00	57,00
Année(s) de travail	7,74	7,29	0,41	34,00
N jours de travail	4,48	0,59	3,00	6,00
Heures de travail/jour	6,76	1,56	5,00	14,00

b. Investigation bioclinique en post-exposition

Paramètre	Moyenne	Ecart-type	Minimum	Maximum
Leucocytes (Giga/L)	7,70	2,33	3,00	14,00
Hématies (Téra/L)	5,15	0,53	4,00	6,00
Hémoglobine (g/dL)	15,26	0,98	14,00	17,00
Hématocrite (%)	44,78	2,85	40,00	51,00
VGM (fL)	87,52	4,50	79,00	96,00
TCMH (pg)	30,07	1,44	27,00	33,00
CCMH (g/dL)	34,26	0,59	33,00	35,00
CVGR (%)	14,48	1,16	13,00	17,00
Plaquettes (Giga/L)	213,04	70,14	60,00	342,00
MPH (µm ³)	10,48	1,19	8,00	13,00
PDW (%)	19,63	4,18	13,00	30,00
Poly.Neutrophiles (%)	55,15	9,10	32,00	78,00
Lymphocytes (%)	35,81	8,33	16,00	56,00
Monocytes (%)	6,96	2,16	4,00	12,00
Poly.Eosinophiles (%)	2,07	1,73	0,00	7,00
Vitesse de sédimentation (mm)	14,3	10,9	1,00	41,00
Urée (mg/dL)	29,39	6,23	18,00	46,00
Créatinine sanguine (mg/dL)	0,92	0,16	0,6	1,3
CRP us (mg/dL)	0,14	0,45	0,00	2,00

c. Fonction pulmonaire

Paramètre	Moyenne	Ecart-type	Minimum	Maximum
<i>Pré-exposition</i>				
FVC (L) %	87,37	19,14	23,00	165,00
FEV1 (L) %	84,91	20,33	18,00	163,00
FEV1/FVC %	97,13	14,08	57,00	124,00
FEF ₂₅₋₇₅ (L/s) %	86,62	35,03	6,00	179,00
<i>Post-exposition</i>				
FVC (L) %	87,30	15,24	46,00	148,00
FEV1 (L) %	82,57	18,22	37,00	117,00
FEV1/FVC %	94,89	16,45	25,00	121,00
FEF ₂₅₋₇₅ (L/s) %	87,32	34,62	5,00	180,00

d. Exposition individuelle aux aldéhydes

Aldéhyde	Moyenne	Ecart-type	Minimum	Maximum
Formaldéhyde FA ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	310,00	158,58	0,04	949,30
Acétaldéhyde AA ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	301,24	595,31	0,05	5931,23
Acroléine Acro ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	256,36	308,68	0,02	1519,88
Butanal ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	331,00	368,89	0,04	1408,52
Benzaldéhyde ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	9,54	17,57	0,04	105,33
Hexanal ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	75,51	124,23	0,04	980,66

Abréviations françaises pour des paramètres de la formule sanguine

VGM, Volume Globulaire Moyen; TCMH, Teneur Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine; CCMH, Concentration Corpusculaire Moyenne en Hémoglobine; CVGR, Concentration du Volume des Globules Rouges; MPH, Volume Moyen des Plaquettes ou Mean Platelet Volume; PDW, Largeur de Distribution des Plaquettes ou Platelet Distribution Width.

Abréviations françaises avec leurs équivalents anglo-saxons des volumes et débits mesurés par un spiromètre

CVF, Capacité Vitale Forcée ou FVC, Forced Vital Capacity ; VEMS, Volume Expiratoire Maximum Seconde ou FEV1, Forced Expiratory Volume in one second ; Rapport de Tiffeneau (%) = $\text{VEMS}/\text{CVF} \times 100$ ou $\text{FEV1}/\text{FVC}$; DEM₂₅₋₇₅, Débit Expiratoire Moyen entre 25 et 75% de la CVF ou FEF₂₅₋₇₅, Mean Forced Expiratory Flow between 25% and 75% of FVC.

L'âge moyen des policiers était de 35 ans, travaillant 7 h par jour et pendant 5 jours (Tableau 19a). En comparant les résultats des analyses sanguins (Tableau 19b) avec les valeurs de référence, les valeurs obtenues en post-exposition (mesure unique) se situent dans la plage des valeurs attendues.

L'interprétation des résultats de la spirométrie (Tableau 19c) nécessite une comparaison entre la valeur mesurée d'un individu et la valeur de référence. Par rapport à la valeur de référence, une valeur mesurée inférieure correspond à une anomalie pulmonaire plus grave. Le ratio FEV1/FVC et le FEF_{25-75%} sont des marqueurs précoces de la déficience des petites voies

aériennes. Tous les sujets de notre étude avaient des valeurs en FVC et en FEV1 (égal ou supérieur à 80%), un ratio FEV1/FVC (égal ou supérieur à 70%) ou des valeurs en FEF25–75% (supérieur à 80%) normaux. Le test de Student pour échantillons appariés (Paired Samples T test) des paramètres de la fonction pulmonaire (FVC, FEV1, FEV1/FVC et FEF₂₅₋₇₅) n'a déterminé aucune différence significative de la moyenne entre les deux observations en pré-exposition et post-exposition ($p > 0,05$). En revanche, les moyennes obtenues pour FEV1 (VEMS) prédit sont statistiquement différentes entre pré-exposition et post-exposition ($t = -2,576$; $p = 0,012$, *t*-test).

Par ailleurs, les concentrations de l'exposition individuelle en FA, en AA, en Acro, en butanal, en benzaldéhyde et en hexanal étaient $310 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $301 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $256 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $331 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ et $75 \mu\text{g}/\text{m}^3$, respectivement (Tableau 19d). Toutefois, certaines valeurs en FA (*e.g.* $949 \mu\text{g}/\text{m}^3$) et en Acro (*e.g.* $1519 \mu\text{g}/\text{m}^3$) dépassent la valeur limite d'exposition professionnelle VLEP (610 et $250 \mu\text{g}/\text{m}^3$, respectivement). Ces résultats révèlent que l'exposition à ces niveaux d'émissions du trafic routier constitue une problématique majeure en termes d'effets additifs ou synergiques potentiellement associés à une exposition simultanée aux aldéhydes.

2. Biomarqueurs du stress oxydant

Les résultats des concentrations de biomarqueurs sanguins et urinaires en pré- et post-exposition prélevés auprès des policiers libanais sont présentés dans le tableau 20. Le test de Student (Independent Samples T test) était utilisé pour comparer les moyennes de deux groupes : pré- et post-exposition.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, les limites acceptables des concentrations de la créatinine urinaire se situent entre 30 et $300 \text{ mg}/\text{dL}$ (Tunsaringkarn *et al.*, 2012). Dans notre étude, les concentrations urinaires de la créatinine varient autour de $215 \text{ mg}/\text{dL}$ en pré-exposition et autour de $232 \text{ mg}/\text{dL}$ en post-exposition.

La détermination de la cotinine est recommandée pour l'évaluation du tabagisme actif et la surveillance de l'exposition à la fumée du tabac. L'avantage le plus important de l'utilisation de la cotinine en tant que biomarqueur de la fumée du tabac et de celle du tabagisme passif est qu'environ 72% de la nicotine est converti en cotinine et que la demi-vie de la cotinine est

en moyenne d'environ 17 h, contre 2 à 3 h en moyenne en cas de la nicotine (Kim, 2016). Pour l'évaluation du statut tabagique, la valeur seuil (cut-off) de la cotinine était de 100 µg/g créatinine comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre IV. En accord avec notre hypothèse d'inclusion de sujets non-fumeurs, nos résultats ont montré, des moyennes de concentrations urinaires de la cotinine variant autour de 44,63 µg/g créatinine en pré-exposition et autour de 56,06 µg/g créatinine en post-exposition. Ces faibles taux sont certainement liés à la consommation d'aliments riches en cotinine.

Tableau 20: Comparaisons des concentrations de biomarqueurs pour les policiers

Paramètre	Moyenne	Ecart-type	Minimum	Maximum
<i>Pré-exposition</i>				
Créatinine urinaire (mg/dL)	215,11	97,58	27,00	462,00
Cotinine (µg/mL)	0,11	0,18	0,02	1,25
Cotinine (µg/g créatinine)	44,63	73,50	6,70	451,08
MDA plasmatique (µM)	0,47	0,35	0,13	1,84
MDA urinaire (µM)	0,99	0,91	0,05	6,66
<i>Post-exposition</i>				
Créatinine urinaire (mg/dL)	231,84	91,26	39,00	466,00
Cotinine (µg/mL)	0,11	0,22	0,02	1,93
Cotinine (µg/g créatinine)	56,06	105,39	10,77	830,32
MDA plasmatique (µM)	0,70	0,54	0,13	2,81
MDA urinaire (µM)	1,49	2,61	0,10	23,85

Quant au MDA plasmatique, les valeurs fréquentes varient théoriquement entre 0 et 1 µM dans le plasma de sujets sains. Il faut également noter que le choix de l'anticoagulant n'est pas anodin (Suttner *et al.*, 2001). Ainsi, l'EDTA conduit à des concentrations en MDA plus basses que le citrate. Dans notre étude, les concentrations du MDA plasmatique en pré-exposition varient de 0,13 à 1,84 µM (moyenne : 0,47 µM) et de 0,13 à 2,81 µM (moyenne : 0,7 µM), en post-exposition. Le test de Student pour échantillons appariés (Paired Samples T test) du MDA plasmatique a déterminé une différence significative de la moyenne entre les deux observations en pré-exposition et en post-exposition ($t = -2,652$; $p = 0,010$). Le taux du MDA plasmatique augmente significativement chez les policiers exposés à la pollution de proximité (trafic automobile) et ayant travaillé pendant 5 jours et pendant 7 h par jour.

Quant au MDA urinaire, les valeurs obtenues sont théoriquement voisines de 2 μmol MDA/mg créatinine (Agarwal et Chase, 2002) avec une valeur moyenne, d'après la littérature, autour de 1,5 μM dans l'urine de sujets sains. Dans notre étude, les concentrations du MDA urinaire en pré-exposition varient de 0,05 à 6,66 μM (moyenne : 0,99 μM) et de 0,1 à 23,85 μM (moyenne : 1,49 μM), en post-exposition. Le test de Student pour échantillons appariés (Paired Samples T test) du MDA urinaire a déterminé une différence significative de la moyenne entre les deux observations en pré-exposition et en post-exposition ($t = -2,528$; $p = 0,013$). Le taux du MDA urinaire, augmente significativement chez les policiers exposés à la pollution de proximité (trafic automobile) et ayant travaillé pendant 5 jours et pendant 7 h par jour. Par ailleurs, une corrélation négative a été observée entre le MDA plasmatique et urinaire (non rapporté à la créatinine) en post-exposition (test de corrélation de Spearman, $r = -0,204$, $p = 0,049$).

3. Effets des aldéhydes et de divers facteurs sur le MDA

Une analyse de régression multiple a été réalisée avec l'utilisation de paramètres du stress oxydant en post-exposition (MDA plasmatique et urinaire) en tant que variables dépendantes et, l'âge, les années de travail, l'IMC, la cotinine, le MDA plasmatique et l'exposition individuelle aux aldéhydes de l'air ambiant (*i.e.* FA, AA, Acro, butanal, benzaldéhyde et hexanal) en tant que variables indépendantes. Quant au MDA plasmatique, les valeurs fréquentes varient théoriquement entre 0 et 1 μM dans le plasma de sujets sains. Alors que pour le MDA urinaire, les valeurs obtenues sont théoriquement voisines de 2 μmol MDA/mg créatinine (Agarwal et Chase, 2002) avec une valeur moyenne, d'après la littérature, autour de 1,5 μM dans l'urine de sujets sains. Pour cette analyse de régression logistique (méthode Backward LR), les valeurs seuils du MDA étaient 1 μM pour le plasma et 1,5 μM pour l'urine. Les valeurs bilatérales de $p < 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives (Tableau 21).

Les facteurs qui ont une relation significative avec le MDA plasmatique post-exposition > 1 μM sont : les années de travail (OR = 1,1 ; $p = 0,04$) et une concentration en FA plus élevée (OR = 1,008 ; $p = 0,011$) (Tableau 21a). Quant aux facteurs reliés au MDA urinaire post-exposition $> 1,5$ μM , il s'agit d'une concentration plus élevée en benzaldéhyde (OR = 1,098 ;

p = 0,017), ainsi que d'un moindre taux du butanal (OR = 0,997 ; p = 0,017) et du FA (OR = 0,992 ; p = 0,04) (Tableau 21b).

Tableau 21: Analyse de régression multivariée du MDA plasmatique (a) et urinaire (b) en post-exposition chez les policiers

(a) *MDA plasmatique*

Paramètre	p	OR	95% C.I.	
			Lower	Upper
Année(s) de travail	0,040	1,100	1,004	1,204
Formaldéhyde FA	0,011	1,008	1,002	1,014
Acétaldéhyde AA	0,087	0,991	0,981	1,001
Constant	0,037	0,116		
Overall predicted percentage = 78.5%; Hosmer and Lemshow test p-value = 0,259; Nagelkerk R square = 0.212 ; Omnibus test p-value = 0.016				

* OR, odd ratio; C.I., Confidence Interval

Variable(s) entrée(s) à l'étape 1: IMC, année(s) de travail, formaldéhyde, acétaldéhyde, acroléine, butanal, hexanal, cotinine rapportée à la créatinine en post-exposition, MDA plasmatique pré-exposition.

(b) *MDA urinaire*

Paramètre	p	OR	95% C.I.	
			Lower	Upper
Formaldéhyde	0,046	0,992	0,985	1,000
Acétaldéhyde	0,205	1,006	0,997	1,015
Butanal	0,017	0,997	0,994	0,999
Benzaldéhyde	0,020	1,089	1,014	1,169
Constant	0,092	6,765		
Overall predicted percentage = 70.8%; Hosmer and Lemshow test p-value = 0.510; Nagelkerk R square = 0.209 ; Omnibus test p-value = 0.031				

* OR, odd ratio; C.I., Confidence Interval

Variable(s) entrée(s) à l'étape 1: IMC, année(s) de travail, formaldéhyde, acétaldéhyde, acroléine, butanal, hexanal, benzaldéhyde, cotinine post-exposition, MDA plasmatique pré-exposition, âge.

Ces données confortent l'impact significatif de l'exposition aux aldéhydes de l'air ambiant sur le stress oxydant chez l'Homme. L'ensemble de ces résultats suggèrent qu'une co-exposition à long terme à des niveaux relativement élevés en aldéhydes pourrait induire des

dommages cumulatifs à l'ADN, ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle une exposition chronique à la pollution atmosphérique est associée à un risque accru de cancer.

V- Discussion

Pour mieux explorer dans notre étude la relation entre l'exposition professionnelle aux aldéhydes et les effets associés, notamment, le stress oxydant et les dommages à l'ADN, différents facteurs pouvant affecter la variabilité du MDA ont été pris en considération, *i.e.* l'âge, les années de travail, l'IMC, le stress inflammatoire, la fonction pulmonaire, la cotinine, le MDA plasmatique ; et d'autres mal documentés dans la littérature, à savoir l'exposition individuelle aux aldéhydes de l'air ambiant (*i.e.* FA, AA, Acro, butanal, benzaldéhyde et hexanal). En effet, les aldéhydes exogènes et endogènes, notamment le MDA, produit le plus mutagène de la LPO, peuvent être déterminés dans le sérum, dans l'urine et dans les tissus humains.

Des études précédemment citées suggèrent que des concentrations élevées du MDA ont été observées dans de nombreuses pathologies, parmi lesquelles le diabète (Tangvarasittichai *et al.*, 2009) ou l'asthme (El-Alameey *et al.*, 2017). Dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde, le lupus ou l'insuffisance rénale chronique, les concentrations sériques du HNE peuvent être multipliées par 3 (Shah *et al.*, 2014). Il faut mentionner que les aldéhydes peuvent également provenir de l'alimentation et être excrétés dans l'urine. De ce fait, les mesures de ces composés dans le plasma ou dans les urines peuvent être affectées par le régime alimentaire (Pingitore *et al.*, 2015). Il a été démontré que le MDA urinaire et la CRP sérique étaient corrélés de manière significative à l'obésité, même après ajustement sur l'IMC et sur le tour de taille (Lee S. *et al.*, 2015). En effet, l'obésité induit un stress oxydant systémique grâce à une production accrue des ERO dans les tissus adipeux (Abbasihormozi *et al.*, 2019). Raison pour laquelle, nous avons choisi dans notre étude de réaliser une investigation bioclinique (formule sanguine, CRP, vitesse de sédimentation, urée, créatinine, etc.) et de relever dans nos deux questionnaires général et quotidien, les différents facteurs pouvant affecter le MDA et cités ci-dessus.

En effet, après exposition de 5 jours aux émissions du trafic routier, une augmentation du MDA plasmatique et urinaire a été décrite chez les policiers stationnés au carrefour pendant 7 h par jour. En moyenne, les niveaux de biomarqueurs étaient plus élevés en post-exposition. Les tests statistiques ont produit une association négative entre le MDA plasmatique et urinaire (non rapporté à la créatinine) en post-exposition. Certains biomarqueurs (leucocytes

et vitesse de sédimentation) étaient associés négativement au MDA plasmatique en post-exposition. Aucune association significative n'a été trouvée entre le MDA plasmatique et les autres biomarqueurs (formule sanguine, créatinine, urée et CRP). Dans nos analyses statistiques, les valeurs du MDA plasmatique et urinaire supérieures à 1 et 1,5 μM , respectivement ont été considérées comme associées au stress oxydant conformément aux données de la littérature (Suttner *et al.*, 2001 ; Agarwal et Chase, 2002). Les facteurs affectant le MDA plasmatique après 5 jours d'exposition étaient les années de travail et le FA ; alors que les facteurs prédictifs du MDA urinaire en post-exposition étaient le FA, le benzaldéhyde et le butanal.

Une revue de la littérature montre que les biomarqueurs d'exposition et d'effet, notamment de la génotoxicité, de l'inflammation, de la fonction pulmonaire, et du stress oxydant, ont été examinés chez des personnes travaillant à proximité de routes à forte niveaux de circulation des véhicules et par rapport aux sujets travaillant éloignés de ces routes ou, le plus souvent, dans le bureau. Des études antérieures ont rapporté des niveaux élevés en MDA et des niveaux inférieurs en GPx observés chez la police de la circulation exposée aux polluants atmosphériques (benzène, toluène, CO et benzo[*a*]pyrène) (Prasad *et al.*, 2013). Une autre étude suggère qu'une exposition à long terme des policiers à la pollution atmosphérique, notamment, une augmentation cumulative d'une heure de travail par jour pendant un an, était associée à une diminution du glutathion et pourrait induire des dommages cumulatifs à l'ADN liés au stress oxydant, confortant l'hypothèse que l'exposition chronique à la pollution de l'air est associée à un risque accru du cancer (Tan *et al.*, 2017).

Cependant, les résultats de notre étude suggèrent que l'exposition aux aldéhydes n'est pas le seul facteur important influant sur les niveaux du MDA plasmatique chez les sujets étudiés. Plusieurs autres facteurs, tels que le mode de vie, le stress, les conditions météorologiques (variation saisonnière), l'exposition professionnelle à long terme, la génétique et les expositions environnementales passées, pourraient avoir contribué à la variation de ce biomarqueur. L'impact de ces facteurs sur la variabilité du MDA sera traité en perspectives en exploitant nos questionnaires que nous avons collectés pendant la campagne d'échantillonnage.

Alternativement, le profil des biomarqueurs pourrait également être attribué à d'autres facteurs, par exemple (*i*) le stress lié à la saison et aux conditions météorologiques.

L'humidité et la température étaient plus élevées en été qu'au printemps. Tous les volontaires de la circulation travaillaient sur des routes pour diriger la circulation et contrôler les embouteillages sur des intersections congestionnées. Il y avait rarement de feux de circulation aux points d'échantillonnage. Nous nous sommes rencontrés deux fois par jour (avant d'aller au travail ; après leur retour du travail) avec chacun des volontaires de la circulation et nous avons observé un stress plus élevé en été qu'en printemps. (ii) Deuxièmement, il est également possible que les biomarqueurs d'inflammation aient déjà été améliorés chez ces volontaires de la circulation en raison de leur forte exposition professionnelle. Ying et Rajagopalan (2011) suggèrent que le manque d'association entre les effets à court terme de l'exposition et les biomarqueurs de l'inflammation ne signifie pas nécessairement qu'il n'y a pas d'effet d'une exposition à long terme sur le taux de la CRP ou de la vitesse de sédimentation, par exemple. Les personnes travaillant sur les routes, telles que les chauffeurs de taxi, ont été observées avec des niveaux élevés de biomarqueurs d'inflammation par rapport à une population témoin (Brucker *et al.*, 2013). (iii) Troisièmement, Bind *et al.* (2014) ont constaté que la génétique jouait un rôle dans l'inflammation chronique causée par l'exposition à la pollution atmosphérique. Certaines populations peuvent avoir une plus grande susceptibilité biologique ou une vulnérabilité sociodémographique (Wu *et al.*, 2018). Ruckerl *et al.* (2016) ont observé une forte association de biomarqueurs d'inflammation avec la pollution de l'air dans la population à susceptibilité génétique.

Limitations

Notre étude a plusieurs limites. Les échantillons de sérum et d'urine ont été stockés en présence de pack de glace et dans un congélateur (-80°C) seulement après leur arrivée à l'Université Libanaise, à Beyrouth. Aucun contrôle de qualité n'a été effectué pour évaluer la dégradation de l'échantillon due au stockage à une température plus élevée. L'étude était également compliquée par le fait de ne pas avoir les mêmes individus suivis pendant les deux saisons (printemps et été). Plusieurs variables n'ont pas été testées dans cette étude et ces variables peuvent être très importantes pour affecter la santé des sujets. La transpiration, le stress et l'épuisement peuvent être élevés pendant les étés que lors du printemps plus frais. Le stress psychologique peut également élever les biomarqueurs inflammatoires (Shakya *et al.*, 2019), bien que le stress induit par un trafic intense ne soit probablement pas très différent entre le printemps et l'été dans cette cohorte, car les modèles de trafic étaient généralement inchangés. Bien que les sujets étaient exposés sur le site d'échantillonnage à la même source de pollution de proximité (*i.e.* émissions des aldéhydes du parc automobile) pendant l'étude et

que leurs expositions résidentielles aient été prises en compte dans cette étude, les antécédents résidentiels peuvent avoir encore joué un rôle sur leur santé.

Le stress oxydant peut être évalué et surveillé par la détermination des niveaux de biomarqueurs dans différents échantillons biologiques, tels que le sérum, l'urine, le liquide de lavage broncho-alvéolaire, les expectorations induites, la biopsie bronchique et le condensat d'air exhalé (EBC) (Inonu *et al.*, 2012). Dans la présente étude, nous avons choisi des échantillons sanguin et urinaire, et réalisé un test de la fonction pulmonaire. Cependant, il était souhaitable d'ajouter une collection de l'EBC, suggérée comme procédure simple, non invasive et facilement reproductible (Corradi *et al.*, 2019). De plus, cette technique permet d'obtenir des échantillons des voies respiratoires inférieures pour la surveillance de l'inflammation des voies respiratoires et du stress oxydant (Soyer *et al.*, 2019).

Plusieurs marqueurs du stress oxydant sont mesurables dans le sang. Dans la présente étude, un marqueur du stress oxydant a été évalué, dans le sang et dans l'urine (MDA) ; et un marqueur sanguin anti-oxydant (GSH/GSSG) sera mesuré ultérieurement. Certains auteurs ont opté pour d'autres marqueurs du stress oxydant tels que le 8-isoprostane, le peroxyde d'hydrogène ou la 8-hydroxydeoxyguanosine, la vitamine C et la superoxyde dismutase (Soyer *et al.*, 2019).

Aucune corrélation entre les marqueurs du stress oxydant et les paramètres de la fonction pulmonaire n'a été démontrée. Trois paramètres pléthysmographiques, exprimés en pourcentage des valeurs prédites, ont été choisis : FVC, FEV1, FEV1/FVC et FEF₂₅₋₇₅. Le FEV1 est un indice sensible pour les voies respiratoires inférieures, hautement reproductible (Miller *et al.*, 2005). Cependant, le manque des associations significatives dans cette étude n'exclut pas la possibilité d'effets chroniques. Les conclusions de la présente étude mettent en évidence la complexité des variables explicatives, les limites de la taille de l'échantillon et la courte durée de l'étude (c'est-à-dire 5 jours par participant).

Conclusion

Les résultats ont montré que la production du MDA révèle une relation significative avec les niveaux d'aldéhydes chez les policiers de la circulation et qu'il pouvait exister d'autres facteurs non mesurés tels que la génétique et le stress. En général, les niveaux d'exposition journalière à court terme aux aldéhydes ont affecté la concentration du biomarqueur du stress oxydant mesuré dans un environnement très pollué par les émissions du parc automobile. En particulier, le FA, le butanal et le benzaldéhyde ont eu un effet sur les concentrations du

MDA urinaire mesurées. Parmi les différentes variables testées pour l'effet statistique sur le MDA plasmatique, l'ancienneté au travail (années de travail) avait une incidence sur les concentrations de ce biomarqueur chez les volontaires du trafic. Ainsi, chez les policiers, dans nos conditions d'exposition, un stress oxydant lié à l'exposition aux aldéhydes de l'air ambiant et associé à une augmentation du MDA plasmatique et urinaire a été observé. Le GSH serait impliqué dans les mécanismes d'adaptation après exposition chronique aux aldéhydes. Il apparaît nécessaire de compléter nos résultats en étudiant le ratio GSH/GSSG pour déterminer si l'on est dans un domaine de compensation ou non-curable lié au stress oxydant.

Toutefois, cette étude comporte plusieurs limites et il est recommandé de poursuivre les études sur les facteurs susceptibles d'avoir une incidence sur les biomarqueurs d'effet précoce génotoxique, notamment le niveau des adduits à l'ADN. Il serait intéressant d'explorer le rôle des 9 adduits exocycliques - que nous avons validés *in vitro* et recherchés auprès des fumeurs belges - en tant que biomarqueurs d'exposition à la pollution atmosphérique urbaine.

Discussion générale et perspectives

Durant ces dernières années, une grande importance a été attribuée aux aldéhydes largement répandus dans l'environnement en raison de leurs effets néfastes sur la santé. L'exposition à ces COVs est possible par l'inhalation d'émissions extérieures (d'automobiles, d'industries, de la combustion de divers matériels...) et intérieures (du tabac, du bois pressé, de la cuisson et de la friture...) mais également par l'ingestion de plusieurs aliments. En outre, d'autres sources sont largement impliquées dans la production des aldéhydes. Il s'agit de la voie endogène telle que la LPO induite par le stress oxydant, et le métabolisme intermédiaire de composés naturels, de médicaments et de xénobiotiques. D'où la place des aldéhydes en tant que composants majeurs de l'exposome.

Etant de puissants électrophiles, les aldéhydes, surtout les α,β -insaturés, diffusent dans le milieu cellulaire et exercent leur réactivité sur les macromolécules comme les protéines et les acides nucléiques. Cependant, les voies de détoxification sont très efficaces et évitent ainsi la survenue d'effets toxiques liés aux aldéhydes. Toutefois, l'épuisement des antioxydants augmente les concentrations intracellulaires en aldéhydes, ce qui facilite considérablement leur pouvoir de former des adduits à l'ADN nucléaire. Cette propriété génotoxique des aldéhydes peut être un élément initiateur de la cancérogenèse. En effet, les adduits formés peuvent induire des mutations qui, sans réparation efficace, peuvent mener à l'apparition d'une tumeur. Cette propriété est applicable aux aldéhydes produits par voie endogène. Plusieurs études ont montré que les aldéhydes dérivés de la LPO, avec leurs adduits exocycliques, peuvent induire des lésions mutagènes *in vitro* tant qu'*in vivo* (Langouët *et al.*, 1998 ; Maekawa *et al.*, 2006 ; Chou *et al.*, 2010).

