



HAL
open science

HAP oxydés : étude des effets génotoxiques in-vitro et caractérisation des adduits à l'ADN par spectrométrie de masse

Adeline Clergé

► **To cite this version:**

Adeline Clergé. HAP oxydés : étude des effets génotoxiques in-vitro et caractérisation des adduits à l'ADN par spectrométrie de masse. Toxicologie. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMC432 . tel-02521475v2

HAL Id: tel-02521475

<https://theses.hal.science/tel-02521475v2>

Submitted on 27 Mar 2020

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

HAP oxydés: étude des effets génotoxiques in-vitro et caractérisation des adduits à l'ADN par spectrométrie de masse.

Présentée et soutenue par
Adeline CLERGE

Thèse soutenue publiquement le 19/12/2019
devant le jury composé de

Mme NATHALIE GROVA	Chercheur qualifié, Luxembourg institute of health	Rapporteur du jury
M. BRUNO LE BIZEC	Professeur des universités, ONIRIS	Rapporteur du jury
M. ALEXANDRE ALBINET	INGENIEUR D'ETUDES DE RECH.ET FORMATION, INERIS	Membre du jury
M. PASCAL CARDINAEL	Professeur des universités, Université Rouen Normandie	Président du jury
Mme LAURENCE HUC	Chargé de recherche HDR, INRA de Toulouse	Membre du jury
M. JEREMIE LE GOFF	Chercheur, Centre François Baclesse de Caen	Membre du jury

Thèse dirigée par RAPHAEL DELEPEE, Aliments bioprocédés toxicologie environnements



UNIVERSITÉ
CAEN
NORMANDIE

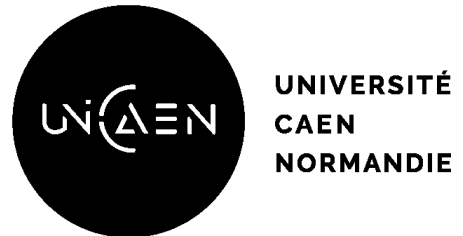
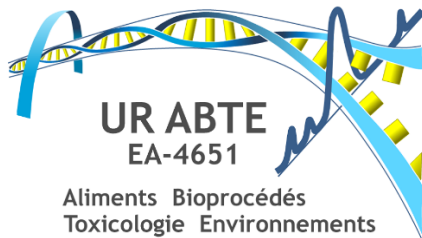


Normandie de Biologie Intégrative,
Santé, Environnement



A mes Parents,
A Stéphane

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein de l'Unité de Recherche EA-4651 ABTE (Aliments, Bioprocédés, Toxicologie, Environnements, sous la double tutelle des universités de Caen et de Rouen), et plus particulièrement au sein de l'équipe ToxEMAC (Toxicologie de l'Environnement, Milieux Aériens, Cancers). Cette équipe est hébergée dans le bâtiment Recherche du Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse à Caen.



Mon contrat doctoral a été financé par une allocation de recherche du Ministère de la Recherche.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mes deux rapporteurs, le **Dr. Nathalie Grova**, de l'université de Lorraine et le **Pr. Bruno Le Bizec**, directeur du LABERCA à Nantes, pour m'avoir fait l'honneur d'examiner mes travaux. Je leur suis reconnaissante du temps accordé pour la lecture critique de ce manuscrit. Je suis également très honorée de compter parmi mon jury de thèse le **Dr. Alexandre Albinet**, de l'INERIS à Verneuil-en-Halatte et le **Dr. Laurence Huc**, de l'INRA à Toulouse.

Je remercie le **Pr. Khaled Meflah** et le **Pr. Marc-André Mahé** pour leur accueil au sein du CLCC François Baclesse et je remercie le **Pr. François Sichel** de m'avoir permis de préparer mon doctorat au sein de l'unité ABTE.

Je tiens énormément à remercier mon directeur de thèse, le **Pr. Raphaël Delépée**, pour m'avoir accompagné et encadré tout au long de cette thèse. Je te remercie de t'être tant investi durant ces trois années afin que ma thèse se passe dans les meilleures conditions, malgré ton emploi du temps surchargé. Merci d'avoir toujours cru en moi, même quand ça oscillait de mon côté. Je n'oublie pas aussi les nombreuses heures de travaux pratiques dispensées à la faculté de pharmacie. Merci de m'avoir permis de découvrir le monde de l'enseignement durant deux années. Je te remercie aussi pour ta bonne humeur, ton enthousiasme, ton humour (le poisson rouge restera dans les annales !), tes nombreux conseils sur mes choix de parcours futur et pour m'avoir permise de participer à autant de congrès. Il sera compliqué de retrouver un encadrant avec une personnalité aussi belle que la tienne ! Je te souhaite tout le meilleur pour le futur, tu le mérites.

Je remercie également mon co-encadrant « non officiel », le **Dr. Jérémie Le Goff**. Merci pour ton investissement sur les différents aspects de ma thèse, pour les nombreuses heures de correction de la revue suivi par la correction du manuscrit. La chimiste que je suis a mangé beaucoup de biologie en ta présence. Merci pour cette petite pointe d'humour au quotidien qui me permettait de rester zen malgré les aléas de la thèse. J'espère que le jeune Padawan aura été à la hauteur de son altesse sérénissime !

Je remercie ensuite **Isabelle Vaudorne** et **Stéphanie Lagadu**, deux techniciennes sans lesquelles je serais bien loin de tous ces résultats de thèse. Isabelle, merci pour ton aide

pour la culture cellulaire, pour les nanobilles (elles nous auront bien fait souffrir ces petites !!) et pour les nombreuses heures passées sur la purification des adduits, une vraie pro ! Stéphanie, merci de m'avoir aidé avec l'identification de ces petits adduits. Bizarrement, la masse fonctionnait toujours bien mieux quand le grand Manitou était juste à côté de nous ! Et merci pour ces congrès avec toi, pour m'avoir aidé à gérer le stress des présentations et pour cette petite souris au restaurant, la cerise sur le gâteau !

Je remercie ensuite sincèrement les différents acteurs qui ont participé à la réalisation de cette thèse. Pour le côté biologique, tout d'abord **Emilie Brotin** pour avoir réalisé tous les tests dont je ne connaissais pas l'existence. Merci pour ton aide précieuse (même durant les jours fériés !), tes conseils et ta bonne humeur. **Edwige**, merci pour l'entretien impeccable de mes petites cellules et pour la rapide formation que tu m'as fait. Elles n'auront jamais aussi bien poussé qu'entre tes mains (ça doit être à cause de la petite musique que tu leur chantes...). Je remercie aussi **Marilyne Guillamin**, technicienne de la plateforme de cytométrie, pour ton efficacité de travail et ton énorme gentillesse. Concernant les chimistes, je souhaiterais remercier le **Dr. Thomas Cailly** et le **Dr. Victor Babin** pour leur chaleureux accueil au sein du laboratoire et pour les nombreuses tentatives de réduction de mes oxy-HAP. Merci à **Christine** qui m'a encadré dès mon arrivée malgré ses nombreuses activités.

Comment ne pas remercier mes collègues doctorants, ex-doctorants et stagiaires qui m'ont accompagné tout au long de cette thèse. **Antoine D., Quentin, Samia, Héléna, Tess, Rebecca et Antoine G.** Je n'oublierai jamais ces années avec vous, cette bonne humeur au quotidien, nos soirées sushi, pizza, raclette, jeux de société, ... Vous avez été des collègues en or, je ne vous en remercierai jamais assez.

Pour finir, que serais-je aujourd'hui sans **ma famille** ... Je remercie tout particulièrement **ma maman et mon papa** pour m'avoir poussé à l'école depuis ma tendre enfance. Merci d'avoir toujours tout donné pour nous, de nous avoir permis d'avoir un foyer serein qui fait ce que nous sommes à présent. Grâce à vous, j'ai pu réaliser mes rêves dont celui de partir en Erasmus en République Tchèque. Bien que cette expérience vous a refroidi au tout début, elle a été extraordinaire et restera inoubliable. Viens ensuite mes frères et sœurs, **Elodie, Florian, Tom**, ma petite **Poppy** et mon meilleur ami **Baptiste**, grâce à qui je me sens bien dans ma peau au quotidien. Merci !

Le meilleur pour la fin, l'homme de ma vie, mon *iron-man*, **Stéphane**. Le hasard est tellement bien fait que tu as une page rien que pour toi ... Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu m'apportes au quotidien. En plus de m'avoir « supportée » pendant ces quelques mois de rédaction, tu as su m'épauler, me distraire et me redonner le sourire à chaque instant. Tu as tant de qualités que ces quelques phrases ne suffiront jamais pour décrire ce que nous vivons tous les deux. Le meilleur est à venir et cela ne fait que commencer. Merci ...

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	9
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES TABLEAUX.....	13

Avant-propos	15
---------------------------	----

CHAPITRE 1.	21
-------------------------	----

Dérivés oxygénés des HAP (oxy-HAP) : contaminations environnementales et évaluation du risque génotoxique et mutagène pour l'Homme.	21
---	----

I. Etat de l'art : évaluation du risque cancérigène lié à l'exposition aux HAP et leurs dérivés.....	23
I.1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).....	23
I.2. Les HAP oxygénés	26
I.2.1. Contexte d'étude	26
I.2.2. Article n°1: Oxy-PAHs: occurrence in the environment and potential genotoxic/mutagenic risk assessment for human health	28
I.3. Utilisation des biomarqueurs en lien avec l'exposition aux HAP et oxy-HAP	56
I.4. Les adduits à l'ADN : biomarqueurs de dose efficace.....	58
I.4.1. Définition des adduits à l'ADN.....	58
I.4.2. Cinétique de formation et d'élimination des adduits à l'ADN.....	60
I.4.3. Signification biologique des adduits à l'ADN	63
II. Sélection de 7 oxy-HAP d'intérêt	69

CHAPITRE 2.	73
-------------------------	----

Etudes in vitro de cytotoxicité et du caractère mutagène dans l'évaluation du risque des 7 oxy-HAP prioritaires.	73
---	----

I. Démarche méthodologique	75
I.1. Test MTS : test de prolifération cellulaire	75
I.2. La mort cellulaire	76
I.2.1. Test CellTox™ Green.....	76
I.2.2. Les mécanismes de mort cellulaire : apoptose vs nécrose	77
I.2.3. Les caspases-3/7 : médiateurs cellulaires d'apoptose	79
I.3. Etude du cycle cellulaire	82

I.3.1. Les points de contrôle du cycle cellulaire	82
I.3.2. Inhibition et promotion du cycle cellulaire	83
I.4. Mutagénicité	85
I.5. Résumé de la démarche méthodologique	87
II. Matériel et méthodes	88
II.1. Culture cellulaire	88
II.2. Test MTS : test de prolifération cellulaire.....	88
II.3. Cinétique de la cytotoxicité : test CellTox™ Green	89
II.4. Quantification cinétique des caspases-3/7 pour l'étude du processus d'apoptose	90
II.5. Cytométrie en flux.....	91
II.6. Etude du caractère mutagène : test d'Ames	92
II.6.1. Principe	92
II.6.2. Analyses statistiques	94
III. Résultats	94
III.1. Optimisation des conditions de culture des cellules BEAS-2B.....	94
III.1.1. Influence du nombre de passages sur les tests de cytotoxicité.	94
III.1.2. Influence de la confluence cellulaire sur les tests de cytotoxicité	96
III.2. Article n°2: Evaluation of cytotoxicity and mutagenicity of 7 oxy-PAHs.	97
IV. Discussion et conclusions.....	125
CHAPITRE 3.	129
Formation et identification d'adduits à l'ADN aux oxy-HAP dans le cadre de l'évaluation du risque génotoxique.	129
I. Principales méthodes de détections des dommages à l'ADN	132
II.1. Le test des comètes.....	132
II.2. Les méthodes immunologiques	133
II.3. Phosphorylation des histones H2AX	134
II.4. Le post-marquage au phosphore 32.....	135
II.5. La chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse.....	137
II.6. Critère de choix des méthodes.....	140
II. Réactivité des oxy-HAP vis-à-vis des nucléosides.	142
III. Synthèse des adduits à l'ADN	144
III.1. Adduits de la 1,2-naphthoquinone	144

III.1.1. Article n°3: Synthesis, purification and characterization of stable deoxyguanosine adducts of 1,2-naphthoquinone, an oxydated metabolite of naphthalene (soumise dans Talanta).....	144
III.1.2. Bilan sur la synthèse des adduits à la 1,2-naphthoquinone.....	166
III.2. Adduits de la 7,12-benz[<i>a</i>]anthracènequinone.....	167
III.2.1. Article n°4: Synthesis and characterization of new DNA adduct with oxy-PAH: stable deoxyguanosine adducts of 7,12-benz[<i>a</i>]anthracenequinone (à soumettre dans Analytica Chimica Acta).....	167
III.2.2. Bilan sur la synthèse des adduits à la 7,12-benz[<i>a</i>]anthracenequinone	185
III.3. Adduits de la 6 <i>H</i> -benzo[<i>cd</i>]pyrene-6-one	185
III.3.1. Article n°5: Synthesis and characterization of new DNA adduct with oxy-PAH: stable deoxyguanosine adducts of 6 <i>H</i> -benzo[<i>cd</i>]pyrene-6-one (à soumettre dans Analytica Chimica Acta).....	186
III.3.2. Bilan sur la synthèse des adduits à la 6 <i>H</i> -benzo[<i>cd</i>]pyrene-6-one	201
III.4. Adduits à l'ADN sur cellules BEAS-2B.....	201
III.4.1. Matériel & méthodes	202
III.4.1.a. Culture cellulaire	202
III.4.1.b. Exposition aux oxy-HAP.	202
III.4.1.c. Recueil des cellules - extraction de l'ADN - hydrolyse	202
III.4.1.d. Post-marquage au phosphore 32	203
III.4.2. Résultats & discussion	203
IV. Discussion et conclusion	204
Discussion générale	209
Conclusion et perspectives	217
Références.....	221
ANNEXES	255

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

- 1,2-NphQ : 1,2-naphthoquinone
- 2'-dG : 2'-deoxyguanosine
- 2'-dX : 2'-deoxyxanthosine
- 8-oxodG : 8-oxo-7,8-dihydroxy-2'-deoxyguanosine
- 9,10-AQ : 9,10-anthraquinone
- ADN : Acide désoxyribonucléique
- AhR : récepteurs aryl-hydrocarbure
- ARN : Acide ribonucléique
- BANTone : 7*H*-benz[*de*]anthracène-7-one
- BaP : benzo[*a*]pyrène
- BAQ : 7,12-benz[*a*]anthracènequinone
- B[*b*]FO : 11*H*-benzo[*b*]fluorène-11-one
- BER : Réparation par excision de paires de bases
- BEAS-2B : cellules épithéliales bronchiques humaines immortalisées et non cancéreuses
- BPDE : 7,8-dihydroxy-9,10-époxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyrène
- BPO : 6*H*-benzo[*cd*]pyrène-6-one
- BSA: Bovin serum albumin (albumine de sérum bovin)
- CAD: caspase-activated DNase
- CCS: Collision cross section (section efficace de collision)
- CDK : cyclin-dépendent kinase
- CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer
- CYP450 : cytochrome P450
- DFF40/45 : DNA fragmentation factor
- DMF : N,N-diméthylformamide
- DMSO : diméthylsulfoxyde
- E. Coli : Escherichia Coli

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

GC/MS : chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

ICAD : Inactive caspase-activated DNase

IMS : Ion Mobility Spectrometry (Spectrométrie de Mobilité Ionique)

INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

MoA : Mode of action (mode d'action)

MTS : 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium

NCQ : 5,12-naphtacènequinone

NER : Réparation par excision de nucléotides

Nitro-HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques nitrés

Oxy-HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques oxydés

OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique

PAC : Polycyclic Aromatic Compounds (Composés Aromatiques Polycycliques)

PBS : Phosphate buffered saline

RAL : Relative Adducts Levels (taux relatif d'adduits)

SDS : dodécylsulfate de sodium

SRM : Standard Reference Material (matériau standard de référence)

SRM 1650b : Matériel standard de référence associé aux particules de diesel

ToF : Time of Flight (temps de vol)

UHPLC-IMS/QToF/HRMS : Chromatographie liquide haute performance couplée à la mobilité ionique et à la spectrométrie de masse haute résolution

UHPLC-MS/MS : Chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en tandem

U.S. EPA : agence américaine pour la protection de l'environnement

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Modèle de transport des HAP et des oxy-HAP dans l'environnement (adaptée de Suess <i>et al.</i> 1976 et Abdel-Shafy <i>et al.</i> , 2016).....	27
Figure 2. Le continuum des biomarqueurs dans la recherche d'une association entre l'exposition et l'apparition du cancer (adapté de Perera et Weinstein, 2000).....	58
Figure 3. Voies de détoxification des adduits du benzo[a]pyrène-7,8-dione (adapté de Clergé <i>et al.</i> 2019).....	60
Figure 4. Sites réactifs des bases de l'ADN (adapté de Tretyakova, Goggin, and Janis 2012).....	62
Figure 5. Comparaison de la durée de vie des adduits à l'ADN par rapport aux adduits aux protéines (d'après Henderson <i>et al.</i> , 1989).....	64
Figure 6. Mécanisme de cancérogenèse génotoxique (adapté de Farmer, 2004).....	65
Figure 7. Evènements clé du concept MoA.....	67
Figure 8. Réduction du composé de tétrazolium MTS en produit de formazan.....	76
Figure 9. Mode d'action du CellTox™ Green sur les cellules en mort cellulaire (tirée de "CellTox™ Green Cytotoxicity Assay Cell Death Assay Cytotoxicity" n.d.).....	77
Figure 10. Représentation schématique de l'apoptose et de la nécrose (reproduite à partir de Robertson et Orrenius 2000).....	78
Figure 11. Proposition de mécanisme impliquant les caspases dans le processus d'apoptose (adapté de Robertson et Orrenius 2000 et Li <i>et al.</i> 1997).....	80
Figure 12. Le cycle cellulaire et l'intervention des complexes CDK-cyclines dans la progression des cellules (adaptée de Grunwald, Mayol, and Ronot 2010).....	83
Figure 13. Résumé de la démarche méthodologique portant sur l'évaluation de la cytotoxicité et du caractère mutagène des oxy-HAP prioritaires.....	87
Figure 14. Protocole de réalisation du test d'Ames grâce à l'utilisation du kit Xenometrics.....	93

Figure 15. Impact du nombre de passages des cellules BEAS-2B observé sur les courbes de cytotoxicité du test MTS. A. Passage n°10. B. Passage n°40.....	95
Figure 16. Impact de la confluence cellulaire sur les cellules BEAS-2B observé grâce au test du CellTox™ Green. A. 20 000 cellules par puit. B. 10 000 cellules par puit. C. 7 000 cellules par puit.....	96
Figure 17. Conséquences biologiques des dommages à l'ADN.....	127
Figure 18. Etapes de la technique du post-marquage au phosphore 32.....	136
Figure 19. Représentation schématique de la source électrospray et du triple quadripôle utilisés durant cette étude.....	139
Figure 20. Mécanisme proposé concernant la formation des adduits à l'ADN (adaptée de McCoull <i>et al.</i> 1999 et de Balu <i>et al.</i> 2004)	143
Figure 21. Résultats des analyses en post-marquage après exposition des cellules BEAS-2B aux trois oxy-HAP d'intérêt.....	204
Figure 22. Synthèse des nanobilles magnétiques et caractérisation par microscopie électronique à balayage.....	207
Figure 23. Résultats de l'immobilisation des enzymes sur nanobilles magnétiques.....	207

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Classification des HAP selon l'U.S. EPA (Etats-Unis) et le CIRC (International). Groupe 1 : substance cancérigène ; Groupe 2A : substance probablement cancérigène ; Groupe 2B : substance possiblement cancérigène ; Groupe 3 : substance inclassable quant à sa cancérigénicité (Straif <i>et al.</i> 2005; Keith 2015; Cancer environnement 2018).....	25
Tableau 2. Avantages et inconvénients des adduits à l'ADN et aux protéines.....	66
Tableau 3. Principales méthodes utilisables pour la recherche de dommages à l'ADN. - : pas applicable * : inconvénient **** : avantage.....	141
Tableau 4. Concentrations d'exposition sur cellules BEAS-2B.....	202

Avant-propos

Avant-propos

En France métropolitaine, le nombre de nouveaux cas de cancer pour l'année 2018 est estimé à 382 000 selon l'Institut national du cancer (INCa, "Le cancer en chiffres, Fondation ARC pour la recherche sur le cancer"). L'incidence des cancers est en continuelle augmentation depuis 1980 (Institut National du Cancer 2017). En France, ils représentent la deuxième cause de mortalité chez la femme après les maladies cardiovasculaires (Inserm-CepiDc 2019) et la première cause chez l'homme. Les modifications environnementales telles que l'augmentation des différents types de pollution (sols, eau, air, nucléaire, ...) semblent être liées au développement de ces pathologies.

La révolution industrielle, caractérisée par la prolifération industrielle associée au déploiement des véhicules personnels, de l'industrie, du chauffage, etc. a occasionné le développement d'une pollution de l'air, des eaux et des sols (Holgate *et al.* 1999). L'impact de cette pollution (classée comme cancérigène avéré par le centre international de recherche sur le cancer (CIRC), Loomis *et al.* 2013; Straif, Cohen, and Samet 2013) sur la santé est considérable et a entraîné la mise en place de contrôles des émissions dans de nombreux pays associés à la fixation de limites réglementaires (Jarrige 2011). Cependant, différents facteurs de risque tels que les caractéristiques innées ou acquises viennent moduler la susceptibilité de chaque individu dans le développement d'une pathologie. L'exposition aux composés présents dans l'environnement peut se faire soit par inhalation, par ingestion ou par voie transdermique. La part relative de l'environnement et des facteurs génétiques dans l'étiologie des cancers n'est pas simple à déterminer. Pour caractériser cette exposition, le concept de l'exposome a été développé en 2005 par Christopher Paul Wild en complément de l'étude génomique. Il peut être défini comme l'association de toutes les expositions auxquelles l'homme est soumis durant sa vie (Wild 2012). Malgré cela, peu de composés ont fait l'objet d'une évaluation approfondie quant à leur dangerosité.

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) constituent une famille de composés chimiques largement étudiée (Benoit, LeBel, and Williams 1979; Baek *et al.*

1991; Cerniglia 1992; Allen *et al.* 1997; Bekki *et al.* 2009; Abdel-Shafy and Mansour 2016; Ewa and Danuta 2017). Ces composés sont très présents dans l'environnement de par l'augmentation de leur émission, leur persistance et leur potentiel de bioaccumulation. Au sein des nombreux congénères composant la famille de HAP, plusieurs ont démontré l'induction de toxicité sur le développement, de cancérogénicité, de mutagénicité, de perturbation de la fonction cardiaque et d'immunotoxicité chez les organismes exposés (IARC 2010; Dasgupta *et al.* 2014). Une liste de 16 HAP prioritaires a été créée dans les années 1980 par l'agence américaine pour la protection de l'environnement (U.S. EPA). Cependant, la pertinence de cette liste peut être remise en question aujourd'hui car depuis, des études ont démontré que la toxicité de la fraction des HAP non substitués et molécules apparentées est généralement supérieure à celle des 16 HAP prioritaires cumulés (Andersson and Achten 2015). En conséquence, d'autres composés tels que les HAP nitrés (nitro-HAP) et les HAP oxygénés (oxy-HAP) peuvent être incriminés. Les oxy-HAP ont été très peu étudiés concernant leur occurrence, leur devenir et leurs effets contrairement aux nitro-HAP. Quelques études de mutagénicité ont été menées sur un nombre limité d'oxy-HAP et leurs résultats sont sans équivoque concernant la préoccupation qu'ils représentent (Moller, Hagen, and Ramdahl 1985; Durant *et al.* 1996; Misaki, Matsui, and Matsuda 2007a; Bekki *et al.* 2009; Dasgupta *et al.* 2014; Larsson *et al.* 2014; Misaki *et al.* 2016; Wincent, Bihanic, and Dreij 2016).

En complément des mesures environnementales, la surveillance biologique des expositions aux agents chimiques, dite biométrie, pourrait permettre d'évaluer l'impact de l'exposition aux oxy-HAP chez l'homme. Cependant, ces mesures possèdent des limitations telles que l'absence d'informations concernant les voies d'absorption d'un composé dans l'organisme. Les agents chimiques considérés cancérogènes peuvent être classés en fonction de leur mode d'action : (i) ils peuvent avoir une action directe sur les cellules nécessitant ou non une activation métabolique ; on parle d'agent cancérogène génotoxique quand la substance chimique agit directement sur les gènes contrairement au cancérogène non génotoxique qui agit indirectement en favorisant la prolifération du processus de cancérogenèse (INSERM 2005); (ii) ils peuvent agir par interaction avec le système endocrinien induisant des effets nocifs sur l'homme et/ou sa descendance ; on parle alors de perturbateur endocrinien (INSERM 2008). Certains oxy-HAP sont considérés comme des agents cancérogènes génotoxiques directs puisqu'ils ne

nécessitent pas d'activation métabolique pour être toxiques (Clergé *et al.* 2019). Afin de prédire l'apparition du cancer et d'améliorer sa prévention, des marqueurs biologiques, dit biomarqueurs, doivent être développés de manière à évaluer l'impact de ces molécules génotoxiques pour l'Homme. Cependant, concernant les oxy-HAP, le développement de ces biomarqueurs en est encore à un stade précoce et fait l'objet des travaux décrits dans cette thèse. L'évaluation de la génotoxicité est donc impactée par le manque d'outils capables de rendre compte de façons précoces des dommages à l'ADN susceptibles de participer à la cancérogenèse.

Ce travail de thèse a été consacré à l'évaluation de la génotoxicité et de la mutagénicité des oxy-HAP associée au développement de biomarqueurs pertinents que sont les adduits à l'ADN.

Le premier chapitre bibliographique a pour objectif de faire une synthèse des données disponibles concernant les sources, le devenir et l'occurrence des oxy-HAP dans les différents compartiments de l'environnement. De ce travail d'analyse bibliographique résulte la rédaction d'une revue scientifique (Clergé *et al.* 2019). Les travaux concernant leur génotoxicité, leur mutagénicité et leur potentiel d'activation tumorale seront regroupés permettant de mettre l'accent sur le fait que leur omission entraîne une dramatique sous-estimation de la toxicité de ces molécules. Dans le cadre de l'étude de la génotoxicité des oxy-HAP, il s'est avéré nécessaire de développer des biomarqueurs d'exposition permettant d'influencer ou de prédire l'apparition d'effets délétères ou de maladies chez l'homme. Ce premier chapitre se terminera par la sélection de 7 oxy-HAP pertinents possédant un potentiel cancérogène/génotoxique au regard de la littérature.

Le deuxième chapitre sera consacré à l'évaluation de la cytotoxicité et de la mutagénicité de nos 7 oxy-HAP d'intérêt sur différents modèles cellulaires. La cytotoxicité est le premier critère d'évaluation non spécifique de la toxicité *in vitro*. Son évaluation permettra la sélection des doses d'exposition pour des études de toxicité plus fines, notamment en génotoxicité et en mutagénicité. La mutagénicité sera évaluée selon les recommandations de l'OCDE (organisation de coopération et de développement économique, OCDE 1997). Cette cytotoxicité peut entraîner l'apparition de mutations ou l'activation des mécanismes de mort cellulaire soit par nécrose ou soit par apoptose. Chaque mécanisme est représenté par des médiateurs spécifiques permettant la bonne

réalisation du processus. A travers ce chapitre, l'étude des oxy-HAP d'intérêt a permis la rédaction d'une publication regroupant des données nouvelles entraînant une meilleure évaluation de la toxicité de l'ensemble de la famille des oxy-HAP.

Le troisième chapitre sera dédié au développement des biomarqueurs que sont les adduits à l'ADN permettant de démontrer la génotoxicité de nos composés. Ces biomarqueurs nous permettront de mettre en évidence les mécanismes d'action des oxy-HAP sur l'ADN de par la mise en avant des sites d'action. Les adduits à l'ADN seront étudiés grâce à deux méthodes complémentaires : le post-marquage au phosphore 32 et la spectrométrie de masse. Ces biomarqueurs pourraient ensuite être utilisés pour la surveillance en santé humaine et dans l'environnement (biomonitoring). Sur trois molécules (1,2-naphthoquinone, 7,12-benz[*a*]anthracènequinone et 6*H*-benz[*cd*]pyrène-6-one), chaque développement a fait l'objet de la rédaction d'un article. Dans la perspective d'une utilisation de ces adduits dans le biomonitoring, les techniques employées doivent être optimisées pour les études à haut débit. Des résultats préliminaires seront présentés concernant l'évaluation de la faisabilité d'une immobilisation sur nanobilles magnétiques des enzymes nécessaires à l'hydrolyse de l'ADN.

CHAPITRE 1.

Dérivés oxygénés des HAP (oxy-HAP) : contaminations environnementales et évaluation du risque génotoxique et mutagène pour l'Homme.

CHAPITRE 1

Dérivés oxygénés des HAP (oxy-HAP) : contaminations environnementales et évaluation du risque génotoxique et mutagène pour l'Homme.

I. Etat de l'art : évaluation du risque cancérigène lié à l'exposition aux HAP et leurs dérivés

I.1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

Les composés aromatiques polycycliques (PAC) sont des polluants largement répandus dans les différents compartiments de l'environnement. Cette famille de polluants regroupe une grande variété de composés avec au moins deux cycles aromatiques et pouvant contenir différents groupements fonctionnels composés d'oxygène, d'azote ou de soufre. Parmi les PAC, certaines classes de composés, telles que les HAP, sont considérées comme plus préoccupantes pour la santé humaine et l'environnement. Ces composés sont constitués d'au moins deux cycles aromatiques et ne comportent que des carbones et des hydrogènes. Les sources de HAP dans l'environnement sont nombreuses. Ces molécules sont issues de la décomposition de la matière organique à des températures très élevées, de l'ordre de 500°C (Assink and Brink 2012). Cette décomposition est le plus souvent reliée aux activités humaines (transports, chauffage urbain, production d'énergie, incinération des déchets, ...). Selon leur nombre de cycles et leur poids moléculaire, les HAP sont présents dans l'atmosphère sous deux formes, gazeuse pour les plus légers (entre 2 et 4 cycles) et particulaire pour les plus hauts poids moléculaires. Les HAP liés aux particules représentent entre 70 et 80% des HAP totaux de l'atmosphère et sont adsorbés à la surface des particules carbonées en suspension dans l'air (Rehwagen *et al.* 2005). Sous l'influence de différents facteurs (phénomènes météorologiques, retombée atmosphérique ou effluents urbains et/ou routiers), ces particules vont se reprendre dans les différents compartiments de l'environnement et vont

entraîner une exposition continue de l'homme par voie aérienne principalement. Cette exposition peut résulter en le développement de pathologies telles que le cancer.

Percivall Pott est considéré comme le précurseur de l'épidémiologie des cancers suite à son étude clinique, publiée en 1775, sur le cancer du scrotum des enfants ramoneurs, en lien avec l'exposition aux suies qui ont par la suite été reconnues comme riches en HAP (Pott 1775). Ce pouvoir cancérigène a été confirmé dans les années 1914-1916 par Katsusaburō Yamagiwa qui fut le premier à provoquer un cancer chez l'animal par exposition cutanée aux mélanges de HAP contenus dans le goudron (Fujiki 2014). La génotoxicité des HAP fut ensuite démontrée en 1964 par l'établissement de la relation entre la lésion à l'ADN et l'apparition des cancers sur la peau de souris (Brookes and Lawley 1964). Depuis, les études se sont succédées et ont montré que de nombreux HAP étaient mutagènes, qu'ils entraînaient une immunotoxicité et une perturbation de la fonction cardiaque chez les organismes exposés (S. Wang *et al.* 2007; IARC 2010; Dasgupta *et al.* 2014). De plus, des études épidémiologiques ont démontré qu'une exposition aux HAP entraînait une augmentation de la probabilité d'une survenue de cancers du poumon, de la peau et de la vessie dans divers secteurs professionnels (Denissenko *et al.* 1996; Mastrangelo, Fadda, and Marzia 1996; Boffetta, Jourenkova, and Gustavsson 1997; Wichmann 2007).

Les résultats de ces différentes études ont entraîné la mise en place de plusieurs listes regroupant des HAP considérés comme prioritaires pour les analyses environnementales et toxicologiques. La première liste a été créée en 1976 par l'U.S. EPA et regroupe 16 HAP considérés comme particulièrement toxiques pour l'homme (Tableau 1). Cette liste a atteint l'autorité d'un document juridique et les 16 composés nommés « HAP prioritaires » ont été intégrés de manière systématique dans un grand nombre d'études environnementales. Cette liste a été créée suivant trois critères décisifs réalisables à cette époque : (i) disponibilité des standards analytiques et capacité de dosage par les techniques analytiques du moment, (ii) occurrence élevée dans l'environnement et (iii) toxicité bien déterminée. Par exemple, le benzo[*a*]pyrène (BaP) est l'un des premiers HAP prioritaire à avoir été découvert. Par conséquent, son activité cancérigène/mutagène a été largement décrite (Durant *et al.* 1996; Balu *et al.* 2004, 2006; M. Huang *et al.* 2012; Sen *et al.* 2012; M. Huang, Blair, and Penning 2013).

Tableau 1. Classification des HAP selon l'U.S. EPA (Etats-Unis) et le CIRC (International). **Groupe 1** : substance cancérigène ; **Groupe 2A** : substance probablement cancérigène ; **Groupe 2B** : substance possiblement cancérigène ; **Groupe 3** : substance inclassable quant à sa cancérigénicité (Straif *et al.* 2005; L. H. Keith 2015; Cancer environnement 2018).

HAP	Classification U.S. EPA	Classification CIRC
Benzo[a]pyrène	x	1
Cyclopenta[cd]pyrène	-	2A
Dibenzo[a,h]anthracène	x	2A
Dibenzo[a,i]pyrène	-	2A
Benz[<i>j</i>]aceanthrylène	-	2B
Benz[a]anthracène	x	2B
Benzo[b]fluoranthène	x	2B
Benzo[<i>j</i>]fluoranthène	-	2B
Benzo[k]fluoranthène	x	2B
Benzo[c]phenanthrène	-	2B
Chrysène	x	2B
Dibenzo[a,h]pyrène	-	2B
Dibenzo[a,i]pyrène	-	2B
Indéno[1,2,3,c,d]pyrène	x	2B
5-méthylchrysène	-	2B
Naphtalène	x	2B
Benzo[g,h,i]pérylène	x	3
Anthracène	x	3
Acénaphtène	x	3
Acénaphtylène	x	
Fluoranthène	x	3
Fluorène	x	3
Phénanthrène	x	3
Pyrène	x	3
Pollution aérienne	-	1
gaz d'échappement des moteurs diesel	-	1
gaz d'échappement de moteurs essence	-	2B

En 2002, le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) a proposé une seconde liste de HAP regroupant des « cancérogènes avérés » (classe 1), des « cancérogènes probables » (2A) et des « possibles cancérogènes » (classe 2B, Straif *et al.* 2005). Une réévaluation a été réalisée en 2008 entraînant la sélection de 22 composés (tableau 1, Cancer environnement 2018). Cette liste comporte 7 composés considérés comme inclassable quant à leur cancérogénicité (classe 3).

Cependant, de nombreuses études réalisées tout autour du monde soulignent de grandes différences entre l'activité mutagène (donc potentiellement cancérogène) des HAP considérés prioritaires et celle associée à la fraction globale des HAP et leur dérivés (Lundstedt *et al.* 2007; Andersson and Achten 2015; Pálková *et al.* 2015). L'équipe d'Umbuzeiro a montré, par l'utilisation du test d'Ames (méthode décrite dans la partie II du chapitre 2) que la mutagénicité de la fraction des oxy-HAP et des nitro-HAP (extraites de particules fines prélevées à São Paulo au Brésil) était bien supérieure à celle des HAP (Umbuzeiro *et al.* 2008). De plus, ce caractère mutagène a été associé à une forte génotoxicité mise en évidence par la détection de dommages à l'ADN. Ces résultats sont concordants avec l'étude de Barron et Holder démontrant que le risque pour l'Homme est sous-estimé de 40 à 70 fois lorsque l'on ne se concentre que sur la fraction des HAP non substitués (Barron and Holder 2003). Il est donc maintenant reconnu que d'autres HAP ainsi que leur dérivés oxydés, nitrés et alkylés doivent être intégrés dans les études de génotoxicité et de mutagénicité.