Les aldéhydes ont fait l'objet de nombreuses études qui ont permis de nos jours de les classer parmi les produits cancérogènes par le CIRC et les produits CMR en Europe (cancérogène, mutagène et toxique) selon la réglementation REACH.

Pour évaluer l'exposition en lien avec un risque cancérogène et dans le cadre d'une biosurveillance, la quantification des aldéhydes dans les matrices biologiques est difficile en raison de leur réactivité élevée et leurs courtes demi-vies, d'où l'intérêt porté à l'analyse des adduits exocycliques à l'ADN stables. Celle-ci peut contribuer à la compréhension du processus cancéreux lié au stress oxydant, mais elle peut également servir de biomarqueur d'exposition/effet précoce pour les études en lien avec l'exposition aux aldéhydes.

Sur le plan des approches analytiques, les progrès actuels sont donnés par l'adductomique pour détecter et identifier les dommages à l'ADN chez l'Homme (Kanaly *et al.*, 2006 ; Carlsson et Tornqvist, 2017). Plusieurs adduits exocycliques à l'ADN ont déjà été identifiés par cette stratégie dans les tissus humains (Chou *et al.*, 2010 ; Matsuda *et al.*, 2013 ; Li *et al.*, 2017). Ils ont été identifiés et mesurés par LC-MS/MS, ce qui a considérablement amélioré la détection simultanée de plusieurs adduits à l'ADN dans le cadre d'une approche d'adductomique. Actuellement, les chercheurs ont pu identifier divers adduits à l'ADN dérivés de la LPO dans les tissus humains et ont montré une relation entre leurs quantités/profil et le risque de cancer (Matsuda *et al.*, 2013 ; Monien *et al.*, 2015).

C'est sur cette base de données scientifiques que nous avons mis au point une méthode analytique pour évaluer lors d'une même analyse 9 adduits exocycliques à l'ADN induits par 8 aldéhydes provenant à la fois de sources exogènes et endogènes. Nous avons pu dépasser ce défi en adoptant une méthodologie intégrant d'abord la réduction des adduits instables de l'AA, du FA et du MDA par l'ajout du NaBH₃CN dans le but d'obtenir une meilleure quantification des adduits correspondants stables. L'utilisation des adduits homologues marqués au ¹³C₁₀ et ¹⁵N₅, comme étant des étalons internes, a contribué à ajouter plus de rigueur dans le développement de la méthode, UHPLC-ESI-MS/MS, en vue d'une confirmation de l'identité des adduits obtenus surtout dans des matrices biologiques plus complexes. Il est important de préciser que la méthode développée est la 1^{ère} à utiliser des standards de calibration et des échantillons QCs préparés dans l'ADNct. Cette condition a été adaptée après avoir évalué et observé l'effet matrice de l'ADNct par rapport à l'eau. Ceci impose malheureusement des limites de détection et de quantification plus élevées et par conséquent une sensibilité plus faible par comparaison aux études antérieures (Liu *et al.*, 2005 ; Yin *et al.*, 2013). Cependant, cette condition permet de s'approcher des conditions physiologiques et d'avoir des résultats plus réels lors de l'analyse des échantillons humains.

Ainsi, notre méthode développée a été validée conformément aux directives internationales et répond à toutes les exigences énumérées dans les directives de l'EMA. Elle est capable d'analyser un grand nombre d'échantillons en raison du court temps d'analyse (7 min/échantillon) en préservant de bonnes sensibilité et séparation des adduits à l'ADN des nucléosides normaux. Les analyses sur un même échantillon peuvent être répétées vu que la méthode utilise un faible volume d'injection et une quantité d'ADN (50 µg) de départ raisonnable pour des études en population.

L'analyse « adductomique » apparaît comme une approche innovante pour mesurer plusieurs adduits exocycliques à l'ADN dans une même analyse en tant que biomarqueurs de multiexpositions chroniques et variées.

Ensuite, nous avons voulu utiliser notre méthode sur des échantillons biologiques en adoptant de 2 approches différentes mais complémentaires. La 1^{ère} a visé à exposer un ADN acellulaire *in vitro* aux différents aldéhydes dans le but d'étudier leurs propriétés d'adduction seuls et en mélange mais aussi pour établir un profil d'adduits pertinent. La 2^{ème} a consisté à rechercher ce profil dans l'ADN extrait de sang humain chez des populations saines exposées ou pas aux aldéhydes présents dans le tabac.

L'approche *in vitro* a été effectuée en milieu liquide considéré proche des conditions sanguines en vue d'explorer dans des études ultérieures en population, l'exposition systémique via l'étude des propriétés d'adduction seul et en mélange de 8 aldéhydes.

Par l'application de la méthode analytique sur l'ADNct non traité aux aldéhydes, un profil basal d'adduits exocycliques à l'ADN a été établi au départ dans l'ADNct non traité. Ce dernier a affecté la quantification de certains adduits (AcroG, AAdG réduit, FAdG réduit et HNEdG) présents en faible quantité. Quant à l'analyse des courbes dose-réponse, elles étaient toutes ascendantes pour tous les adduits formés par exposition de l'ADNct aux très faibles concentrations de l'aldéhyde. Cette première étape a permis de garantir l'activité d'adduction des aldéhydes vis-à-vis de la dG de l'ADN dans un contexte dénué de tout mécanisme de réparation et d'élimination des xénobiotiques. Par contre, aux concentrations plus élevées, la réponse devient fortement dépendante de la concentration surtout pour les adduits du MDA et du MG. Nos résultats sont concordants avec ceux décrits dans la littérature : il est souvent mentionné que le risque d'adduction à l'ADN est plus fréquent à faible concentration (Dalleau *et al.*, 2013).

Dans le but de se rapprocher des conditions de multiexpositions à bas bruit chez l'Homme, nous avons étudié les réponses induites par le mélange équimolaire de ces aldéhydes. Diverses réactivités ont été observées chez les aldéhydes aux différentes concentrations d'exposition probablement liées à leur structure chimique notamment le nombre d'insaturations et la longueur de la chaîne carbonée. L'effet du mélange a été évalué sous forme d'inhibition de la formation d'adduits en fonction de différentes concentrations chez quelques aldéhydes et un effet inverse pour d'autres. Ces observations montrent que les aldéhydes en mélange en milieu liquide préservent une activité d'adduction avec une réactivité variable selon leur structure chimique

Le modèle le plus proche d'une exposition à un mélange d'aldéhydes est l'exposition à la fumée du tabac. Une teneur élevée en carbonyles en mélange, tels que l'Acro, le HNE, le FA, l'AA, le propanal et le MDA a déjà été retrouvée dans la fumée de cigarette (Fujioka et Shibamoto, 2006 ; Sampson *et al.*, 2014). Des études récentes ont découvert que les adduits à l'ADN induits par la fumée de tabac sont en fait des adduits à l'ADN induits par l'aldéhyde, plutôt que par des HAP (Weng *et al.*, 2018). Ces résultats laissent penser que le rôle de divers cancérigènes dans la fumée de tabac peut être différent de celui des cancérigènes pris seuls en raison des effets du mélange de plus de 6000 produits chimiques de la fumée de tabac sur l'absorption et le métabolisme. Il est également probable que les composants de la fumée de tabac interagissent les uns avec les autres modifiant ainsi leur potentiel cancérigène.

Dans notre étude de l'exposition tabagique sur le profil d'adduits exocycliques, des différences significatives ont été retrouvées dans les niveaux d'adduits - à l'exception du MDAdG réduit - entre les 2 populations non malades fumeurs et non-fumeurs. Ces premiers résultats, très encourageants devront faire l'objet d'une confirmation sur un plus grand nombre d'échantillons. Par ailleurs, quelques données d'exposition tabagique ont pu être recueillies et des corrélations significatives ont pu être établies entre ces données et le niveau de certains adduits. Cependant, aucune corrélation significative n'a été observée entre un marqueur spécifique lié au tabagisme et les niveaux de tous les adduits à l'ADN, soit le profil entier, chez les fumeurs dans notre étude. Les faibles effectifs de cette approche ont grandement limité cette analyse. Pour consolider la puissance statistique, il faudrait bien entendu de poursuivre cette analyse sur des plus grandes cohortes.

Par ailleurs, nous avons comparé les profils d'adduits dans les 2 groupes, fumeurs et non-fumeurs, avec les variations de l'expression du même profil dans le contexte d'une exposition *in vitro* à un mélange équimolaire d'aldéhydes. L'intérêt porté par cette comparaison était d'évaluer l'effet de 2 environnements différents sur le profil de ces adduits induits dans l'ADN génomique extrait de cellules sanguines d'une part et un ADN nu exposé *in vitro* en milieu liquide d'autre part. La présence des 9 adduits dans les deux types d'ADN permet de montrer que l'organisme humain est exposé de manière systémique aux aldéhydes et que ces derniers peuvent exercer leur activité d'adduction dans les cellules du sang. Nos résultats sont cohérents avec un ensemble de données de la littérature. Les aldéhydes provenant de sources endogènes ou exogènes diffusent dans les cellules et réagissent avec le GSH cytosolique et les protéines. Une fraction des aldéhydes diffuse plus loin dans le noyau et réagit avec l'ADN, induisant des lésions à l'ADN (Xie *et al.*, 2016). Ainsi, les dommages à l'ADN, qui ne

sont pas réparés efficacement dans les 48 h, peuvent induire des mutations pouvant constituer la première étape de la cancérogenèse. Selon Xie et ses collègues (2016), la survie des cellules vis-à-vis des aldéhydes faiblement toxiques dépend de la réparation de l'ADN, tandis que celle des aldéhydes hautement toxiques est indépendante de la réparation de l'ADN.

Au regard des résultats obtenus *in vitro* et chez l'Homme, il serait intéressant de rechercher les adduits dans l'ADN des cellules mononucléées prélevées du sang de policiers exposés en milieu professionnel et de les comparer aux profils d'adduits obtenus chez les fumeurs. Notre étude épidémiologique réalisée auprès des policiers libanais était principalement prévue pour étudier la relation entre les niveaux du stress oxydant et les adduits à l'ADN générés à la fois par des aldéhydes exogènes, issus de la pollution urbaine, et produits de manière endogène. Dans la présente étude, l'exposition des policiers pour 5 jours était associée à une augmentation du niveau de MDA urinaire liée au stress oxydant, confortant l'hypothèse qu'une exposition à la pollution de l'air est en lien avec un risque accru du cancer. L'un des résultats les plus significatifs de l'étude est la corrélation négative entre le taux du MDA urinaire et celui du MDA plasmatique. Par conséquent, compte tenu cette augmentation du taux de MDA urinaire liée à l'exposition aux aldéhydes exogènes, ces résultats suggèrent la probabilité d'une formation d'adduits à l'ADN (*e.g.* M₁dG) médiés par un hydroperoxyde lipidique, tel que le MDA (Blair, 2008). Ces résultats prouvent qu'il serait intéressant de rechercher les adduits exocycliques susceptibles d'être produits *in vivo* et qui pourraient constituer une nouvelle classe de biomarqueurs permettant d'évaluer les dommages à l'ADN d'origines endogène et exogène.

En conclusion, l'ensemble des études basées sur une approche adductomique restent encore trop insuffisantes pour statuer sur l'intérêt des adduits exocycliques à l'ADN comme biomarqueurs précoces de la LPO et plus largement comme biomarqueurs prédictifs du stress oxydant en lien avec des pathologies chroniques comme le cancer. Si on veut envisager d'inscrire ce profil d'adduits exocycliques dans une base de données pour l'identification et la quantification d'adduits dans une approche adductomique, d'autres études sont nécessaires pour statuer sur l'intérêt d'utiliser l'approche adductomique dans l'évaluation d'une exposition multiple aux aldéhydes. Notre approche acellulaire basée sur l'exposition de l'ADNct aux aldéhydes (seuls et en mélange) nous a permis de définir les conditions expérimentales utiles pour des futures analyses d'ADN génomique extrait de cellules et de tissus. Aussi, il serait maintenant intéressant d'évaluer, en parallèle des études en population,

la pertinence de ce profil d'adduits comme biomarqueur d'effet précoce des aldéhydes et de la LPO dans des études expérimentales en utilisant des modèles *in vitro* et *in vivo* exposés à différents stress oxydants.

Perspectives

Afin d'approfondir les résultats obtenus au cours de cette thèse, différentes perspectives sont envisageables.

Au regard des résultats obtenus au cours de cette thèse tant chez l'Homme, qu'*in vitro*, il serait intéressant de compléter cette étude en recherchant tout particulièrement les niveaux d'adduits à l'ADN et de caractériser les profils d'adduits en lien avec une exposition environnementale, comme le trafic routier urbain. Une corrélation avec une étude des effets biologiques sur l'ADN en milieu professionnel apporterait un plus aux explications sur les résultats obtenus chez les fumeurs.

Il apparaît important d'étudier plus spécifiquement la variation des biomarqueurs d'effet génotoxique précoce liée à l'exposition aux aldéhydes pouvant être affectée par des facteurs, tels que le mode de vie, le stress, les conditions météorologiques (variation saisonnière), les groupes d'expositions environnementales, la variabilité en terme de pollution de fond *versus* pollution de proximité, le nombre de voiture par minute, la densité du trafic routier, l'effet cumulatif, la génétique et les expositions environnementales passées.

Références bibliographiques

- AALTO-KORTE K., MAKELA E. A., HUTTUNEN M., SUURONEN K. and JOLANKI R. Occupational contact allergy to glyoxal. *Contact Dermatitis*, 2005, vol. 52, no. 5, pp. 276-281.
- ABBASIHORMOZI S. H., BABAPOUR V., KOUHKAN A., NIASARI NASLJI A., AFRAZ K., ZOLFAGHARY Z. and SHAHVERDI A. H. Stress hormone and oxidative stress biomarkers link obesity and diabetes with reduced fertility potential. *Cell Journal*, 2019, vol. 21, no. 3, pp. 307-313.
- AGARWAL R. and CHASE S. D. Rapid, fluorimetric-liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *Journal of Chromatography B*, 2002, vol. 775, pp. 121-126.
- AKASAKA S. and YONEI S. Mutation induction in *Escherichia coli* incubated in the reaction mixture of NADPH-dependent lipid peroxidation of rat-liver microsomes. *Mutation Research*, 1985, vol. 149, pp. 321-326.
- ALTEMOSE B., ROBSON M. G., KIPEN H. M., OHMAN STRICKLAND P., MENG Q., GONG J., HUANG W., WANG G., RICH D. Q., ZHU T. and ZHANG J. Association of air pollution sources and aldehydes with biomarkers of blood coagulation, pulmonary inflammation, and systemic oxidative stress. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 2017, vol. 27, no. 3, pp. 244-250.
- ARAGNO M. and MASTROCOLA R. Dietary sugars and endogenous formation of advanced glycation endproducts: emerging mechanisms of disease. *Nutrients*, 2017, vol. 9, no. 4, 16 p.
- ARAYASIRI M., MAHIDOL C., NAVASUMRIT P., AUTRUP H. and RUCHIRAWAT M. Biomonitoring of benzene and 1,3-butadiene exposure and early biological effects in traffic policemen. *Science of the Total Environment*, 2010, vol. 408, no. 20, pp. 4855-4862.
- ARIF J. M., DRESLER C., CLAPPER M. L., GAIROLA C. G., SRINIVASAN C., LUBET R. A. and GUPTA R. C. Lung DNA adducts detected in human smokers are unrelated to typical polyaromatic carcinogens. *Chemical Research in Toxicology*, 2006, vol. 19, no. 2, pp. 295-299.
- AYALA A., MUÑOZ M. F. and ARGÜELLES S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, vol. 2014, 31 p.
- BALBO S., HASHIBE M., GUNDY S., BRENNAN P., CANOVA C., SIMONATO L., MERLETTI F., RICHIARDI L., AGUDO A., CASTELLSAGUE X., ZNAOR A., TALAMINI R., BENCKO V., HOLCÁTOVÁ I., WANG M., HECHT S. S. and BOFFETTA P. N²-ethyldeoxyguanosine as a potential biomarker for assessing effects of alcohol consumption on DNA. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2008, vol. 17, pp. 3026-3032.

- BALBO S., HECHT S. S., UPADHYAYA P. and VILLALTA P. W. Application of a high-resolution mass-spectrometry-based DNA adductomics approach for identification of DNA adducts in complex mixtures. *Analytical Chemistry*, 2014, vol. 86, pp. 1744-1752.
- BARTSCH H., NAIR J. and OWEN R. W. Exocyclic DNA adducts as oxidative stress markers in colon carcinogenesis: potential role of lipid peroxidation, dietary fat and antioxidants. *Biological Chemistry*, 2002, vol. 383, pp. 915-921.
- BARTSCH H. and NAIR U. J. Lipid peroxidation-derived DNA adducts and the role in inflammation-related carcinogenesis. *Cancer and Inflammation Mechanisms*, 2014, Chapter 5, pp. 61-74, John Wiley & Sons, Inc., New York.
- BASU A. K. and MARNETT L. J. Unequivocal demonstration that malondialdehyde is a mutagen. *Carcinogenesis*, 1983, vol. 4, no. 3, pp. 331-333.
- BENEDETTI A., COMPORTI M. and ESTERBAUER H. Identification of 4-hydroxynonenal as a cytotoxic product originating from the peroxidation of liver microsomal lipids. *Biochimica and Biophysica Acta*, 1980, vol. 620, pp. 281-296.
- BESSETTE E. E., GOODENOUGH A. K., LANGOUET S., YASA I., KOZEKOV I. D., SPIVACK S. D. and TURESKY R. J. Screening for DNA adducts by data-dependent constant neutral loss-triple stage mass spectrometry with a linear quadrupole ion trap mass spectrometer. *Analytical Chemistry*, 2009, vol. 81, pp. 809-819.
- BIND M. A., COULL B., SUH H., WRIGHT R., BACCARELLI A., VOKONAS P. and SCHWARTZ J. A novel genetic score approach using instruments to investigate interactions between pathways and environment: Application to air pollution. *Public Library of Science*, 2014, vol. 9, no. 4, 8 p.
- BLAIR I. A. DNA adducts with lipid peroxidation products. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, vol. 283, no. 23, pp. 15545-15549.
- BOLIN C., STEDEFORD T. and CARDOZO-PELAEZ F. Single extraction protocol for the analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (oxo8dG) and the associated activity of 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Journal of Neuroscience Methods*, 2004, vol. 136, no. 1, pp. 69-76.
- BONASSI S., CELLAI F., MUNNIA A., UGOLINI D., CRISTAUDO A., NERI M., MILIC M., BONOTTI A., GIESE R.W. and PELUSO M.E.M. 3-(2-deoxy- β -d-erythro-pentafuranosyl)pyrimido[1,2- α]purin-10 (3H)-one deoxyguanosine adducts of workers exposed to asbestos fibers. *Toxicology Letters*, 2017, vol. 270, pp. 1-7.
- BORGIE M., GARAT A., CAZIER F., DELBENDE A., ALLORGE D., LEDOUX F., COURCOT D., SHIRALI P. and DAGHER Z. Traffic-related air pollution. A pilot exposure assessment in Beirut, Lebanon. *Chemosphere*, 2014, vol. 96, pp. 122-128.
- BORGIE M. (a), LEDOUX F., VERDIN A., CAZIER F., GREIGE H., SHIRALI P., COURCOT D. and DAGHER Z. Genotoxic and epigenotoxic effects of fine particulate matter from rural and urban sites in Lebanon on human bronchial epithelial cells. *Environmental Research*, 2015, vol. 136, pp. 352-362.
- BORGIE M. (b), DAGHER Z., LEDOUX F., VERDIN A., CAZIER F., MARTIN P., HACHIMI A., SHIRALI P., GREIGE-GERGES H., and COURCOT D. Comparison between ultrafine and fine particulate matter collected in Lebanon: Chemical characterization, in vitro cytotoxic effects and metabolizing enzymes gene expression

- in human bronchial epithelial cells. *Environmental Pollution*, 2015, vol. 205, pp. 250-260.
- BRAMBILLA G., SCIABA L., FAGGIN P., MAURA A., MARINARI U. M., FERRO M. and ESTERBAUER H. Cytotoxicity, DNA fragmentation and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells exposed to the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal and homologous aldehydes. *Mutation Research*, 1986, vol. 171, no. 2-3, pp. 169-176.
- BRUCKER N., MORO A. M., CHARÃO M. F., DURGANTE J., FREITAS F., BAIERLE M., NASCIMENTO S., GAUER B., BULCÃO R. P., BUBOLS G. B., FERRARI P. D., THIESEN F. V., GIODA A., DUARTE M. M., DE CASTRO I., SALDIVA P. H. and GARCIA S. C. Biomarkers of occupational exposure to air pollution, inflammation and oxidative damage in taxi drivers. *The Science of the Total Environment*, 2013, vol. 463-464, pp. 884-893.
- BRYANT M. S., LAY J. O. and CHIARELLI M. P. Development of fast atom bombardment mass spectral methods for the identification of carcinogen-nucleoside adducts. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1992, vol. 3, pp. 360-371.
- BUDIAWAN, SCHULER D. and EDER E. Development of a ³²P-postlabelling method for the detection of 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts of crotonaldehyde in vivo. *Archives of Toxicology*, 2000, vol. 74, pp. 404-414.
- BUKOWSKA B. and KARWOWSKI B. T. The clustered DNA lesions - types, pathways of repair and relevance to human health. Review. *Current Medicinal Chemistry*, 2018, vol. 25, no. 23, pp. 2722-2735.
- BURTON G. J. and JAUNIAUX E. Oxidative stress. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 2011, vol. 25, no. 3, pp. 287-299.
- CADET J., DAVIES K. J. A., MEDEIROS M. H., DI MASCIO P. and WAGNER J. R. Formation and repair of oxidatively generated damage in cellular DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, 2017, vol. 107, pp. 13-34.
- CAI W., HE J. C., ZHU L., CHEN X., ZHENG F., STRIKER G. E., & VLASSARA H. Oral glycotoxins determine the effects of calorie restriction on oxidant stress, age-related diseases, and lifespan. *The American Journal of Pathology*, 2008, vol. 173, no. 2, pp. 327-336.
- CAJELLI E., FERRARIS A. and BRAMBILLA G. Mutagenicity of 4-hydroxynonenal in V79 Chinese hamster cells. *Mutation Research*, 1987, vol. 190, pp. 169-176.
- CAMEL V. and BERMOND A. The use of ozone and associated oxidation processes in drinking water treatment. *Water Research*, 1998, vol. 32, no. 11, pp. 3208-3222.
- CAO C., LAI T., LI M., ZHOU H., LV D., DENG Z., YING S., CHEN Z., LI W. and SHEN H. Smoking-promoted oxidative DNA damage response is highly correlated to lung carcinogenesis. *Oncotarget*, 2016, vol. 7, no. 14, pp. 18919-18926.
- CARLSSON H. and TÖRNQVIST M. An adductomic approach to identify electrophiles in vivo. Review. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 2017, vol. 121, no. 3, pp. 44-54.
- CARMELLA S. G., CHEN M., HAN S., BRIGGS A., JENSEN J., HATSUKAMI D. K. and HECHT S. S. Effects of smoking cessation on eight urinary tobacco carcinogen and

- toxicant biomarkers. *Chemical Research in Toxicology*, 2009, vol. 22, no. 4, pp. 734-741.
- CARRA' A., VILLALTA P. W., DATOR R. P. and BALBO S. Screening for inflammation-induced DNA adducts with a comprehensive high resolution LC-MS3 adductomic approach. In Proceedings of the 64th ASMS Annual Meeting, San Antonio, TX, USA, 4-8 June 2016.
- Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health (US). How tobacco smoke causes disease: the biology and behavioral basis for smoking-attributable disease. A report of the Surgeon General. Atlanta, 2010, GA, USA.
- CEPPI M., MUNNIA A., CELLAI F., BRUZZONE M. and PELUSO M. E. M. Linking the generation of DNA adducts to lung cancer. Review. *Toxicology*, 2017, vol. 390, pp. 160-166.
- CHAUDHARY K., NOKUBO M., REDDY G. R., YEOLA S. N., MORROW J. D., BLAIR I. A. and MARNETT L. J. Detection of endogenous malondialdehyde-deoxyguanosine adducts in human liver. *Science*, 1994, vol. 265, pp. 1580-1582.
- CHEN H. J. C. and CHUNG F. L. Epoxidation of trans-4-hydroxy-2-nonenal by fatty acid hydroperoxides and hydrogen peroxide. *Chemical Research in Toxicology*, 1996, vol. 9, pp. 306-312.
- CHEN H.-J. C., CHIANG L.-C., TSENG M.-C., ZHANG L. L., NI J. and CHUNG F.-L. Detection and quantification of 1,N6-ethenoadenine in human placental DNA by mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 1999, vol. 12, pp. 1119-1126.
- CHEN H.-J. C., LIN T.-C., HONG C.-L. and CHIANG L.-C. Analysis of 3,N4-ethenocytosine in DNA and in human urine by isotope dilution gas chromatography/negative ion chemical ionization/mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 2001, vol. 14, pp. 1612-1619.
- CHEN H.-J. C., WU C.-F., HONG C.-L. and CHANG C.-M. Urinary excretion of 3,N4-etheno-2'-deoxycytidine in humans as a biomarker of oxidative stress: association with cigarette smoking. *Chemical Research in Toxicology*, 2004, vol. 17, pp. 896-903.
- CHEN L., WANG M., VILLALTA P. W., LUO X., FEUER R., JENSEN J., HATSUKAMI D. K. and HECHT S. S. Quantitation of an acetaldehyde adduct in human leukocyte DNA and the effect of smoking cessation. *Chemical Research in Toxicology*, 2007, vol. 20, no.1, pp. 108-113.
- CHEN H.-J. and LIN W.-P. Simultaneous quantification of 1,N2-propano-2'-deoxyguanosine adducts derived from acrolein and crotonaldehyde in human placenta and leukocytes by isotope dilution nanoflow LC nanospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2009, vol. 81, pp. 9812-9818.
- CHEN H.-J. C., LIN G.-J. and LIN W.-P. Simultaneous quantification of three lipid peroxidation-derived etheno adducts in human DNA by stable isotope dilution nanoflow liquid chromatography nanospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2010, vol. 82, pp. 4486-4493.
- CHEN H.-J. C. and LIN W.-P. Quantitative analysis of multiple exocyclic DNA adducts in human salivary DNA by stable isotope dilution nanoflow liquid chromatography-

- nanospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 2011, vol. 83, pp. 8543-8551.
- CHENG G., SHI Y., STURLA S. J., JALAS J. R., MCINTEE E. J., VILLALTA P. W., WANG M. and HECHT S. S. Reactions of formaldehyde plus acetaldehyde with deoxyguanosine and DNA: formation of cyclic deoxyguanosine adducts and formaldehyde cross-links. *Chemical Research in Toxicology*, 2003, vol. 16, no. 2, pp. 145-152.
- CHOU P.-H., KAGEYAMA S., MATSUDA S., KANEMOTO K., SASADA Y., OKA M., SHINMURA K., MORI H., KAWAI K., KASAI H., SUGIMURA H. and MATSUDA T. Detection of lipid peroxidation-induced DNA adducts caused by 4-oxo-2(E)-nonenal and 4-oxo-2(E)-hexenal in human autopsy tissues. *Chemical Research in Toxicology*, 2010, vol. 23, no. 9, pp. 1442-1448.
- CHUNG F.-L. and HECHT S. S. Formation of cyclic 1,N2-adducts by reaction of deoxyguanosine with α -acetoxy-N-nitrosopyrrolidine, 4-(carbethoxynitrosamino)butanal, or crotonaldehyde. *Cancer Research*, 1983, vol. 43, pp. 1230-1235.
- CHUNG F.-L., YOUNG R. and HECHT S. S. Formation of cyclic 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts in DNA upon reaction with acrolein or crotonaldehyde. *Cancer Research*, 1984, vol. 44, pp. 990-995.
- CHUNG F.-L. and HECHT S. S. Formation of cyclic 1,N2-glyoxal-deoxyguanosine upon reaction of N-nitro-2-hydroxymorpholine with deoxyguanosine. *Carcinogenesis*, 1985, vol. 6, no. 11, pp. 1671-1673.
- CHUNG F.-L., YOUNG R. and HECHT S. S. Detection of cyclic 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts in DNA of rats treated with N-nitrosopyrrolidine and mice treated with crotonaldehyde. *Carcinogenesis*, 1989, vol. 10, no. 7, pp. 1291-1297.
- CHUNG F.-L., CHEN H.-J. C. and NATH R. G. Lipid peroxidation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts. *Carcinogenesis*, 1996, vol. 17, no. 10, pp. 2105-2111.
- CHUNG F.-L., NATH R. G., NAGAO M., NISHIKAWA A., ZHOU G.-D. and RANDEKATH K. Endogenous formation and significance of 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts. *Mutation Research*, 1999, vol. 424, pp. 71-81.
- CHUNG F.-L., NATH R. G., OCANDO J., NISHIKAWA A. and ZHANG L. Deoxyguanosine adducts of t-4-Hydroxy-2-nonenal are endogenous DNA lesions in rodents and humans: detection and potential sources. *Cancer Research*, 2000, vol. 60, pp. 1507-1511.
- CHURCHWELL M. I., BELAND F. A. and DOERGE D. R. Quantification of multiple DNA adducts formed through oxidative stress using liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 2002, vol. 15, no. 10, pp. 1295-1301.
- CLAEREBOUTD J., ESMANS E. L., VANDENECKHOUT E. G. and CLAEYS M. Fast-atom-bombardment and tandem mass-spectrometry for the identification of nucleoside adducts with phenyl glycidyl ether. *Nucleosides and Nucleotides*, 1990, vol. 9, no. 3, pp. 333-344.

- COHEN S. M., GARLAND E. M., ST. JOHN M., OKAMURA T. and SMITH R. A. Acrolein Initiates Rat Urinary Bladder Carcinogenesis. *Cancer Research*, 1992, vol. 52, pp. 3577-3581.
- COLLINS A. R., DUTHIE S. J. and DOBSON V. L. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, 1993, vol. 14, no. 9, pp. 1733-1735.
- Commission Decision No. 2002/657/EC. *Official Journal of the European Communities*, 2002, L 221/8, 29 p.
- CORRADI M., FOLESANI G., ROBUSCHI B., SELIS L., RICCELLI M. G., RICCELLI M. G., ANDREOLI R., PISI R., CHETTA A. and MUTTI A. Non-invasive techniques to assess restrictive lung disease in workers exposed to free crystalline silica. *La Medicina del Lavoro*, 2019, vol. 110, no. 2, pp. 83-92.
- DALLEAU S., BARADAT M., GUÉRAUD F. and HUC L. Cell death and diseases related to oxidative stress: 4-hydroxynonenal (HNE) in the balance. Review. *Cell Death and Differentiation*, 2013, vol. 20, pp. 1615-1630.
- DANAEI G., VANDER HOORN S., LOPEZ A. D., MURRAY C. J. L., EZZATI M. and the Comparative Risk Assessment collaborating group (Cancers). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*, 2005, vol. 366, pp. 1784-1793.
- DATOR R. P., SOLIVIO M. J., VILLALTA P. W. and BALBO S. Bioanalytical and mass spectrometric methods for aldehyde profiling in biological fluids. Review. *Toxics*, 2019, vol. 7, 35 p.
- DE LOS SANTOS C., ZALIZNYAK T. and JOHNSON F. NMR characterization of a DNA duplex containing the major acrolein- derived deoxyguanosine adduct gamma-OH-1,-N2-propano-2'-deoxyguanosine. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, vol. 276, pp. 9077-9082.
- DENNEHY M.K. and LOEPPKY R.N. Mass spectrometric methodology for the determination of glyoxaldehydeoxyguanosine and O6-hydroxyethyldeoxyguanosine DNA adducts produced by nitrosamine bident carcinogens. *Chemical Research in Toxicology*, 2005, vol. 18, no. 3, pp. 556-565.
- DEVECI S. E., DEVECI F., AÇIK Y. and OZAN A. T. The measurement of exhaled carbon monoxide in healthy smokers and non-smokers. *Respiratory Medicine*, 2004, vol. 98, pp. 551-556.
- DIZDAROGLU M. The use of capillary gas chromatography-mass spectrometry for identification of radiation-induced DNA base damage and DNA base amino acid cross-links. *Journal of Chromatography*, 1984, vol. 295, pp. 103-121.
- DOUKI T. and AMES B. N. An HPLC-EC assay for 1,N2-propano adducts of 2'-deoxyguanosine with 4-hydroxynonenal and other α,β -unsaturated aldehydes. *Chemical Research in Toxicology*, 1994, vol. 7, no. 4, pp. 511-518.
- DOUKI, T., ODIN, F., CAILLAT, S., FAVIER, A. and CADET, J. Predominance of the 1,N2-propano 2'-deoxyuanosine adduct among 4-hydroxy-2-nonenal-induced DNA lesions. *Free Radical Biology and Medicine*, 2004, vol. 37, no. 1, pp. 62-70.

- DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 2002, vol. 82, pp. 47-95.
- DUDDA A. and SPITELLER G., and Kobelt F. Lipid oxidation products in ischemic porcine heart tissue. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1996, vol. 82, no. 1, pp. 39-51.
- ECHA. European Chemicals Agency. 2019. Online: <https://echa.europa.eu/fr/information-on-chemicals>.
- ECKL P. and ESTERBAUER H. Genotoxic effects of 4-hydroxyalkenals. *Advances in Biosciences*, 1989, vol. 76, pp. 141-157.
- ECKL P., ORTNER A. and ESTERBAUER H. Genotoxic properties of 4-hydroxyalkenals and analogous aldehydes. *Mutation research*, 1993, vol. 290, pp. 183-192.
- EL-ALAMEEY I. R., FATHY G. A., SHADY M., ALI A., FATHY H. A., YOUNESS E. R. and NASR S. A. Relationship of oxidant and antioxidant markers to asthma severity in egyptian asthmatic children. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 2017, vol. 5, no. 5, pp. 645-650.
- ESCHER B. I., HACKERMÜLLER J., POLTE T., SCHOLZ S., AIGNER A., ALTENBURGER R., BÖHME A., BOPP S. K., BRACK W., BUSCH W., CHADEAU-HYAM M., COVACI A., EISENTRÄGER A., GALLIGAN J. J., GARCIA-REYERO N., HARTUNG T., HEIN M., HERBERTH G., JAHNKE A., KLEINJANS J., KLÜVER N., KRAUSS M., LAMOREE M., LEHMANN I., LUCKENBACH T., MILLER G.W., MÜLLER A., PHILLIPS D. H., REEMTSMA T., ROLLE-KAMPCZYK U., SCHÜÜRMAN G., SCHWIKOWSKI B., TAN Y.-M., TRUMP S., WALTER-ROHDE S. and WAMBAUGH J. F. From the exposome to mechanistic understanding of chemical-induced adverse effects. *Environment International*, 2016, vol. 99, pp. 97-106.
- ESTERBAUER H., ECKL P. and ORTNER A. Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutation Research*, 1990, vol. 238, pp. 223-233.
- ESTERBAUER H., SCHAUR R. J. and ZOLLNER H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. Review. *Free Radical Biology and Medicine*, 1991, vol. 11, pp. 81-128.
- EMA. European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. 2011, ref. no: EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1.
- EVERETT S. M., SINGH R., LEURATTI C., WHITE K.L.M., NEVILLE P., GREENWOOD D., MARNETT L.J., SCHORAH C.J., FORMAN D., SHUKER D. and AXON A.T.R. Levels of malondialdehyde-deoxyguanosine in the gastric mucosa: relationship with lipid peroxidation, ascorbic acid, and helicobacter pylori. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2001, vol. 10, pp. 369-376.
- FANG J.-L. and VACA C. E. Detection of DNA adducts of acetaldehyde in peripheral white blood cells of alcohol abusers. *Carcinogenesis*, 1997, vol. 18, no. 4, pp. 627-632.
- FARMER P. B. and SINGH R. Use of DNA adducts to identify human health risk from exposure to hazardous environmental pollutants: the increasing role of mass spectrometry in assessing biologically effective doses of genotoxic carcinogens. Review. *Mutation Research*, 2008, vol. 659, pp. 68-76.

- FEDTKE N., BOUCHERON J. A., TURNER M. J. JR and SWENBERG J. A. Vinyl chloride-induced DNA adducts. I: Quantitative determination of N2,3-ethenoguanine based on electrophore labeling. *Carcinogenesis*, 1990, vol. 11, no. 8, pp. 1279-1285.
- FENG Z., HU W., HU Y., and TANG M.-S. Acrolein is a major cigarette-related lung cancer agent: Preferential binding at p53 mutational hotspots and inhibition of DNA repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, vol. 103, no. 42, pp. 15404-15409.
- FINK S. P., REDDY G. R. and MARNETT L. J. Mutagenicity in *Escherichia coli* of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, vol. 94, pp. 8652-8657.
- FLOYD R. A., WATSON J. J., WONG P. K., ALTMILLER D. H. and RICKARD R. C. Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Radical Research Communications*, 1986, vol. 1, no. 3, pp. 163-172.
- FOILES P. G., CHUNG F.-L. and HECHT S. S. Development of a monoclonal antibody-based immunoassay for cyclic DNA adducts resulting from exposure to crotonaldehyde. *Cancer Research*, 1987, vol. 47, pp. 360-363.
- FOILES P. G., AKERKAR S. A. and CHUNG F.-L. Application of an immunoassay for cyclic acrolein deoxyguanosine adducts to assess their formation in DNA of salmonella typhimurium under conditions of mutation induction by acrolein. *Carcinogenesis*, 1989, vol. 10, no. 1, pp. 87-90.
- FOILES P. G., AKERKAR S. A., MIGLIYETTA L. M. and CHUNG F.-L. Formation of cyclic deoxyguanosine adducts in Chinese hamster ovary cells by acrolein and crotonaldehyde. *Carcinogenesis*, 1990, vol. 11, no. 11, pp. 2059-2061.
- FU T.-M., JACOB D. J., WITTRUCK F., BURROWS J. P., VREKOUSSIS M. and HENZE D. K. Global budgets of atmospheric glyoxal and methylglyoxal, and implications for formation of secondary organic aerosols. *Journal of Geophysical Research D*, 2008, vol. 113, no. 15, 17 p.
- FU D., CALVO J. A. and SAMSON L. D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. Review. *Nature Reviews Cancer*, 2012, vol. 12, pp. 104-120.
- FU Y., NATH R. G., DYBA M., CRUZ I. M., PONDICHERRY S. R., FERNANDEZ A., SCHULTZ C. L., YANG P., PAN J., DESAI D., KRZEMINSKI J., AMIN S., CHRISTOV P. P., HARA Y., CHUNG F.-L. In vivo detection of a novel endogenous etheno-DNA adduct derived from arachidonic acid and the effects of antioxidants on its formation. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, vol. 73, pp. 12-20.
- FUJIOKA K. and SHIBAMOTO T. Determination of toxic carbonyl compounds in cigarette smoke. *Environmental Toxicology*, 2006, vol. 21, no. 1, pp. 47-54.
- FUKUMOTO M. *Nicotine et cotinine* in *Drugs and Poisons in Humans*. Springer, Berlin, Heidelberg: 2005, pp. 499-508.
- FUSTINONI S., PERBELLINI L., SOLEO L., MANNO M. and FOA V. Biomonitoring in occupational exposure to low levels of 1,3-butadiene. *Toxicology Letters*, 2004, vol. 149, pp. 353-360.

- GANGL E. T., TURESKY R. J. and VOUIROS P. Determination of in vitro- and in vivo-formed DNA adducts of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline by Capillary Liquid Chromatography/Microelectrospray Mass Spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 1999, vol. 12, pp. 1019-1027.
- GARCIA C. C. M., FREITAS F. P., DI MASCIO P. and MEDEIROS M. H. G. Ultrasensitive simultaneous quantification of 1,N2-etheno-2'-deoxyguanosine and 1,N2-propano-2'-deoxyguanosine in DNA by an online liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay. *Chemical Research in Toxicology*, 2010, vol. 23, pp. 1245-1255.
- GARCIA C.C., ANGELI J.P., FREITAS F.P., GOMES O.F., DE OLIVEIRA T.F., LOUREIRO A.P., DI M.P., MEDEIROS M.H. (13C2)- Acetaldehyde promotes unequivol formation of 1,N2-propano-2'-deoxyguanosine in human cells. *Journal of American Chemistry Society*, 2011, vol. 133, pp. 9140-9143.
- GARNER R. C. The role of DNA adducts in chemical carcinogenesis. *Mutation Research*, 1998, vol. 402, pp. 67-75.
- GENTILE F., ARCARO A., PIZZIMENTI S., DAGA M., CETRANGOLO G. P., DIANZANI C., LEPORE A., GRAF M., AMES P. R. J. and BARRERA G. DNA damage by lipid peroxidation products: implications in cancer, inflammation and autoimmunity. Review. *AIMS Genetics*, 2017, vol. 4, no. 2, pp. 103-137.
- GODA Y. and MARNETT L. J. High-performance liquid chromatography with electrochemical detection for determination of the major malondialdehyde-guanine adduct. *Chemical Research in Toxicology*, 1991, vol. 4, no. 5, pp. 520-524.
- GONIEWICZ M.L., EISNER M.D., LAZCANO-PONCE E., ZIELINSKA-DANCH W., KOSZOWSKI B., SOBCZAK A., HAVEL C., JACOB P. and BENOWITZ N.L. Comparison of urine cotinine and the tobacco-specific nitrosamine metabolite 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) and their ratio to discriminate active from passive smoking. *Nicotine & Tobacco Research*, 2011, vol. 13, no. 3, pp. 202-208.
- GRIGORYEVA E. S., KOKOVA D. A., GRATCHEV A. N., CHERDYNTSEV E. S., BULDAKOV M. A., KZHYSHKOWSKA J. G. and CHERDYNTSEVA N. V. Smoking-related DNA adducts as potential diagnostic markers of lung cancer: new perspectives. Review. *Experimental Oncology*, 2015, vol. 37, no. 1, pp. 5-12.
- GUERAUD F. 4-Hydroxynonenal metabolites and adducts in pre-carcinogenic conditions and cancer. *Free Radical Biology and Medicine*, 2017, vol. 111, pp. 196-208.
- GUO J. and TURESKY R. J. Human biomonitoring of DNA adducts by ion trap multistage mass spectrometry. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, 2016, vol. 66, pp. 7.24.1-7.24.25.
- GUPTA R. C., REDDY M. V. and RANDEPATH K. 32P-postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts. *Carcinogenesis*, 1982, vol. 3, no. 9, pp. 1081-1092.
- GURUNG A. and BELL M. L. Exposure to airborne particulate matter in Kathmandu Valley, Nepal. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 2012, vol. 22, pp. 235-242.

- HADLEY M. and DRAPER H. H. Isolation of a guanine-malondialdehyde adduct adduct from rat and human urine. *Lipids*, 1990, vol. 25, no. 2, pp. 82-85.
- HALENG J., PINCEMAIL J., DEFRAIGNE J. O., CHARLIER C. and CHAPELLE J. P. Le stress oxydant. *Revue Médicale de Liège*, 2007, vol. 62, no. 10, pp. 628-638.
- HAN X. and NAEHER L. A review of traffic-related air pollution exposure assessment studies in the developing world. *Environment International*, 2006, vol. 32, no. 1, pp. 106-120.
- HARRIS C. C., YOLKEN R. H., KROKAN H. and HSU I.-C. Ultrasensitive enzymatic radioimmunoassay: application to detection of cholera toxin and rotavirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1979, vol. 76, no. 10, pp. 5336-5339.
- Hecht S.S. Tobacco carcinogens, their biomarkers, and tobacco-induced cancer. *Nature Reviews Cancer*, 2003, vol. 3, no. 10, pp. 733-744.
- HECHT S. S. Lung carcinogenesis by tobacco smoke. *International Journal of Cancer*, 2012, vol. 131, no. 12, pp. 2724-2732.
- HECHT S. S., STEPANOV I. and CARMELLA S. G. Exposure and metabolic activation biomarkers of carcinogenic tobacco-specific nitrosamines. *Accounts of Chemical Research*, 2016, vol. 49, no. 1, pp. 106-114.
- HECHT S. S. Oral cell DNA adducts as potential biomarkers for lung cancer susceptibility in cigarette smokers. Review. *Chemical Research in Toxicology*, 2017, vol. 30, no. 1, pp. 367-375.
- HEMERYCK L. Y., DECLOEDT A. I., VANDEN BUSSCHE J., GEBOES K. P. and VANHAECKE L. High resolution mass spectrometry based profiling of diet-related deoxyribonucleic acid adducts. *Analytica Chimica Acta*, 2015, vol. 892, pp. 123-131.
- HEMERYCK L. Y., ROMBOUITS C., VAN HECKE T., VAN MEULEBROEK L., VANDEN BUSSCHE J., DE SMET S. and VANHAECKE L. In vitro DNA adduct profiling to mechanistically link red meat consumption to colon cancer promotion. *Toxicological Research*, 2016, vol. 5, pp. 1346-1358.
- HO V., BRUNETTI V., PEACOCK S., MASSEY T. E., GODSCHALK R. W. L., VAN SCHOOTEN F. J., ASHBURY J. E., VANNER S. J. and KING W. D. Exposure to meat-derived carcinogens and bulky DNA adduct levels in normal-appearing colon mucosa. *Mutation Research*, 2017, vol. 821, pp. 5-12.
- HSU I.-C., POIRIER M. C., YUSPA S. H., GRUNBERGER D., WEINSTEIN I. B., YOLKEN R. H. and HARRIS C. C. Measurement of benzo(a)pyrene-DNA adducts by enzyme immunoassays and radioimmunoassay. *Cancer Research*, 1981, vol. 41, pp. 1091-1095.
- HU W., FENG Z., EVELEIGH J., IYER G., PAN J., AMIN S., CHUNG F.-L. and TANG M.-S. The major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, preferentially forms DNA adducts at codon 249 of human p53 gene, a unique mutational hotspot in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 2002, vol. 23, no. 11, pp. 1781-1789.
- HUANG H., WANG H., QI N., ALBENA K., RIZZO C. J. and STONE M. P. Rearrangement of the (6S,8R,11S) and (6R,8S,11R) exocyclic 1,N2-deoxyguanosine adducts of trans-4-hydroxynonenal to N2-deoxyguanosine cyclic hemiacetal adducts

- when placed complementary to cytosine in duplex DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, vol. 130, pp. 10898-10906.
- HUANG H., WANG H., LLOYD R. S., RIZZO C. J. and STONE M. P. Conformational interconversion of the trans-4-hydroxynonenal-derived (6S,8R,11S) 1,N2-deoxyguanosine adduct when mismatched with deoxyadenosine in DNA. *Chemical Research in Toxicology*, 2009, vol. 22, pp. 187-200.
- HUSSAIN S. P., RAJA K., AMSTAD P. A., SAWYER M., TRUDEL L. J., WOGAN G. N., HOFSETH L. J., SHIELDS P. G., BILLIAR T. R., TRAUTWEIN C., HÖHLER T., GALLE P. R., PHILLIPS D. H., MARKIN R., MARROGI A. J. and HARRIS C. C. Increased p53 mutation load in nontumorous human liver of wilson disease and hemochromatosis: oxyradical overload diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2000, vol. 97, no. 23, pp. 12770-12775.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: Some N-Nitroso compounds. Lyon: secretariat of the World Health Organization, 1978, vol. 17, 350 p.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: allyl compounds, aldehydes, epoxides and peroxides. Lyon: secretariat of the World Health Organization, 1985, vol. 36, 369 p.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: Tobacco smoking. Lyon: secretariat of the World Health Organization, 1986, vol. 38, 432 p.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans: Tobacco smoke and involuntary smoking. Lyon: secretariat of the World Health Organization, 2004, vol. 83, 1452 p.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans: Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-2-ol. Lyon: secretariat of the World Health Organization, 2006, vol. 88, 497 p.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: outdoor air pollution. Lyon: secretariat of the World Health Organization, 2016, vol. 109, 448 p.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans: Agents classified by the IARC monographs. Lyon: secretariat of the World Health Organization, 2019, vol. 1-123.
- INAGAKI S., ESAKA Y., DEYASHIKI Y., SAKO M. and GOTO M. Analysis of DNA adducts of acetaldehyde by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2003, vol. 987, pp. 341-347.
- INONU H., DORUK S., SAHIN S., ERKORKMAZ U., CELIK D., CELIKEL S. and SEYFIKLI Z. Oxidative stress levels in exhaled breath condensate associated with COPD and smoking. *Respiratory Care*, 2012, vol. 57, pp. 413-419.
- ISHINO K., KATO T., KATO M., SHIBATA T., WATANABE M., WAKABAYASHI K., NAKAGAMA H. and TOTSUKA Y. Comprehensive DNA adduct analysis reveals

pulmonary inflammatory response contributes to genotoxic action of magnetite nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, vol. 16, pp. 3474-3492.

- KALAPOUS M. P. Methylglyoxal in living organisms-chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicology Letters*, 1999, vol. 110, no. 3, pp. 145-175.
- KALAPOUS M. P. The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chemico-Biological Interactions*, 2008, vol. 171, no. 3, pp. 251-271.
- KALAPOUS M. P. Where does plasma methylglyoxal originate from? *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2013, vol. 99, no. 3, pp. 260-271.
- KANALY R.A., HANAOKA T., SUGIMURA H., TODA H., MATSUI S. and MATSUDA T. Development of the adductome approach to detect DNA damage in humans. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2006, vol. 8, pp. 993-1001.
- KANALY R. A., MATSUI S., HANAOKA T. and MATSUDA T. Application of the adductome approach to assess intertissue DNA damage variations in human lung and esophagus. *Mutation Research*, 2007, vol. 625, pp. 83-93.
- KANALY R. A., MICHELETTO R., MATSUDA T., UTSUNO Y., OZEKI Y. and HAMAMURA N. Application of DNA adductomics to soil bacterium *Sphingobium* sp strain KK22. *Microbiologyopen*, 2015, vol. 4, pp. 841-856.
- KARLHUBER G. M., BAUER H. C. and ECKL P. M. Cytotoxic and genotoxic effects of 4-hydroxynonenal in cerebral endothelial cells. *Mutation Research*, 1997, vol. 381, pp. 209-216.
- KASAI H., IWAMOTO-TANAKA N. and FUKADA S. DNA modifications by the mutagen glyoxal: adduction to G and C, deamination of C and GC and GA cross-linking. *Carcinogenesis*, 1998, vol. 19, no. 8, pp. 1459-1465.
- KATO K., YAMAMURA E., KAWANISHI M., YAGI T., MATSUDA T., SUGIYAMA A. and UNO Y. Application of the DNA adductome approach to assess the DNA-damaging capability of in vitro micronucleus test-positive compounds. *Mutation Research*, 2011, vol. 721, pp. 21-26.
- KAWAI Y., FURUHATA A., TOYOKUNI S., ARATANI Y. and UCHIDA K. Formation of acrolein-derived 2'-deoxyadenosine adduct in an iron-induced carcinogenesis model. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003, vol. 278, no. 50, pp. 50346-50354.
- KIIANITSA K. and MAIZELS N. Ultrasensitive isolation, identification and quantification of DNA-protein adducts by ELISA-based RADAR assay. *Nucleic Acids Research*, 2014, vol. 42, no. 13, 12 p.
- KIM S. Overview of cotinine cutoff values for smoking status classification. Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2016, vol. 13, no. 12, 15 p.
- KLAENE J. J., SHARMA V. K., GLICK J. and VOUIROS P. The analysis of DNA adducts: the transition from ³²P-postlabelling to mass spectrometry. Mini-review. *Cancer Letters*, 2013, vol. 334, pp. 10-19.
- KLAENE J.J., FLARAKOS C., GLICK J., BARRET J.T., ZARBL H. and VOUIROS P. Tracking matrix effects in the analysis of DNA adducts of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Chromatography A*, 2016 vol. 1439, pp. 112-123.