I.2. Les HAP oxygénés

I.2.1. Contexte d'étude

Les dérivés oxydés des HAP, dits oxy-HAP, sont constitués d'au moins un atome d'oxygène substitué aux cycles aromatiques et sont plus solubles dans l'eau que les HAP parents. Ces composés ont été très peu étudiés en terme de toxicité. Ils sont considérés comme des polluants secondaires et sont formés par dégradation biologique (Cerniglia 1992), par oxydation chimique (Kochany and Maguire 1994; Lee, Iso, and Hosomi 2001) ou à partir de la phototransformation des HAP parents (Kochany and Maguire 1994; Mallakin *et al.* 1999). Lorsqu'ils sont recherchés, les oxy-HAP sont détectés dans les sols

(de l'ordre du $\mu\text{g/g}$, Brooks *et al.* 1998; Meyer, Cartellieri, and Steinhart 1999; Eriksson, Dalhammar, and Borg-Karlson 2000), dans l'eau (de l'ordre du ng/g ou du ng/L , Machala *et al.* 2001; Lundstedt, Haglund, and Oberg 2003; Kurihara *et al.* 2005; Layshock, Wilson, and Anderson 2010) et dans l'air (de l'ordre du $\mu\text{g/g}$, Wingfors, Hägglund, and Magnusson 2011; Ringuet *et al.* 2012; Nocun and Schantz 2013; Fujiwara *et al.* 2014; Huang *et al.* 2014; Keyte, Albinet, and Harrison 2016; Tomaz *et al.* 2016) à des concentrations similaires à celles des HAP et dix fois plus importantes que celles des nitro-HAP (Albinet *et al.* 2007; S. Wei *et al.* 2012; Huang *et al.* 2014; C. Wei *et al.* 2015; Bandowe and Nkansah 2016; Harrison *et al.* 2016; Tomaz *et al.* 2016; de Oliveira Galvão *et al.* 2018). Les dérivés les plus courants sont les oxy-HAP de type cétones et quinones. Suite aux retombées atmosphériques en lien avec les processus de combustion, aux effluents urbains et/ou routiers et au déversement de pétrole, des transferts d'oxy-HAP sont réalisés entre les différents compartiments de l'environnement où ils pourront s'accumuler (Figure 1, Suess 1976; Ramdahl 1983; Wischmann and Steinhart 1997; Meyer, Cartellieri, and Steinhart 1999; Meyer and Steinhart 2001; Abdel-Shafy and Mansour 2016). Les organismes vivants sont donc exposés à de faibles concentrations d'oxy-HAP de manière chronique.

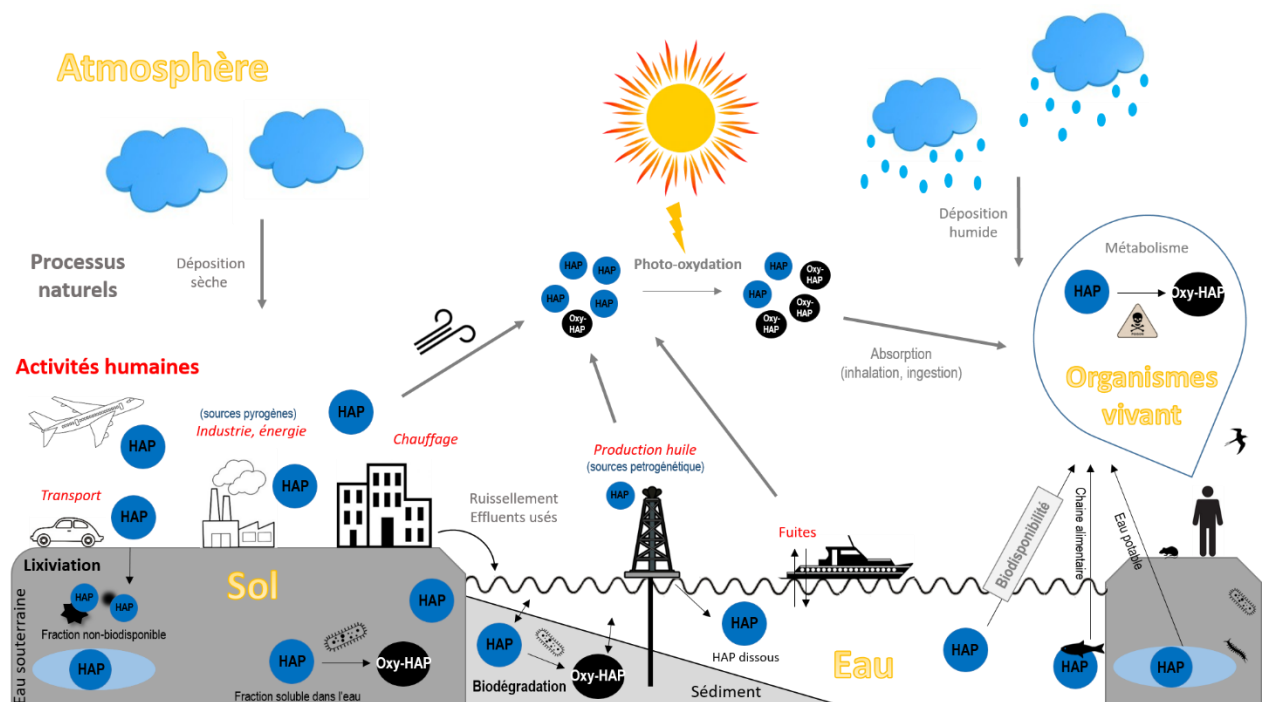



Figure 1. Modèle de transport des HAP et des oxy-HAP dans l'environnement (adaptée de Suess *et al.* 1976 et Abdel-Shafy *et al.*, 2016)

Du fait de leur action mutagène directe supposée, il semblerait que les oxy-HAP soient plus toxiques que les HAP dont ils proviennent (Andersson and Achten 2015). Les effets mutagènes/génotoxiques observés sont des plus en plus souvent associés aux fractions contenant des oxy-HAP, démontrant ainsi que ce sont des composés très préoccupants et que leur omission entraîne une sous-estimation dramatique du risque de cancer.

1.2.2. Article n°1: Oxy-PAHs: occurrence in the environment and potential genotoxic/mutagenic risk assessment for human health

Nous avons donc montré que les HAP sont des composés très étudiés du fait de leur forte présence dans l'environnement et de la création des listes de HAP prioritaires. Cependant, ces données n'expliquent pas l'entière toxicité de la classe des HAP. Afin de situer le contexte d'étude de cette thèse, il nous a semblé opportun de passer en revue toutes les données bibliographiques disponibles concernant les oxy-HAP. Ces recherches ont donné lieu à la rédaction d'une revue dans le journal « Critical review in toxicology » (IF 2018 : 4.771, reproduite avec l'autorisation de l'éditeur, le 13 septembre 2019) et rassemblent dans un premier temps les sources et le devenir de ces composés dans l'environnement, mettant ainsi en avant l'importante exposition de l'homme à ces composés. D'autre part, les études préliminaires concernant la génotoxicité, le caractère mutagène et le potentiel de promotion tumoral sont regroupés de manière exhaustive. Cette revue permet de mettre en avant les données manquantes concernant les mécanismes de toxicité des oxy-HAP et les composés à étudier.

Oxy-PAHs: occurrence in the environment and potential genotoxic/mutagenic risk assessment for human health

Adeline Clergé^{a,b}, Jérémie Le Goff^c, Claire Lopez^a, Jérôme Ledauphin^a and Raphaël Delépée^{a,b,d} 

^aNormandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, ABTE, Caen Cedex, France; ^bComprehensive Cancer Center François Baclesse, UNICANCER, Caen Cedex, France; ^cAdn'Tox SAS, Caen Cedex, France; ^dNormandie Univ, UNICAEN, PRISMM core facility, SF4206 ICORE, CCC F. Baclesse, Caen, France

ABSTRACT

Structurally modified polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) such as nitrated PAHs (nitro-PAHs) and oxygenated PAHs (oxy-PAHs) can be incriminated in the total toxicity of polycyclic aromatic compounds (PACs) fraction in the environment. Compared to nitro-PAHs, oxy-PAHs have been poorly studied. Oxy-PAHs covers compounds with different moieties such as polycyclic aromatic ketones (PAKs) and polycyclic aromatic quinones (PAQs). In this review, we have compiled exhaustively all the data available on the sources, the fate, and the occurrence of oxy-PAHs focusing on the most ubiquitous ones in the environment, *ie* PAKs and PAQs. Data concerning their genotoxicity, mutagenicity and tumor promotion potential for humans are also provided based on the mode-of-action analysis framework. Mutagenicity results based on the limited number of oxy-PAHs tested, are unequivocal on the concern they represent. Their omission in mutagenic/carcinogenic risk has caused a dramatic underestimation of cancer risk. On the basis of environmental and genotoxicological data, we suggest prioritized 4 major oxy-PAHs molecules in ecotoxicological and toxicological studies, namely 6-*H*-benzo[*cd*]pyren-6-one (BPO), 7,12-benz[*a*]anthracenequinone (BAQ), 5,12-naphthacenequinone (NCQ) and 11-*H*-benzo[*b*]fluoren-11-one (B[*b*]FO). We also propose to develop biomarkers of exposure and/or risk for these compounds, for example by quantification of DNA adducts.

ARTICLE HISTORY

Received 18 May 2018
Revised 3 April 2019
Accepted 5 April 2019

KEYWORDS

Environmental chemical; oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons; cancer; genotoxicity; mutagenicity; systematic review

Table of contents

Introduction	1
Sources, fate and occurrence	2
<i>Environmental sources</i>	2
<i>Degradation</i>	4
<i>In vivo metabolic production</i>	4
Genotoxic and mutagenic risks of oxy-PAHs for human	8
<i>Exposure routes</i>	9
<i>Genotoxicity of oxy-PAHs</i>	11
<i>Other in vitro endpoints implicated in potential carcinogenic risk of oxy-PAHs</i>	13
<i>Perspectives and further data to collect</i>	22
Acknowledgements	23
Declaration of interest	23
ORCID	23
References	23

Introduction

Environmental monitoring and associated genotoxicity/mutagenicity studies are often based on the 16 priority list from the United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA)

and sometimes only on benzo[*a*]pyrene (BaP) (Durant et al. 1996; Balu et al. 2004; Huang et al. 2012; Sen et al. 2012; Huang et al. 2013). Nevertheless, other carcinogenic/mutagenic PAHs are regularly detected in the environment (IARC 2010). Numerous data from around the world emphasize great differences between concentration of these priority PAHs and the mutagenic activity associated with the global fraction of PAHs. As a consequence, it is now widely recognized that other PAHs and derivatives should be taken into account to explain the overall toxicity of samples. For example, Umbuzeiro et al. sampled urban particulate matter (UPM) in two sites of São Paulo (Brazil), taken during the summer of 2004 (Umbuzeiro et al. 2008). Using the conventional *in vitro* reverse mutation assay in *Salmonella thyphimurium* (Ames assay), the authors show unexpected negligible mutagenic activity of the organic extract following organic extraction of UPM containing the non-polar PAHs including those from the US EPA list. By contrast, more polar fractions showed a high mutagenic activity. These fractions are supposed to contain PAHs elimination or transformation compounds formed by sulfonation, nitration or photooxidation, and their derivatives. Among these secondary products, oxygenated PAHs (oxy-PAHs) and nitrogenated PAHs such as nitrated PAHs (nitro-PAHs) are the more worrying because of both specific toxicity and environmental occurrence.

CONTACT Raphaël Delépée  raphael.delepee@unicaen.fr  Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse, 3 Av. Général Harris, 14076 Caen cedex 05, FRANCE

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Structurally, oxy-PAHs fraction is composed of many oxy-PAHs including polycyclic aromatic ketones (PAKs), polycyclic aromatic quinones (PAQs), hydroxylated PAHs (hydroxy-PAHs), polycyclic aromatic carboxaldehydes, polycyclic aromatic carboxylic acids, polycyclic aromatic lactones and polycyclic aromatic anhydrides. These compounds have one or more oxygen atoms substituted into their rings and are more water soluble than parent PAHs. DNA adducts were observed with the oxy-PAHs fraction, revealing potential genotoxic adverse outcomes using a pathway related to one of the parent PAHs, for example BaP (Du Four et al. 2004). The study of solvent extracted fractions highlights the fact that a risk assessment strategy focusing on priority PAHs leads to a probable underestimation of the risk associated with the overall soil contamination. When placed alongside other findings, such results challenge the monitoring strategy of PAHs based on the 40-year-old priority PAH list.

In a more approximate approach to evaluate environmental PAC toxicity, BaP is frequently used as a PAC global marker; also, in animal studies the BaP indicator reflects as little as 20% of the cancer potency of a complex mixture of PACs (Gaylor et al. 2000). Taking these factors into account, the need for considering classes of PACs, like nitro-PAHs and oxy-PAHs, that have been so far neglected emerges. These compounds are increasingly detected in mutagenicity/carcinogenicity studies, thereby demonstrating the fact that their omission may cause a dramatic underestimation of cancer risks. However, to date, these compounds remain in the margins of cancer studies.

It also seems that some nitro-PAHs and oxy-PAHs are more toxic than their unsubstituted parent PAH. This greater toxicity is mainly due to both direct mutagenic potential and generally increased bioavailability (Andersson and Achten 2015). Among PAH derivatives, the most commonly studied are nitro-PAHs. Indeed, numerous studies describe the occurrence, fate, and effect of nitro-PAHs in the environment (Schuetzle 1983; Tokiwa et al. 1994; Talaska et al. 1996; Enya et al. 1997; 1998; Arlt 2005; Miller-Schulze et al. 2016). By contrast, only a very limited number of studies is available concerning oxy-PAHs. Because of their high oxidation state, oxy-PAHs have been proposed to be “dead-end products” of PAHs, making the toxicity of these compounds widely understudied in regard to their possible occurrence (Lundstedt et al. 2007). Several studies have found oxy-PAH concentrations to be comparable to, or of the same order of magnitude of unsubstituted PAH concentrations and thus about ten times higher than nitro-PAH concentrations (Albinet et al. 2007; Wei et al. 2012; Huang et al. 2014; Wei et al. 2015; Bandowe and Nkansah 2016; Harrison et al. 2016; Tomaz et al. 2016; de Oliveira Galvão et al. 2018).

The aim of this review is to provide a detailed assessment of the sources, the occurrence, and the flows of oxy-PAHs in the different compartments of the environment. An overview of available data concerning the genotoxicity, mutagenicity and tumor promotion potential of these compounds will also be provided. Finally, a list of 4 oxy-PAHs that could be considered of great importance will be suggested on the basis of these data and strategies including biomarkers will be

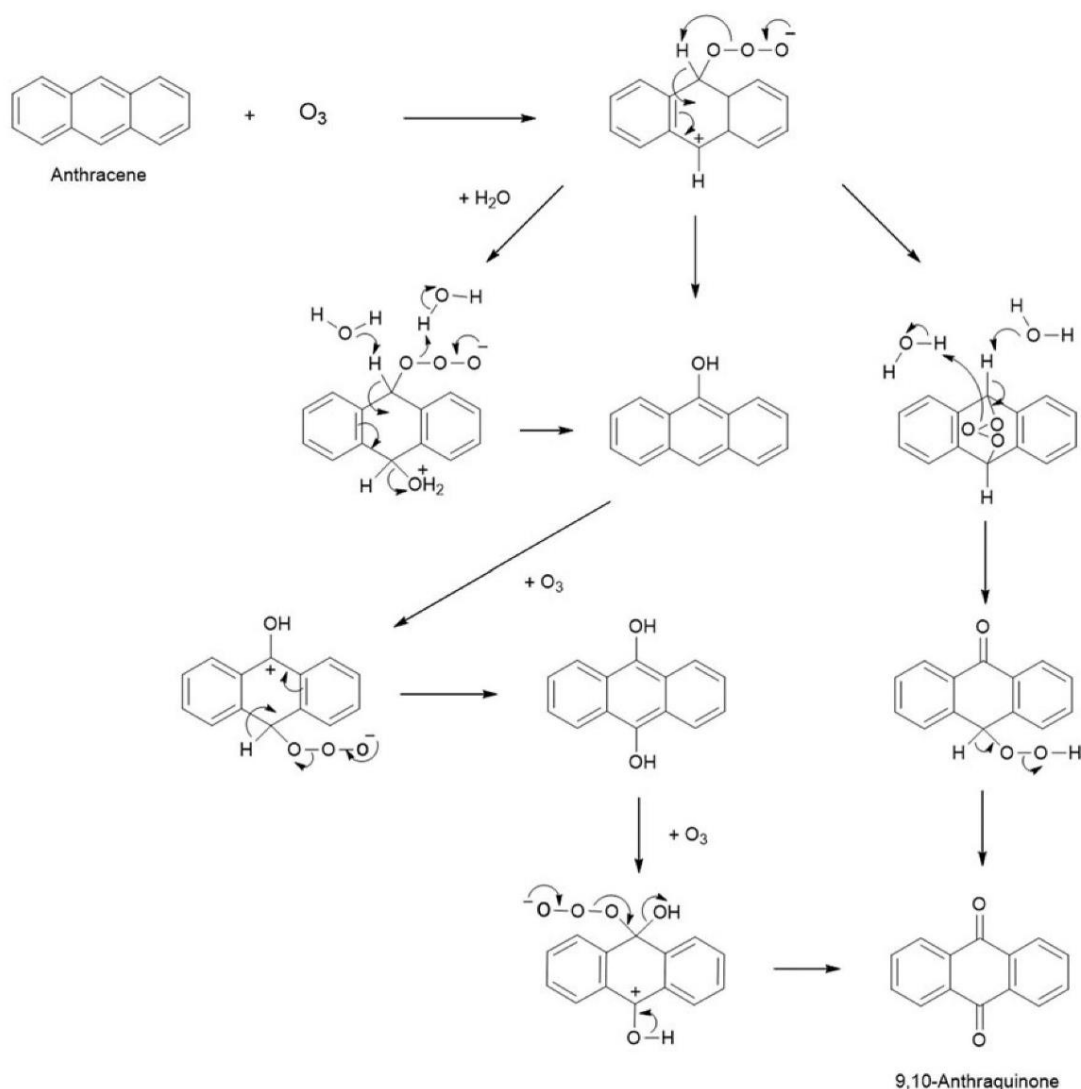
proposed to evaluate their potential Human health hazards and risks.

Sources, fate and occurrence

Environmental sources

In the environment, oxy-PAHs can be produced directly during incomplete combustion of organic matter at temperatures higher than 500 °C with insufficient oxygen (Layshock et al. 2010). The main anthropogenic primary sources of oxy-PAHs are diesel and gasoline exhaust (Choudhury 1982; Alsberg et al. 1985; Spitzer and Takeuchi 1995; Cho et al. 2004; Valavanidis et al. 2006; Layshock et al. 2010; Keyte et al. 2013; Nocun and Schantz 2013), gases produced from combustion processes (Ramdahl 1985; Souza et al. 2014) and fly ash (Akimoto et al. 1997).

Oxy-PAHs have also been demonstrated to be produced as secondary compounds from parent PAHs by means of photo-oxidation, chemical oxidation, or microbial/fungal oxidation. For most PAHs, the main reaction in the gas phase corresponds to the addition of OH radical, NO₃ radical or O₃ to the aromatic rings to form an energy-rich adduct (Atkinson and Arey 2007). Further reactions with NO₂ or O₂ yield to nitro-, oxy- derivatives compounds and ring-opened products. Some studies demonstrate this reactivity; (i) gas phase reaction of naphthalene with OH radicals yields to 1- and 2-naphthol which is mainly decomposed into 1- and 2-nitronaphthalene and 1,2- and 1,4-naphthoquinone (1,2-NphQ and 1,4-NphQ) (Keyte et al. 2013); (ii) Letzel et al. demonstrated the formation of 1,6-benzo[*a*]pyrenequinone (BaP-1,6-dione), 3,6-benzo[*a*]pyrenequinone (BaP-3,6-dione), and 6,12-benzo[*a*]pyrenequinone (BaP-6,12-dione) after the heterogenous reaction of BaP with ozone (Letzel et al. 1999); (iii) Wang et al. observed the formation of 9-fluorenone (9-FLU), dibenzopyranone, 9,10-phenanthrenequinone (9,10-PQ) and 2,2'-diformylbiphenyl from the reaction of the phenanthrene with O₃ in the gas phase (Wang et al. 2007). Bailey et al. proposed a possible mechanism for the reaction of anthracene with O₃ (Bailey 1982). In the Scheme 1, two pathways were proposed and lead to the formation of anthraquinone; (iv) polycyclic aromatic lactone can also be produced by the reaction of O₃ with PAHs (Miet et al. 2009). However, Kwok et al. showed that the reaction of O₃ with gas phase PAHs can be neglected under atmospheric conditions due to a slow reaction with aromatic rings. This reaction can't be considered as a significant degradation process or route to the formation of derivative products (Kwok et al. 1994). Similarly, Keyte et al. worked on the influence of the O₃ in the oxy-PAH concentration in air. They demonstrate that this concentration is highlighted by the suggested mechanisms of oxy-PAHs formation associated to the three rings PAH anthracene or to the four rings PAH pyrene (Scheme 1). This example illustrates the prevalence of quinone form as final product of complex reactions with hydroxylated compounds as intermediate products (Keyte et al. 2013). This study also demonstrates that PAH-NO₃ adducts can be degraded into PAQ products which increased oxy-PAH concentrations in the environment. All these studies



Scheme 1. Suggested mechanisms for the heterogeneous reaction of anthracene with O₃ (reproduced from Keyte et al. 2013, published by the Royal Society of Chemistry).

highlight that hydroxy-PAHs are intermediate of reaction, polycyclic aromatic lactones are too slow to be produced and that the main degradation products of PAHs are PAQs and PAKs. These data are supported by the lower hydroxy-PAHs and carboxy-PAHs concentrations detected in the environment compared to those of PAQs, PAKs or parent PAHs (Kishikawa et al. 2004; Kamiya et al. 2005; Barrado et al. 2012; Bandowe, Meusel et al. 2014). Therefore, the extensive review of the literature on the occurrence of the oxy-PAHs in the environment will be focused on PAQs and PAKs concentrations in the environment.

Many PAQs and PAKs have been found in UPM and ambient air (Fernandez and Bayona 1992b; Lewis et al. 1995; Durant et al. 1998; Hannigan et al. 1998; Niederer 1998; Schnelle-Kreis et al. 2001; Cho et al. 2004; Pedersen et al. 2005; Schnelle-Kreis et al. 2005; Albinet et al. 2006; Chung et al. 2006; Del Rosario Sienra 2006; Lintelmann et al. 2006; Valavanidis et al. 2006; Albinet et al. 2007; Wingfors et al. 2011; Cochran et al. 2012; Ringuet et al. 2012; Wei et al. 2012; Delgado-Saborit et al. 2013; Nocun and Schantz 2013;

Fujiwara et al. 2014; Keyte et al. 2016), and in urban aerosols (Bayona et al. 1994; Allen et al. 1997; Yassaa et al. 2001; Castells, Santos, and Galceran 2003; Davis 2006; Kojima et al. 2010; Huang et al. 2014; Di Filippo et al. 2015; Li et al. 2015; Lin et al. 2015; Tomaz et al. 2016; Nowakowski et al. 2017).

Air is the primary emission compartment for all PACs that are distributed between the gas phase and particulate matter (PM), according to physical parameters. To illustrate this distribution, a study was conducted on a large number of PACs in both the gaseous and particulate phases during 1 year at an urban site in Grenoble (Tomaz et al. 2016). This study confirms a relationship between gas/particle partitioning and physico-chemical parameters such as molecular weight and vapor pressure of pollutants. PACs of a molecular weight lower than 202 g/mol were mainly detected in the gaseous phase while heavier PACs (molecular weight higher than 252 g/mol) were largely associated with the particulate phase. Another study was conducted in a rural site of Pearl River Delta region which is one of the most populated regions in China (Huang et al. 2014). Influence of wind speed, solar

radiation, NO, NO_x, O₃ and SO₂ concentrations on the production of 6 PAKs and PAQs was studied. A positive correlation was obtained with SO₂ concentrations, wind spread and solar radiation, thereby demonstrating that these parameters must be taken into account in environmental studies. In addition, a strong seasonality was observed with higher concentration of PAQs between October and March. This can be explained by higher primary emissions from residential heating and influence of winter meteorological conditions (Bandowe, Meusel et al. 2014; Tomaz et al. 2016).

Nocun et al. developed a GC-MS method to identify and quantify oxy-PAHs in 6 SRMs used by the NIST (SRM 1649b, 1648a, 2786, 1650b, 2975 and 1975). PAKs and PAQs concentrations were quantified in the material at the ppm level, with the highest concentrations in diesel particulate matter. The 7,12-Benz[*a*]anthracenequinone (BAQ) differed from the others with a concentration of 5 mg/kg (Nocun and Schantz 2013). These concentrations come close to PAHs concentrations and are higher than nitro-PAHs, further demonstrating that oxy-PAHs and especially PAKs and PAQs must not be neglected in environmental studies.

One critical physico-chemical parameter that distinguishes PAHs from oxy-PAHs is that the latter possess higher water solubility than their corresponding parent and are thus more mobile in the environment. They also have a higher tendency to spread from contaminated sites to surface water and groundwater (Lundstedt et al. 2007; Dasgupta et al. 2014; Josefsson et al. 2015). These compounds can be deposited in surface water and in soils in which they may have a long lifetime, subsequently allowing them to re-evaporate into the atmosphere. PAKs and PAQs have been found in coastal and river sediments (Fernandez et al. 1992; McKinney et al. 1999; Machala et al. 2001), in sewage sludge (Bodzek et al. 1997), in river and coastal water (Fernandez and Bayona 1992; Grifoll et al. 1992; Kurihara et al. 2005; Layshock et al. 2010), in industrial waste (Mosi et al. 1997) and in slurry water (Lundstedt et al. 2003). In aquatic environments, distribution of pollutants is realized between suspended particles dissolved in the aqueous phase and sediments.

PAKs and PAQs were also detected in soils (Niederer 1998; Brooks et al. 1999; Meyer et al. 1999; Eriksson et al. 2000; Lundstedt et al. 2003; Lundstedt, Haglund et al. 2006; Lundstedt, Persson et al. 2006; Mattsson, Lundstedt, and Stenius 2009; Layshock, Wilson, and Anderson 2010). When oxy-PAHs are deposited on soil, they possibly become mobile. Direct transfer from atmospheric and aquatic compartments can occur by particulate matter deposition or water spreading, respectively. In soil, most of oxy-PAHs are bound to soil particles and their mobility will be influenced by the mobility of these particles. However, oxy-PAHs and mainly PAQs can also be produced *in situ* during the bioremediation of soil contaminated with hazardous organic compounds and degradation of PAHs can be accompanied by the accumulation of PAH metabolites. Some authors have worked on treatment of natural or artificial PAHs-contaminated soils thanks to different methods (white-rot fungi, Fenton oxidation ...). Degradation of parent PAHs induces formation of some nitro-PAHs, alkyl-PAHs, hydroxy-PAHs and oxy-PAHs such as 9,10-anthraquinone (9,10-AQ), 9-FLU, and

4-hydroxy-9-fluorenone (Andersson and Henrysson 1996; Wischmann and Steinhart 1997; Lee et al. 1998; Eriksson, Dalhammar, and Borg-Karlson 2000; Lee and Hosomi 2001; Meyer and Steinhart 2001; Andersson et al. 2003; Lundstedt et al. 2003; Lundstedt, Haglund et al. 2006). Accumulation of 9-FLU and BAQ following microbial degradation of PAHs has been described (Andersson et al. 2003). This accumulation may result in an increase of soil toxicity and/or a more persistent toxicity in time, even though parent PAHs are degraded. All these studies demonstrate that many PAKs and PAQs can accumulate in the soil during PAHs degradation thereby creating new environmental pollutants. The production process of oxy-PAHs from PAHs in microbial or fungal organisms has been described. Enzymatically, this process involves oxygenase, dehydrogenase and lignolytic enzymes. For example, it has been shown that laccase is a fungal lignolytic enzyme which is implicated in microbial catabolism of PAHs to form PAQs (Haritash and Kaushik 2009).

These different data are summarized in Table 1. The ubiquitous occurrence of PAQs and PAKs in the environment seems to confirm their status of dead-end product introduced by Lundstedt et al. (2007).

Degradation

The produced oxy-PAHs are usually considered as persistent pollutants and represent a significant contribution to the overall danger of toxic compounds in the different compartments of the environment. Nevertheless, to date, few data have shown the bacterial metabolization of PAQs. These bacteria are the pyrene-degrading bacteria *Mycobacterium sp.* PYR100 (Kim et al. 2003) and *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 (Kim et al. 2004), each of them produces two quinone reductases that convert PAH *o*-quinones to the corresponding catechols; *M. vanbaalenii* PYR-1 has also been observed to grow on 4,5-pyrenequinone (Kazunga and Aitken 2000). Unfortunately, these bacteria were not able to degrade other quinones like anthraquinone (Rodgers-Vieira et al. 2015).

In vivo metabolic production

In addition to environmental sources, oxy-PAHs can be produced in many biological systems from parent PAHs as metabolites. Nevertheless, only few examples of this metabolic formation are described in the literature. Enzyme-based oxidation converting PAHs to the corresponding PAKs and PAQs is the way for organisms to increase hydrosolubility of compounds in order to facilitate their elimination. Sometimes, the process leads to the production of more toxic intermediates. For example, BaP, which is known to be genotoxic and mutagenic, requires metabolic activation to acquire these toxic properties. Its body absorption leads to the activation of aryl hydrocarbon receptor (AhR) which is a cytosolic transcription factor. Activated AhR will dimerize with Aryl hydrocarbon Nuclear Translocator (ARNT), enter the nucleus and interact with genes containing a xenobiotic response element (e.g. cytochrome P450 such as CYP1A1, dehydrogenases ...) (Baird et al. 2005; Madureira et al. 2014).

Table 1. PAHs and PAQs concentrations in the different environmental matrices.

Soil									
Name	Abbreviations CAS	Concentration in industrial waste (µg/g dry weight)	Concentration in gasworks soils (µg/g dry weight)	Concentration in bioremediated soils (µg/g dry weight)	Concentration in urban soils (µg/g dry weight)	Concentration in sediments (µg/g dry weight)	Concentration in wood preservation (µg/g dry weight)	References	
6H-benzo[cd]pyrene-6-one	BPO 3074-00-8 BAQ 2498-66-0	10.00–20.00	4.30–5.00	2.50–17 000.00	0.01–0.05	–	2.40–26.00 0.64–9.00	Mattsson et al. 2009 Mosi et al. 1997; Niederer 1998; Brooks et al. 1999; Meyer et al. 1999; Lundstedt et al. 2003; Lundstedt, Haglund et al. 2006; Lundstedt Persson et al. 2006; Mattsson et al. 2009	
5,12-Naphthacenequinone	NCQ 1090-13-7	–	4.50–4.70	410.00–53 000.00	0.01–0.27	0.61–0.68	0.55–29.00	Niederer 1998; Meyer et al. 1999; Lundstedt et al. 2003; Lundstedt, Haglund et al. 2006; Lundstedt, Persson et al. 2006; Mattsson et al. 2009; Layshock et al. 2010	
11H-benzo[b]fluoren-11-one	B[bf]FO 3074-03-1 IND	–	–	–	–	–	0.07–0.65	Mattsson et al. 2010 Meyer et al. 1999; Lundstedt et al. 2003; Lundstedt, Haglund et al. 2006; Lundstedt, Persson et al. 2006; Mattsson et al. 2009	
1-Acenaphthenone	2235-15-6	–	–	–	–	–	0.49–1.80	Mattsson et al. 2009	
9-Florenone	9-FLU 486-25-9	20.00–40.00	12.00–26.00	1.60–340 000.00	–	0.65–0.65	0.70–16.00	Mosi et al. 1997; Brooks et al. 1999; Meyer et al. 1999; Eriksson et al. 2000; Lundstedt et al. 2003; Lundstedt, Haglund et al. 2006; Lundstedt, Persson et al. 2006; Mattsson et al. 2009; Layshock et al. 2010	
4H-cyclopenta[def]phenanthren-4-one	CP[def]PHEO 5737-13-3	–	–	35.00	–	0.37–1.14	1.30–139.00	Lundstedt, Haglund et al. 2006; Mattsson et al. 2009; Eriksson et al. 2010; Layshock et al. 2010	
9,10-Phenanthrenequinone	9,10-PQ 84-11-7	–	–	17.00	–	–	2.10–15.00	Eriksson et al. 2010	
9,10-Anthraquinone	9,10-AQ 84-65-1	6.00–24.00	14.00–24.00	20.20–250 000.00	0.01–0.08	1.53–1.70	–	Mosi et al. 1997; Niederer 1998; Brooks et al. 1999; Meyer et al. 1999; Eriksson et al. 2000; Lundstedt, Haglund et al. 2006; Lundstedt, Persson et al. 2006; Mattsson et al. 2009; Layshock 2010	
7H-benz[de]anthracen-7-one	BANTone 82-05-3	–	12.00–18.00	6.60–22 000.00	0.01–0.05	0.14–1.28	0.05–4.10	Niederer 1998; Brooks et al. 1999; Eriksson et al. 2000; Lundstedt et al. 2003; Lundstedt, Haglund et al. 2006; Lundstedt, Persson et al. 2006; Mattsson et al. 2009; Layshock et al. 2010	
11H-benzo[a]fluoren-11-one	B[af]FO 479-79-8	–	–	–	–	1.17–1.27	0.31–28.00	Mattsson et al. 2009; Layshock et al. 2010	
Water and sediments									
Name	Abbreviations CAS	Concentration in sewage sludge (ng/L)	Concentration in river water (ng/L)	Concentration in coastal and river sediments (ng/g dry weight)	Concentration in river slurry water (ng/L)	Concentration in slurry water (ng/L)	Concentration in coastal and river sediments (µg/L)	References	
6H-benzo[cd]pyren-6-one	BPO 3074-00-8	–	ng	–	–	–	BDL	Griffoll et al. 1992; Kurihara et al. 2005; Layshock et al. 2010	
7,12-Benz[<i>a</i>]anthracenequinone	BAQ 2498-66-0	–	–	–	–	0.57	2.1–122.0	Fernandez et al. 1992; Fernandez and Bayona 1992; Machala et al. 2001; Lundstedt et al. 2003	

(continued)

Table 1. Continued.

Name		Concentration in sewage sludge		Concentration in river and coastal water (ng/L)		Concentration in slurry water (ng/L)		Concentration in coastal and river sediments		References
		ng/L	ng/g dry weight	ng/L	ng/L	ng/L	ng/L	ng/g dry weight	µg/L	
5,12-Naphthacenequinone	NCO 1090-13-7	-	-	-	-	-	-	613.0-680.0	0.03	Layshock et al. 2010
11H-Benzo[<i>b</i>]fluoren-11-one	B[<i>b</i>]FO 3074-03-1	nq	nq	-	-	-	-	4.00	-	Bodzek et al. 1997; Fernandez and Bayona 1992
1,4-Naphthoquinone	1,4-NphQ 130-15-4	-	-	nq	-	-	-	BDL	-	Grifoll et al. 1992; Layshock et al. 2010
9-Fluorenone	9-FLU 486-25-9	nq	nq	-	-	9.90	-	2.8-653.0	0.02	Fernandez et al. 1992; Fernandez and Bayona 1992; Bodzek et al. 1997; McKinney et al. 1999; Machala et al. 2001; Lundstedt et al. 2003; Layshock et al. 2010
9(10 <i>H</i>)-anthracenone	AO 90-44-8	nq	nq	-	-	-	-	≤0.5-8.0	0.18	Fernandez and Bayona 1992; Bodzek et al. 1997; Machala et al. 2001
Xanthone	XAN 90-47-1	nq	nq	-	-	-	-	-	-	Bodzek et al. 1997
4 <i>H</i> -cyclopenta[<i>d</i>]phenanthren-4-one	CP[<i>d</i>]PHEO 5737-13-3	-	-	-	-	-	-	3.0-680.0	-	Fernandez et al. 1992; Fernandez and Bayona 1992; Layshock et al. 2010
9,10-Anthraquinone	9,10-AQ 84-65-1	nq	nq	3.90-200.00	-	29.00	-	7.9-1700.0	-	Bodzek et al. 1997; McKinney et al. 1999; Machala et al. 2001; Lundstedt et al. 2003; Kurihara et al. 2005; Layshock et al. 2010
7 <i>H</i> -benz[<i>d</i>]antracen-7-one	BANTone 82-05-3	-	-	-	-	0.14	-	3.9-1280.0	0.02	Fernandez et al. 1992; Machala et al. 2001; Lundstedt et al. 2010
11 <i>H</i> -Benzo[<i>a</i>]fluorene-11-one	B[<i>a</i>]FO 479-79-8	-	-	-	-	-	-	1.8-1270.0	0.05	Fernandez and Bayona 1992; Layshock et al. 2010

Name		Concentration in diesel and gasoline exhaust (PM10, PM2.5, SRM 1650b, 2975)		Concentration in urban particulate matter (PM10, PM2.5, SRM 1648a, 2786)		Concentration in urban dust and ambient air (PM10, 1649b)		Concentration in combustion processes (wood smoke, incinerator fly ash)	
		µg/g	pg/m ³	µg/g	pg/m ³	µg/g	pg/m ³	µg/g	pg/m ³
6 <i>H</i> -benzo[<i>c</i>]pyren-6-one	BPO 3074-00-8	1.87-747.40	2.99E6	0.80-220.00	106.0-1300.0	2.42-4.19	-	0.05-0.60	-
7,12-Benzo[<i>a</i>]anthracenequinone	BAQ 2498-66-0	0.79-21.93	-	0.60-84.00	4.0-2700.0	2.20-8.46	10.0-3030.0	4.95	-
5,12-Naphthacenequinone	NCO 1090-13-7	0.77-9.00	-	0.23-1368.00	11.0-3160.0	1.25-3.16	-	-	-
11 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>]fluoren-11-one	B[<i>b</i>]FO 3074-03-1	619.30-832.80	852.00-3.33E6	0.30-57.80	2.0-155.2	0.91-5.00	10.0-3580.0	nq	nq
1,2-Naphthoquinone	1,2-NphQ 524-42-5	0.19-13.69	-	-	-	-	-	-	-
1,4-Naphthoquinone	1,4-NphQ 130-15-4	0.24-7.93	5.00-230.00	-	0.0-270.0	-	-	-	-
1-Acenaphthenone	2235-15-6	-	-	-	-	nq	nq	-	-
9-Fluorenone	9-FLU 486-25-9	2.69-1580.00	7100.00-6.32E6	0.37-49.20	2.0-2290.0	0.78-1.22	0.0-6910.0	6.40-52.51	-
Phenalenone	548-39-0	3203.10	12.81E6	93.0-182.00	-	1.30	-	nq	nq
Acenaphthenequinone	ANQ 82-86-0	-	-	nq	nq	-	-	-	-
Benzophenone	BPh 119-61-9	-	-	-	180.0-660.0	-	-	-	-
9(10 <i>H</i>)-anthracenone	AO 90-44-8	-	-	0.001	0.0-170.0	0.02	-	88.87	-

(continued)

Table 1. Continued.