- KOHN K. W., ERICKSON L. C., EWIG R. A. G. and FRIEDMAN C. A. Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry*, 1976, vol. 15, no. 21, pp. 4629-4637.
- KOTTEMANN M. C. and SMOGORZEWSKA A. Fanconi anaemia and the repair of Watson and Crick DNA crosslinks. *Nature*, 2013, vol. 493, pp. 356-363.
- KURUTAS E. B. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutrition Journal*, 2016, vol. 15, no. 1, 71 p.
- KWON J. W., PARK H. W., KIM W. J., KIM M. G. and LEE S. J. Exposure to volatile organic compounds and airway inflammation. *Environmental Health*, 2018, vol. 17, no. 1, 8 p.
- LAI Y., YU R., HARTWELL H. J., MOELLER B. C., BODNAR W. M. and SWENBERG J. A. Measurement of endogenous versus exogenous formaldehyde induced DNA-protein crosslinks in animal tissues by stable isotope labeling and ultrasensitive mass spectrometry. *Cancer Research*, 2016, vol. 76, no. 9, pp. 2652-2661.
- LANG J., CELOTTO C. and ESTERBAUER H. Quantitative determination of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by high performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*, 1985, vol. 150, pp. 369-378.
- LANGE J. N., WOOD K. D., KNIGHT J., ASSIMOS D. G. and HOLMES R. P. Glyoxal formation and its role in endogenous oxalate synthesis. Review. *Advances in Urology*, 2012, vol. 2012, 5 p.
- LANGOUËT S., MICAN A.N., MÜLLER M., FINK S.P., MARNETT L.J., MUHLE S.A. and GUENGERICH F.P. Misincorporation of nucleotides opposite five-membered exocyclic ring guanine derivatives by escherichia coli polymerases in vitro and in vivo: 1,N2-ethenoguanine, 5,6,7,9-tetrahydro-9-oxoimidazo[1, 2-a]purine, and 5,6,7,9-tetrahydro-7-hydroxy-9-oxoimidazo[1, 2-a]purine. *Biochemistry*, 1998, vol. 37, no. 15, pp. 5184-5193.
- LAPOLLA A., FLAMINI R., DALLA VEDOVA A., SENESI A., REITANO R., FEDELE D., BASSO E., SERAGLIA R. and TRALDI P. Glyoxal and methylglyoxal levels in diabetic patients: quantitative determination by a new GC/MS method. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2003, vol. 41, no. 9, pp. 1166-1173.
- LEE H. W., WANG H. T., WENG M. W., CHIN C., HUANG W., LEPOR H., WU X. R., ROM W. N., CHEN L. C. and TANG M. S. Cigarette side-stream smoke lung and bladder carcinogenesis: inducing mutagenic acrolein-DNA adducts, inhibiting DNA repair and enhancing anchorage-independent-growth cell transformation. *Oncotarget*, 2015, vol. 6, no. 32, pp. 33226-33236.
- LEE S. M., CHO Y. H., LEE S. Y., JEONG D. W., CHO A. R., JEON J. S., PARK E. J., KIM Y. J., LEE J. G., YI Y. H., TAK Y. J., HWANG H. R., LEE S. H. and HAN J. Urinary malondialdehyde is associated with visceral abdominal obesity in middle-aged men. *Mediators of Inflammation*, 2015, pp. 1-6.
- LEURATTI C., WATSON M. A., DEAG E. J., WELCH A., SINGH R., GOTTSCHALG E., MARNETT L. J., ATKIN W., DAY N. E., SHUKER D. E. G. and BINGHAM S. A.. Detection of malondialdehyde DNA adducts in human colorectal mucosa: relationship

- with diet and the presence of adenomas. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2002, vol. 11, pp. 267-273.
- LEWANDOWSKA A. M., RUDZKI M., RUDZKI S., LEWANDOWSKI T. and LASKOWSKA B. Environmental risk factors for cancer - review paper. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2019, vol. 26, no. 1, pp. 1-7.
- LI X., LIU L., WANG H., CHEN J., ZHU B., CHEN H., HOU H., HU Q. Simultaneous analysis of six aldehyde-DNA adducts in salivary DNA of nonsmokers and smokers using stable isotope dilution liquid chromatography electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2017, vol. 1060, pp. 451-459.
- LIMA L.F., MURTA G.L., BANDEIRA A.C.B., NARDELI C.R., LIMA W.G. and BEZERRA F.S. Short-term exposure to formaldehyde promotes oxidative damage and inflammation in the trachea and diaphragm muscle of adult rats. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 2015, vol. 202, pp. 45-51.
- LIOY P. J. and RAPPAPORT S. M. Exposure science and the exposome: an opportunity for coherence in the environmental health sciences. *Environmental Health Perspectives*, 2011, vol. 119, no. 11, pp. A466-A467.
- LISTON B. W., GUPTA A., NINES R., CARLTON P. S., KRESTY L. A., HARRIS G. K. and STONER G. D. Incidence and effects of Ha-ras codon 12 G → A transition mutations in preneoplastic lesions induced by N-nitrosomethylbenzylamine in the rat esophagus. *Molecular Carcinogenesis*, 2001, vol. 32, no. 1, pp. 1-8.
- LIU X., LOVELL M. A. and LYNN B. C. Development of a method for quantification of acrolein-deoxyguanosine adducts in DNA using isotope dilution-capillary LC/MS/MS and its application to human brain tissue. *Analytical Chemistry*, 2005, vol. 77, pp. 5982-5989.
- LIU X., LOVELL M. A. and LYNN B. C. Detection and quantification of endogenous cyclic DNA adducts derived from trans-4-hydroxy-2-nonenal in human brain tissue by isotope dilution capillary liquid chromatography nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 2006, vol. 19, no. 5, pp. 710-718.
- LIU X.-Y., ZHU M.-X. and XIE J.-P. Mutagenicity of acrolein and acrolein-induced DNA adducts. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2010, vol. 20, no. 1, pp. 36-44.
- LIU Y., HYDE A. S., SIMPSON M. A. and BARYCKI J. J. Emerging regulatory paradigms in glutathione metabolism. *Advances in Cancer Research*, 2014, vol. 122, pp. 69-101.
- LOIDL-STÄHLHOFEN A. and SPITELLER G. α -Hydroxyaldehydes, products of lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1994, vol. 1211, no. 2, pp. 156-160.
- LONKAR P. and DEDON P. C. Reactive species and DNA damage in chronic inflammation: reconciling chemical mechanisms and biological fates. *International Journal of Cancer*, 2011, vol. 128, pp. 1999-2009.
- LU K., YE W., GOLD A., BALL L. M. and SWENBERG J. A. Formation of S-[1-(N2-deoxyguanosinyl)methyl]glutathione between glutathione and DNA induced by formaldehyde. *Journal of the American Chemical Society*, 2009, vol. 131, pp. 3414-3415.
- LU K. (a), COLLINS L. B., RU H., BERMUDEZ E. and SWENBERG J. A. Distribution of DNA adducts caused by inhaled formaldehyde is consistent with induction of nasal carcinoma but not leukemia. *Toxicological Sciences*, 2010, vol. 116, pp. 441-451.

- LU K. (b), YE W., ZHOU L., COLLINS L. B., CHEN X., GOLD A., BALL L. M. and SWENBERG J. A. Structural characterization of formaldehyde-induced cross-links between amino acids and deoxynucleosides and their oligomers. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, vol. 132, pp. 3388-3399.
- LU K., MOELLER B., DOYLE-EISELE M., MCDONALD J. and SWENBERG J. A. Molecular dosimetry of N²-hydroxymethyl-dG DNA adducts in rats exposed to formaldehyde. *Chemical Research in Toxicology*, 2011, vol. 24, pp. 159-161.
- LUBOS E., LOSCALZO J. and HANDY D. E. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011, vol. 15, no. 7, pp. 1957-1997.
- MA B., VILLALTA P.W., BALBO S. and STEPANOV I. Analysis of a malondialdehyde-deoxyguanosine adduct in human leukocyte DNA by liquid chromatography nano-electrospray-high-resolution tandem mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 2014, vol. 27, pp. 1829-1836.
- MA B., STEPANOV I. and HECHT S. S. Recent studies on DNA adducts resulting from human exposure to tobacco smoke. Review. *Toxics*, 2019, vol. 7, 16 p.
- MAEKAWA M., KAWAI K., TAKAHASHI Y., NAKAMURA H., WATANABE T., SAWA R., HACHISUKA K. and KASAI H. Identification of 4-oxo-2'-hexenal and other direct mutagen formed in model lipid peroxidation reactions as dGuo adducts. *Chemical Research in Toxicology*, 2006, vol. 19, no. 1, pp. 130-138.
- MAO H., SCHNETZ-BOUDAUD N. C., WEISENSEEL J. P., MARNETT L. J. and STONE M. P. Duplex DNA catalyzes the chemical rearrangement of a malondialdehyde deoxyguanosine adduct. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1999, vol. 96, pp. 6615-6620.
- MARIE C. Recherche de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques à travers l'étude des lésions de l'ADN chez l'homme. Thèse doctorale en Santé Environnement. Grenoble: Université Joseph-Fourier-Grenoble I, 2007, 210 p.
- MARNETT J. L., HURD H. K., HOLLSTEIN M. C., LEVIN D. E., ESTERBAUER H. and AMES B. N. Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in *Salmonella* tester strain TA104. *Mutation Research*, 1987, vol. 148, pp. 25-34.
- MARNETT L. J. and BURCHAM P. C. Endogenous DNA adducts: potential and paradox. *Chemical Research in Toxicology*, 1993, vol. 6, pp. 771-785.
- MARNETT L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation Research*, 1999, vol. 424, pp. 83-95.
- MARNETT L. J. Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. *Toxicology*, 2002, vol. 181-182, pp. 219-222.
- MARROCCO I., ALTIERI F. and PELUSO I. Measurement and clinical significance of biomarkers of oxidative stress in humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, pp. 1-32.
- MATSUDA T., MATSUMOTO A., UCHIDA M., KANALY R. A., MISAKI K., SHIBUTANI S., KAWAMOTO T., KITAGAWA K., NAKAYAMA K. I., TOMOKUNI K. and ICHIBA M. Increased formation of hepatic N²-Ethylidene-2'-

- deoxyguanosine DNA adducts in aldehyde dehydrogenase 2-knockout mice treated with ethanol. *Carcinogenesis*, 2007, vol. 28, no. 11, pp. 2363-2366.
- MATSUDA T., TAO H., GOTO M., YAMADA H., SUZUKI M., WU Y., XIAO N., HE Q., GUO W., CAI Z., KURABE N., ISHINO K., MATSUSHIMA Y., SHINMURA K., KONNO H., MAEKAWA M., WANG Y. and SUGIMURA H. Lipid peroxidation-induced DNA adducts in human gastric mucosa. *Carcinogenesis*, 2013, vol. 34, no. 1, pp. 121-127.
- MCDIARMID M. A., IYPE P. T., KOLODNER K., JACOBSON-KRAM D. and STRICKLAND P. T. Evidence for acrolein-modified DNA in peripheral blood leukocytes of cancer patients treated with cyclophosphamide. *Mutation Research*, 1991, vol. 248, pp. 93-99.
- MEDEIROS M. H. G. Exocyclic DNA adducts as biomarkers of lipid oxidation and predictors of disease. Challenges in developing sensitive and specific methods for clinical studies. Review. *Chemical Research in Toxicology*, 2009, vol. 22, no. 3, pp. 419-425.
- MICHEL F., BONNEFONT-ROUSSELOT D., MAS E., DRAI J. and THÉRON P. Biomarkers of lipid peroxidation: analytical aspects. Review. *Annales de Biologie Clinique (Paris)*, 2008, vol. 66, no. 6, pp. 605-620.
- MIGDAL C. and SERRES M. Espèces réactives de l'oxygène et stress oxydant. *Médecine/Sciences*, 2011, vol. 27, no. 4, pp. 405-412.
- MILLER M. R., HANKINSON J., BRUSASCO V., BURGOS F., CASABURI R., COATES A., CRAPO R., ENRIGHT P., VAN DER GRINTEN C. P., GUSTAFSSON P., JENSEN R., JOHNSON D. C., MACINTYRE N., MCKAY R., NAVAJAS D., PEDERSEN O. F., PELLEGRINO R., VIEGI G. and WANGER J. ATS/ERS Task Force. Standardization of spirometry. *European Respiratory Journal*, 2005, vol. 26, no. 2, pp. 319-338.
- MINKO I. G., KOZEKOV I. D., HARRIS T. M., RIZZO C. J., LLOYD R. S. and STONE M. P. Chemistry and biology of DNA containing 1,N(2)-deoxyguanosine adducts of the alpha,beta-unsaturated aldehydes acrolein, crotonaldehyde, and 4-hydroxynonenal. Review. *Chemical Research in Toxicology*, 2009, vol. 22, no. 5, pp. 759-778.
- MLAKAR A. and SPITELLER G. Reinvestigation of lipid peroxidation of linolenic acid. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1994, vol. 1214, no. 2, pp. 209-220.
- MOL M., REGAZZONI L., ALTOMARE A., DEGANI G., CARINI M., VISTOLI G. and ALDINI G. Enzymatic and non-enzymatic detoxification of 4-hydroxynonenal: Methodological aspects and biological consequences. Review. *Free Radical Biology and Medicine*, 2017, vol. 111, pp. 328-344.
- MONIEN B. H., SCHUMACHER F., HERRMANN K., GLATT H., TURESKY R. J. and CHESNÉ C. Simultaneous detection of multiple DNA adducts in human lung samples by isotope-dilution UPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 2015, vol. 87, pp. 641-648.
- MONTERO-MONTOYA R., LÓPEZ-VARGAS R. and ARELLANO-AGUILAR O. Volatile organic compounds in air: sources, distribution, exposure and associated illnesses in children. *Annals of Global Health*, 2018, vol. 84, no. 2, pp. 225-238.

- MORABIA A., AMSTISLAVSKI P. N., MIRER F. E., AMSTISLAVSKI T. M., EISL H., WOLFF M. S. and MARKOWITZ S. B. Air pollution and activity during transportation by car, subway, and walking. *American Journal of Preventive Medicine*, 2009, vol. 37, no. 1, pp. 72-77.
- MOREAU D. Etude de nouvelles cibles moléculaires de cancer bronchopulmonaire non à petites cellules pharmacomodulées par des substances originales naturelles et synthétiques. Thèse doctorale en Sciences de la Vie et de la Santé. Nantes: Université de Nantes, 2006, 242 p.
- MOREAU M., OUELLET N., AYOTTE P. and BOUCHARD M. Effects of intravenous benzo[a]pyrene dose administration on levels of exposure biomarkers, DNA adducts, and gene expression in rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 2015, vol. 78, no. 3, pp. 166-184.
- MURAKAMI H., HORIBA R., IWATA T., MIKI Y., UNO B. SAKAI, T., KANEKOC K., ISHIHAMAD Y., TESHIMAA N. and ESAKA, Y. Progress in a selective method for the determination of the acetaldehyde-derived DNA adducts by using HILIC-ESI-MS/MS. *Talanta*, 2018, vol. 177, pp. 12-17.
- NAIR J., SRIVATANAKUL P., JEDPIYAWONGSE A. and BARTSCH H. Urinary excretion of 1,N6-ethenodeoxyadenosine in patients diagnosed with chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma from Thailand. *Proceedings of the American Association for Cancer Research*, 2002, vol. 42, pp. 2843.
- NAIR J., STRAND S., FRANK N., KNAUFT J., WESCH H., GALLE P. R. and BARTSCH H. Apoptosis and age-dependant induction of nuclear and mitochondrial etheno-DNA adducts in Long-Evans Cinnamon (LEC) rats: enhanced DNA damage by dietary curcumin upon copper accumulation. *Carcinogenesis*, 2005, vol. 26, pp. 1307-1315.
- NAIR J., GANSAUGE F., BEGER H., DOLARA P., WINDE G. and BARTSCH H. Increased etheno DNA adducts in affected tissues of patients suffering from Crohn's disease, ulcerative colitis and chronic pancreatitis. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2006, vol. 8, no. 5-6, pp.1003-1010.
- NAIR U., BARTSCH H. and NAIR J. Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adduct types and levels in humans. *Free Radical Biology & Medicine*, 2007, vol. 43, pp. 1109-1120.
- NAIR J., SRIVATANAKUL P., HAAS C., JEDPIYAWONGSE A., KHUHAPREMA T., SEITZ H. K. and BARTSCH H. High urinary excretion of lipid peroxidation-derived DNA damage in patients with cancer-prone liver diseases. *Mutation Research*, 2010, vol. 683, pp. 23-28.
- NATH R. G. and CHUNG F.-L. Detection of exocyclic 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts as common DNA lesions in rodents and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, vol. 91, pp. 7491-7495.
- NATH R. G., CHEN H.-J. C., NISHIKAWA A., YOUNG R. and CHUNG F.-L. A 32P-postlabelling method for simultaneous detection and quantification of exocyclic etheno and propano adducts in DNA. *Carcinogenesis*, 1994, vol. 15, no. 5, pp. 979-984.

- NATH R. G., OCANDO J. E. and CHUNG F.-L. Detection of 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts as potential endogenous DNA lesions in rodent and human tissues. *Cancer Research*, 1996, vol. 56, pp. 452-456.
- NEMET I., VARGA-DEFTERDAROVIĆ L. and TURK Z. Methylglyoxal in food and living organisms. *Molecular Nutrition and Food Research*, 2006, vol. 50, no. 12, pp. 1105-1117.
- NIELSEN A. T. and HOULIHAN W. J. *The aldol condensation* in Organic reactions (Cope, A. C., Ed.), John Wiley & Sons, 1968, vol. 16, pp. 1-87.
- OLSEN R., MOLANDER P., ØVREBØ S., ELLINGSEN D.G., THORUD S., THOMASSEN Y., LUNDANES E., GREIBROKK T., BACKMAN J., SJÖHOLM R. and KRONBERG L. Reaction of glyoxal with 2'-deoxyguanosine, 2'-deoxyadenosine, 2'-deoxycytidine, cytidine, thymidine, and calf thymus DNA: identification of DNA adducts. *Chemical Research in Toxicology*, 2005, vol. 18, no. 4, pp. 730-739.
- PACI E., PIGINI D., BAULEO L., ANCONA C., FORASTIERE F. and TRANFO G. Urinary cotinine concentration and self-reported smoking status in 1075 subjects living in central Italy. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2018, vol. 15, no. 4, 8 p.
- PAN J., DAVIS W., TRUSHIN N., AMIN S., NATH R. G., SALEM N. JR. and CHUNG F.-L. A solid-phase extraction/high-performance liquid chromatography-based 32P-postlabeling method for detection of cyclic 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts derived from enals. *Analytical Biochemistry*, 2006, vol. 348, pp. 15-23.
- PAN J., LI L., LIANG L., HE H., SU Y., WANG X. and LIU S. Cytoprotective effects of cell-permeable bifunctional antioxidant enzyme, GST-TAT-SOD, against cisplatin-induced cell damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, pp. 1-7.
- PARK J.-W., CUNDY K. C. and AMES B. N. Detection of DNA adducts by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Carcinogenesis*, 1989, vol. 10, no. 5, pp. 827-832.
- PELUSO M., MUNNIA A., RISSO G. G., CATARZI S., PIRO S., CEPPI M., GIESE R. W. and BRANCATO B. Breast fine-needle aspiration malondialdehyde deoxyguanosine adduct in breast cancer. *Free Radical Research*, 2011, vol. 45, no. 4, pp. 477-482.
- PELUSO M., MUNNIA A., PIRO S., JEDPIYAWONGSE A., SANGRAJRANG S., GIESE R.W., CEPPI M., BOFFETTA P. and SRIVATANAKUL P. Fruit and vegetable and fried food consumption and 3-(2-deoxy-β-d-erythro-pentafuranosyl)pyrimido [1,2-α] purin-10(3H)-one deoxyguanosine adduct formation. *Free Radical Research*, 2012, vol. 46, no. 1, pp. 85-92.
- PERERA F. P. and WEINSTEIN I. B. Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis*, 2000, vol. 21, no. 3, pp. 517-524.
- PERIAT A., KOHLER I., BUGHEY A., BIERI S., VERSACE F., STAUB C. and GUILLARME D. Hydrophilic interaction chromatography versus reversed phase liquid chromatography coupled to mass spectrometry: effect of electrospray ionization

- source geometry on sensitivity. *Journal of Chromatography A*, 2014, vol. 1356, pp. 211-220.
- PFLAUM M., WILL O. and EPE B. Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis*, 1997, vol. 18, no. 11, pp. 2225-2231.
- PHILLIPS D. H., FARMER P. B., BELAND F. A., NATH R. G., POIRIER M. C., REDDY M. V. and TURTELTAUB K. W. Methods of DNA adduct determination and their application to testing compounds for genotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2000, vol. 35, pp. 222-233.
- PIETSCH K. E., VAN MIDWOUD P. M., VILLALTA P. W. and STURLA S. J. Quantification of acylfulvene- and illudin s-DNA adducts in cells with variable bioactivation capacities. *Chemical Research in Toxicology*, 2013, vol. 26, pp. 146-155.
- PINGITORE A., LIMA G. P., MASTORCI F., QUINONES A., IERVASI G. and VASSALLE C. Exercise and oxidative stress: potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. Review. *Nutrition*, 2015, vol. 31, no. 7-8, pp. 916-922.
- PLEIL J. D. Categorizing biomarkers of the human exposome and developing metrics for assessing environmental sustainability. Review. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*, 2012, vol. 15, no. 4, pp. 264-280.
- PLUSKOTA-KARWATKA D., PAWŁOWICZ A.J., TOMAS M. and KRONBERG L. Formation of adducts in the reaction of glyoxal with 2'-deoxyguanosine and with calf thymus DNA. *Bioorganic Chemistry*, 2008, vol. 36, pp. 57-64.
- POIRIER A. E., RUAN Y., GREVERS X., WALTER S. D., VILLENEUVE P. J., FRIEDENREICH C. M., BRENNER D. R. and ComPARE Study Team. Estimates of the current and future burden of cancer attributable to active and passive tobacco smoking in Canada. *Preventive Medicine*, 2019, vol. 122, pp. 9-19.
- PRASAD B. S., VIDYULLATHA P., VENKATA R. P., TIRUMALA V. G., VARRE S., PENAGALURU U. R., GROVER P., MUNDLURU H. P. and PENAGALURU P. R. Evaluation of oxidative stress and DNA damage in traffic policemen exposed to vehicle exhaust. *Biomarkers*, 2013, vol. 18, no. 5, pp. 406-411.
- RAPPAPORT S.M. and SMITH M.T. Environment and disease risks. *Science*, 2010, vol. 330, pp. 460-461.
- RAPPAPORT S. M. Implications of the exposome for exposure science. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 2011, vol. 21, no. 1, pp. 5-9.
- RAVANAT J.-L., TURESKY R. J., GREMAUD E., TRUDEL L. J. and STADLER R. H. Determination of 8-oxoguanine in DNA by gas chromatography-mass spectrometry and HPLC-electrochemical detection: overestimation of the background level of the oxidized base the gas chromatography-mass spectrometry assay. *Chemical Research in Toxicology*, 1995, vol. 8, no. 8, pp. 1039-1045.
- REGULUS P., SPESSOTTO S., GATEAU M., CADET J., FAVIER A. and RAVANAT J. L. Detection of new radiation-induced DNA lesions by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2004, vol. 18, pp. 2223-2228.

- RINDGEN D., TURESKY R. J. and VOUIROS P. Determination of in vitro formed DNA adducts of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine using capillary liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 1995, vol. 8, pp. 1005-1013.
- ROUZER C.A., CHAUDHARY A.K., NOKUBO M., FERGUSON D.M., REDDY G.R., BLAIR I.A. and MARNETT L.J. Analysis of the malondialdehyde-2'-deoxyguanosine adduct pyrimidopurinone in human leukocyte DNA by gas chromatography /electron capture/negative chemical ionization/mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 1997, vol. 10, no. 2, pp. 181-188.
- RÜCKERL R., SCHNEIDER A., HAMPEL R., BREITNER S., CYRYS J., KRAUS U., GU J., SOENTGEN J., KOENIG W. and PETERS A. Association of novel metrics of particulate matter with vascular markers of inflammation and coagulation in susceptible populations-results from a panel study. *Environmental Research*, 2016, vol. 150, pp. 337-347.
- SAIEVA C., PELUSO M., PALLI D., CELLAI F., CEROTI M., SELVI V., BENDINELLI B., ASSEDI M., MUNNIA A. and MASALA G. Dietary and lifestyle determinants of malondialdehyde DNA adducts in a representative sample of the Florence City population. *Mutagenesis*, 2016, vol. 31, no. 4, pp. 475-480.
- SAMPSON M. M., CHAMBERS D. M., PAZO D. Y., MOLIÈRE F., BLOUNT B. C. and WATSON C. H. Simultaneous analysis of 22 volatile organic compounds in cigarette smoke using gas sampling bags for high-throughput solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, 2014, vol. 86, no. 14, pp. 7088-7095.
- SANTELLA R. M. Immunological methods for detection of carcinogen-DNA damage in humans. Review. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 1999, vol. 8, pp. 733-739.
- SAPKOTA A., HALDEN R. U., DOMINICI F., GROOPMAN J. D. and BUCKLEY T. J. Urinary biomarkers of 1,3-butadiene in environmental settings using liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry. *Chemico-Biological Interactions*, 2006, vol. 160, pp. 70-79.
- SAPKOTA M. and WYATT T. A. Alcohol, aldehydes, adducts and airways. *Biomolecules*, 2015, vol. 5, no. 4, pp. 2987-3008.
- SARKAR P. Response of DNA damage genes in acrolein-treated lung adenocarcinoma cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2019, vol. 450, no. 1-2, pp. 187-198.
- SCHROETER J. D., CAMPBELL J., KIMBELL J. S., CONOLLY R. B., CLEWELL H. J. and ANDERSEN M. E. Effects of endogenous formaldehyde in nasal tissues on inhaled formaldehyde dosimetry predictions in the rat, monkey, and human nasal passages. *Toxicological Sciences*, 2014, vol. 138, no. 2, pp. 412-424.
- SENTKOWSKA A., BIESAGA M., and PYRZYNSKA K. Application of hydrophilic interaction liquid chromatography for the quantification of flavonoids in genista tinctoria extract. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2016, vol. 2016, 9 p.
- SERVAIS S. Altérations mitochondriales et stress oxydant pulmonaire en réponse à l'Ozone : Effets de l'âge et d'une supplémentation en Oméga-3. Thèse doctorale en Physiologie. Lyon : Université Claude Bernard-Lyon I, 2004, 127 p.

- SETO H., OKUDA T., TAKESUE T. and IKEMURA T. Reaction of malonaldehyde with nucleic acid. I. Formation of fluorescent pyrimido[1,2-a]purin-10(3H)-one nucleosides. *The Chemical Society of Japan*, 1983, vol. 56, no. 6, pp. 1799-1802.
- SHAH D., MAHAJAN N., SAH S., NATH S. K. and PAUDYAL B. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *Journal of Biomedical Science*, 2014, vol. 21, no. 1, 23 p.
- SHAKYA K. M., PELTIER R. E., ZHANG Y. and PANDEY B. D. Roadside exposure and inflammation biomarkers among a cohort of traffic police in Kathmandu, Nepal. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2019, vol. 16, no. 3, 16 p.
- SHANGARI N., BRUCE W. R., POON R., and O'BRIEN P. J. Toxicity of glyoxals-role of oxidative stress, metabolic detoxification and thiamine deficiency. *Biochemical Society Transactions*, 2003, vol. 31, no. 6, pp. 1390-1393.
- SHANGARI N. and O'BRIEN P. J. The cytotoxic mechanism of glyoxal involves oxidative stress. *Biochemical Pharmacology*, 2004, vol. 68, no. 7, pp. 1433-1442.
- SHUCK S. C., WUENSCHHELL G. E. and TERMINI J. S. Product studies and mechanistic analysis of the reaction of methylglyoxal with deoxyguanosine. *Chemical Research in Toxicology*, 2018, vol. 31, no. 2, pp. 105-115.
- SILVA M. S., GOMES R. A., FERREIRA A. E., FREIRE A. P. and CORDEIRO C. The glyoxalase pathway: the first hundred years... and beyond. *The Biochemical Journal*, 2013, vol. 453, no. 1, pp. 1-15.
- SINGH R. and FARMER P. B. Liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry: the future of DNA adduct detection. Review. *Carcinogenesis*, 2006, vol. 27, no. 2, pp. 178-196.
- SINGH R., SANDHU J., KAUR B., JUREN T., STEWARD W. P., SEGERBÄCK D. and FARMER P. B. Evaluation of the DNA damaging potential of cannabis cigarette smoke by the determination of acetaldehyde derived N2-ethyl-2'-deoxyguanosine adducts. *Chemical Research in Toxicology*, 2009, vol. 22, no. 6, pp. 1181-1188.
- SINGH R., TEICHERT F., SEIDEL A., ROACH J., CORDELL R., CHENG M. K., FRANK H., STEWARD W. P., MANSON M. M. and FARMER P. B. 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, vol. 24, pp. 2329-2340.
- SKRZYDLEWSKA E., SULKOWSKI S., KODA M., ZALEWSKI B., KANCZUGA-KODA L. and SULKOWSKA M. Lipid peroxidation and antioxidant status in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 2005, vol. 11, no. 3, pp. 403-406.
- SODUM R. S. and CHUNG F.-L. 1,N2-ethenodeoxyguanosine as a potential marker for DNA adduct formation by trans-4-hydroxy-2-nonenal. *Cancer Research*, 1988, vol. 48, pp. 320-323.
- SODUM R. S. and CHUNG F.-L. Structural characterization of adducts formed in the reaction of 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal with deoxyguanosine. *Chemical Research in Toxicology*, 1989, vol. 2, no. 1, pp. 23-28.