Air		Concentration in diesel and gasoline exhaust (PM10, PM2.5, SRM 1650b, 2975)		Concentration in urban particulate matter (PM10, PM2.5, SRM 1648a, 2786)		Concentration in urban dust and ambient air (PM10, 1649b)		Concentration in combustion processes (wood smoke, incinerator fly ash)	
Name	Abbreviations CAS	µg/g	pg/m ³	µg/g	pg/m ³	µg/g	pg/m ³	µg/g	pg/m ³
Phenanthrene	PHNO 484-16-2	—	—	3.20	—	—	—	—	—
Xanthone	XAN 90-47-1	3203.10	12.81E6	0.005–8.20	0.0–140.0	0.07	—	21.26	—
4H-cyclopenta[def]phenanthren-4-one	CP[def]PHEO 5737-13-3	6.90–1708.00	6.83E6	0.41–10.60	5.6–540.0	0.17–0.62	—	3.50	—
1,4-Anthraquinone	1,4-AQ 635-12-1	BDL	BDL	—	91.2–148.4	BDL	—	—	—
9,10-Phenanthrenequinone	9,10-PQ 84-11-7	1.18–24.19	6.00–730.00	—	138.0–690.0	—	—	—	—
9,10-Anthraquinone	9,10-AQ 84-65-1	2.03–53.11	20.00–3700.00	0.41–25.5	9.0–2676.0	0.22–2.63	0.0–9930.0	nq	—
7H-benz[<i>c</i>]fluoren-7-one	B[<i>c</i>]FO 6051-98-5	597.92	2.39E6	0.63	—	0.42–0.70	—	—	—
7H-benz[<i>d</i>]anthracen-7-one	BA[<i>N</i>]Tone 82-05-3	0.24–726	0.50–2.90E6	0.50–81.30	5.3–4900.0	1.31–4.50	4.0–2970.0	—	—
11H-benzo[<i>g</i>]fluoren-11-one	B[<i>g</i>]FO 479-79-8	3.43–1409.00	1026.00–5.64E6	1.36–30.40	4.0–168.1	1.65–3.51	10.0–3690.0	0.05–20.95	—
Cyclopenta[<i>c</i>]pyren-3(4H)-one	CPPO 69795-70-6	—	—	2.20–2.40	—	—	—	—	—
6,12-Benzo[<i>a</i>]pyrenequinone	3067-12-7	—	—	—	—	—	—	—	—

Air		Concentration in urban aerosol		References	
Name	µg/g	pg/m ³	µg/g	pg/m ³	
6H-benzo[<i>c</i>]pyren-6-one	—	1340.0	—	—	Ramdahl 1985; Allen et al. 1997; Hannigan et al. 1998; Wingfors et al. 2011; Wei et al. 2012; Nocun and Schantz 2013
7,12-Benzo[<i>a</i>]anthracenequinone	—	—	—	—	Choudhury 1982; Bayona et al. 1994; Lewis et al. 1995; Durant et al. 1998; Hannigan et al. 1998; Niederer 1998; Schnelle-Kreis et al. 2001; Yassaa et al. 2001; Castells et al. 2003; Albinet et al. 2006; Chung et al. 2006; Del Rosario Siemra 2006; Albinet et al. 2007; Layschock et al. 2010; Mirivel et al., 2010; Wingfors et al. 2011; Cochran et al. 2012; Ringuet et al. 2012; Wei et al. 2012; Delgado-Saborit et al. 2013; Nocun and Schantz 2013; Huang et al. 2014; Keyte et al. 2016; Tomaz 2016
5,12-nAphthacenequinone	—	320.0	—	—	Allen et al. 1997; Durant et al. 1998; Hannigan et al. 1998; Niederer 1998; Schnelle-Kreis et al. 2005; Chung et al. 2006; Del Rosario Siemra 2006; Layschock et al. 2010; Mirivel 2010; Delgado-Saborit et al. 2013; Nocun and Schantz 2013; Fujiwara et al. 2014
11H-benzo[<i>b</i>]fluoren-11-one	—	850.0	—	—	Alsberg et al. 1985; Ramdahl 1985; Fernandez and Bayona, 1992; Bayona et al. 1994; Allen et al. 1997; Durant et al. 1998; Hannigan et al. 1998; Schnelle-Kreis et al. 2001; Schnelle-Kreis et al. 2005; Albinet et al. 2006; Albinet et al. 2007; Bekki et al. 2009; Ringuet et al. 2012; Tomaz 2016
1,2-Naphthoquinone	—	—	—	—	Allen et al. 1997; Cho et al. 2004; Chung et al. 2006; Valavanidis et al. 2006; Delgado-Saborit et al. 2013
1,4-Naphthoquinone	nq	nq	—	—	Lewis et al. 1995; Castells et al. 2003; Cho et al. 2004; Chung et al. 2006; Del Rosario Siemra et al. 2006; Valavanidis et al. 2006; Layschock et al. 2010; Cochran et al. 2012; Delgado-Saborit et al. 2013; Tomaz et al. 2016
1-Acenaphthenone	—	260.0	—	—	Allen et al. 1997; Durant et al. 1998; Tomaz et al. 2016
9-Fluorenone	—	2070.0	—	—	Alsberg et al. 1985; Fernandez and Bayona 1992; Bayona et al. 1994; Choudhury, 1982; Lewis et al. 1995; Allen et al. 1997; Hannigan et al. 1998; Schnelle-Kreis et al. 2001; Castells et al. 2003; Schnelle-Kreis et al. 2005; Del Rosario Siemra 2006; Albinet et al. 2006; Albinet et al. 2010; Wingfors et al. 2011; Ringuet et al. 2012; Wei et al. 2012; Nocun and Schantz 2013; Huang et al. 2014; Keyte et al. 2016; Tomaz et al. 2016
Phenalenone	—	—	—	—	Alsberg et al. 1985; Durant et al. 1998; Hannigan et al. 1998; Schnelle-Kreis et al. 2005; Wingfors et al. 2011; Cochran et al. 2012
Acenaphthenequinone	—	—	—	—	Lewis et al. 1995; Castells et al. 2003; Chung et al. 2006; Delgado-Saborit et al. 2013; Tomaz et al. 2016
Benzophenone	—	—	—	—	Del Rosario Siemra 2006
9(10H)-anthracenone	—	—	—	—	Fernandez and Bayona 1992; Bayona et al. 1994; Choudhury, 1982; Ramdahl, 1985; Schnelle-Kreis et al. 2005; Cochran et al. 2012
Phenanthrenone	—	—	—	—	Allen et al. 1997
Xanthone	—	—	—	—	Alsberg et al. 1985; Fernandez and Bayona 1992; Cochran et al. 2012; Tomaz et al. 2016
4H-cyclopenta[def]phenanthren-4-one	—	—	—	—	Alsberg et al. 1985; Fernandez and Bayona 1992; Bayona et al. 1994; Durant et al. 1998; Schnelle-Kreis et al. 2005; Layschock et al. 2010; Wingfors et al. 2011; Wei et al. 2012; Huang et al. 2014

(continued)

Table 1. Continued.

Name	Concentration in urban aerosol		References
	µg/g	pg/m ³	
1,4-Anthraquinone	–	–	Albinet et al. 2006; Layshock et al. 2010; Ringuet et al. 2012; Tomaz et al. 2016
9,10-Phenanthrenequinone	–	430.0	Choudhury et al. 1982; Cho et al. 2004; Chung et al. 2006; Kishikawa et al. 2006; Lintelmann et al. 2006; Valavanidis et al. 2006; Mirivel 2010; Delgado-Saborit et al. 2013; Tomaz et al. 2016
9,10-Anthraquinone	–	–	Choudhury et al. 1982; Fernandez and Bayona 1992; Bayona et al. 1994; Lewis et al. 1995; Hannigan et al. 1998; Niederer et al. 2006; Schnell-Kreiss et al. 2001; Yassaa et al. 2001; Castells et al. 2003; Cho et al. 2004; Schnell-Kreiss et al. 2005; Albinet et al. 2006; Chung et al. 2006; Del Rosario Sierra 2006; Valavanidis et al. 2006; Albinet et al. 2007; Layshock et al. 2010; Mirivel, 2010; Wingfors et al. 2011; Cochran et al. 2012; Ringuet et al. 2012; Wei 2012; Nocun and Schantz 2013; Fujiwara et al. 2014; Huang et al. 2014; Keyte et al. 2016; Tomaz et al. 2016
7H-benz[<i>c</i>]fluoren-7-one	–	370.0	Choudhury et al. 1982; Alsborg et al. 1985; Ramdahl et al. 1985; Fernandez and Bayona 1992; Allen et al. 1997; Durant et al. 1998; Schnell-Kreiss et al. 2005
7H-benz[<i>d</i>]anthracen-7-one	–	1180.0	Ramdahl et al. 1985; Alsborg 1985; Fernandez and Bayona 1992; Bayona et al. 1994; Lewis et al. 1995; Spitzer and Takeuchi 1995; Durant et al. 1998; Hannigan et al. 1998; Niederer 1998; Castells et al. 2003; Schnell-Kreiss et al. 2005; Albinet et al. 2006; Albinet et al. 2007; Layshock et al. 2010; Mirivel, 2010; Wingfors et al. 2011; Ringuet et al. 2012; Wei et al. 2012; Nocun and Schantz 2013; Huang et al. 2014; Tomaz et al. 2016
11H-benzo[<i>a</i>]fluoren-11-one	–	1030.0	Alsborg et al. 1985; Ramdahl et al. 1985; Fernandez and Bayona 1992b; Bayona et al. 1994; Allen et al. 1997; Durant et al. 1998; Hannigan et al. 1998; Schnell-Kreiss et al. 2001; Schnell-Kreiss et al. 2005; Albinet et al. 2006; Albinet et al. 2007; Bekki et al. 2009; Mirivel 2010; Wingfors et al. 2011; Ringuet et al. 2012; Nocun and Schantz 2013
Cyclopenta[<i>c</i>]pyren-3(4H)-one	–	–	Hannigan et al. 1998; Layshock et al. 2010; Nocun and Schantz 2013
6,12-Benzo[<i>a</i>]pyrenequinone	–	100.0	Allen et al. 1997; Chung et al. 2006

nq: compound detected and not quantified; BDL: below detection limit.

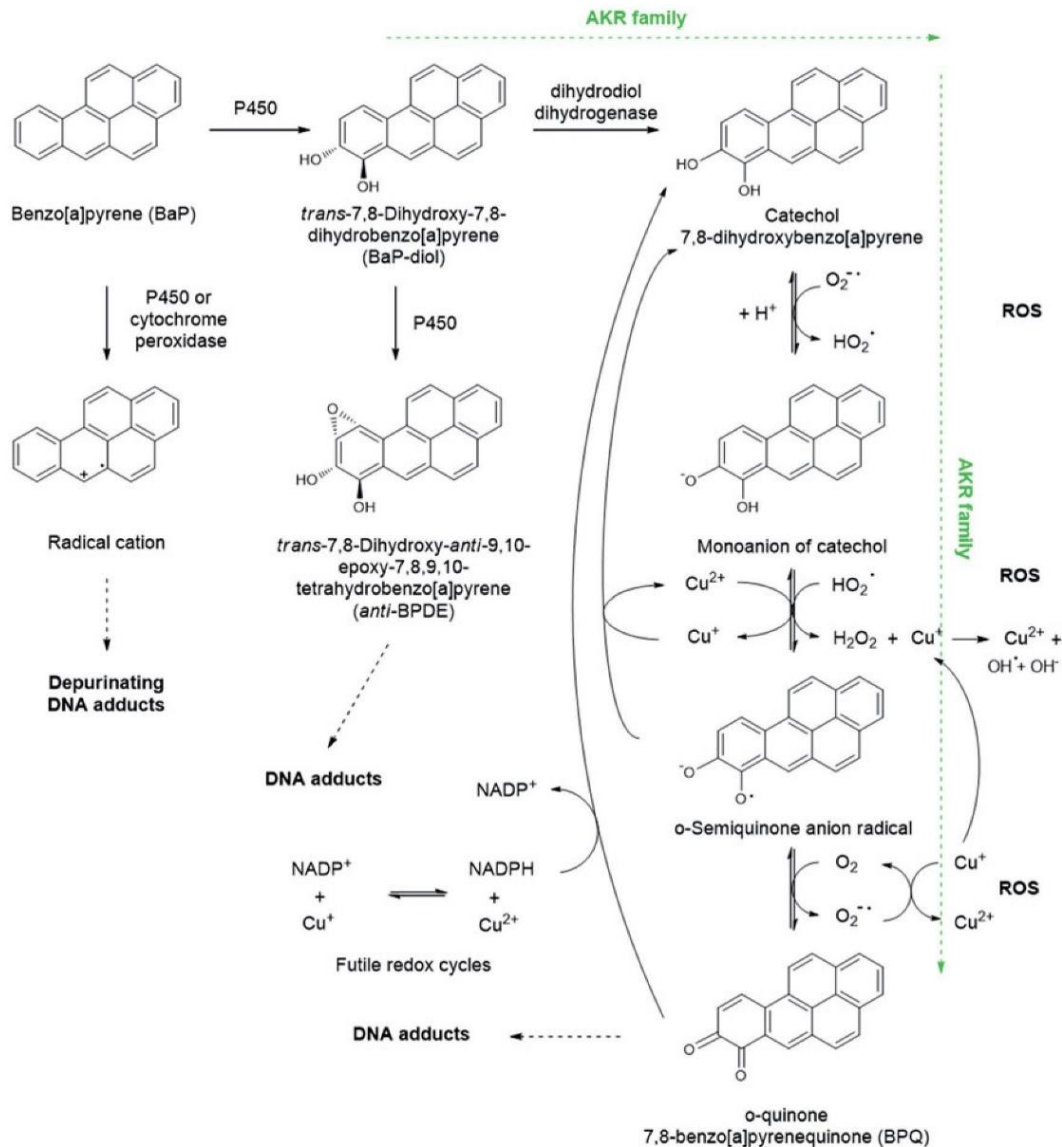
As shown in Scheme 2, this activation is composed of several pathways (Cook et al. 1933; O'Brien 1991; Bolton et al. 2000; Park et al. 2005). The first one is the activation of BaP to radical cation by one-electron oxidation, catalyzed by cytochrome P450 or peroxidases. The second pathway involves epoxidation of BaP, catalyzed by cytochrome P450 and subsequent hydrolysis catalyzed by epoxide hydrolase, which yields *trans*-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo[*a*]pyrene (BaP-diol). Another epoxidation yields *trans*-7,8-dihydroxy-*anti*-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyrene (*anti*-BPDE). *Anti*-BPDE forms predominantly stable adducts with nucleic acids (e.g. guanine or adenine, Hargis et al. 2010) responsible for the genotoxicity attributed to BaP. Generation of the reactive metabolite 7,8-benzo[*a*]pyrenequinone (BPQ) has been previously demonstrated in H358 cells (Jiang et al. 2007; Lu et al. 2011).

PAQs, and PAKs are also produced by biological process in soil. In common mycobacteria, BaP is oxidized into such products by the action of key enzymes like laccase, quinone reductase or catechol-*O*-methyltransferase (Scheme 3, Zeng et al. 2013). Quinones aromatic rings are then degraded into ring-cleavage products by biodegradation or mineralization pathways.

In humans and rodents, aldo-keto reductases (AKRs), a superfamily of monomeric NADPH-dependent oxidoreductase, catalyze the metabolic activation of PAHs *trans*-dihydrodiol to yield active PAHs *o*-quinone. Concerning BaP, AKRs catalyze the oxidation of BaP-diol to yield BPQ and are also able to catalyze the two-electrons reduction of BPQ back to BaP-diol (Flowers-Geary et al. 1993; Flowers et al. 1997; Park et al. 2005; Zhang et al. 2012). This activation results in production of reactive oxygen species (ROS), including O₂^{•-}, H₂O₂ and OH[•], which are toxic and carcinogenic and create DNA damages in Human lung cells (McCoull et al. 1999; Bolton et al. 2000). At present, there is no evidence of the formation of BPQ from BaP or from BaP-diol *in vivo*, even though other BaP quinones have been detected after BaP treatment (Kim et al. 2000).