- SODUM R. M. and CHUNG F.-L. Stereoselective formation of in vitro nucleic acid adducts by 2,3-epoxy-4-hydroxynonanal. *Cancer Research*, 1991, vol. 51, pp. 137-143.
- SOUSA B. C., PITT A. R. and SPICKETT C. M. Chemistry and analysis of HNE and other prominent carbonyl-containing lipid oxidation compounds. Review. *Free Radical Biology and Medicine*, 2017, vol. 111, pp. 294-308.
- SOYER T., TÜRER Ö. B., BIRBEN E., KAHVECI M., TUĞCU G. D., SOYER Ö. U., YALÇIN E., DOĞRU D., ÖZÇELİK U., KIPER N., ŞEKEREL B. and TANYEL F. C. The relationship between oxidative stress markers in exhaled breath condensate and respiratory problems in patients with repaired esophageal atresia. *Journal of Pediatric Surgery*, 2019.
- SPILSBERG B., RUNDBERGET T., JOHANNESSEN L. E., KRISTOFFERSEN A. B., HOLST-JENSEN A. and BERDAL K. G. Detection of food-derived damaged nucleosides with possible adverse effects on human health using a global adductomics approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, vol. 58, pp. 6370-6375.
- STONE M. P., HUANG H., BROWN K. L. and SHANMUGAM G. Chemistry and structural biology of DNA damage and biological consequences. *Chemistry and Biodiversity*, 2011, vol. 8, no. 9, pp. 1571-1615.
- STORNETTA A., VILLALTA P. W., HECHT S. S., STURLA S. and BALBO S. Screening for DNA alkylation mono and cross-linked adducts with a comprehensive LC-MS3 adductomic approach. *Analytical Chemistry*, 2015, vol. 87, pp. 11706-11713.
- SUTTNAR J., MÁŠOVÁ-CHRÁSTINOVÁ L. and DYR J. Influence of citrate and EDTA anticoagulants on plasma malondialdehyde concentrations estimated by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B, Biomedical Sciences and Applications*, 2001, vol. 751, no. 1, pp. 193-197.
- SWENBERG J. A., FEDTKE N., CIROUSSEL F., BARBIN A., and BARTSCH H. Etheno adducts formed in DNA of vinyl chloride exposed rats are highly persistent in liver. *Carcinogenesis* 1992, vol. 13, pp. 727-729.
- SYNOLD T., XI B., WUENSCHHELL G. E., TAMAE D., FIGAROLA L. G., RAHBAR S. and TERMINI J. Advanced glycation end products of DNA: quantification of N2-(1-carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine in biological samples by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 2008, vol. 21, no. 11, pp. 2148-2155.
- TAN C., LU S., WANG Y., ZHU Y., SHI T., LIN M., DENG Z., WANG Z., SONG N., LI S., YANG P., YANG L., LIU Y., CHEN Z. and XU K. Long-term exposure to high air pollution induces cumulative DNA damages in traffic policemen. *Science of the Total Environment*, 2017, vol. 593-594, pp. 330-336.
- TAN B. L., NORHAIZAN M. E., LIEW W. P. and SULAIMAN RAHMAN H. Antioxidant and oxidative stress: a mutual interplay in age-related diseases. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, vol. 9, pp. 1162.
- TANGVARASITTICHAI S., POONSUB P., TANGVARASITTICHAI O. and SIRIGULSATIEN V. Serum levels of malondialdehyde in type 2 diabetes mellitus Thai subjects. *Siriraj Medical Journal*, 2009, vol. 61, pp. 20-23.

- TENG S., BEARD K., POURAHMAD J., MORIDANI M., EASSON E., POON R. and O'BRIEN P. J. The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 2001, vol. 130-132, pp. 285-296.
- THOMAS B., MATSON S., CHOPRA V., SUN L., SHARMA S., HERSCH S., ROSAS H. D., SCHERZER C., FERRANTE R. and MATSON W. A novel method for detecting 7-methyl guanine reveals aberrant methylation levels in Huntington disease. *Analytical Biochemistry*, 2013, vol. 436, no. 2, pp. 112-120.
- THORNALLEY P. J., WARIS S., FLEMING T., SANTARIUS T., LARKIN S. J., WINKLHOFER-ROOB B. M., STRATTON M. R. and RABBANI N. Imidazopurinones are markers of physiological genomic damage linked to DNA instability and glyoxalase 1-associated tumour multidrug resistance. *Nucleic Acids Research*, 2010, vol. 38, no. 16, pp. 5432-5442.
- TONINI G., D'ONOFRIO L., DELL'AQUILA E. and PEZZUTO A. New molecular insights in tobacco-induced lung cancer. *Future Oncology*, 2013, vol. 9, no. 5, pp. 649-655.
- TOPINKA J., SEVASTYANOVA O., BINKOVA B., CHVATALOVA I., MILCOVA A., LNEICKOVA Z., NOVAKOVA Z., SOLANSKY I. and SRAM R.J. Biomarkers of air pollution exposure-A study of policemen in Prague. *Mutation Research*, 2007, vol. 624, pp. 9-17.
- TOYOOKA S., TSUDA T. and GAZDAR A. F. The TP53 gene, tobacco exposure, and lung cancer. Review. *Human Mutation*, 2003, vol. 21, no. 3, pp. 229-239.
- TUDEK B., ZDŽALIK-BIELECKA D., TUDEK A., KOSICKI K., FABISIEWICZ A. and SPEINA E. Lipid peroxidation in face of DNA damage, DNA repair and other cellular processes. Review. *Free Radical Biology and Medicine*, 2017, vol. 107, pp. 77-89.
- TUNSARINGKARN T., SIRIWONG W., PRUEKSASIT T., SEMATONG S., ZAPUANG K. and RUNGSIYOTHIN A. Potential risk comparison of formaldehyde and acetaldehyde exposures in office and gasoline station workers. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 2012, vol. 2, no. 6, pp. 2250-3153.
- TWEED J.O., HSIA S.H., LUTFY K. and FRIEDMAN T.C. The endocrine effects of nicotine and cigarette smoke. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2012, vol. 23, no. 7, pp. 334-342.
- VACA C. E., WILHELM J. and HARMS-RINGDAHL M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. Review. *Mutation Research*, 1988, vol. 195, pp. 137-149.
- VACA C. E., VODICKA P. and HEMMINKI K. Determination of malonaldehyde-modified 2'-deoxyguanosine-3'-monophosphate and DNA by ³²P-postlabelling. *Carcinogenesis*, 1992, vol. 13, no. 4, pp. 593-599.
- VACA C. E. (a), FANGAY J.-L. and SCHWEDAB E. K.H. Studies of the reaction of acetaldehyde with deoxynucleosides. *Chemico-Biological Interactions*, 1995, vol. 98, pp. 51-67.
- VACA C. E. (b), FANG J.-L., MUTANEN M. and VALSTA L. ³²P-postlabelling determination of DNA adducts of malonaldehyde in humans: total white blood cells and breast tissue. *Carcinogenesis*, 1995, vol. 16, no. 8, pp. 1847-1851.

- VALKO M., LEIBFRITZ D., MONCOL J., CRONIN M.T.D., MAZUR M. and TELSER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, vol. 39, no. 1, pp. 44-84.
- VAN DEN DRIESSCHE B., VAN DONGEN W., LEMIERE F. and ESMANS E.L. Implementation of data-dependent acquisitions in the study of melphalan DNA adducts by miniaturized liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2004, vol. 18, no. 17, pp. 2001-2007.
- VANDERVEEN L. A., HASHIM M. F., SHYR Y. and MARNETT L. J. Induction of frameshift and base pair substitution mutations by the major DNA adduct of the endogenous carcinogen malondialdehyde. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, vol. 100, pp. 14247-14252.
- VILLALTA P. W. and BALBO S. The Future of DNA Adductomic Analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, vol. 18, 20 p.
- VISTOLI G., DE MADDIS D., CIPAK A., ZARKOVIC N., CARINI M. and ALDINI G. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radical Research*, 2013, vol. 47, no. S1, pp. 3-27.
- VOULGARIDOU G. P., ANESTOPOULOS I., FRANCO R., PANAYIOTIDIS M. I. and PAPPA A. DNA damage induced by endogenous aldehydes: current stage of knowledge. *Review. Mutation Research*, 2011, vol. 711, pp. 13-27.
- WACKER M., SCHULER D., WANEK P. and EDER E. Development of a ³²P-postlabeling method for the detection of 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts of trans-4-hydroxy-2-nonenal in vivo. *Chemical Research in Toxicology*, 2000, vol. 13, no. 11, pp. 1165-1173.
- WACKER M., WANEK P. and EDER E. Detection of 1,N²-propano-deoxyguanosine adducts of trans-4-hydroxy-2-nonenal after gavage of trans-4-hydroxy-2-nonenal or induction of lipid peroxidation with carbon tetrachloride in F344 rats. *Chemico-Biological Interactions*, 2001, vol. 137, pp. 269-283.
- WANG M., CHUNG F.-L. and HECHT S. S. Identification of crotonaldehyde as a hepatic microsomal metabolite formed by α -hydroxylation of the carcinogen N-Nitrosopyrrolidine. *Chemical Research in Toxicology*, 1988, vol. 1, no. 1, pp. 28-31.
- WANG M., MCINTEE E. J., CHENG G., SHI Y., VILLALTA P. W. and HECHT S. S. Identification of DNA adducts of acetaldehyde. *Chemical Research in Toxicology*, 2000, vol. 13, no. 11, pp. 1149-1157.
- WANG M., YU N., CHEN L., VILLALTA P. W., HOCHALTER J. B. and HECHT S. S. Identification of an acetaldehyde adduct in human liver DNA and quantitation as N²-ethyldeoxyguanosine. *Chemical Research in Toxicology*, 2006, vol. 19, no. 2, pp. 319-324.
- WANG J. and CHANG T. Methylglyoxal content in drinking coffee as a cytotoxic factor. *Journal of Food Science*, 2010, vol. 75, no. 6, pp. H167-H171.

- WANG F., LI C., LIU W. and JIN Y. Oxidative damage and genotoxic effect in mice caused by sub-chronic exposure to low-dose volatile organic compounds. *Inhalation Toxicology*, 2013, vol. 25, no. 5, pp. 235-242.
- WENG M. W., LEE H. W., PARK S. H., HU Y., WANG H. T., CHEN L. C., ROM W. N., HUANG W. C., LEPOR H., WU X. R., YANG C. S. and TANG M. S. Aldehydes are the predominant forces inducing DNA damage and inhibiting DNA repair in tobacco smoke carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2018, vol. 115, no. 27, pp. E6152-E6161.
- WHO. World Health Organization. Glyoxal, concise international chemical assessment Document 57. Geneva: World Health Organization, 2004. Available at <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad57.pdf>
- WILD C.P. Complementing the genome with an exposome: the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 2005, vol. 14, no. 8, pp. 1847-1850.
- WILD C.P. The exposome: from concept to utility. *International Journal of Epidemiology*, 2012, vol. 41, no. 1, pp. 24-32.
- WINTER C. K., SEGALL H. J. and HADDON W. F. Formation of cyclic adducts of deoxyguanosine with the aldehydes trans-4-hydroxy-2-hexenal and trans-4-hydroxy-2-nonenal in vitro. *Cancer Research*, 1986, vol. 46, pp. 5682-5686.
- WU W., JIN Y. and CARLSTEN C. Inflammatory health effects of indoor and outdoor particulate matter. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2018, vol. 141, pp. 833-844.
- WYNDER E. L., GOODMAN D. A. and HOFFMAN D. Ciliotoxic components in cigarette smoke. II. Carboxylic acids and aldehydes. *Cancer*, 1965, vol. 18, no. 4, pp. 505-509.
- XIE M.-Z., SHOULKAMY M. I., SALEM A. M., OBA S., GODA M., NAKANO T. and IDE H. Aldehydes with high and low toxicities inactivate cells by damaging distinct cellular targets. *Mutation Research*, 2016, vol. 786, pp. 41-51.
- YAGI T., FUJIKAWA Y., SAWAI T., TAKAMURA-ENYA T., ITO-HARASHIMA S. and KAWANISHI M. Error-prone and error-free translesion DNA synthesis over site-specifically created DNA adducts of aryl hydrocarbons (3-nitrobenzanthrone and 4-aminobiphenyl). Review. *Toxicological Research*, 2017, vol. 33, no. 4, pp. 265-272.
- YANG J., BALBO S., VILLALTA P. W. and HECHT S. S. Analysis of acrolein-derived 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts in human lung DNA from smokers and non-smokers. *Chemical Research in Toxicology*, 2019, vol. 32, no. 2, pp. 318-325.
- YAO C. and FENG Y.-L. A nontargeted screening method for covalent DNA adducts and DNA modification selectivity using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 2016, vol. 159, pp. 93-102.
- YAO C., FOSTER W. G., SADEU J. C., SIDDIQUE S., ZHU J. and FENG Y. L. Screening for DNA adducts in ovarian follicles exposed to benzo[a]pyrene and cigarette smoke condensate using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Science of the Total Environment*, 2016, vol. 575, pp. 742-749.

- YIN B., WHYATT R. M., PERERA F. P., RANDALL M. C., COOPER T. B. and SANTELLA R. M. Determination of 8-hydroxydeoxyguanosine by an immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA. *Free Radical Biology and Medicine*, 1995, vol. 18, no. 6, pp. 1023-1032.
- YIN R., LIU S., ZHAO C., LU M., TANG M. S. and WANG H. An ammonium bicarbonate-enhanced stable isotope dilution UHPLC-MS/MS method for sensitive and accurate quantification of acrolein-DNA adducts in human leukocytes. *Analytical Chemistry*, 2013, vol. 85, pp. 3190-3197.
- YING Z. and RAJAGOPALAN S. *Hypertension and vascular toxicity of PM in Environmental Cardiology: Pollution and heart disease*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK: 2011, pp. 121-142.
- YOUNG O., CROTTY T., O'CONNELL R., O'SULLIVAN J. and CURRAN A.J. Levels of oxidative damage and lipid peroxidation in thyroid neoplasia. *Head and Neck*, 2010, vol. 32, pp. 750-756.
- YU H.-S., OYAMA T., ISSE T., KITAGAWA K., PHAM T.-T.-P., TANAKA M. and KAWAMOTO T. Formation of acetaldehyde-derived DNA adducts due to alcohol exposure. Mini-review. *Chemico-Biological Interactions*, 2010, vol. 188, pp. 367-375.
- YU R., LAI Y., HARTWELL H. J., MOELLER B. C., DOYLE-EISELE M., KRACKO D., BODNAR W. M., STARR T. B. and SWENBERG J. A. Formation, accumulation, and hydrolysis of endogenous and exogenous formaldehyde-induced DNA damage. *Toxicological Sciences*, 2015, vol. 146, no. 1, pp. 170-182.
- YU Y. (a), GUERRERO C. R., LIU S., AMATO N. J., SHARMA Y., GUPTA S. and WANG Y. Comprehensive assessment of oxidatively induced modifications of DNA in a rat model of human Wilson's disease. *Mol. Cell. Proteomics*, 2016, vol. 15, pp. 810-817.
- YU Y. (b), CUI Y., NIEDERNHOFER L. J. and WANG Y. Occurrence, biological consequences, and human health relevance of oxidative stress-induced DNA damage. Review. *Chemical Research in Toxicology*, 2016, vol. 29, no. 12, pp. 2008-2039.
- ZHANG S., VILLALTA P. W., WANG M. and HECHT S. S. Analysis of crotonaldehyde- and acetaldehyde-derived 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts in DNA from human tissues using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 2006, vol. 19, no. 10, pp. 1386-1392.
- ZHANG S., VILLALTA P. W., WANG M. and HECHT S. S. Detection and quantitation of acrolein-derived 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts in human lung by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 2007, vol. 20, no. 4, pp. 565-571.
- ZHANG S., BALBO S., WANG M., and HECHT S. S. Analysis of Acrolein-Derived 1,N2-Propanodeoxyguanosine adducts in human leukocyte DNA from smokers and nonsmokers. *Chemical Research in Toxicology*, 2011, vol. 24, no. 1, pp. 119-124.
- ZHANG N., SONG Y., WU D., XU T., LU M., ZHANG W. and WANG H. Detection of 1,N2-propano-2'-deoxyguanosine adducts in genomic DNA by ultrahigh performance liquid chromatography-electrospray ionization- tandem mass spectrometry in

- combination with stable isotope dilution. *Journal of Chromatography A*, 2016, vol. 1450, pp. 38-44.
- ZHONG S., LI L., SHEN X., LI Q., XU W., WANG X., TAO Y. and YIN H. An update on lipid oxidation and inflammation in cardiovascular diseases. Review. *Free Radical Biology and Medicine*, 2019, vol. 19, pp. 30271-30280.
- ZOUANI A., MEKACHER L. R., LEHTIHET L., IZITI A., GUERMOUCHE H., AZZOUZ M. and REGGABI M. Évaluation de la concentration de nicotine et de cotinine urinaires chez un groupe de fumeurs actifs et un groupe de « fumeurs passifs », par chromatographie liquide haute performance (HPLC) utilisant une méthode d'extraction en phase solide (SPE). *Annales de Toxicologie Analytique*, 2011, vol. 23, no. 1, pp. 47-52.

Annexes

1 **Annexe I- Article**

2

3 **A VALIDATED UHPLC-MS/MS METHOD FOR SIMULTANEOUS**
4 **QUANTIFICATION OF 9 EXOCYCLIC DNA ADDUCTS INDUCED BY**
5 **8 ALDEHYDES**

6

7 Héléna ALAMIL^{a,b,c}, Mathilde LECHEVREL^{a,b,d}, Stéphanie LAGADU^{a,b,d}, Laurence
8 GALANTI^c, Zeina DAGHER^c & Raphaël DELEPEE^{a,b,d}

9

10 ^aNormandie University, UNICAEN, UNIROUEN, ABTE, Caen, France

11 ^bCLCC François Baclesse, UNICANCER, Caen, France

12 ^cL2GE, Microbiology-Tox/Ecotox team, Faculty of Sciences, Lebanese University, Fanar,
13 Lebanon

14 ^dPRISMM, Plateforme de Recherche et d'Innovation en Spectrométrie de Masse et
15 Métabolomique, ICORE, Caen, France

16 ^eUnit  de Tabacologie, CHU UCL Namur asbl, Belgium.

17

18 1st Corresponding Author: Pr Raphaël DELEPEE, Normandie University, UNICAEN,
19 UNIROUEN, ABTE, Caen, France. Tel +33 231 455 113, fax +33 231 455 172, email:
20 raphael.delepee@unicaen.fr

21 2nd Corresponding Author: H el ena ALAMIL, Normandie University, UNICAEN,
22 UNIROUEN, ABTE, Caen, France. Tel +33 601 074 849, email: helena_amil@hotmail.com

23

24 **Abstract**

25 Human exposure to aldehydes is implicated in multiple diseases including cancer. These
26 compounds can react with nucleophilic sites in DNA to form reversible and irreversible
27 modifications because they are strong electrophiles. These modifications, if not repaired, can
28 contribute to disease pathogenesis. The aim of our study was to provide a mass spectrometry
29 (MS)-based profiling method for identifying potential biomarkers of aldehydes exposure. We
30 have developed and validated a highly sensitive method using liquid chromatography-
31 electrospray ionization-tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS) for the simultaneous
32 quantitation of 9 exocyclic DNA adducts derived from 8 main exogenous and endogenous
33 aldehydes, namely formaldehyde, acetaldehyde, acrolein, crotonaldehyde, malondialdehyde,
34 4-hydroxy-2-nonenal, glyoxal and methylglyoxal. Finally, we applied the established method
35 to quantify adducts in genomic DNA isolated from both a smoker and a non-smoker blood
36 samples.

37

38 **Keywords:** aldehydes; cancer; oxidative stress; adductomic; exposure biomarkers; analytical
39 method validation; ultrahigh performance liquid chromatography -electrospray ionization-
40 tandem mass spectrometry.

41

42 **1. INTRODUCTION**

43 Aldehydes are widespread in the environment (Altemose *et al.*, 2015). Exposure to aldehydes
44 can be through inhalation of outdoor and indoor emissions but also through ingestion of
45 several foods. Aldehydes are also found in tobacco smoke (IARC mono 38 and Wynder *et*
46 *al.*, 1965), automobile exhaust, and other emissions due to industrial processes and
47 combustion of fossil fuels, wood, plastics, kerosene, cotton, biogenic and biomass. Aldehydes
48 can also be produced by overheating frying oils and cooking (IARC mono vol. 36, 88, 109;
49 Esterbauer *et al.*, 1991). In addition, aldehydes occur as intermediates of metabolic activation
50 of a wide range of xenobiotics, including alcohol (IARC mono 36), therapeutic agents
51 (Alarcon and Meienhofer, 1971), environmental carcinogens (Wang *et al.*, 1988) and amino
52 acids (IARC mono 88). They are also produced endogenously by biosynthesis of lipids
53 (Hecker and Ullrich, 1989) and by oxidative stress-induced lipid peroxidation. The main
54 process is likely to be the so-called β -cleavage reaction of lipid alkoxy-radicals (Esterbauer *et*
55 *al.*, 1990 and for review Esterbauer *et al.*, 1991). Therefore, aldehydes represent a major
56 component of the exposome.

57 Indeed, the International Agency for Research on Cancer (IARC) classifies formaldehyde as
58 carcinogen (category 1), acetaldehyde as category 2B but also carcinogen when it is
59 associated with alcoholic beverages, acrolein, crotonaldehyde, malondialdehyde and
60 methylglyoxal as category 3 (IARC, 2019). Most of them can damage DNA by reaction with
61 exocyclic amino group of DNA bases, resulting in the formation of promutagenic lesions that
62 increase the risk of cancer development (for review see Voulgaridou *et al.*, 2011).

63 Among the aldehydes produced by lipid peroxidation, 4-hydroxy-2-nonenal and
64 malondialdehyde can also form exocyclic DNA adducts. Thus, they are considered to
65 contribute to the mutagenic and carcinogenic effects associated to oxidative stress and
66 consequently, the development of cancer (Hu *et al.*, 2002 and Marnett, 1999).

67 The future challenge is ultimately to identify and validate the aldehyde-bases adducts as
68 biomarkers associated with both endogenous and environmental aldehydes exposures and
69 cancer risk.

70 Since adducts play an important role in aldehydes genotoxicity and occur at very low levels
71 *in vivo*, a sensitive and accurate method for quantification of these adducts is required for the
72 analysis of a small amount of DNA in human samples. Recently, liquid chromatography
73 coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has become a method of choice for the
74 quantification of modified nucleosides such as DNA adducts. The two main advantages of
75 the development of LC-MS/MS are *i*) the ability to fill all the exocyclic adducts with in this
76 case, a gain in sensitivity, compared to the method of reference ³²P-Postlabeling and *ii*) the
77 proposition of screening methods to identify any DNA adduct.

78 In this work, we developed and validated a novel sensitive method using isotope dilution
79 ultrahigh performance liquid chromatography -electrospray ionization- tandem mass
80 spectrometry (UHPLC-ESI-MS/MS), for simultaneous detection and quantification of 9
81 exocyclic DNA adducts derived from 8 main exogenous and endogenous aldehydes, namely
82 formaldehyde (FA), acetaldehyde (AA), acrolein (Acro), crotonaldehyde (Croto),
83 malondialdehyde (MDA), 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), glyoxal (Gx) and methylglyoxal
84 (MG). The method was validated according to the European Medicines Agency (EMA)
85 guideline on bioanalytical method validation. The aim of this study is first, economical
86 because levels of these adducts can be compared in a single experiment, minimizing
87 biological samples size, labor, consumable materials and analysis time. It aims also to
88 establish profiles of exocyclic DNA adducts and may serve for adductomic approaches.

89

90 2. EXPERIMENTAL

91

92 2.1. Chemical Hazards

93 Aldehydes are volatiles, highly reactive compound, and known carcinogens and mutagens.
94 Caution should therefore be exercised in the handling of the compounds; they should be
95 handled within a fume hood using appropriate personal protection equipment (PPE).

96

97 2.2. Chemicals and Enzymes

98 2'-Deoxyguanosine (dG) was obtained from Alfa Aesar (Karlsruhe, Germany). [¹³C₁₀,
99 ¹⁵N₅] dG was purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canada). Acrolein,
100 crotonaldehyde, acetaldehyde, formaldehyde (37% in water), glyoxal solution (40% in
101 water), pyruvaldehyde solution (40% in water), 4-hydroxynonenal-dimethyl acetal (HNE-
102 DMA), 1,1,3,3-tetraethoxypropane, sodium cyanoborohydride (NaBH₃CN), calf thymus
103 DNA, alkaline phosphatase grade I from calf intestine, phosphodiesterase I from *Crotalus*
104 *adamanteus* venom, deoxyribonuclease II type V from bovine spleen and nuclease P1 from
105 *Penicillium Citrinum* were all purchased from Sigma-Aldrich (Stenheim, Germany).
106 Phosphodiesterase II SPH was obtained from Worthington Biochemical (Lakewood, NJ,
107 USA). Potassium phosphate monobasic (KH₂PO₄) was procured from Fluka (Steihem,
108 Germany). LC-MS grade water, methanol, glacial acetic acid and acetonitrile were all
109 obtained from VWR (Kelsterbach, Germany). The DNA extraction kit Nucleobond[®] CB 100
110 was purchased from Macherey-Nagel (Duren, Germany). HNE solution was prepared from
111 HNE-DMA following the instructions of the supplier company (Sigma-Aldrich). MDA
112 solution was obtained by hydrolysis of 1,1,3,3-tetraethoxypropane as previously described
113 (Seto *et al.*, 1983).

114

115 **2.3. Chromatography**

116 Purification and quantification of synthesized standards were carried out on a Shimadzu
117 UHPLC system equipped with 2 Nexera X2 LC-30AD pumps, a DGU-20A_{5R} degassing unit
118 and a SPD-20A prominence UV/Vis detector (Shimadzu, Kyoto, Japan). The instrument was
119 equipped with a Rheodyne injector (Rheodyne, Rohert Park, CA, USA) and a Varian ProStar
120 column oven (Varian, Walnut Creek, CA, USA). The analytical column used for standards
121 purification and quantification was Atlantis[®] T3 OBD[™] Prep column 100Å, 10 x 250 mm, 5
122 µm (Waters, Milford, MA, USA). The mobile phases were water (A) and pure methanol (B).
123 The column temperature was kept at 50 °C and the flow rate was 2 mL/min. Different elution
124 gradient systems were adapted to purify and quantify synthesized adducts. Systems 1 started
125 with 2% B, followed by a linear gradient up to 20% B at 15 min, which was held for 5 min,
126 followed by 10 min at 80% B, and then re-equilibrated to the starting conditions for 5 min.
127 The UV detector was set at 254 and 259 nm. System 2 started with 20% B, followed by a
128 linear gradient up to 80% B at 10 min, which was held for 5 min, and then re-equilibrated to
129 the starting conditions for 5 min. The UV detector was set at 254 and 260 nm. System 3
130 started with 2% B, followed by a linear gradient up to 20% B at 15 min, which was held for 5
131 min, followed by a linear gradient up to 80% B for 10 min, which was held for 5 min, and
132 then re-equilibrated to the starting conditions for 5 min. The UV detector was set at 254 nm.
133 System 4 started with 20% B, followed by a linear gradient up to 80% B at 5 min, which was
134 held for 10 min, and then re-equilibrated to the starting conditions for 5 min. The UV
135 detector was set at 259 nm. System 5 started with 2% B, followed by a linear gradient up to
136 20% B at 15 min, which was held for 15 min, followed by a linear gradient up to 90% B at 40
137 min, hold for 10 min, and then re-equilibrated to the starting conditions for 10 min. The UV
138 detector was set at 255 nm. System 6 started with 2% B, followed by a linear gradient up to
139 15% B at 15 min, which was held for 10 min, followed by 5 min at 80% B, and then re-

140 equilibrated to the starting conditions for 5 min. The UV detector was set at 254 nm. System
141 7 ran an isocratic elution of 80% B. The UV detector was set at 259 nm.
142 The UHPLC system, coupled to the mass spectrometer, was equipped with Shimadzu CBM-
143 20A communications bus module, 2 DGU-20A_{5R} degassing units, a CTO-20AC prominence
144 oven, a Nexera X2 SIL-30AC autosampler and 2 Nexera X2 LC-30AD pumps (Shimadzu,
145 Kyoto, Japan). The analytical column used for analytes separation was a reversed phase
146 Acquity C₁₈ UPLC[®] HSS C18 SB 1.0 x 150 mm, 1.8 μm (Waters, Ireland) with the following
147 solvents: mobile phase A, 0.1% acetic acid in water and mobile phase B, 0.1% acetic acid in
148 methanol/acetonitrile (50/50). The column temperature was kept at 50 °C and the flow rate
149 was maintained at 0.2 mL/min using an injection volume of 2.5 μL. The elution pump
150 gradient ramped from 5% B, up to 80% B at 2.5 min, which was held for 1.5 min, and then
151 re-equilibrated to the starting conditions for 3 min thus, the run to run time was 7 min.

152

153 **2.4. Mass spectrometric conditions**

154 The separation system interfaces with a triple quadrupole MS (LCMS-8030Plus, Shimadzu).
155 The electrospray ionization source was set in the positive ion mode as follows: drying gas
156 flow, 10 L/min; nebulizer gas flow, 3 mL/min; ion spray voltage, -4500 V; heat block
157 temperature, 280 °C and desolvation line temperature, 150 °C. Nitrogen was used for both
158 nebulization and desolvation. High purity Argon was used as the collision gas.
159 Each standard was individually verified by full scan mass spectrometry and analyzed for at
160 least three times in selected ion monitoring (SIM) mode with an injection volume of 1 μL.
161 The initial products corresponding to each standard were characterized by their *m/z*
162 (precursors MH⁺). Collision energies were set at 10, 20 and 30 V for product ion scan of
163 MH⁺. A multiple reaction monitoring (MRM) mode was then adopted for optimization of
164 standards transitions. The 2 most intensive mass transitions were selected for each standard

165 useful for its identification and quantification and 1 transition for each internal standard. The
166 primary mass loss for all adducts was 116 amu and 121 amu corresponding to loss of
167 deoxyribose (dR) and labeled dR, respectively. Mass transition and optimized MRM
168 parameters are detailed in table 1.

169

170 **2.5. Preparation of DNA Adducts Standards**

171 Adducts standards were synthesized according to previous studies (*Supplementary data* table
172 S-1). Briefly, dG was incubated with aldehyde in phosphate buffer (PB) under gentle stirring.
173 In the case of FA, AA and MDA adduct synthesis, the solution was reduced just after the
174 incubation by the addition of NaBH₃CN, and it was allowed to stand for 30 min at room
175 temperature. A second aliquot of NaBH₃CN was then added, and the mixture was incubated
176 at 37 °C for 30 min. This procedure was repeated once more (Wang *et al.*, 2000). The
177 addition of NaBH₃CN leads to the formation of N²-ethyl-dG, N²-methyl-dG and 5,6-dihydro-
178 M₁dG, the most stable adducts of AA, FA, and MDA, respectively. Adducts names and
179 structures are represented in table 2.

180 The purification of synthesized adducts was performed on LC-UV following different
181 systems. AcrodG, reduced FAdG, reduced MDAdG and GxdG were purified on system 1;
182 whereas, CrotodG isomers were purified on system 2. The purification of reduced AAdG and
183 HNEdG was performed on systems 3 and 4, respectively; whereas, isomers of CE₁dG and
184 cMGdG were purified on systems 5 and 6, respectively. Retention times of dG and all
185 adducts are shown in *Supplementary data* table S-2. The fractions containing each adduct
186 were combined, followed by concentration under vacuum using a Speedvac[®].

187 The amount of each synthesized adduct was quantified using LC-UV with the same
188 chromatographic conditions as their purification except for cMGdG and HNEdG quantified
189 on systems 5 and 7, respectively. Knowing the retention times of adducts, peaks areas were

190 noted and the amount of each purified adduct was calculated according to the equation
191 $C_i = A_i / \epsilon_i k$ (A_i : adduct peak area; ϵ : adduct extinction coefficient; k : instrument response
192 constant). Further quantification details and calculation are provided in *Supplementary data*
193 *text 1* and *Supplementary data table S-3*.

194 Isotopically labeled standards were synthesized at small scale by incubation of 1 mg/mL of
195 [$^{13}\text{C}_{10}$, $^{15}\text{N}_5$]dG with aldehydes under constant stirring at 37 °C. For each labeled adduct
196 synthesis, 3 solvents were tested and the choice between PB, DMF and DMSO was done with
197 respect to the best yield and purity of adducts synthesis (*Supplementary data table S-4*).
198 Similarly to above, just after the incubation, labeled adducts of AA, FA and MDA were
199 reduced by the addition of NaBH_3CN to their stable forms [$^{13}\text{C}_{10}$, $^{15}\text{N}_5$]N²-ethyl-dG, [$^{13}\text{C}_{10}$,
200 $^{15}\text{N}_5$]N²-methyl-dG and 5,6-dihydro-[$^{13}\text{C}_{10}$, $^{15}\text{N}_5$]M₁dG, respectively. Labeled standards were
201 purified on the same LC-UV systems as their homologues. The fractions containing each
202 labeled adduct were combined and concentrated under vacuum to obtain a final volume of
203 approximately 200 μL . The absence of unlabeled adducts was checked on LC-MS/MS and
204 seemed consistent with the purity of [$^{13}\text{C}_{10}$, $^{15}\text{N}_5$]dG. The final concentration of each labeled
205 adduct was evaluated by comparison to a solution at 100 ppb of their unlabeled homologues.

206

207 **2.6. Samples preparation**

208 Two human blood samples, from a smoker and a non-smoker, were used for method
209 application on biological samples. From each donor, a 5 mL sample of venous blood was
210 withdrawn into a BD Vacutainer[®] spray-coated K₂EDTA tube then, immediately frozen at -
211 80 °C. The DNA was extracted from whole blood using Macherey-Nagel kit (Macherey-
212 Nagel, Nucleobond[®] CB 100). The DNA was purified using the NucleoBond[®] AXG 100
213 column. The sample was loaded into the column and washed three times with specific buffer
214 then, the DNA was eluted from the column with adequate buffer and isopropanol was added

215 for DNA precipitation. After washing step with 70% ethanol in water, the DNA was reduced
216 with NaBH₃CN as described in section 2.5 then, precipitated with NaCl (5 M) and cold
217 ethanol. Following the centrifugation, the supernatant was discarded and the pellet was dried
218 on Speedvac[®] then reconstituted in adjusted volume of ultrapure water to obtain a final
219 concentration of 1 mg/mL.

220

221 **2.7. Preparation of calibration standards and quality control samples**

222 A mixture of internal standards (IS) was prepared at 0.32 ng/mL of labeled HNEdG and 1.6
223 ng/mL of all the rest labeled adducts. Spiking solutions and their dilutions were prepared
224 daily for validation experiments. All stock and solutions were stored at -80 °C.

225 Calibration standards and quality control (QC) samples were prepared in 1 mg/mL calf
226 thymus DNA. Aliquots of 50 µg of one lot calf thymus DNA were reduced by addition of
227 NaBH₃CN as described above. The pH was neutralized by addition of 10 µL of NaOH (0.1
228 M). Ice-cold ethanol was then added to the solution and mixed well by inversion until the
229 DNA was visible and then centrifuged at 10000 rpm for 10 min at 4 °C. The DNA was
230 washed with 1 mL of ethanol/water (70:30 v/v) and centrifuged again at 10000 rpm for 10
231 min at 4 °C. The supernatant was discarded and the pellet was dried on Speedvac[®] then
232 dissolved in 50 µL of ultrapure water. To all aliquots, 25 µL of IS mixture was added.
233 Calibration standards at concentration levels of 0.250, 0.500, 1.000, 2.500, 5.000, 10.000,
234 25.000, 50.000, 100.000, 175.000 and 250.000 ng/mL were prepared by spiking the mixture
235 of DNA matrix and IS with 25 µL of different standards stock solutions. For determining the
236 inter and intraday precision and accuracy, QC samples were similarly prepared at 4 levels,
237 the lower limit of quantification (LLOQ) QC (5.000 ng/mL for GxdG, cMGdG and CEEdG
238 and, 0.250 ng/mL for the other 6 adducts), low QC (10.000 ng/mL for GxdG, cMGdG and
239 CEEdG and, 0.400 ng/mL for the other 6 adducts), medium QC (2.500 ng/mL for MDAdG and

240 80.000 ng/mL for the other 8 adducts) and high QC (80.000 ng/mL for MDAdG, and 200.000
241 ng/mL for the rest 8 adducts). Following spiking, the DNA was enzymatically hydrolyzed by
242 addition of an enzymes cocktail containing phosphodiesterase II (0.05 U), bovine spleen
243 deoxyribonuclease II (5 U) and *Penicillium Citrinum* nuclease P1 (1 U) in 10 μ L of adequate
244 buffer (pH 6). The mixture was incubated under gentle stirring for 2h at 37 °C. A second step
245 consisted of the addition of calf intestine alkaline phosphatase (4.6 U), *Crotalus adamenteus*
246 venom phosphodiesterase I (0.03 U) and 14 μ L of adequate buffer (pH 8). Again, the mixture
247 was incubated under gentle stirring for 2h at 37 °C. The reaction was stopped by the addition
248 of 8 μ L of HCl (0.1 M), 13.5 μ L of NaCl (5 mM), and cold ethanol for enzymes
249 precipitation. The mixture was centrifuged at 10000 rpm for 10 min at 4 °C. The supernatant
250 solution was transferred to a new tube and evaporated to dryness. The hydrolyzed DNA was
251 reconstituted in 20 μ L of HPLC grade water and transferred to HPLC vials containing low
252 volume inserts for analysis on LC-MS/MS. The pellet containing the remaining non-
253 hydrolyzed DNA was dried and redissolved in ultrapure water, then quantified by UV
254 spectroscopy on Nanodrop[®] for evaluation of hydrolysis yield.

255

256 **2.8. Method validation**

257 The developed method was validated, according to the European Medicines Agency (EMA)
258 guideline on bioanalytical method validation (EMA, 2011), in terms of selectivity, carry-
259 over, limits of quantification (LOQ), inter and intraday accuracy and precision, matrix effects
260 and linearity.

261 Since aldehydes DNA adducts are naturally present in DNA, matrix-matched calibration with
262 internal standard correction was selected for the current work. The analytes standards were
263 spiked into one lot of reduced calf thymus DNA as described above. A sufficient quantity of

264 homogenous reduced DNA was used for all validation solutions to avoid variability of the
265 subsamples results due to inhomogeneity.

266

267 **2.8.1. Selectivity**

268 The first step in method validation is to assess selectivity of the method. The latter should be
269 able to differentiate the analytes of interest and IS from endogenous components in the
270 matrix. An IS should be used and should preferably be a related standard with a retention
271 time close to that of the analyte. It must be added to the fraction to be analyzed at the
272 beginning of the experiment and must have an appropriate form, particularly suitable for MS
273 detection. The analyte shall elute at the characteristic retention time that is typical for the
274 corresponding calibration standard under the same experimental conditions. Identification
275 criteria, specified in Commission Decision 2002/657/EC, consist also in the presence of 4
276 identification points: the precursor ion and 2 daughter ions (Commission Decision no.
277 2002/657/EC).

278

279 **2.8.2. Carry-over**

280 Carry-over was assessed by injecting methanol after the highest calibration level for each
281 adduct. Analytes peaks should not exceed 20% of the LLOQ and 5% for the IS.

282

283 **2.8.3. Lower limit of quantification**

284 The lower limit of quantification (LLOQ) is the lowest concentration of analyte in a sample
285 which can be quantified. Knowing that the blank matrix contains almost all analytes, the
286 peaks areas of the lowest levels of the DNA calibration curves were considered for regression
287 analysis and the LLOQ was defined as the lowest calibration standard with an acceptable
288 accuracy and precision (<20%).

289

290 **2.8.4. Accuracy and precision**

291 For determinations of accuracy and precision within-run (intraday) and between-run (inter-
292 day), QC samples were analyzed in 4 levels (LLOQ QC, low QC, medium QC and high QC)
293 against the calibration curves. To determine within-run accuracy, a minimum of 5 samples
294 per QC were analyzed in a single run and the obtained concentrations were compared with
295 the nominal value (as percentage). The within-run precision was expressed by the coefficient
296 of variation (CV) between the repeated individual measures of analyte. Whereas, QC samples
297 from at least 3 runs done on at least 2 different days were analyzed and similar calculation as
298 above evaluated the between-run accuracy and precision. Acceptance criteria for both within
299 and between-run were $\pm 20\%$ for the LLOQ QC and $\pm 15\%$ for the other QC levels.

300

301 **2.8.5. Matrix effects**

302 Matrix effects were investigated by calculating the ratio between the slopes of analytes in
303 matrix-matched calibration curves and the slopes of analytes-only calibration curves. For that
304 reason, calibration standards at same concentration levels were prepared by spiking 50 μL
305 water with 25 μL of IS mixture and 25 μL of different standards stock solutions. The
306 calibration curves were obtained by plotting peak area of each analyte versus standard
307 concentrations. Therefore, the ratio of both slopes expressed the matrix factor (MF). Besides,
308 the IS-normalized MF was also calculated by dividing the MF of the analyte by the MF of the
309 IS which was done in the same way as above but by plotting peak area of each analyte to its
310 corresponding labeled IS.

311

312 **2.8.6. Linearity**

313 In order to determine the linearity of the method, DNA calibration solutions were prepared in
314 a range of 0.250 ng/mL to 250.000 ng/mL (levels are listed in section 2.7). The analysis was
315 performed in replicate run; over three validation runs were constructed to establish acceptable
316 DNA calibration curve for each adduct in at least three days of validation. Shimadzu
317 LabSolutions software (version 5.86 SP1) was used to create standard curves and to calculate
318 adduct concentrations. The calibration curves were obtained by plotting peak area ratio of
319 each analyte to its corresponding labeled IS versus standard concentrations. The back
320 calculated concentrations of the calibration standards must be within $\pm 15\%$ of the nominal
321 value, with the exception for the LLOQ for which it must be within $\pm 20\%$. At least 75% of
322 the calibration standards, with a minimum of six calibration standard levels, should fulfill this
323 criterion.

324

325 **2.9. Application of the validated method**

326 For analytical validation on samples of biological origin, two human blood samples, from a
327 smoker (30 cigarettes per day) and a non-smoker, were obtained from Tabacology Unit at
328 CHU UCL Namur asbl in Belgium. Both donors were females aged of 55 years old. Ethical
329 approval for the blood collection was obtained from the ethical committee of CHU UCL
330 Namur Godinne (NUB: B039201316167). Blood samples were collected from non-smokers
331 and from smokers before smoking cessation at their first visit to the unit. After sample
332 treatment detailed in section 2.6, a 50 μg aliquot of each extracted genomic DNA was
333 enzymatically hydrolyzed after addition of 25 μL of IS mixture and processed as previously
334 described in section 2.7. QC samples were run between samples injections to verify
335 sensitivity and instrumental performance. The level of DNA adducts was calculated using the
336 formula (Li *et al.*, 2017):

337 Relative adduct level = [DNA adducts concentration (ng/mL)/MW of DNA adducts] / [DNA
338 concentration (ng/mL)/Mean MW of bases] (equation I)

339 With mean MW of bases = 3240, the obtained results were multiplied by 10^7 , and the levels
340 of adducts were expressed as adducts per 10^7 nucleotides.

341

342 **3. RESULTS**

343

344 **3.1. Method validation**

345 The validation of the developed method was succeeded for selectivity, carry-over,
346 limits of quantification, inter and intraday accuracy and precision, matrix effects and
347 linearity.

348

349 **3.1.1. Selectivity**

350 The method is able to differentiate the analytes of interest and IS from endogenous
351 components in the matrix since a stable isotope labeled form for each analyte was used as an
352 IS, which is particularly suited for MS detection. It was added to the DNA matrix at the
353 beginning of the experiment before hydrolysis step and had a very close retention time to the
354 corresponding analyte. In addition, analytes were identified by the presence of 4 confirmation
355 points: the precursor ion and 2 daughter ions figured in a transition of quantification and a
356 second transition of confirmation per analyte.

357

358 **3.1.2. Carry-over**

359 No significant chromatographic peak greater than 20% of the LLOQ and 5% for the IS
360 response was detected when analyzing adducts and IS in methanol injection after ULOQ
361 injection. These results confirm the absence of carry-over.

362

363 **3.1.3. Lower limit of quantification**

364 The level of 0.250 ng/mL is the LLOQ of the six following adducts: AcrodG, CrotodG,
365 reduced AAdG, reduced FAdG, HNEdG and reduced MDAdG. Whereas, CEEdG, cMGdG

366 and GxdG were quantified starting 5.000 ng/mL. Both accuracy and precision values did not
367 exceed $\pm 20\%$.

368

369 **3.1.4. Accuracy and precision**

370 Accuracy and precision were determined for each adduct per QC in a single run and between
371 3 different runs. They were all within $\pm 20\%$ for LLOQ and $\pm 15\%$ for other samples as
372 shown in tables 3 and 4 for inter and intraday evaluations, respectively.

373

374 **3.1.5. Matrix effects**

375 The CV of IS-normalized MF was within $\pm 14.01\%$ for all adducts except reduced FAdG, for
376 which IS-normalized MF varied of $\pm 41.39\%$. Therefore, we selected to quantify adducts
377 against DNA matrix calibration standards spiked with the same amount of IS mixture.

378

379 **3.1.6. Linearity**

380 Linearity was assessed through three runs of validation, in each, one DNA calibration
381 curve was established per analyte, plotted to its corresponding labeled IS. However, we
382 selected to use the reduced [$^{13}\text{C}_{10}$, $^{15}\text{N}_5$]FAdG to establish reduced AAdG linearity knowing
383 that, its corresponding IS was still used to identify the adduct. Similarly, [$^{13}\text{C}_{10}$, $^{15}\text{N}_5$]CrotodG
384 served to establish GxdG and cMGdG linearity and their labeled homologues helped to
385 determine adducts retention times. All DNA calibration curves were linear weighted by $1/X$
386 and the back calculated concentrations of the calibration standards, with a minimum of six
387 levels, were within $\pm 15\%$ of the nominal value (maximal values are shown in table 5), with
388 the exception for the LLOQ for which it was within $\pm 20\%$. Linearity was obtained over a
389 range of 0.250 ng/mL to 250.000 ng/mL for AcrodG, CrotodG, reduced AAdG and reduced
390 FAdG. Whereas, for reduced MDAdG, it covered a range of 0.250 ng/mL to 100.000 ng/mL.

391 For GxdG, cMGdG and CEEdG, linearity was determined from 5.000 ng/mL to 250.000
392 ng/mL.

393

394 **3.2. Application of the validated method**

395 The developed method was applied to determine simultaneously the concentration of the
396 studied adducts in extracted genomic DNA from a smoker blood *versus* a non-smoker blood.

397 The cigarette smoke contains many aldehydes known to link covalently DNA bases for which
398 DNA adduct can be considered as biomarker of smoking exposure. The exocyclic DNA
399 adducts were identified in the samples by the presence of a parent ion and 2 daughter ions for
400 each adduct. In addition, the retention time of each adduct in the sample was compared to the
401 retention time of its labeled IS and to that in calibration standards. QC samples analyzed
402 between human samples confirmed instrument performance.

403 Adducts at the LLOQ and above were quantified against DNA calibration curve and the
404 relative adduct level (RAL) was calculated using equation I. A significant difference in
405 adducts levels (figure 1) was remarkable between both samples.

406 In the smoker blood DNA, the level of CrotodG was 28.33 adducts per 10^7 normal
407 nucleotides, whereas, the level of AcrodG was 4.13 adducts per 10^7 normal nucleotides.
408 Reduced FAdG occurred in a higher level of 6.33 adducts per 10^7 normal nucleotides on the
409 contrary to HNEdG and reduced MDAdG present at levels of 0.65 and 3.5 adducts per 10^7
410 normal nucleotides, respectively. However, CEEdG was quantified in the sample at a level of
411 9.42 adducts per 10^7 normal nucleotides while, cMGdG and GxdG were not quantifiable
412 since they were below the LLOQ.

413 In the DNA of non-smoker blood, AcrodG was not quantifiable and, CrotodG and reduced
414 FAdG occurred at very low levels (1.15 and 0.08 adducts per 10^7 normal nucleotides,
415 respectively) comparing to their levels in smoker blood DNA. In contrast, the level of

416 reduced MDAAdG was slightly higher (4.33 adducts per 10^7 normal nucleotides), whereas, the
417 level of HNEdG was slightly lower (0.62 adducts per 10^7 normal nucleotides). Besides, non-
418 smoker blood DNA contained cMGdG and GxdG at levels of 26.88 and 3.09 adducts per 10^7
419 normal nucleotides. In addition, CEAdG was the most relevant adduct in non-smoker DNA
420 occurring at a level of 41.88 adducts per 10^7 normal nucleotides.

421 On the other hand, it was clearly remarkable that in both samples, reduced AAdG was not
422 quantifiable.

423

424 4. DISCUSSION

425 Given the implication of exocyclic DNA adducts in biomonitoring risk assessment, many
426 UHPLC-ESI-MS/MS methods have been developed for their simultaneous detection and
427 quantification. Churchwell *et al.* developed a method for simultaneous quantification of 4
428 adducts one of them is the non-reduced adduct of MDA (Churchwell *et al.*, 2002), whereas
429 Yin *et al.* succeeded to separate and quantify dG, dC and dA adducts of acrolein and their
430 isomers (Yin *et al.*, 2013). Similarly, Zhang *et al.* developed a method to quantify both
431 diastereomers of CrotodG (Zhang *et al.*, 2016). Sixteen DNA adducts were simultaneously
432 analyzed in human lung biopsy specimens, most of them were ethenoadducts with one
433 exocyclic adduct corresponding to non-reduced adduct of MDA (Monien *et al.*, 2015). All
434 these methods were using isotopically labeled standards of each adduct as internal standard
435 but, to our knowledge, none of them was fully validated according to international guidelines.
436 For this purpose, we synthesized adducts standards as described in many earlier studies and
437 their isotopically labeled homologues were prepared in the same manner but at a small scale.
438 Synthesized adducts are chemically stable when present in DNA; however those of AA, FA
439 and MDA are considered unstable once DNA is hydrolyzed into 2'-deoxynucleosides (Wang
440 *et al.*, 2000). For this reason, reduction step using NaBH₃CN was essential to quantify
441 unstable adducts via the quantification of their reduced corresponding adducts (Wang *et al.*,
442 2006).

443 The choice of column, the LC solvent, the type and concentration of buffer are all critical
444 aspects for good chromatography, but also for improving MS sensitivity (Yin *et al.*, 2013;
445 Guo and Turesky, 2016). One of the most critical point in the method development is the
446 separation of the DNA adducts from the four normal nucleosides. Indeed, even if an MS
447 detection is employed, the typical difference in concentrations between normal nucleosides
448 and DNA adducts ranged between 10⁶ and 10⁹. In this situation a slight overlap in

449 chromatographic peaks corresponding to DNA adduct with the ones of normal nucleosides
450 will cause a serious suppression of ionization for DNA adducts. So the development of
451 specific analytical protocols for the quantification of oxidative DNA-adducts via LC-ESI-
452 MS/MS has evolved rapidly in recent years and generated significant scientific
453 progress (Churchwell *et al.*, 2002). Most of the methods for the separation of DNA adducts
454 from aldehydes in the literature uses reversed phase chromatography on C₁₈ column. The
455 method using a sub-2 µm particles UHPLC column (Zhang *et al.*, 2016) allows quick
456 separation whereas over-2 µm HPLC columns leads to longer analysis time typically around
457 30 min (Churchwell *et al.*, 2002, Singh *et al.*, 2009, Lu *et al.*, 2011).