Genotoxic and mutagenic risks of oxy-PAHs for human

The aim of this review is to collect available data on oxy-PAHs in order to provide critical information for Human health risk assessment focusing on cancer. In the previous part, we demonstrated the ubiquitous occurrence of oxy-PAHs (PAQs and PAKs) in the environment. This part is dedicated to review the state of knowledge on the carcinogenic risk to draw up a full list of further work needed. Since a decade, cancer risk assessment follows the mode-of-action (MOA) analysis framework (Meek et al. 2003; Preston and Williams 2005; US EPA 2005; Boobis et al. 2006, 2009; Julien et al. 2009; Pottenger et al. 2014). The EPA *Guidelines for Cancer Risk Assessment* (US EPA 2005) define MOA as the "sequence of key events and processes, starting with interaction of an agent with a cell, proceeding through operational and anatomical changes and resulting in cancer formation". This framework uses key events as the organizing



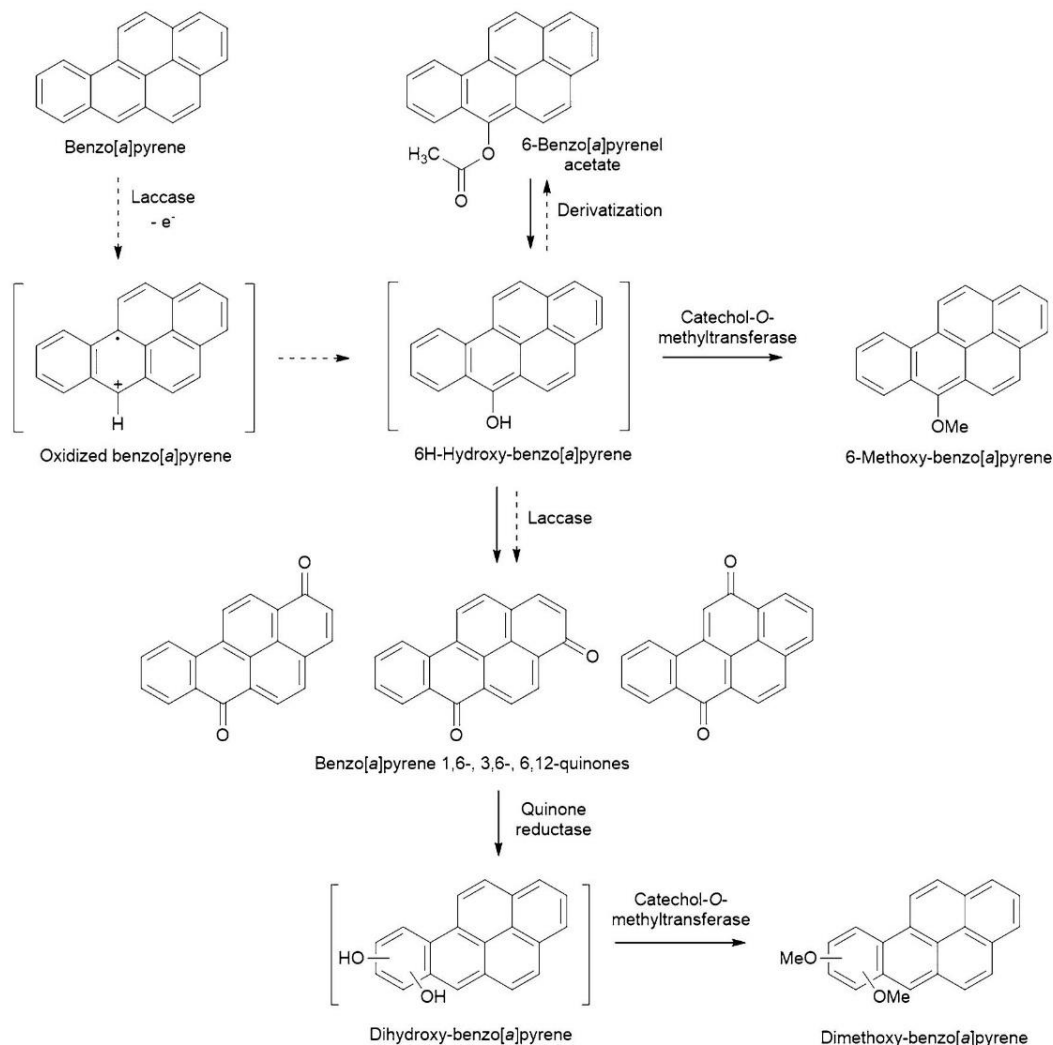
Scheme 2. Metabolic activation of benzo[a]pyrene to 7,8-benzo[a]pyrenequinone (adapted from Flowers-Geary et al. 1993; Flowers et al. 1997; McCoull et al. 1999; Bolton et al. 2000; Park et al. 2005).

principle. Key event is described as “an empirically observable precursor step that is itself a necessary element of the MOA or is a biologically based marker for such an element” (US EPA 2005; Jarabek et al. 2009). In the MOA framework, the gradation of biomarkers is preferred to strict delineation between exposure and effect. This denotes that the determination of biomarkers as key events depends on the degree of understanding of the MOA and the nature of the available data.

Exposure routes

Respiratory tract is the major site of exposure to particulate matter. This exposure concerns tracheobronchial tree and pulmonary alveoli. Particulate matter is composed of different fractions: ultrafine particles (PM_{0.1}, diameter lower than 0.1 μm), fine particles (PM_{2.5}, diameter lower than 2.5 μm) and

coarse particles (PM_{2.5-10}, diameter between 2.5 μm and 10 μm). PM_{2.5-10} are generally deposited at the upper part of the respiratory tract and cleared whereas PM_{0.1} and PM_{2.5} may reach alveoli on which clearance is really slow. These small particles possess a large specific surface and can adsorb different substances like PAHs and derivatives (Kim and Hu 1998; Oh et al. 2011). Boubilil et al. worked on primary cultures of Human bronchial epithelial cells which is one of the first target of the PM (Boubilil et al. 2013). These cells were exposed to three particle-size fractions at different concentrations. Thanks to transmission electron microscopy, particles were observed in vesicles of basal cytoplasm and in the apical cytoplasm. Moreover, some were found very close to the apical membrane which can suggest a possible metabolism of particles followed by exocytosis. Five weeks after treatment, solid particles were still present in the treated epithelium which exhibits normal development. The adsorption



Scheme 3. Proposed mechanism for the O-methylation of benzo[a]pyrene by laccase and mycobacteria. The compounds in brackets are hypothetical intermediates. Short dashed line arrows indicate the steps of benzo[a]pyrene oxidation by laccase and solid line arrows indicate the step of successive transformation of the metabolites (reproduced from Zeng et al. 2013, with permission).

of PAHs on these particles could lead to the introduction into Human body, their distribution and metabolism in lung cells.

The *in vivo* production of oxy-PAHs from PAHs is also to be considered. Indeed, the Human metabolism of PAHs can conduct to internal exposure to oxy-PAHs. The production of ROS during this process can also contribute to the genotoxicity or mutagenicity of oxy-PAHs (McCoull et al. 1999; Bolton et al. 2000).

Exposure to oxy-PAHs may also happen by ingestion of contaminated food. Usually, raw food should not contain oxy-PAHs or in very small quantities. In places distant from industry and road traffic, levels of oxy-PAHs found in unprocessed food are representative of background contamination. This contamination could originate from transportation of contaminated particles over long distances, from natural emissions like volcanoes or from forest fire. When it is detected, the background contamination of uncooked food by oxy-PAHs ranges between 0.01 µg/kg and 1.00 µg/kg concentrations (Abdel-Shafy and Mansour 2016). Significant

concentrations of oxy-PAHs were detected in mussel (Layshock et al. 2010) and fish tissues (Bandowe, Bigalke, et al. 2014). 9-FLU and 6H-benzo[cd]pyren-6-one (BPO) were found, at the ng/g level, in leaf lettuce by deposition of PAH-containing particles present in ambient air (Wickström et al. 1986). The 1,4-NphQ and different phenolic compounds are detected in walnut liqueur and are supposed to be originated from shoots of the corresponding tree (Jakopic et al. 2007).

Moreover, storage of food could be another route of exposure to oxy-PAHs. Vapenka et al. demonstrate that paper pulp processing results in production of derivatives like 9,10-AQ which can be transferred during storage (Vapenka et al. 2016).

Processes of cooking such as smoking, roasting or frying can lead to the emergence of oxy-PAHs like 9-FLU, 9,10-AQ, 7H-benz[de]anthracen-7-one (BANTone), and BAQ. Chen et al. demonstrate that these molecules can deeper penetrate inside prepared food like in smoked meats (Chen et al. 2014). In roasted and fried peanuts, accumulation of benzofluorenone and BAQ can be observed, the latter being connected

to concentration of the parent benz[*a*]anthracene (Onat et al. 2017). Oxy-PAHs can also be present in *Youtiao*, a traditional Chinese fried bread consumed for breakfast (Li et al. 2016; Zhao et al. 2017).

The inhalation and the ingestion of oxy-PAHs in Human body make them available for reacting with biological molecules such as DNA and proteins, which can initiate processes of genotoxicity.

Genotoxicity of oxy-PAHs

Few data are available in the literature on genotoxic effects of oxy-PAHs, and if available, they are patchy. An interesting *in vitro* study was realized by Oh et al. on the inhalation health effect of organic extract of PM_{2.5} using BEAS-2B, an immortalized Human bronchial epithelial cell line. They used a crude extract (CE) collected in Suwon city (Korea) to assess the genotoxic effects based on Comet and cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assays (Oh et al. 2011). Comet assay provides the opportunity to study DNA single strand breakages (Fairbairn et al. 1995; Jha 2008) and CBMN assay is commonly used for assessing chromosome breakage, chromosome loss and the frequency of dividing cells (Fenech 1993; Fenech et al. 1999). The CE exhibited a genotoxic potential in the BEAS-2B cells, demonstrated by a significant number of formed micronuclei and broken DNA. The aliphatic, aromatic and slightly polar fractions of this CE showed similar micronucleus formation and similar DNA damages as the whole crude extract. The exact composition of these fractions was not described in this work but includes the oxy-PAHs as possible contributors of the genotoxic effects (Topinka et al. 1998). More specifically, the genotoxicity of oxy-PAHs has also been demonstrated for acenaphthenequinone and BAQ in *Japanese medaka* (*Oryzias latipes*) embryos using comet assay (Dasgupta et al. 2014). The authors demonstrated a dose-dependent DNA breakage response in *Oryzias latipes* embryos. Moreover, genotoxicity of BAQ was the highest of the tested compounds that is, 1.5 times higher than BaP after a 7-day exposure at the concentration of 10 µg/L. Another study was conducted by Mattsson et al., on the effect of the exposure of hepatocyte HepG2 cells by PAHs and oxy-PAHs. These cells were selected because of their ability to activate PAHs (Mattsson et al. 2009). Samples used in this study were soil fractions from industrially contaminated sites containing complex mixtures of PAHs and their derivatives. Exposure of cells to the equivalent of 1 mg of soil/mL medium of PAH fraction resulted in

persistent H2AX phosphorylation, apparent after 48 h exposure. H2AX phosphorylation is linked to DNA damages and more precisely to double-stranded breaks of DNA (Sharma et al. 2012). The oxy-PAHs fraction led to the phosphorylation of H2AX histones at a concentration as low as 0.01 mg/mL after 24 h exposure. This demonstrated that oxy-PAHs fraction possesses a DNA damaging potent at least 100 times higher than PAHs. These studies demonstrate that oxy-PAHs can possibly be genotoxic for humans. They highlight the need for further work in order to confirm this genotoxicity and to understand how they interact with cells.

More specific DNA alterations related to some oxy-PAHs structure were described. Some chemicals can create covalent bonds with macromolecules like DNA, RNA and proteins. This interaction is called "adduct" which comes from *addition product* (Wild and Pisani 1997). DNA adducts are chemical-specific promutagenic damages and are also possible biomarkers of exposure to pollutants. Concerning DNA, activated oxy-PAHs can interact with nucleotides at different sites to form DNA adducts. Umbuzeiro et al. used the very sensitive radioactive ³²P-postlabeling method to study DNA adduct formation after the exposure of calf thymus DNA to fractions of UPM containing nitro-PAHs and oxy-PAHs sampled in two sites of São Paulo (Brazil) (Umbuzeiro et al. 2008). Specific ³²P-postlabeling procedures including nuclease P1 or butanol enrichments were applied to increase the versatility of the method and thus detect the maximum of DNA adduct structures in autoradiographies, after the thin layer (TLC) separation. Concerning the nitro-PAH fraction, no spot was detected along the diagonal radioactive zone (a classical pattern of spots associated in general to genotoxic PAHs and metabolites) contrary to the oxy-PAHs fraction which shows the presence of multiple discrete radioactive spots along the diagonal line of the thin layer plate (Figure 1). Moreover, the quantitative DNA adducts analysis showed that the oxy-PAH fraction is approximately three times more reactive than the nitro-PAH fraction. Unfortunately, like previous studies, no precise adduct chemical structure can be obtained by this method.

The most studied oxy-PAH DNA adducts are derived from BPQ. In 1993, Shou et al. studied the reaction between calf thymus DNA and selected PAHs metabolites that is, BPQ, BaP-diol and (±)-*anti*-BPDE (Shou et al. 1993) thanks to ³²P-postlabelling and HPLC separation. The ability of PAHs to form covalent bonds with DNA was examined using radiolabeled PAH metabolites in presence of native, deproteinated and deproteinated/sheared calf thymus DNA. Concerning

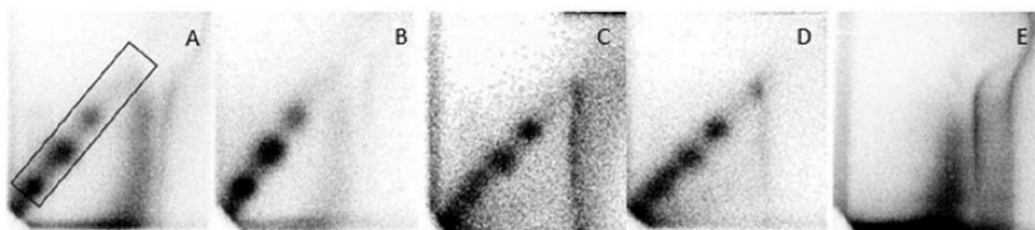
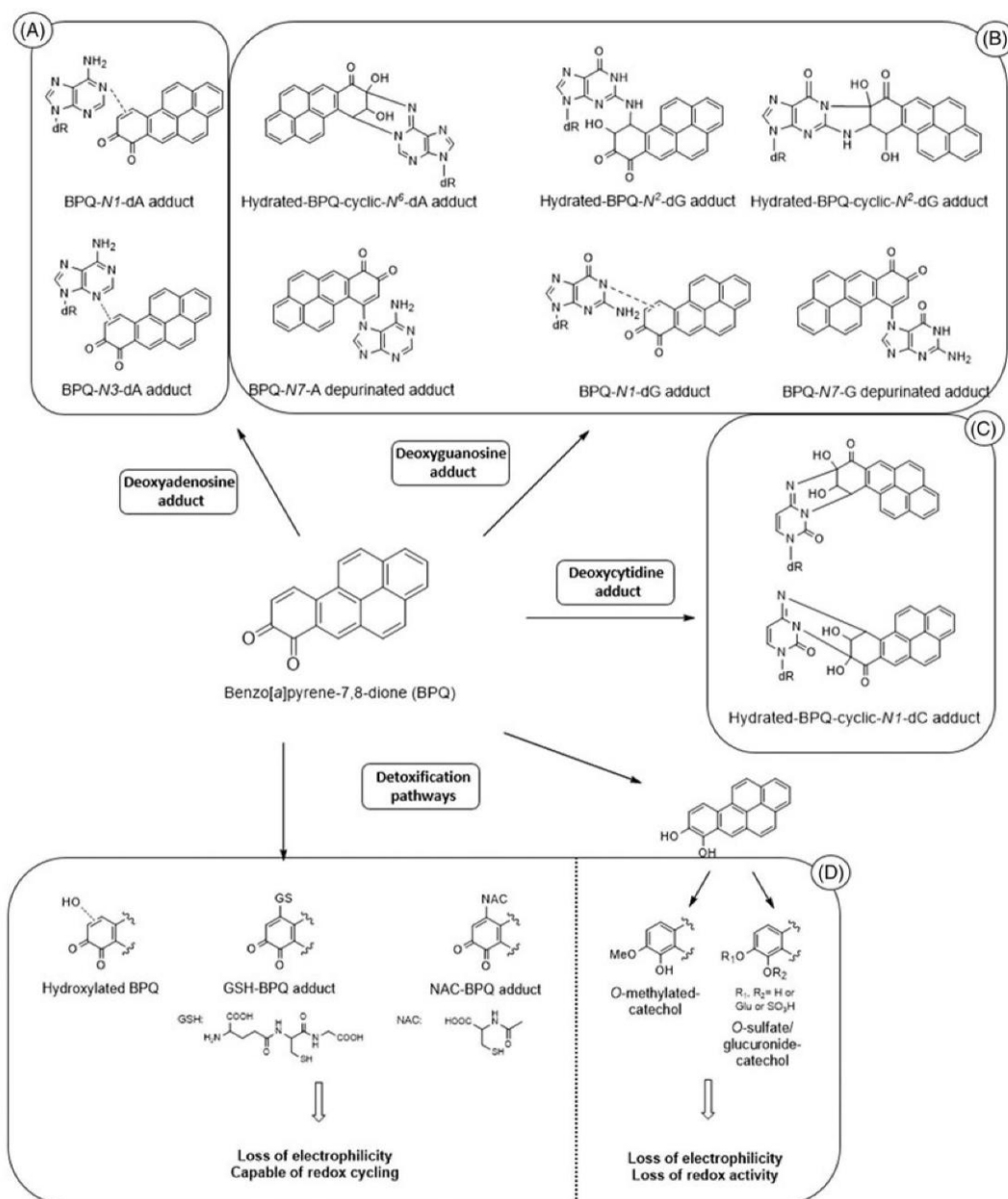


Figure 1. ³²P postlabeling DNA adduct profiles of DNAs modified *in vitro* by rat cytosol mediated reduction of oxy-PAH fraction, enriched by either the nuclease P1 (NP 1) or butanol extraction (but) version of the postlabeling assay as indicated. A, C: Ibirapuera station; B, D: Ibirapuera park station; E: oxy-PAH fraction without rat liver cytosol DNA adducts (reproduced from Umbuzeiro et al. 1984 with permission).