458 In order to increase the sensitivity of the methods, some authors introduce online column
459 switching, capillary separation, and nanoESI has enabled detection limits of ~1 adduct in
460 10⁹ nucleotides using 1–10 µg of DNA (Klaene *et al.*, 2013). This approach has been
461 successfully used to determine DNA adducts derived as a result of oxidative stress and lipid
462 peroxidation (Singh and Farmer, 2006). Churchwell *et al.* (2002) reported the simultaneous
463 analysis of four different lipid peroxidation and oxidative stress derived DNA adducts in
464 DNA hydrolysates of 100 µg or less using on-line sample preparation coupled with LC-MS.
465 This method permitted adducts quantification at levels below one adduct in 10⁸ normal
466 nucleotides in untreated rat and normal human liver tissue. Singh *et al.* (2009) have
467 developed a sensitive online column-switching LC-MS/MS method that allowed the dose-
468 dependent detection of reduced AAdG in DNA exposed to cannabis cigarette smoke. In a
469 previous study, non-reduced FAdG in nasal DNA of rats exposed to [¹³CD₂] formaldehyde
470 was quantified by a highly sensitive nano-UPLC-MS/MS method with 20 amol limit of
471 detection on a C₁₈ analytical column switching (Lu *et al.*, 2011). Nevertheless, these
472 techniques lead to long analysis times (up to 50 min) due to the switching column technique
473 and the long retention time in capillary LC. Yin *et al.* (2013) reported the effect of additives

474 in mobile phase for the detection of the acrolein-derived DNA adducts by LC-ESI-MS/MS
475 using reversed phase chromatography. In their report, the optimization of additive species in
476 the mobile phase enhanced the ESI-MS intensities by 2.3-8.7 times. Zhang *et al.* (2016) also
477 reported the influence of additive for the CrotoDg adducts. They have developed a sensitive
478 approach for accurate quantification of CrotoDg adducts using stable isotope dilution
479 UHPLC-MS/MS analysis on a C₁₈ column (2.1 mm i.d. x 50 mm, 1.8 μm). The limits of
480 detection (LOD_s, S/N=3) and the limits of quantification (LOQs, S/N =10) were estimated
481 about 50 amol and 150 amol, respectively. By the use of this method, both diastereomers of
482 CrotoDg adducts were detected in untreated human cell line with a frequency of 0.24-0.35
483 adducts per 10⁷ nucleotides. Interestingly, ammonium bicarbonate seemed to be the best
484 choice for separation of stereoisomers of acrolein and crotonaldehyde adducts in comparison
485 to formic acid and three volatile ammonium buffers (Yin *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016).
486 Recently, hydrophilic interaction chromatography (HILIC) has attracted attention, as an
487 alternative to reversed-phase chromatography, because this chromatographic mode is capable
488 of separating hydrophilic and polar organic compounds (Murakami *et al.*, 2018). Three
489 commercially available columns, which packed three different types of stationary phases
490 possessing different kinds of functional groups (aminopropyl, dihydroxypropyl, and
491 carbamoyl) bonded to the silica surface, were examined for the separation of four normal
492 deoxynucleosides together with the two DNA adducts using the mobile phase optimized for
493 ESI-MS detection. In addition to the ability for separation of hydrophilic compounds, the
494 mobile phases used in HILIC separation are generally organic solvent-rich ones, and such
495 solvent composition is suitable to improve the ionization efficiency in the ESI process by
496 enhancing the efficiency of desolvation (Sentkowska *et al.*, 2016). The improvement of
497 sensitivity for a variety of compounds in HILIC-ESI-MS/MS has been reported compared to
498 reversed phase LC-ESI-MS/MS (Periat *et al.*, 2014). Nevertheless, to obtain a good

499 separation the gradient needed to last for at least 20 min to elute dG (Murakami *et al.*, 2018).
500 Another drawback in the use of HILIC is a long time to equilibrate the column after the
501 gradient. This leads to long run-to-run times not compatible with large number of samples.
502 Thus, we selected the Acquity UPLC® HSS C18 SB (1.0 x 150 mm, 1.8 µm) column for our
503 separation. This UHPLC column is a C₁₈ grafted non-encapped low-coverage high strength
504 synthetic silica allowed a run-to-run analysis time of 7 min with a good separation of DNA-
505 adducts from normal nucleosides (figure 2). In this work, the objective was to allow a fast
506 method for the simultaneous analysis of DNA adducts formed from 8 aldehydes dedicated to
507 analyze a large number of samples. Thus in order to obtain a better sensitivity we set up the
508 separation to combine several peaks corresponding to isomers of the same adduct in one
509 peak, 0.1% (v/v) acetic acid was chosen as an additive in both mobile phases after
510 comparison to other concentrations of the latter acid and formic acid. The elution gradient
511 was adjusted to minimize analysis time without losing peaks resolution and sensitivity.
512 Regarding the optimization of mass spectrometric conditions in our study, the most intensive
513 transition was the loss of deoxyribose moiety and its labeled homologue for all adducts and
514 internal standards, respectively. This was consistent with previous works. It was chosen for
515 adducts quantification by injecting 2.5 µL of samples or calibration standards starting with 50
516 µg of DNA. In previous developed methods, 15 µL were injected from 20 µg of DNA
517 solution (Yin *et al.*, 2013); these conditions were improved to 2 µL of 5 µg DNA solution
518 (Zhang *et al.*, 2016).
519 Our method is the first that quantifies simultaneously 9 DNA adducts from aldehydes by
520 using calibration in DNA. Indeed, all the published methods using calibration curves were
521 using calibrators prepared in water. LLOQ was determined for AcrodG at 0.25 ng/mL
522 corresponding to a level of 2.4 adducts per 10⁷ normal nucleotides. Liu *et al.* (2005)
523 quantified AcrodG starting 0.02 ng/mL knowing that their method detected only one adduct

524 using a calibration curve in water (Liu *et al.*, 2005). Detection sensitivity was improved by a
525 factor 5 when ammonium bicarbonate was used to detected simultaneously 4 adducts of
526 acrolein with dG, dC and dA (Yin *et al.*, 2013). In the same publication a matrix effect of
527 80% was evaluated on few samples. During the validation of our method, by adding the DNA
528 adducts at the beginning of the sample preparation procedure, the matrix effects and
529 extraction recoveries were evaluated on calibration curves were found to be between 14%
530 and 41%, highlighting the necessity to quantify from DNA extracted calibrators. Therefore,
531 matrix-matched calibration standards were used to quantify adducts. Similarly, comparing to
532 previous studies our validated method is less sensitive than other methods since the latters
533 used water matrix calibration standards. LLOQ of CrotoG, HNEdG, Reduced AAdG,
534 Reduced FAdG and Reduced MDAdG were 2.3, 1.8, 2.6, 2.7 and 2.5 adducts per 10^7 normal
535 nucleotides, respectively corresponding to 0.25 ng/mL for each adduct which is at least in the
536 same order of magnitude than previous studies if the instrumental sensitivity is taken into
537 account, meaning that the concentration factor due to the time consuming sample
538 concentration (on-line or off-line) is neglected (Zhang *et al.*, 2016, Churchwell *et al.*, 2002;
539 Liu *et al.*, 2005, Liu *et al.*, 2006 and Lu *et al.*, 2011, Singh *et al.*, 2009). We had to raise the
540 LLOQ for the 3 remaining adducts GxdG (LLOQ = 5 ng/mL corresponding to 47.5 adducts
541 per 10^7 normal nucleotides), cMGdG and CEAdG (LLOQ = 5 ng/mL corresponding to 45.5
542 adducts per 10^7 normal nucleotides) since they are present in DNA at higher concentration
543 thus lowering accuracy and precision. But that means that higher levels of adducts might be
544 present in DNA for these adducts.

545 For method application, DNA obtained from 2 human blood samples was extracted and
546 analyzed using our developed method. Except for reduced AAdG, cMGdG and GxdG, all
547 analytes were present in smoker DNA at levels ranging from 0.65 to 28.33 adducts per 10^7
548 normal nucleotides. In non-smoker DNA, AcroG and reduced AAdG were not quantifiable;

549 HNEdG, CrotodG and reduced FAdG occurred at lower levels unlikely to CEAdG and reduced
550 MDAAdG. Besides, non-smoker blood DNA contained cMGdG and GxdG. These differences
551 in both DNA adducts profiles is due to large subject-to-subject variability exposure to
552 complex mixtures, or other confounding factors (Liu *et al.*, 2005). Our results are
553 contradictory to previous works on smokers and non-smokers samples. As reported by Zhang
554 *et al.* no relationship was found in AcrodG levels to self-reported time since cessation of
555 smoking, or to gender or age (Zhang *et al.*, 2007). Adduct level ranged from 0.16-2.09
556 adducts per 10^7 nucleotides consistent with recently reported levels of 0.285 ± 0.149 AcrodG
557 per 10^7 nucleotides and 0.25 ± 0.107 AcrodG per 10^7 nucleotides in smokers and non-
558 smokers DNA, respectively (Yang *et al.*, 2019). Even if a difference was observed between
559 the AcrodG levels in both human samples in our study, the adduct levels remain consistent
560 with these previous studies. Concerning AA-derived adducts, their presence at unquantifiable
561 levels could be due to (i) the additional formation of CrotodG by 2 molecules of AA, (ii) poor
562 AA-produced sources including diet and lifestyle (food, alcoholic beverages/tobacco
563 consumption) and pollution (IARC 1985-2019, Garcia *et al.*, 2011).

564 Adducts levels in human samples were reported in earlier studies to be in higher levels
565 comparing to our LLOQ. The type of tissue sample can have a real influence on adducts
566 amounts. Indeed the pathological conditions contribute to adduction. For example, levels of
567 28-51 AcrodG adducts per 10^7 normal nucleotides (Liu *et al.*, 2005) and 2.38-5.56 HNEdG
568 per 10^7 normal nucleotides (Liu *et al.*, 2006) were found in DNA of brain tissues from
569 Alzheimer's disease subjects and age-matched controls; the mean level of AcrodG adducts
570 was about 0.9 ± 0.13 adducts per 10^7 normal nucleotides in DNA samples of extracted human
571 leukocytes (Yin *et al.*, 2013) and a level of 1 reduced AAdG per 10^7 normal nucleotides was
572 quantified in human liver DNA (Wang *et al.*, 2006). In addition, 0.24–0.35 CrotodG per 10^7
573 normal nucleotides were detected in untreated human MRC5 cells (Zhang *et al.*, 2016) and

574 CEdG was detected in WM-266-4 human melanoma cells at a frequency of one lesion per 10^7
575 nucleotides (Yuan *et al.*, 2008), and in human breast tumor at levels 3–12 adducts per 10^7 dG
576 (Synold *et al.*, 2008).

577 Our method is the first ever validated method to detect and quantify simultaneously 9
578 exocyclic DNA adducts formed from 8 aldehydes. It may be easily extended to the
579 quantification of other adducts in the future.

580

581

582 5. CONCLUSION

583 For the first time ever, we have described the development and the validation,
584 according to international guidelines, of an analytical method on UHPLC-ESI-MS/MS to
585 quantify simultaneously 9 exocyclic DNA adducts derived from 8 aldehydes from DNA
586 extracted calibrators and QCs. After synthesis, identification and quantitation of these
587 adducts and their $^{13}\text{C}_{10}$, $^{15}\text{N}_5$ isotopes homologues, calibration curves were established
588 ranging from 0.250 (LLOQ) to 250.000 ng/mL (ULOQ) of adducts in both matrices water
589 and DNA in the aim to describe the response of the instrument with regard to analyte
590 concentration. Quality control samples were prepared and analyzed to prove the method
591 within-run, and between-run accuracy and precision. Absence of carry-over was also
592 checked. The method is able to differentiate the 9 analytes of interest and their homologues
593 IS using identification criteria specified by Commission Decision 2002/657/EC. The method
594 meets all the requirements listed in the EMA guidelines. This is essential to ensure the
595 acceptability of the performance and the reliability of analytical results. This first ever
596 validated method can furthermore be used in adductomic approaches especially to assess the
597 DNA damages that can be attributed to oxidative stress. These adducts are generated from
598 aldehydes obtained from external environment as well as from endogenous oxidative stress
599 related pathway. They have been proposed to be involved in the mutagenicity of oxidative
600 stress and could be used as biomarkers of the latter (Douki *et al.*, 2004). The validated
601 UHPLC-MS/MS method was found to be enough sensitive and accurate for low-level
602 quantification of 9 exocyclic DNA adducts derived from 8 main exogenous and endogenous
603 aldehydes, namely formaldehyde, acetaldehyde, acrolein, crotonaldehyde, malondialdehyde,
604 4-hydroxy-2-nonenal, glyoxal and methylglyoxal.

605

606 **Funding**

607 This research was funded by Agence Universitaire de la Francophonie (Bureau
608 Moyen-Orient), by National Council of Scientific Research in Lebanon (contract No. 01-08-
609 15) and by Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie.

610

611 **Acknowledgments**

612 The authors express their sincere thanks to Elaine Hsiao Yin Lim for her help in
613 English correcting. The authors declare that there is no conflict of interest.

614

615 **References**

616 ALARCON R. A. and MEIENHOFR J. Formation of the cytotoxic aldehyde acrolein
617 during *in vitro* degradation of cyclophosphamide. Nature New Biology, 1971, vol. 233, pp.
618 250-252.

619 ALTEMOSE B., GONG J., ZHU T., HU M., ZHANG L., CHENG H., ZHANG L.,
620 TONG J., KIPEN H. M., OHMAN-STRICKLAND P., MENG Q., ROBSON M. G., ZHANG
621 J. Aldehydes in relation to air pollution sources: A case study around the beijing olympics.
622 Atmospheric Environment, 2015, vol. 109, pp. 61-69.

623 CHENG G., SHI Y., STURLA S. J., JALAS J. R., MCINTEE E. J., VILLALTA P. W.,
624 WANG M. and HECHT S. S. Reactions of formaldehyde plus acetaldehyde with
625 deoxyguanosine and DNA: formation of cyclic deoxyguanosine adducts and formaldehyde
626 cross-links. Chemical Research in Toxicology, 2003, vol. 16, no. 2, pp. 145-152.

627 CHUNG F.-L. and HECHT S. S. Formation of cyclic 1,N²-adducts by reaction of
628 deoxyguanosine with α -acetoxy-N-nitrosopyrrolidine, 4-(carbethoxynitrosamino)butanal, or
629 crotonaldehyde. Cancer Research, 1983, vol. 43, pp. 1230-1235.

630 CHUNG F.-L., YOUNG R. and HECHT S. S. Formation of cyclic 1,N²-
631 propanodeoxyguanosine adducts in DNA upon reaction with acrolein or crotonaldehyde.
632 Cancer Research, 1984, vol. 44, pp. 990-995.

633 CHUNG F.-L. and HECHT S. S. Formation of cyclic 1,N²-glyoxal-deoxyguanosine
634 upon reaction of N-nitro-2-hydroxymorpholine with deoxyguanosine. Carcinogenesis, 1985,
635 vol. 6, no. 11, pp. 1671-1673.

636 CHURCHWELL M. I., BELAND F. A. and DOERGE D. R. Quantification of multiple
637 DNA adducts formed through oxidative stress using liquid chromatography and electrospray
638 tandem mass spectrometry. Chemical Research in Toxicology, 2002, vol. 15, no. 10, pp.
639 1295-1301.

640 Commission Decision No. 2002/657/EC. Official Journal of the European
641 Communities. L 221 (2002) 8.

642 DOUKI T., ODIN F., CAILLAT S., FAVIER A. and CADET J. Predominance of the
643 1,N²-propano 2'-deoxyuanosine adduct among 4-hydroxy-2-nonenal-induced DNA lesions.
644 Free Radical Biology and Medicine, 2004, vol. 37, no. 1, pp. 62-70.

645 European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. 2011, ref.
646 no: EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1.

647 ESTERBAUER H., ECKL P. and ORTNER A. Possible mutagens derived from lipids
648 and lipid precursors. Mutation Research, 1990, vol. 238, pp. 223-233.

649 ESTERBAUER H., SCHAUR R. J. and ZOLLNER H. Chemistry and biochemistry of
650 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. (Review). Free Radical Biology
651 and Medicine, 1991, vol. 11, pp. 81-128.

652 GARCIA C.C., ANGELI J.P., FREITAS F.P., GOMES O.F., DE OLIVEIRA T.F.,
653 LOUREIRO A.P., DI M.P., MEDEIROS M.H. (¹³C₂)- Acetaldehyde promotes unequivol
654 formation of 1,N²-propano-2'-deoxyguanosine in human cells. Journal of American
655 Chemistry Society, 2011, vol. 133, pp. 9140-9143.

656 GUO J. and TURESKY R. J. Human biomonitoring of DNA adducts by ion trap
657 multistage mass spectrometry. Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, 2016, vol. 66,
658 pp. 7.24.1-7.24.25.

659 HECKER M. and ULLRICH V. On the mechanism of prostacyclin and thromboxane
660 A₂ biosynthesis. The Journal of Biological Chemistry, 1989, vol. 264, no. 1, pp. 141-150.

661 HU W., FENG Z., EVELEIGH J., IYER G., PAN J., AMIN S., CHUNG F.-L. and
662 TANG M.-S. The major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, preferentially
663 forms DNA adducts at codon 249 of human p53 gene, a unique mutational hotspot in
664 hepatocellular carcinoma. Carcinogenesis, 2002, vol. 23, no. 11, pp. 1781-1789.

665 International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of
666 the carcinogenic risk of chemicals to humans: allyl compounds, aldehydes, epoxides and
667 peroxides. Lyon: secretariat of the World Health Organization, 1985, vol. 36, 369 p.

668 International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of
669 the carcinogenic risk of chemicals to humans: Tobacco smoking. Lyon: secretariat of the
670 World Health Organization, 1986, vol. 38, 432 p.

671 International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of
672 the carcinogenic risks to humans: Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tert-butoxypropan-
673 2-ol. Lyon: secretariat of the World Health Organization, 2006, vol. 88, 497 p.

674 International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the evaluation of
675 the carcinogenic risk of chemicals to humans: outdoor air pollution. Lyon: secretariat of the
676 World Health Organization, 2016, vol. 109, 448 p.

677 International Agency for Research on Cancer. IARC monographs on the identification
678 of carcinogenic hazards to humans: Agents classified by the IARC monographs. Lyon:
679 secretariat of the World Health Organization, 2019, vol. 1-123.

680 KLAENE J. J., SHARMA V. K., GLICK J. and VOUIROS P. The analysis of DNA
681 adducts: the transition from ³²P-postlabelling to mass spectrometry. *Cancer Letters*, 2013,
682 vol. 334, pp. 10-19.

683 LI X., LIU L., WANG H., CHEN J., ZHU B., CHEN H., HOU H., HU Q.
684 Simultaneous analysis of six aldehyde-DNA adducts in salivary DNA of nonsmokers and
685 smokers using stable isotope dilution liquid chromatography electrospray ionization-tandem
686 mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2017, vol. 1060, pp. 451-459.

687 LIU X., LOVELL M. A. and LYNN B. C. Development of a method for quantification
688 of acrolein-deoxyguanosine adducts in DNA using isotope dilution-capillary LC/MS/MS and
689 its application to human brain tissue. *Analytical Chemistry*, 2005, vol. 77, pp. 5982-5989.

690 LIU X., LOVELL M. A. and LYNN B. C. Detection and quantification of endogenous
691 cyclic DNA adducts derived from trans-4-hydroxy-2-nonenal in human brain tissue by
692 isotope dilution capillary liquid chromatography nanoelectrospray tandem mass
693 spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 2006, vol. 19, no. 5, pp. 710-718.

694 LU K., MOELLER B., DOYLE-EISELE M., MCDONALD J. and SWENBERG J. A.
695 Molecular dosimetry of N²-hydroxymethyl-dG DNA adducts in rats exposed to
696 formaldehyde. *Chemical Research in Toxicology*, 2011, vol. 24, pp. 159-161.

697 MARNETT L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutation*
698 *Research*, 1999, vol. 424, pp. 83-95.

699 MONIEN B. H., SCHUMACHER F., HERRMANN K., GLATT H., TURESKY R. J.
700 and CHESNÉ C. Simultaneous detection of multiple DNA adducts in human lung samples by
701 isotope-dilution UPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 2015, vol. 87, pp. 641-648.

702 MURAKAMI H., HORIBA R., IWATA T., MIKI Y., UNO B. SAKAI, T., KANEKOC
703 K., ISHIHAMAD Y., TESHIMAA N. and ESAKA, Y. Progress in a selective method for the
704 determination of the acetaldehyde-derived DNA adducts by using HILIC-ESI-MS/MS.
705 *Talanta*, 2018, vol. 177, pp. 12-17.

706 PERIAT A., KOHLER I., BUGHEY A., BIERI S., VERSACE F., STAUB C. and
707 GUILLARME D. Hydrophilic interaction chromatography versus reversed phase liquid
708 chromatography coupled to mass spectrometry: effect of electrospray ionization source
709 geometry on sensitivity. *Journal of Chromatography A*, 2014, vol. 1356, pp. 211-220.

710 SENTKOWSKA A., BIESAGA M., and PYRZYNSKA K. Application of hydrophilic
711 interaction liquid chromatography for the quantification of flavonoids in genista tinctoria
712 extract. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2016, vol. 2016, 9 p.

713 SETO H., OKUDA T., TAKESUE T. and IKEMURA T. Reaction of malonaldehyde
714 with nucleic acid. I. Formation of fluorescent pyrimido[1,2-a]purin-10(3H)-one nucleosides.
715 The Chemical Society of Japan, 1983, vol. 56, no. 6, pp. 1799-1802.

716 SHUCK S. C., WUENSCHHELL G. E. and TERMINI J. S. Product studies and
717 mechanistic analysis of the reaction of methylglyoxal with deoxyguanosine. Chemical
718 Research in Toxicology, 2018, vol. 31, no. 2, pp. 105-115.

719 SINGH R. and FARMER P. B. Liquid chromatography-electrospray ionization-mass
720 spectrometry: the future of DNA adduct detection. Carcinogenesis, 2006, vol. 27, no. 2, pp.
721 178-196.

722 SINGH R., SANDHU J., KAUR B., JUREN T., STEWARD W. P., SEGERBÄCK D.
723 and FARMER P. B. Evaluation of the DNA damaging potential of cannabis cigarette smoke
724 by the determination of acetaldehyde derived N²-ethyl-2'-deoxyguanosine adducts. Chemical
725 Research in Toxicology, 2009, vol. 22, no. 6, pp. 1181-1188.

726 SYNOLD T., XI B., WUENSCHHELL G. E., TAMAE D., FIGAROLA L. G.,
727 RAHBAR S. and TERMINI J. Advanced glycation end products of DNA: quantification of
728 N²-(1-carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine in biological samples by liquid chromatography
729 electrospray ionization tandem mass spectrometry. Chemical Research in Toxicology, 2008,
730 vol. 21, no. 11, pp. 2148-2155.

731 VOULGARIDOU G. P., ANESTOPOULOS I., FRANCO R., PANAYIOTIDIS M. I.
732 and PAPPA A. DNA damage induced by endogenous aldehydes: current stage of knowledge.
733 Mutation Research, 2011, vol. 711, pp. 13-27.

734 WANG M., CHUNG F.-L. and HECHT S. S. Identification of crotonaldehyde as a
735 hepatic microsomal metabolite formed by α -hydroxylation of the carcinogen N-
736 Nitrosopyrrolidine. Chemical Research in Toxicology, 1988, vol. 1, no. 1, pp. 28-31.

737 WANG M., MCINTEE E. J., CHENG G., SHI Y., VILLALTA P. W. and HECHT S.
738 S. Identification of DNA adducts of acetaldehyde. *Chemical Research in Toxicology*, 2000,
739 vol. 13, no. 11, pp. 1149-1157.

740 WANG M., YU N., CHEN L., VILLALTA P. W., HOCHALTER J. B. and HECHT S.
741 S. Identification of an acetaldehyde adduct in human liver DNA and quantitation as N²-
742 ethyldeoxyguanosine. *Chemical Research in Toxicology*, 2006, vol. 19, no. 2, pp. 319-324.

743 WINTER C. K., SEGALL H. J. and HADDON W. F. Formation of cyclic adducts of
744 deoxyguanosine with the aldehydes trans-4-hydroxy-2-hexenal and trans-4-hydroxy-2-
745 nonenal in vitro. *Cancer Research*, 1986, vol. 46, pp. 5682-5686.

746 WYNDER E. L., GOODMAN D. A. and HOFFMAN D. Ciliotoxic components in
747 cigarette smoke. II. Carboxylic acids and aldehydes. *Cancer*, 1965, vol. 18, no. 4, pp. 505-
748 509.

749 YANG J., BALBO S., VILLALTA P. W. and HECHT S. S. Analysis of acrolein-
750 derived 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts in human lung DNA from smokers and non-
751 smokers. *Chemical Research in Toxicology*, 2019, vol. 32, no. 2, pp. 318-325.

752 YIN R., LIU S., Zhao C., LU M., TANG M. S. and WANG H. An ammonium
753 bicarbonate-enhanced stable isotope dilution UHPLC-MS/MS method for sensitive and
754 accurate quantification of acrolein-DNA adducts in human leukocytes. *Analytical Chemistry*,
755 2013, vol. 85, pp. 3190-3197.

756 YUAN B., CAO H., JIANG Y., HONG H. and WANG Y. Efficient and accurate
757 bypass of N²-(1-carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine by DinB DNA polymerase in vitro and in
758 vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, vol. 105, pp. 8679-8684.

759 ZHANG S., VILLALTA P. W., WANG M. and HECHT S. S. Analysis of
760 crotonaldehyde- and acetaldehyde-derived 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts in DNA

761 from human tissues using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass
762 spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*, 2006, vol. 19, no. 10, pp. 1386-1392.

763 ZHANG S., VILLALTA P. W., WANG M. and HECHT S. S. Detection and
764 quantitation of acrolein-derived 1,N²-propanodeoxyguanosine adducts in human lung by
765 liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Chemical*
766 *Research in Toxicology*, 2007, vol. 20, no. 4, pp. 565-571.










767 ZHANG N., SONG Y., WU D., XU T., LU M., ZHANG W. and WANG H. Detection
768 of 1,N²-propano-2'-deoxyguanosine adducts in genomic DNA by ultrahigh performance
769 liquid chromatography-electrospray ionization- tandem mass spectrometry in combination
770 with stable isotope dilution. *Journal of Chromatography A*, 2016, vol. 1450, pp. 38-44.

771

773 Table 1: Mass transition and optimized MRM parameters for each DNA adduct

Aldehydes	Adducts	Q1	Q3	CE (eV)
Acrolein	AcrodG	324.1	208.1	-11
			190.2	-28
	$[^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_5]\text{AcrodG}$	339	218	-11
Crotonaldehyde	CrotodG	338	222.1	-13
			178.1	-27
	$[^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_5]\text{CrotodG}$	353	232	-13
Acetaldehyde	Reduced AAdG	296.1	180.2	-11
			163.1	-31
	Reduced $[^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_5]\text{AAdG}$	311	190	-11
Formaldehyde	Reduced FAdG	282.1	166	-10
			149.1	-32
	Reduced $[^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_5]\text{FAdG}$	297	176	-10
4-Hydroxy-2-nonenal	HNEdG	424	308.2	-13
			152.2	-27
	$[^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_5]\text{HNEdG}$	439	318	-13
Malondialdehyde	Reduced MDAAdG	306.1	190.1	-11
			135.1	-39
	Reduced $[^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_5]\text{MDAAdG}$	321	200	-11
Glyoxal	GxdG	326.1	210	-11
			164.2	-29
	$[^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_5]\text{GxdG}$	341	220	-11
Methylglyoxal	cMGdG	340.2	224.1	-10
			152.1	-32
	$[^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_5]\text{cMGdG}$	355	234	-10
	CEdG	340.1	224	-12
			177.9	-18
$[^{13}\text{C}_{10}, ^{15}\text{N}_5]\text{CEdG}$	355	234	-12	

775 Table 2: Adducts names and structures

Aldehydes	Aldehydes abbreviations	Adducts names	Adducts abbreviations	Adducts structures	Ref.
Malondialdehyde	MDA	5,6-dihydro-3-(2-deoxy- β -D- <i>erythro</i> -pentafuranosyl)pyrimido[1,2- α]purin-10(3 <i>H</i>)-one-deoxyguanosine	Reduced MDAdG		Seto <i>et al.</i> , 1983
Glyoxal	Gx	3-(2'-deoxy- β -D- <i>erythro</i> -pentofuranosyl)-5,6,7-trihydro-6,7-dihydroxyimidazo[1,2- <i>a</i>]purine-9-one	GxdG		Chung and Hecht, 1985
Methylglyoxal	MG	N ² -(1-carboxyethyl)-2'-deoxyguanosine	CEdG		Shuck <i>et al.</i> , 2018
		1,N ² -(1,2-dihydroxy-2-methyl)ethano-2'-deoxyguanosine	cMGdG		Shuck <i>et al.</i> , 2018
Formaldehyde	FA	N ² -methyl-deoxyguanosine	Reduced FAdG		Cheng <i>et al.</i> , 2003
Acetaldehyde	AA	N ² -ethyl-deoxyguanosine	Reduced AAdG		Wang <i>et al.</i> , 2000
Crotonaldehyde / 2 x acetaldehyde	Croto / 2 x AA	α -R/S-methyl- γ -hydroxy-1,N ² -propano-deoxyguanosine	CrotodG		Chung and Hecht, 1983
Acroléine	Acro	α -R/S-hydroxy-1,N ² -propano-deoxyguanosine γ -hydroxy-1,N ² -propano-deoxyguanosine	AcrodG		Chung <i>et al.</i> , 1984
4-hydroxy-2-nonenal	HNE	4-hydroxy-2-nonenal-deoxyguanosine	HNEdG		Winter <i>et al.</i> , 1986

776

777

778 Table 3: Inter-day accuracy and precision ($n=9$)

Adducts	Inter-day (n=9)		Concentration			
			LLOQ	Low QC	Medium QC	High QC
AcrodG	Accuracy	Min %	-18.59	-14.91	-12.71	-8.68
		Max %	18.86	14.90	2.95	14.25
	Precision	CV	16.17	13.14	5.18	8.61
CrotodG	Accuracy	Min %	-8.56	-11.23	-11.19	-2.41
		Max %	18.05	13.73	9.83	12.32
	Precision	CV	8.80	10.31	7.48	5.28
Reduced AAdG	Accuracy	Min %	-15.42	-14.95	-6.89	-8.12
		Max %	18.67	14.23	2.88	5.51
	Precision	CV	14.17	11.33	2.98	4.44
Reduced FAdG	Accuracy	Min %	-11.38	-14.98	-7.21	2.80
		Max %	10.46	14.62	8.68	13.71
	Precision	CV	7.37	11.73	5.95	6.43
HNEdG	Accuracy	Min %	-19.14	-11.41	-14.99	-8.26
		Max %	15.48	12.28	6.67	14.66
	Precision	CV	12.03	8.50	7.76	8.29
Reduced MDAdG	Accuracy	Min %	-18.97	-10.75	-12.08	-14.86
		Max %	19.11	14.08	7.66	14.32
	Precision	CV	13.17	8.97	6.90	11.86
GxdG	Accuracy	Min %	-17.03	-13.43	-12.07	-14.90
		Max %	14.74	14.46	14.48	7.21
	Precision	CV	9.29	10.88	11.27	8.69
cMGdG	Accuracy	Min %	-12.34	-11.73	-13.10	-13.75
		Max %	14.03	14.20	13.11	11.06
	Precision	CV	8.17	9.11	8.63	9.31
CEdG	Accuracy	Min %	-17.47	-14.40	-12.15	-8.94
		Max %	13.75	14.56	11.85	14.46
	Precision	CV	10.16	10.20	7.62	7.86

779

780

781 Table 4: Intraday accuracy and precision (n=5)

Adducts	Intraday (n=5)		Concentration			
			LLOQ	Low QC	Medium QC	High QC
AcrodG	Accuracy	Min %	-18.59	-14.91	-7.36	-7.45
		Max %	13.84	14.82	3.13	14.25
	Precision	CV	16.03	13.01	4.12	7.91
CrotodG	Accuracy	Min %	-7.23	-11.23	-1.91	7.97
		Max %	15.53	12.84	12.28	14.75
	Precision	CV	7.81	9.53	5.45	2.20
Reduced AAdG	Accuracy	Min %	-14.98	-14.95	-1.21	-4.23
		Max %	19.38	9.09	2.36	5.51
	Precision	CV	13.23	10.72	1.37	4.07
Reduced FAdG	Accuracy	Min %	-5.03	-13.73	-5.79	0.40
		Max %	12.75	14.46	8.68	13.71
	Precision	CV	6.83	11.46	5.69	6.22
HNEdG	Accuracy	Min %	-20.00	-11.41	-10.58	-5.16
		Max %	-1.89	12.28	6.67	9.15
	Precision	CV	9.13	8.45	7.66	6.19
Reduced MDAdG	Accuracy	Min %	-18.97	-10.65	-8.14	-13.30
		Max %	6.95	5.23	7.51	12.45
	Precision	CV	11.74	6.02	6.56	11.49
GxdG	Accuracy	Min %	-5.31	-4.47	-12.07	-13.26
		Max %	10.24	5.33	13.92	1.90
	Precision	CV	5.59	3.54	11.13	7.85
cMGdG	Accuracy	Min %	-5.18	-11.73	-13.10	-9.68
		Max %	3.68	8.66	5.28	9.56
	Precision	CV	3.56	8.19	7.23	8.14
CEdG	Accuracy	Min %	-10.98	-8.23	0.97	-3.66
		Max %	12.19	13.10	11.85	5.20
	Precision	CV	9.20	8.11	4.50	3.49

782

783

784 Table 5: The maximal percentage of the back calculated concentrations of the calibration
785 standards against the nominal value

Adducts	Percentage
AcrodG	14.45
CrotodG	13.56
Reduced AAdG	14.62
Reduced FAdG	13.65
HNEdG	14.84
Reduced MDAdG	14.64
GxdG	14.74
cMGdG	14.99
CEdG	14.98

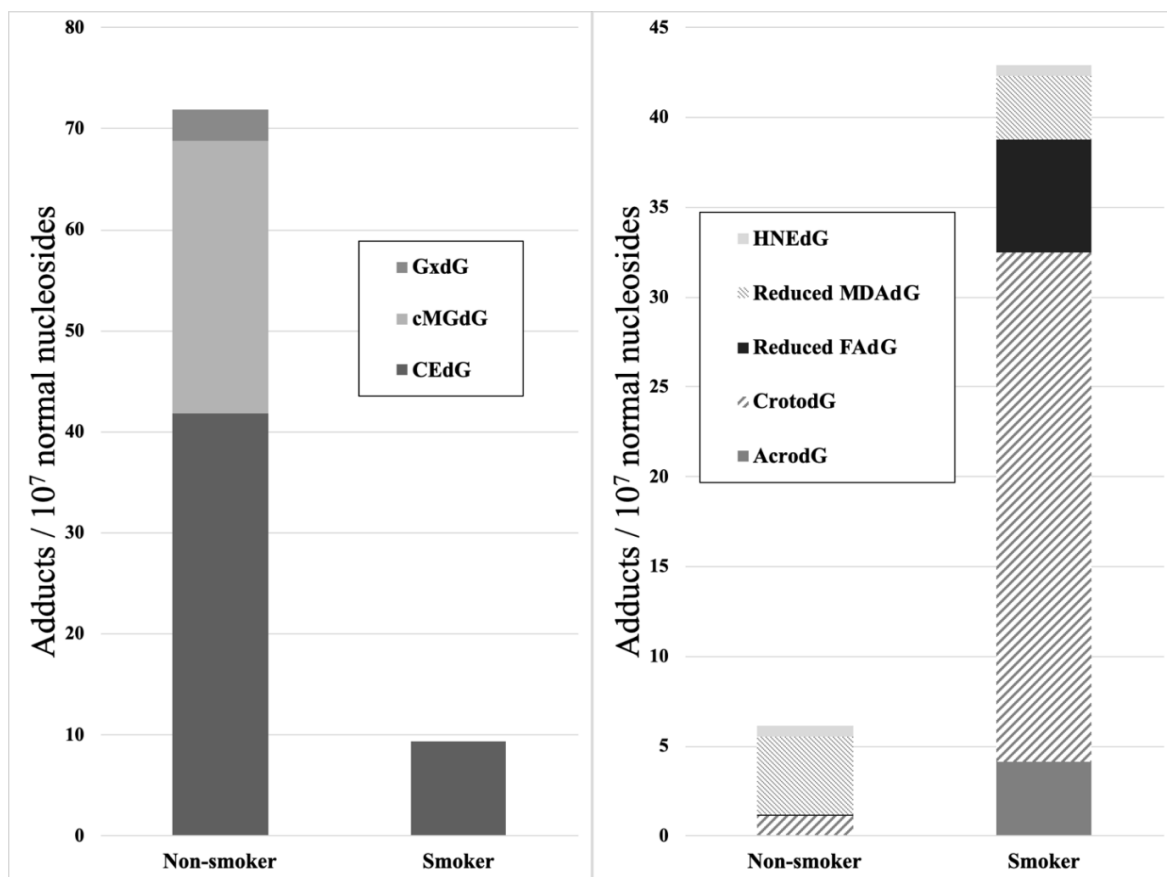
786

787

788 **Figures**

789

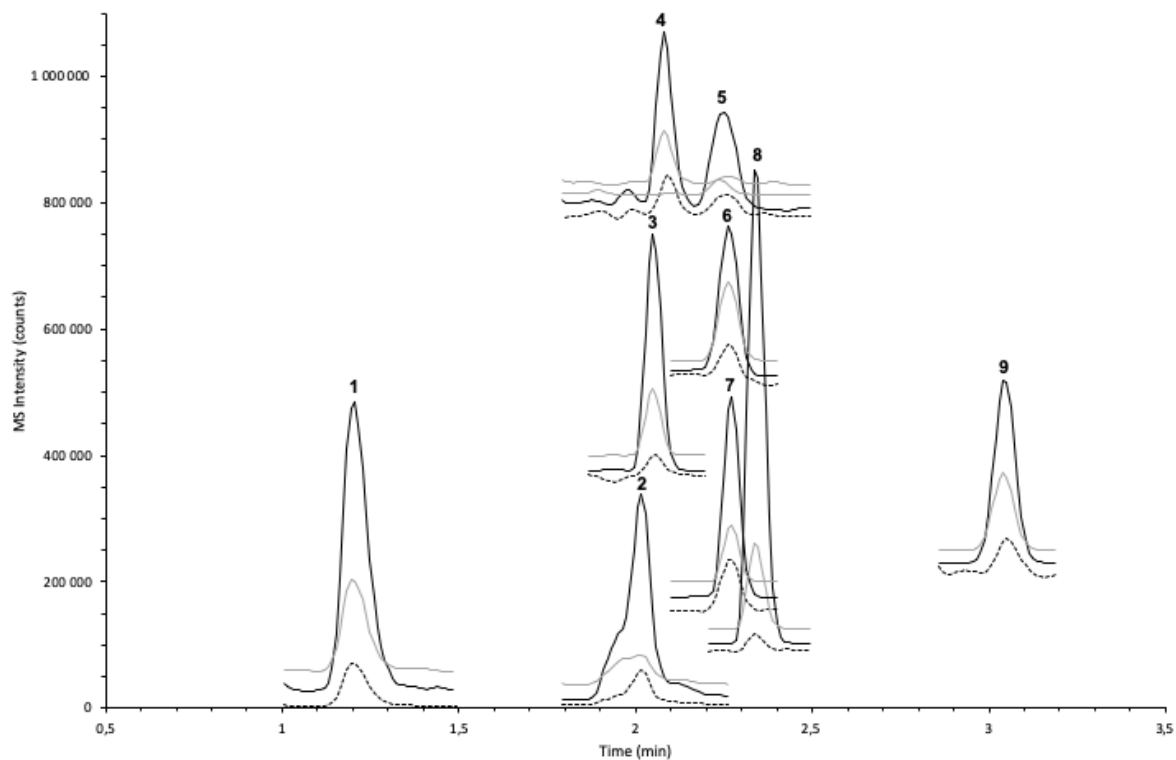
790



791

792 Figure 1. DNA adducts levels pattern of genomic DNA isolated from both a smoker and a
793 non-smoker blood samples.

794



795

796 Figure 2. Chromatogram of a DNA calibrator at 100 ng/mL. For each peak, the dotted lines
 797 correspond to the $^{15}\text{N}_5, ^{13}\text{C}_{10}$ internal standards, the black and the grey lines correspond to the
 798 first and the second MRM transitions in the table 1. Peaks: 1. GxdG, 2. AcrodG, 3. Reduced
 799 FAdG, 4. and 5. CEdG, 6. CrotodG, 7. Reduced AAdG, 8. Reduced MDAdG, 9. HNEdG.

Annexe II- Questionnaire général

1. Personal information

1. Date / /
2. Code..... Height..... Weight.....
3. Sex Male Female
4. Date of birth / /
5. Present occupation Outdoor Policeman
6. Since when have you been working as outdoor policeman? / /
7. Barrack.....

2. Place of residence

1. City of residence.....
2. What term best describes the place you are living?
 - Farm
 - village in a rural area
 - small town
 - suburb of a city
 - inner city
3. Do you live near (< 500 m):

	No	Yes	If "yes", give distance (m)
a- A quarry?			
b- A metropolitan road?			
c- A foundry?			
d- A pottery?			
e- A fuel station?			
f- An airport?			
g- A coffee roaster?			
h- A garage of cars sprays painting?			
i- A site of varnishing of furniture and wooden floors?			
j- A sewage treatment plant?			
k- A petroleum refining and coal processing plant?			
l- A generator?			
m- An industry?			

4. If "yes" to "generator" please specify:
 Working hours of the generator hours/day
 Does not apply
5. How long have you been living in your house?.....
6. Is there a chimney or open fireplace in the house **that is not blocked**? Yes No
a- If "yes", did you use it this week? Yes No Does not apply
7. Which of the following methods did you use to heat your house this week?
 Radiators (filled with hot water heated by electricity, gas or oil)
 Electric air condition
 Electric fan heater
 Hot air ducts
 Open gas fire (open chimney)
 Closed gas fire
 Open coke or coal fire
 Open wood fire
 Paraffin or kerosene heater
 Other, please specify
 None
8. Are there any damp patches on the walls or ceilings in the house? Yes No
9. Is there any mold or mildew on the walls or ceilings in the house? Yes No
10. How often is the house aerated?
 Every day or every other day
 Once or twice a week
 Once every two to four weeks
 Less than once every four weeks
 Never
11. Did you cook this week? Yes No
If "Yes",
a- How many times did you cook? times Does not apply
b- Did you use a gas oven? Yes No Does not apply
c- Did you use firewood or charcoal for cooking? Yes No Does not apply
d- Did you use an extractor fan? Yes No Does not apply
e- Does the fan take the fumes outside the house? Yes No Does not apply

3. Occupational history

1. Have you ever worked before your current job? Yes No
a- If "Yes", please specify the job:
 In a manufacture of candles In a fire center

- In a quarry
- In a foundry
- In a pottery
- In a cotton, flax or heap mill
- With asbestos
- In a fuel station
- In an airport
- In coffee roasting
- In a garage of cars spray painting

- Varnishing wooden furniture and floors
- In a sewage treatment plant
- In a petroleum refining and coal processing plant
- In a copy center
- In a hairdresser / barber shop
- Other, please specify:
.....
- Does not apply

2. Have you ever been exposed to gas or chemical fumes in your work? Yes No

If "Yes",

a- Specify job/industry.....Total years worked.....

b- What type of exposure? Long-term exposure work accident Does not apply

c- Duration of exposure: hours/day for days (or years)

4. Medical history

1. Do you consider yourself to be in a good health? Yes No

a- If "No" state reason.....

2. Do you have any nasal allergies, including hay fever? Yes No

3. If you get a cold does it usually go to your chest? Yes No Don't get colds
(Usually means more than 1/2 the time)

4. Did you have a chest x-ray recently? Yes No

If "yes",

a- When did you last have your chest x-rayed? does not apply

b- What was the outcome?.....

5.

Do you have:	Yes	No	Treatment
a- Chronic bronchitis?			
b- Emphysema?			
c- Pneumonia?			
d- Hay fever?			
e- Asthma?			

f- High blood pressure?			
g- Heart trouble?			
h- Lung cancer?			
i- Other chest conditions? (illness / operation / injuries)			

5. Cough and phlegm

1. Do you **usually** have a cough? Yes No
(Count a cough with the first smoke or on first going out of doors. Exclude clearing of throat)
 - a- If "yes", do you **usually** cough as much as much as 4 to 6 times a day 4 or more days out of the week? Yes No
 Does not apply
2. Do you **usually** cough at all on getting up or first thing in the morning? Yes No
3. Do you **usually** cough at all during the rest of the day or at night? Yes No
4. If "Yes" to any of above (1, 2, 3):
 - a- Do you usually cough like this on most days for 3 consecutive months or more during the year? Yes No
 Does not apply
 - b- For how many years have you had the cough? Does not apply number of years.....
5. Do you usually bring up phlegm from your chest? Yes No
(Count phlegm with the first smoke or on first going out of doors. Exclude phlegm from the nose)
 - a- If "yes", do you usually bring up phlegm like this as much as twice a day 4 or more days out of the week? Yes No
 Does not apply
6. Do you usually bring up phlegm at all on getting up or first thing in the morning? Yes No
7. Do you usually bring up phlegm at all during the rest of the day or at night? Yes No
8. If "Yes" to any of above (5, 6, 7):
 - a- Do you bring up phlegm like this on most days for 3 consecutive months or more during the year? Yes No
 Does not apply
 - b- For how many years have you had trouble with phlegm? Does not apply number of years.....
9. Have you had periods or episodes of (increased) cough and phlegm lasting for 3 weeks or more each year? Yes No
 - a- If "Yes", for how long have you

had at least 1 such episode per year? Does not apply number of years.....

6. Wheezing

1. Does your chest ever sound wheezy or whistling
 - a- When you have a cold? Yes No
 - b- Occasionally apart from colds? Yes No
 - c- Most days or nights? Yes No
 - d- If "Yes" to any of above, for how many years has this been present? Does not apply number of years.....
2. Have you ever had an attack of wheezing that has made you feel short of breath? Yes No
If "Yes",
 - a- How old were you when you had your first such attack? Does not apply Age in years.....
 - b- Have you had 2 or more such episodes? Yes No
 Does not apply
 - c- Have you ever required medicine or treatment for the(se) attack(s)? Yes No
 Does not apply

7. Breathlessness

1. If disabled from walking by any condition other than heart or lung disease, please describe nature of condition(s).....
2. Are you troubled by shortness of breath when hurrying on the level or walking up a slight hill? Yes No
If "Yes",
 - a- Do you have to walk slower than people of your age on the level because of breathlessness? Yes No
 Does not apply
 - b- Do you ever have to stop for breath when walking **at your own pace** on the level? Yes No
 Does not apply
 - c- Do you ever have to stop for breath after walking about 100 meters (or after few minutes) on the level? Yes No
 Does not apply
 - d- Are you too breathless to leave the house or breathless on dressing or climbing one flight of stairs? Yes No
 Does not apply

8. Medicine

1. Are you currently taking any medicines, including inhaler, aerosols or tablets? Yes No
2. Have you ever had any difficulty with your breathing after taking medicines? Yes No

- a- If "Yes" please specify which medicines?.....
3. Have you used any inhaled medicines to help your breathing at any time in the last 12 months? Yes No
- if "Yes",
- a- Please specify.....
- b- In the last 3 months, how have you used them:
- when needed
 - in short courses
 - continuously
 - not at all
4. Do or did you use a hair straightening product? Yes No
- a- If "Yes", please give the date of the last use (if known).....

9. Tobacco smoking

Have you ever smoked:

	No	Yes	Quantity Cig./day	Date of the last smoking
a- Cigarette?				
b- Cigars?				
c- E-cigarette?				
d- Rolling tobacco?				
e- Bidies?				
f- Pipe?				
g- Narghile?				

10. Secondhand smoking

1. Have you been **regularly exposed to tobacco smoke** for the past 12 months? ("regularly" means almost all days and all nights) Yes No
- If "Yes",
- a- Not counting yourself, how many people in your household smoke **regularly**? Does not apply
 number of people.....
- b- Is there someone who smokes regularly in the office where you work? Does not apply
 Yes No
- c- How many **hours a day** you are exposed to other people's tobacco smoke:
- i. Does not apply

- ii. At home?.....hours/day
- iii. At work?.....hours/day
- iv. In bars, restaurants, cinemas and other entertainment places?.....hours/day
- v. Elsewhere?.....hours/day

11. Diet and drinks consumption

1. What choices best describe your meals this week?

	No	Yes	Quantity taken per week
a- Milk and dairy food			
b- Fruits			
c- Vegetables			
d- Bread			
e- Rice			
f- Potatoes			
g- Pasta			
h- Meat			
i- Fish			
j- Eggs			
k- Processed meat or chicken products			
l- High sugar snacks			
m- Takeaway meal			
n- Water			
o- Hot beverages			
p- Cold beverages (soda and juices)			
q- Alcoholic drinks			

2. If "yes" to alcoholic drinks,

a- Compare your consumption between this week and the last weekend:

- same consumption
- more during the last weekend
- more during this week
- Does not apply

b- How many **cups** of each drink did you consume this week?

i- Does not apply



ii- Shots

.....



iii- Vodka

.....



iv- Arak

.....



v- Wine

.....



vi- Whiskey

.....



vii- Beer

.....

- c- What is the proportion of alcohol (only in the case of **Arak** and **vodka**)? Does not apply
 1/4 1/3 1/2 2/3 3/4 1

12. Vehicles and driving

1. What kind of vehicle did you drive (did you take) last weekend?
 Bus / van
 Taxi / car
 Motorcycle
 Forklift / dingo / bob-cat / Bulldozer / front end loader / tractor / Truck / lorry / semitrailer
 other, please describe.....
2. What kind of vehicle did you drive (did you take) during this week?
 Bus / van
 Taxi / car
 Motorcycle
 Forklift / dingo / bob-cat / Bulldozer / front end loader / tractor / Truck / lorry / semitrailer
 other, please describe.....
3. What fuel does this vehicle use?
 Diesel
 Petrol / gasoline
 LPG / propane
 Battery or electricity
 Other, please describe.....
4. Do you usually fill the fuel tank yourself?
 No
 Yes
 a- If "Yes", how many times this week did you fill the fuel tank yourself?
 Does not apply times
5. When driving this week (or taking a vehicle), where did you do most of your driving (your road)?
 Major metropolitan roads
 Minor metropolitan roads
 Country roads
 Mine underground
 Mine surface
 Construction sites
 Other industrial sites
 Indoors (e.g. Warehouse)
 other, please describe.....
6. To your knowledge, did this vehicle carry this week:
 Paints
 Diesel
 Gasoline
 Any other petroleum product
 I don't know

7. How often do **cars** (gasoline) pass your house?

- Constantly
- Frequently
- Seldom
- Never

8. How often do **heavy vehicles** (diesel) pass your house?

- Constantly
- Frequently
- Seldom
- Never

Signature..... Date.....

Annexe III- Questionnaire quotidien

POL _____

Date ____/____/____

During the work	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday
Shift	<input type="radio"/> morning <input type="radio"/> afternoon	<input type="radio"/> morning <input type="radio"/> afternoon	<input type="radio"/> morning <input type="radio"/> afternoon	<input type="radio"/> morning <input type="radio"/> afternoon	<input type="radio"/> morning <input type="radio"/> afternoon
Same location?	<input type="radio"/> Yes, please specify location: ----- <input type="radio"/> No, please specify location in function of time ----- ----- -----	<input type="radio"/> Yes, please specify location: ----- <input type="radio"/> No, please specify location in function of time ----- ----- -----	<input type="radio"/> Yes, please specify location: ----- <input type="radio"/> No, please specify location in function of time ----- ----- -----	<input type="radio"/> Yes, please specify location: ----- <input type="radio"/> No, please specify location in function of time ----- ----- -----	<input type="radio"/> Yes, please specify location: ----- <input type="radio"/> No, please specify location in function of time ----- ----- -----
Data on traffic jam	-----	-----	-----	-----	-----
Rush hours	_____ _____	_____ _____	_____ _____	_____ _____	_____ _____
Number of cars passing by per minute during rush hours	_____ cars/min At _____	_____ cars/min At _____	_____ cars/min At _____	_____ cars/min At _____	_____ cars/min At _____

Calm hours	_____	_____	_____	_____	_____
Number of cars passing by per minute during calm hours	_____ cars/min At _____	_____ cars/min At _____	_____ cars/min At _____	_____ cars/min At _____	_____ cars/min At _____
Data on weather	-----	-----	-----	-----	-----
Problem with the badge?	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes, please specify: ----- ----- -----	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes, please specify: ----- ----- -----	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes, please specify: ----- ----- -----	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes, please specify: ----- ----- -----	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes, please specify: ----- ----- -----
Was it a regular usual day?	<input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No, please specify: ----- ----- -----	<input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No, please specify: ----- ----- -----	<input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No, please specify: ----- ----- -----	<input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No, please specify: ----- ----- -----	<input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No, please specify: ----- ----- -----

On the way to work	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday
How did you come to work today?	<input type="radio"/> Slept at work <input type="radio"/> walking <input type="radio"/> by bike <input type="radio"/> motorcycle <input type="radio"/> public transport <input type="radio"/> car	<input type="radio"/> Slept at work <input type="radio"/> walking <input type="radio"/> by bike <input type="radio"/> motorcycle <input type="radio"/> public transport <input type="radio"/> car	<input type="radio"/> Slept at work <input type="radio"/> walking <input type="radio"/> by bike <input type="radio"/> motorcycle <input type="radio"/> public transport <input type="radio"/> car	<input type="radio"/> Slept at work <input type="radio"/> walking <input type="radio"/> by bike <input type="radio"/> motorcycle <input type="radio"/> public transport <input type="radio"/> car	<input type="radio"/> Slept at work <input type="radio"/> walking <input type="radio"/> by bike <input type="radio"/> motorcycle <input type="radio"/> public transport <input type="radio"/> car
Time spent in this vehicle					
Duration of traffic					
Duration of opened vehicle windows					
Duration of use of the air conditioner					
Any secondhand smoking tobacco?	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes
Duration of exposure to secondhand smoking					

On the way home (the day before)	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday
When did you go back home yesterday?	<input type="radio"/> it was a day off <input type="radio"/> just after my shift <input type="radio"/> didn't go <input type="radio"/> after resting in the barrack for -----	<input type="radio"/> it was a day off <input type="radio"/> just after my shift <input type="radio"/> didn't go <input type="radio"/> after resting in the barrack for -----	<input type="radio"/> it was a day off <input type="radio"/> just after my shift <input type="radio"/> didn't go <input type="radio"/> after resting in the barrack for -----	<input type="radio"/> it was a day off <input type="radio"/> just after my shift <input type="radio"/> didn't go <input type="radio"/> after resting in the barrack for -----	<input type="radio"/> it was a day off <input type="radio"/> just after my shift <input type="radio"/> didn't go <input type="radio"/> after resting in the barrack for -----
How did you get home?	<input type="radio"/> Slept at work <input type="radio"/> walking <input type="radio"/> by bike <input type="radio"/> motorcycle <input type="radio"/> public transport <input type="radio"/> car	<input type="radio"/> Slept at work <input type="radio"/> walking <input type="radio"/> by bike <input type="radio"/> motorcycle <input type="radio"/> public transport <input type="radio"/> car	<input type="radio"/> Slept at work <input type="radio"/> walking <input type="radio"/> by bike <input type="radio"/> motorcycle <input type="radio"/> public transport <input type="radio"/> car	<input type="radio"/> Slept at work <input type="radio"/> walking <input type="radio"/> by bike <input type="radio"/> motorcycle <input type="radio"/> public transport <input type="radio"/> car	<input type="radio"/> Slept at work <input type="radio"/> walking <input type="radio"/> by bike <input type="radio"/> motorcycle <input type="radio"/> public transport <input type="radio"/> car
Time spent in this vehicle					
Duration of traffic					
Duration of opened vehicle windows					
Duration of use of the air conditioner					
Any secondhand smoking tobacco?	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes
Duration of exposure to secondhand smoking					

At home or barrack (the day before)	Monday	Tuesday	Wednesday	Thursday	Friday
What did you eat yesterday?	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----	----- -----
What did you drink with your meal?	<input type="radio"/> Nothing <input type="radio"/> Yes, I drunk: _____ _____ Qantity_____	<input type="radio"/> Nothing <input type="radio"/> Yes, I drunk: _____ _____ Qantity_____	<input type="radio"/> Nothing <input type="radio"/> Yes, I drunk: _____ _____ Qantity_____	<input type="radio"/> Nothing <input type="radio"/> Yes, I drunk: _____ _____ Qantity_____	<input type="radio"/> Nothing <input type="radio"/> Yes, I drunk: _____ _____ Qantity_____
Did you sleep with the windows opened at night?	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes
Any secondhand smoking tobacco?	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes
Number of persons smoking in the house					
Duration of exposure to secondhand smoking					
Did you smell paints, petroleum product or any other emissions?	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes

Name of the products you smelled					
Duration of exposure to these products					
Did you get out the house yesterday?	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes
How did you get out?	<input type="radio"/> doesn't apply <input type="radio"/> walking <input type="radio"/> by bike <input type="radio"/> motorcycle <input type="radio"/> public transport <input type="radio"/> car	<input type="radio"/> doesn't apply <input type="radio"/> walking <input type="radio"/> by bike <input type="radio"/> motorcycle <input type="radio"/> public transport <input type="radio"/> car	<input type="radio"/> doesn't apply <input type="radio"/> walking <input type="radio"/> by bike <input type="radio"/> motorcycle <input type="radio"/> public transport <input type="radio"/> car	<input type="radio"/> doesn't apply <input type="radio"/> walking <input type="radio"/> by bike <input type="radio"/> motorcycle <input type="radio"/> public transport <input type="radio"/> car	<input type="radio"/> doesn't apply <input type="radio"/> walking <input type="radio"/> by bike <input type="radio"/> motorcycle <input type="radio"/> public transport <input type="radio"/> car
Time spent in this vehicle					
Duration of traffic					
Duration of opened windows					
Duration of air conditioner					
Any secondhand smoking tobacco?	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes	<input type="radio"/> No <input type="radio"/> Yes
Duration of secondhand smoking					