BPQ at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, an amount of 1.7–3.5 native adducts was observed per 1000 normal nucleotides. For (\pm)-*anti*-BPDE at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, whatever the secondary structure of DNA, an amount of 1.5–3.2 adducts was observed per 1000 normal nucleotides. Concerning deproteinated and deproteinated/sheared calf thymus DNA, a low level of adducts was obtained in presence of BPQ, which demonstrates that formation of adducts is connected to secondary structure of the latter. This study allows to demonstrate that (\pm)-*anti*-BPDE and BPQ are almost equireactive to native calf thymus DNA. These adducts were identified as 2-deoxyguanosine (2'-dG) adducts but a complete characterization was not reported.

This complete characterization of stable adducts between BPQ and nucleotides was realized by Balu et al. As shown in Part B of Scheme 4, a set of four BPQ-DNA adducts was synthesized with 2'-dG and two others with 2'-deoxyadenosine (2'-dA) (Balu et al. 2004). They later synthesized and fully characterized BPQ-2'-deoxycytidine adduct (BPQ-2'-dC) (Scheme 4, Part C) (Balu et al. 2006). These standards were analyzed in ^{32}P -postlabeling with the aim of determining a specific signature of BPQ-DNA adducts from *in vitro* exposures. Then, calf thymus DNA and DNA homopolymers were exposed to BPQ. Eight major and approximately ten minor DNA adducts were detected (Parts A, B, and C) (McCoull et al. 1999; Balu et al. 2004, 2006; Nesnow et al. 2010; Yao et al. 2016).



Scheme 4. BPQ-DNA adducts formation and detoxification pathways (adapted from McCoull et al. 1999; Balu et al. 2004, 2006; Nesnow et al. 2010; Huang et al. 2012, 2013; Yao et al. 2016).

An interesting *in vitro* study was conducted on three different cell lines by Huang et al.: Human lung adenocarcinoma A549 cells, Human bronchoalveolar H358 cells and immortalized Human bronchial epithelial HBEC-KT cells (Table 2, Huang et al. 2012; Huang et al. 2013). These lines were exposed to radiolabeled and non-radiolabeled BPQ. The study of 1,3- $^{3}\text{H}_2$ -BPQ distribution in the medium demonstrates that radioactivity is rapidly distributed and consumed. Moreover, a significant amount of radioactivity was found in the cell lysate pellets, which can originate from formation of adducts with proteins or DNA. After treatment of the media, different metabolites of 1,3- $^{3}\text{H}_2$ -BPQ were detected by High Performance Liquid Chromatography – Ultraviolet – Radioactivity monitoring (HPLC-UV-RAM). The resulting structures were different according to the cell lines and were identified as BPQ conjugates with glutathione (GSH-BPQ), *N*-acetyl-L-cysteine (NAC-BPQ), 8-*O*-monomethylated-catechol, *O*-sulfate/glucuronide-catechol, and monohydroxylated-BPQ by liquid chromatography – tandem mass spectrometry (LC-MS/MS, Scheme 4, Part D). In addition, an adenine-BPQ adduct was detected in the cell culture media but the source was not determined (Scheme 4, Part B). The second part of this study was focused on the identification of DNA adducts in these three cell lines. After extraction and hydrolysis, analysis by LC-MS/MS revealed stable DNA adducts with different structures depending on cell lines. In A549 cells, stable DNA adducts were identified as hydrated-BPQ- N^2 -dG and hydrated-BPQ- $\text{N}1$ -dG. In HBEC-KT cells, stable DNA adducts were identified as hydrated-BPQ-dA, hydrated-BPQ- $\text{N}1$ - or $\text{N}3$ -dA, and BPQ- $\text{N}1$ - or $\text{N}3$ -dA (Scheme 4, Parts A and B).

Reactivity of other oxy-PAHs towards DNA has also been demonstrated by *in vitro* studies. McCoull et al. worked on DNA adducts formation between BPQ, 1,2-NphQ and 1,2-phenanthrenequinone (1,2-PQ) with 2'-dG (McCoull et al. 1999). The aim was to synthesize chemical standards for identification of adducts *in vitro* and *in vivo*. For each molecule, LC-MS characterization allowed to demonstrate that an addition on N7 position of 2'-dG leads to depurinated adducts (Scheme 4, Part B & Scheme 5). Moreover, this study also demonstrated that the amount of adducts formed was negatively correlated to the number of rings in the structure of the oxy-PAH. Saeed et al. focused on the mechanism of formation of DNA adducts from 1,2-NphQ (Saeed et al. 2007). They confirm the results of McCoull et al. that 1,2-NphQ reacts preferably with DNA at the N3 position of adenine and N7 position of guanine, leading to formation of depurinated adducts (Scheme 5). The reaction between 1,2-NphQ and nucleosides is believed to occur by 1,4-Michael addition which can be a general mechanism of PAH-DNA adducts formation.

Recently, Yao et al. worked on follicular cells from isolated ovarian follicles which were exposed to BaP and to cigarette smoke condensate (Yao et al. 2016). DNA adduct screening by HPLC-MS/MS revealed the presence of adducts with BPQ, BPDE and 1,2-PQ which were identified owing to the synthesis of standards (Scheme 4, Part B and Scheme 6). In addition, this study demonstrated an increase of the formation of all identified DNA adducts with the concentration of exposure in a dose dependent manner. These observations consolidate the link between exposure and genotoxicity of oxy-PAHs.

Very few data on adducts with oxy-PAHs were reported *in vivo*. Nesnow et al. worked on the involvement of BPQ-covalent DNA adducts in the mechanism of action of BaP concerning mouse lung tumorigenesis (Nesnow et al. 2010). Groups of mice were exposed to BPQ and BP-diol. No BPQ-DNA adduct was obtained in lung or liver tissues contrary to BP-diol which gave BPDE-DNA adducts in both tissues. Nevertheless, a significant weight loss was observed after treatment which demonstrated the toxicity of these molecules. The authors hypothesized that the absence of BPQ-DNA adducts can be explained by the metabolism of BPQ, the repair of adducts or its inactivation in a form that cannot react with DNA by cause of a Michael addition as represented in Scheme 4 (detoxification pathways, Part D). Indeed, formation of phase II metabolites of oxy-PAHs such as *O*-monomethylated catechol, *O*-monoglucuronide catechol, or *O*-monosulfate catechol could represent detoxification pathways of BPQ due to the loss of electrophilic properties and redox activity. Moreover, other metabolites such as GSH-BPQ, NAC-BPQ or monohydroxylated-BPQ have lost their electrophilicity but are still able to redox-cycle thus producing oxidative stress and oxidative DNA damages (Scheme 4) (Nesnow et al. 2010; Huang et al. 2012).

In conclusion, as underlined by some authors, information is missing concerning mechanism of formation, stability, rate of repair and persistence of DNA adducts formed by oxy-PAHs. Nevertheless, these adducts can be considered as biomarkers of biological effective dose and thus early markers of the interaction between one chemical compound and DNA.

Other *in vitro* endpoints implicated in potential carcinogenic risk of oxy-PAHs

According to MOA framework, genotoxic/mutagenic potential is constituting a critical issue in the determination of the carcinogenic risk. Even if this key event is only partially demonstrated, one crucial measurable endpoint is the ability of oxy-PAHs to alter DNA sequence that is, to induce critical mutations in the target organs (those where tumor is suspected to appear). In complement to more direct effects, induction of certain enzymes involved in xenobiotic metabolism can be considered as a potential nonspecific and indirect mutagenic activity, by the way of facilitating the bioactivation of pro-genotoxic compounds. Indeed, as many carcinogenic/mutagenic compounds are associated to prior biotransformation by cells to exert their toxicity, the induction of these enzymes like CYP1A1 can be considered as a complementary endpoint for the carcinogenic risk assessment (Kopponen et al. 1994; Topinka et al. 1998). Moreover, this enzyme induction can contribute to increase oxy-PAH concentration by intra-cellular production of oxy-PAHs from oxidation of PAHs in presence of multiple exposure. In complement to genotoxicity, data available in the literature for mutagenicity and enzyme induction of each oxy-PAHs are collected in Table 2. Generally, mutagenicity potential has been tested by either the classical bacterial assay that is, the Ames assay on *S. typhimurium* strains, or eukaryotic systems like mutations in HPGRase gene locus associated to 8-azaguanine resistance in v79

Table 2. Summary of data in literature concerning PAKs and PAQs.

Compounds	Abbreviations/ CAS	Studied adverse endpoint associated with potential carcinogenic hazard	Biological model	Dose	Results	References	Remarks
6 <i>H</i> -benzo[<i>a</i>]pyren-6-one	BPO 3074-00-8	Enzyme induction and inhibition	HepG2	5 µM (24 h)	-	Misaki, Matsui et al. 2007	CYP, AKR1C1, NQO1, GSTM1 (mRNA)
			Mouse hepatoma cells H1L1	0.0006–2 µM	+	Misaki, Kawami et al. 2007	AhR agonist activity H1L1-luc transactivation reporter gene assay
			HaCat cells	0.1–10 µM	++	Wincent et al. 2016	Inhibitor CYP1A1 and TCDD- mediated effect
			HaCat cells Rat hepatoma H4IIE cell line	0.1–10 µM 25 µM (maximum concentration)	-/+ +	Larsson et al. 2014 Larsson et al. 2014	AhR activator AhR agonist activity H4IIE-luc transactivation reporter gene assay
7,12-benz[<i>a</i>]anthracenequinone	BAQ 2498-66-0	Mutagenicity	Salmonella Typhimurium (+/- S9 micro- somal fraction)	5–1000 µg/plate	±	Moller et al. 1985	-
			h1A1V2 human cell line (tk locus)	0–1 µg/mL	+	Durant et al. 1996	MMC: 43.0 ± 24.0 ng/mL; Relative MMC to B[a]P: 0.32 ± 0.17
			Bhas 42 mouse cells HepG2	0.001–0.05 µg/mL 5 µM (24 h)	++ +	Misaki et al. 2016 Misaki, Matsui, et al. 2007	CYP1A1, 1A2, AKR1C1, NQO1 (mRNA)
			Mouse hepatoma cells H1L1	0.0006–50 µM	++	Misaki, Kawami et al. 2007	AhR agonist activity H1L1-luc transactivation reporter gene assay
5,12-Naphthacenequinone	NCQ 1090-13-7	Genotoxicity	HaCat cells	0.1–10 µM	++	Wincent et al. 2016	AhR activator
			HaCat cells	0.1–10 µM	++	Wincent et al. 2016	CYP1A1 inhibitor
			Rat hepatoma H4IIE cell line	0.1–4.0 µM 25 µM (maximum concentration)	++ ++	Bekki et al. 2009 Larsson et al. 2014	AhR agonist activity H4IIE-luc transactivation reporter gene assay
			Japanese medaka (embryos, comet assay)	0.0001–10 µM 0–80 mg/L 48 h and 7 days	+	Machala et al. 2001 Dasgupta et al. 2014	AhR and ER-mediated activity LOEC ≤ 19 nM
5,12-Naphthacenequinone	NCQ 1090-13-7	Mutagenicity	h1A1V2 human cell line (tk locus)	0–10 µg/mL	-	Durant et al. 1996	-
			Bhas 42 mouse cells HepG2	0.02–1 µg/mL 5 µM (24 h)	++	Misaki et al. 2016 Misaki, Matsui et al. 2007	CYP1A1, 1A2, 1B1, AKR1C1, NQO1 (mRNA)
			Mouse hepatoma cells H1L1	0.00008–6 µM	++	Misaki, Kawami et al. 2007	AhR agonist activity H1L1-luc transactivation reporter gene assay
			HaCat cells Rat hepatoma H4IIE cell line	0.1–10 µM 5.7 (maximum concentration)	++ ++	Wincent et al. 2016 Larsson et al. 2014	AhR activator AhR agonist activity H4IIE-luc transactivation reporter gene assay
5,12-Naphthacenequinone	NCQ 1090-13-7	Mutagenicity	HaCat cells h1A1V2 human cell line (tk locus)	0.1–10 µM 0–10 µg/mL	++ -	Wincent et al. 2016 Durant et al. 1996	CYP1A1 inhibitor
			Bhas 42 mouse cells	0.02–1 µg/mL	+	Misaki et al. 2016	-

(continued)

Table 2. Continued.

Compounds	Abbreviations/ CAS	Studied adverse endpoint associated with potential carcinogenic hazard		Biological model	Dose	Results	References	Remarks
		Enzyme induction and inhibition	Mutagenicity					
11H-benzofluoren-11-one	B[6]FO 3074-03-1	Enzyme induction and inhibition	Mutagenicity	HepG2	5 μ M (24 H)	+	Misaki, Matsui et al. 2007	CYP1A1, 1A2, AKR1C1, NQO1 (mRNA)
				Mouse hepatoma cells H1L1	0.001–100 μ M	++	Misaki, Kawami et al. 2007	AhR agonist activity H1L1-luc transactivation reporter gene assay
1,2-Naphthoquinone	1,2-NphQ 524-42-5	Enzyme induction and inhibition	Mutagenicity	Rat hepatoma H4IIE cell line	0.1–4.0 μ M	++	Bekki et al. 2009	AhR agonist activity H4IIE-luc transactivation reporter gene assay
				Salmonella Typhimurium (+/-) S9 microsomal fraction)	50–1000 μ g/plate	+	Moller et al. 1985	–
				Bhas 42 mouse cells	0.02–1 μ g/mL	+	Misaki et al. 2016	–
				Rat hepatoma H4IIE cell line	0.1–4.0 μ M	+	Bekki et al. 2009	AhR agonist activity H4IIE-luc transactivation reporter gene assay
1,4-Naphthoquinone	1,4-NphQ 130-15-4	Enzyme induction and inhibition	Mutagenicity	Reaction with 2'-deoxy-guanosine (2'-dG) and Guanine (Gua)	10.7 mM	+	McCoull et al. 1999	Detection with mass spectrometry (HPLC-MS/MS)
				Reaction with 2'-dG, 2'-deoxyadenosine (2'-dA), adenine (Ade), and calf thymus DNA	3.05–13.33 mM	+	Saeed et al. 2007	Detection with mass spectrometry (UPLC-MS/MS)
				F344 rats	100–800 mg of naphthalene per kg body weight	+	Waidyanatha et al. 2002	Cysteinyl adducts in hemoglobin and albumin
				Salmonella Typhimurium (with and without microsomal fraction)	17.5 nmol/plate	+	Bolton et al. 2000	–
9-Fluorenone	9-FLU 486-25-9	Enzyme induction and inhibition	Mutagenicity	Bhas 42 cells	0.01–0.5 μ g/mL	+	Misaki et al. 2016	–
				UZOS-luc cell line	25 μ M	+	Bekki et al. 2009	human transthyretin-binding assays
				Rat hepatoma H4IIE cell line	0.1–4 μ M	+	Misaki, Kawami et al. 2007	AhR agonist activity H4IIE-luc transactivation reporter gene assay
				Mouse hepatoma cells H1L1	0.01–40 μ M	–	Misaki, Kawami et al. 2007	AhR agonist activity H1L1-luc transactivation reporter gene assay
Phenalenone	548-39-0	Enzyme induction and inhibition	Mutagenicity	HaCat cells	0.1–10 μ M	–	Wincent et al. 2016	AhR activator
				HaCat cells	0.1–10 μ M	+	Wincent et al. 2016	CYP1A1 inhibitor
				Rat hepatoma H4IIE cell line	Unspecified	–	Machala et al. 2001	AhR and ER-mediated activity
				Mouse hepatoma cells H1L1	0.1–4.0 μ M	–	Bekki et al. 2009	AhR agonist activity H4IIE-luc transactivation reporter gene assay
Phenalenone	548-39-0	Enzyme induction and inhibition	Mutagenicity	HaCat cells	0.1–10 μ M	–/+	Wincent et al. 2016	AhR activator
				HaCat cells	0.1–10 μ M	–	Wincent et al. 2016	CYP1A1 inhibitor
				HaCat cells	0.1–10 μ M	+	Wincent et al. 2016	Inhibitor of TCDD-mediated effect
				Mouse hepatoma cells H1L1	0.01–40 μ M	+	Misaki, Kawami et al. 2007	AhR agonist activity H1L1-luc transactivation reporter gene assay

(continued)

Table 2. Continued.

Compounds	Abbreviations/ CAS	Studied adverse endpoint associated with potential carcinogenic hazard	Biological model	Dose	Results	References	Remarks
Acenaphthenequinone	ANQ 82-86-0	Mutagenicity	h1A1v2 human cell line (tk locus)	0–15 µg/mL	+	Durant et al. 1996	MMC: 5.4 ± 0.8 µg/mL; Relative MMC to B[a]P: CYP1A1 inhibitor
			HaCat cells	0.1–10 µM	–	Wincent et al. 2016	LOEC ≤ 27 nM
9(10 <i>H</i>)-anthracenone	AO 90-44-8	Enzyme induction and inhibition	Japanese medaka (embryos, comet assay)	0–80 mg/L 48h and 7 days	+	Dasgupta et al. 2014	AhR agonist activity H1L1-luc transactivation reporter gene assay
			Mouse hepatoma cells H1L1	0.001–20 µM	–	Misaki, Kawaki et al. 2007	AhR agonist activity H4IIE-luc transactivation reporter gene assay
Xanthone	XAN 90-47-1	Mutagenicity	Rat hepatoma H4IIE cell line	0.1–4 µM	+	Bekki et al. 2009	AhR and ER-mediated activity
			Salmonella Typhimurium (without micro- somal fraction)	Unspecified 50–500 /plate	–	Machala et al. 2001 Moller et al. 1985	–
4 <i>H</i> -cyclopenta[def]phenanthrene-4-one	CPI[def]PHEO 5737-13-3	Enzyme induction and inhibition	Mouse hepatoma cells H1L1	0.001–100 µM	–	Misaki, Kawaki et al. 2007	AhR agonist activity H1L1-luc transactivation reporter gene assay
			HaCat cells	0.1–10 µM	–/+	Wincent et al. 2016	AhR activator
1,4-anthraquinone	1,4-AQ 635-12-1	Enzyme induction and inhibition	HaCat cells	0.1–10 µM	+	Wincent et al. 2016	CYP1A1 and TCDD inhibitor
			h1A1v2 human cell line (thymidine kin- ase locus)	0–10 µg/mL	–	Durant et al. 1996	–
9,10-anthraquinone	9,10-AQ 84-65-1	Enzyme induction and inhibition	Rat hepatoma H4IIE cell line	0.1–4.0 µM	+	Bekki et al. 2009	AhR agonist activity H4IIE-luc transactivation reporter gene assay
			Mouse hepatoma cells H1L1	0.0002–10 µM	–	Misaki et al. 2007b	AhR agonist activity H1L1-luc transactivation reporter gene assay
1,2-phenanthrenequinone	1,2-PQ 573-12-6	Mutagenicity	HaCat cells	0.1–10 µM	–	Wincent et al. 2016	AhR activator and CYP1A1 inhibitor
			Rat hepatoma H4IIE cell line	unspecified	–	Machala et al. 2001	AhR and ER-mediated activity
9,10-phenanthrenequinone	9,10-PQ 84-11-7	Enzyme induction and inhibition	HaCat cells	0.1–10 µM	+	Wincent et al. 2016	Inhibitor of TCDD-medi- ated effect
			h1A1v2 human cell line (tk locus)	0–5 µg/L	–	Durant et al. 1996	–
9,10-phenanthrenequinone	9,10-PQ 84-11-7	Enzyme induction and inhibition	Salmonella Typhimurium (with and without microsomal fraction)	7.0–70 nmol/plate	++	Bolton et al. 2000	–
			Mouse hepatoma cells H1L1	0.001–4 µM	+	Misaki et al. 2007b	AhR agonist activity H1L1-luc transactivation reporter gene assay
9,10-phenanthrenequinone	9,10-PQ 84-11-7	Enzyme induction and inhibition	HaCat cells	0.1–10 µM	–/+	Wincent et al. 2016	AhR activator
			Rat hepatoma H4IIE cell line	0.1–10 µM	++	Wincent et al. 2016	CYP1A1 inhibitor
9,10-phenanthrenequinone	9,10-PQ 84-11-7	Enzyme induction and inhibition	HaCat cells	0.1–4.0 µM	+	Bekki et al. 2009	AhR agonist activity H4IIE-luc transactivation reporter gene assay
			Rat hepatoma H4IIE cell line	0.1–4.0 µM	+	Bekki et al. 2009	AhR agonist activity H4IIE-luc transactivation reporter gene assay

(continued)

Table 2. Continued.

Compounds	Abreviations/ CAS	Studied adverse endpoint associated with potential carcinogenic hazard	Biological model	Dose	Results	References	Remarks
7H-benzo[<i>c</i>]fluoren-7-one	B[<i>c</i>]FO 6051-98-5	Mutagenicity	h1A1v2 human cell line (tk locus)	0–1 µg/mL	–	Durant et al. 1996	–
		Tumor promotion Enzyme induction	Salmonella Typhimurium (with and without micro- somal fraction) Bhas 42 mouse cells Mouse hepatoma cells H1L1	17.5–35 nmol/plate 60 µM 0.01–0.5 µg/mL 0.001–100 µM	+ + – ++	Bolton et al. 2000 Chesis et al. 1984 Misaki et al. 2016 Misaki et al. 2007b	AhR agonist activity H1L1-luc transactivation reporter gene assay
7H-benz[<i>de</i>]anthracen-7-one	BANTone 82-05-3	Mutagenicity	Salmonella Typhimurium (without micro- somal fraction)	50–500 µg/plate	+	Moller et al. 1985	–
		Enzyme induction and inhibition	Mouse hepatoma cells H1L1	0.003–10 µM	+	Misaki et al. 2007b	AhR agonist activity H1L1-luc transactivation reporter gene assay
7H-dibenzo[<i>c,g</i>]fluoren-7-one	194-58-1	Mutagenicity	Rat hepatoma H4IIE cell line	0.1–4 µM	++	Bekky et al. 2009	AhR agonist activity H4IIE-luc transactivation reporter gene assay
		Mutagenicity	HaCat cells Rat hepatoma H4IIE cell line	0.1–10 µM 25 µM (maximum concentration)	–/+ ++	Wincent et al. 2016 Larsson et al. 2014	AhR activator AhR agonist activity H4IIE-luc transactivation reporter gene assay
11H-benzo[<i>a</i>]fluoren-11-one	B[<i>a</i>]FO 479-79-8	Mutagenicity	Salmonella Typhimurium (+/–) S9 micro- somal fraction)	50–1000 µg/plate	+	Moller et al. 1985	–
		Enzyme induction and inhibition	HaCat cells h1A1v2 human cell line (tk locus)	0.0001–1 µM 0.1–10 µM 0–10 µg/mL	+ + +	Machala et al. 2001 Wincent et al. 2016 Durant et al. 1996	AhR and ER-mediated activity CYP1A1 and TCDD inhibitors MMC: 3.3 ± 1.8 µg/mL ; Relative MMC to B[<i>a</i>]P: 3.90E-3 ± 2.20E-3
11H-benzo[<i>a</i>]fluoren-11-one	B[<i>a</i>]FO 479-79-8	Mutagenicity	Salmonella Typhimurium (without micro- somal fraction)	5–1000 µg/plate	+	Moller et al. 1985	–
		Enzyme induction and inhibition	HepG2 Mouse hepatoma cells H1L1	5 µM (24H) 0.01–40 µM	+ ++	Misaki et al. 2007a Misaki et al. 2007b	CYP1A1, AKR1C1 (mRNA) AhR agonist activity H1L1-luc transactivation reporter gene assay
11H-benzo[<i>a</i>]fluoren-11-one	B[<i>a</i>]FO 479-79-8	Mutagenicity	HaCat cells	0.1–10 µM 0.1–10 µM	++ ++	Wincent et al. 2016	AhR activator CYP1A1 and TCDD inhibitor
		Tumor promotion	Rat hepatoma H4IIE cell line	25 µM (maximum concentration)	++	Larsson et al. 2014	AhR agonist activity H4IIE-luc transactivation reporter gene assay
11H-benzo[<i>a</i>]fluoren-11-one	B[<i>a</i>]FO 479-79-8	Mutagenicity	Salmonella Typhimurium (without micro- somal fraction)	50–1500 µg/plate	–	Moller et al. 1985	AhR agonist activity H4IIE-luc transactivation reporter gene assay
		Tumor promotion	Bhas 42 mouse cells	0.02–1 µg/mL	+	Misaki et al. 2016	–

(continued)

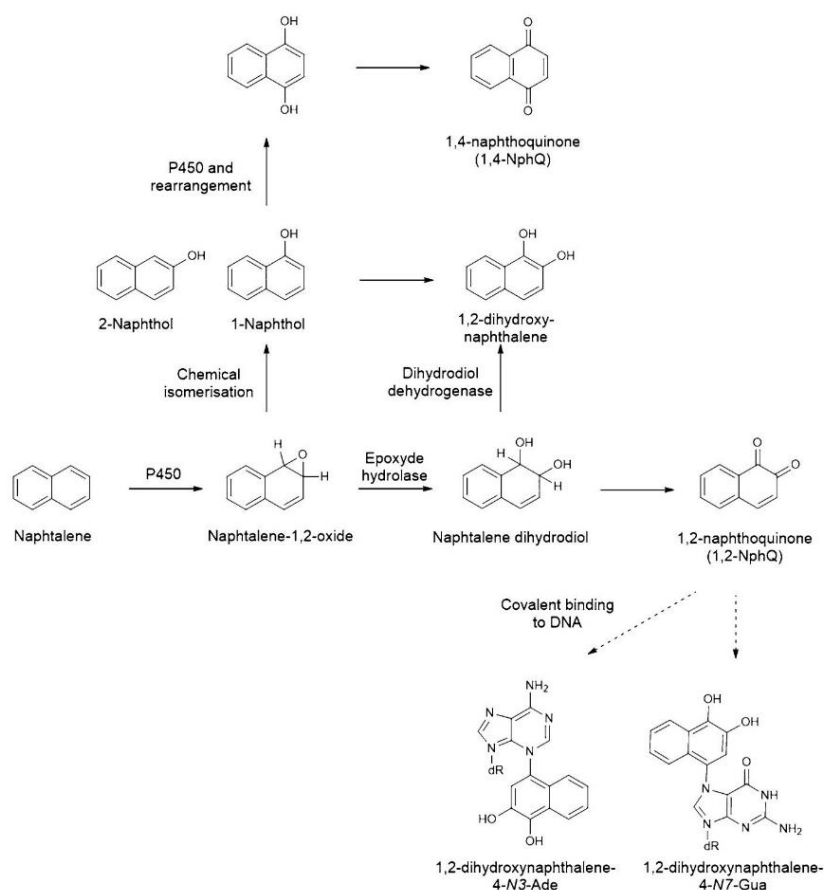
Table 2. Continued.

Compounds	Abbreviations/ CAS	Studied adverse endpoint associated with potential carcinogenic hazard	Biological model	Dose	Results	References	Remarks
cyclopenta[cd]pyren-3(4H)-one	CPPO 69795-70-6	Enzyme induction and inhibition	HepG2 Mouse hepatoma cells H1L1	5 μ M (24H) 0.0006–50 μ M	+	Misaki et al. 2007a Misaki et al. 2007b	AKR1C1 (mRNA) AHR agonist activity H1L1-luc transactivation reporter gene assay
benzo[<i>c</i>]phenanthrene-1,4-quinone	B[<i>c</i>]P-1,4-Q 109699-80-1	Mutagenicity Enzyme induction and inhibition	h1A1v2 human cell line (tk locus) UZOS-luc cell line Rat hepatoma H4IIE cell line	0–10 μ g/mL 25 μ M 0.1–4 μ M	+	Durant et al. 1996 Bekki et al. 2009	human transthyretin-bind- ing assays AHR agonist activity H4IIE-luc transactivation reporter gene assay
1,4-chrysenequinone	1,4-CQ 100900-16-1	Enzyme induction and inhibition	Mouse hepatoma cells H1L1 HaCat cells Rat hepatoma H4IIE cell line UZOS-luc cell line Rat hepatoma H4IIE cell line	0.0002–10 μ M 0.1–10 μ M 0.1–10 μ M 24 μ M (maximum concentration) 25 μ M 0.1–4.0 μ M	++ -/+ + ++ + ++	Misaki et al. 2007b Wincent et al. 2016 Larsson et al. 2014 Bekki et al. 2009 Durant et al. 1996	AHR agonist activity H1L1-luc transactivation reporter gene assay AHR activator CYP1A1 inhibitor AHR agonist activity H4IIE-luc transactivation reporter gene assay human transthyretin-bind- ing assays AHR agonist activity H4IIE-luc transactivation reporter gene assay
5,6-chrysenequinone	5,6-CQ 2051-10-7	Mutagenicity Enzyme induction and inhibition	h1A1v2 human cell line (tk locus) Rat hepatoma H4IIE cell line	0–1 μ g/mL 0.1–4.0 μ M	- +	Durant et al. 1996 Bekki et al. 2009	AHR agonist activity H4IIE-luc transactivation reporter gene assay
13 <i>H</i> -dibenz[<i>a,h</i>]fluoren-13-one	86854-01-5	Mutagenicity	Salmonella Typhimurium (without micro- somal fraction)	10–1000 μ g/plate	±	Moller et al. 1985	-
7 <i>H</i> -dibenz[<i>de,j</i>]anthracen-7-one	80440-44-4	Mutagenicity	h1A1v2 human cell line (tk locus) Salmonella Typhimurium (without micro- somal fraction)	0–10 mg/L 10–1000 μ g/plate	- ±	Durant et al. 1996 Moller et al. 1985	-
1,6-benzo[<i>a</i>]pyrenequinone	BaP-1,6-dione 3067-13-8	Mutagenicity	h1A1v2 human cell line (tk locus) Chinese hamster V79 cells Salmonella typhimurium (without micro- somal fraction)	0–0.3 μ g/mL 2–8 μ g/ml 30 μ M 1–5 μ g/plate	- - ++ -	Durant et al. 1996 Wislocki et al. 1976 Chesis et al. 1984 Wislocki et al. 1976	-
3,6-benzo[<i>a</i>]pyrenequinone	BaP-3,6-dione 3067-14-9	Mutagenicity	h1A1v2 human cell line (tk locus) Chinese hamster V79 cells	0–0.3 μ g/mL 1–4 μ g/ml 30 μ M 1–10 μ g/plate	- - ++ -	Durant et al. 1996 Wislocki et al. 1976 Chesis et al. 1984 Wislocki et al. 1976	-

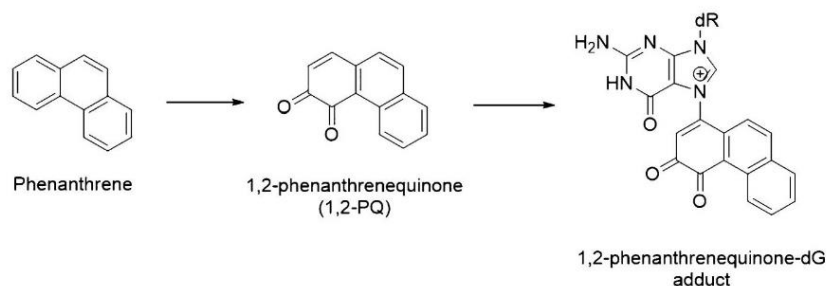
(continued)

Table 2. Continued.

Compounds	Abbreviations/ CAS	Studied adverse endpoint associated with potential carcinogenic hazard	Biological model	Dose	Results	References	Remarks
4,5-benzo[<i>a</i>]pyrenequinone	42286-46-4	Mutagenicity	<i>Salmonella Typhimurium</i> (without micro- somal fraction) h1A1V2 human cell line (tk locus) Chinese hamster V79 cells <i>Salmonella typhimurium</i> (without micro- somal fraction)	0–0.6 µg/mL 2–8 µg/ml 1–10 µg/plate	– – –	Durant et al. 1996 Wislocki et al. 1976 Wislocki et al. 1976	– – –
7,8-benzo[<i>a</i>]pyrenequinone	BPQ 65199-11-3	Genotoxicity	A549 cells (DNA adducts) H358 cells (DNA adducts) HBEC-KT cells (DNA adducts) <i>Salmonella typhimurium</i> (with and without microsomal fraction)	5 µM (24H) 5 µM (24H) 5 µM (24H) 35–70 nmol/plate	+ – + ++	Huang et al. 2013 Bolton et al. 2000	metabolite of BaP.
6,12-Benzo[<i>a</i>]pyrenequinone	BaP-6,12-dione 3067-12-7	Mutagenicity	p53 Yeast Assay (y1G397)	0.25 µM (2H)	+	Sen et al. 2012	<i>in situ</i> generation of BaP radical cations, B[a]P-1,6-dione and B[a]P-3,6-dione, with positive results
11,12-Benzo[<i>a</i>]pyrenequinone	60657-26-3	Mutagenicity	<i>Salmonella typhimurium</i> (without micro- somal fraction) Chinese hamster V79 cells <i>Salmonella Typhimurium</i> (without micro- somal fraction)	1–5 µg/plate 90 µM 2–8 µg/plate 1–10 µg/plate	– + – –	Wislocki et al. 1976 Chesis et al. 1984 Wislocki et al. 1976 Wislocki et al. 1976	– – – –
Anthanthrenequinone	641-13-4	Mutagenicity	Chinese hamster V79 cells	0.05–1 µg/plate	–	Wislocki et al. 1976	–
6,13-Pentacenequinone	PCQ 3029-32-1	Enzyme induction and inhibition	h1A1V2 human cell line (tk locus) Mouse hepatoma cells H1L1	0–1 µg/mL 0.00008–1 µM	+ +	Durant et al. 1996 Misaki et al. 2007b	AhR agonist activity H1L1-luc transactivation reporter gene assay
Oxy-PAH fraction (Soil)	–	–	HepG2 cells (γH2AX)	0.01–1.0 mg soil/ mL, 24–48H	+	Mattsson et al. 2009	also, induction of Mdm2 phosphorylation
Oxy-PAH fraction (air)	–	Genotoxicity	Calif thymus DNA (+microsome)	0.005–1 µg/µg DNA	+	Umbuzeiro et al. 2008	32P-postlabeling.
		Mutagenicity	<i>salmonella Typhimurium</i> (+/- S9 micro- somal fraction)	0.5–100 µg/ plate (90 min)	+		organic extract of urban particulate matter (UPM); TA98 and YG 1041 <i>Salmonella</i> strains



Scheme 5. Metabolic activation of naphthalene (adapted from Waidyanatha et al. 2002 and Saeed et al. 2007).



Scheme 6. Metabolic activation of phenanthrene (adapted from Yao et al. 2016).

Chinese hamster lung cells (Wislocki et al. 1976) and mutations at the tyrosine kinase gene locus of Human B lymphoblastoid cell line (h1A1v2) (Durant et al. 1996). Considering the limited number of oxy-PAHs tested for at least one toxic effect (enzyme induction/inhibition, genotoxicity, mutagenicity, or tumor promotion), the results are unequivocal on the concern that represent the oxy-PAHs. Indeed, 24 oxy-PAHs of the Table 2 were shown as mutagenic either for eukaryotic or prokaryotic cells over the 34 tested. This proportion is similar for tumor promotion and enzyme induction/inhibition (6 among 7 and 16 among 22 tested compounds respectively). It can be noticed that results are contrasted for BAQ, 5,12-naphthacenequinone (NCQ), and 11-*H*-benzo[*a*]fluorene-

11-one (B[*a*]FO) for which mutagenicity tests are negative whereas tumor promotion and enzyme induction tests are positive, thus questioning the underlying toxicity mechanisms of these compounds.

To go into more details, some specific works can be highlighted for a better comprehension of the issues that can represent the oxy-PAHs congeners. In water, a study conducted on two rivers in Barcelona has demonstrated that base-pair substitution and frameshift mutagens are recovered in either river water and coastal sediments. Moreover, S9 mix mutagenic activation rises to an enhancement of the mutagenicity in the more polar fractions accounting for 50% of the total organic mass extract (Grifoll et al. 1992).

In air, the first study concerns the evaluation of the global mutagenicity of the different fractions of UPM sample. Using the conventional *in vitro* Ames reverse mutation assay in *S. typhimurium* strains TA98 and YG1041, Umbuzeiro et al. showed unexpected negligible mutagenic activity of the organic extract after organic extraction of UPM containing the non-polar PAHs including ones from the US EPA list (Umbuzeiro et al. 2008). By contrast, significant mutagenic activities were detected in association with more polar extracted fractions of UPM containing the nitro-PAHs or oxy-PAHs congeners, that is in line with the results on individual compounds. The 3-nitrobenzanthrone was detected in nitro-PAHs fraction. From this, it can be suggested that the parent compound BANTone and probably several other target oxy-PAHs are partly included in this fraction. This highlights that unknown oxy-PAH can be incriminated in the mutagenic activities of these polar fractions.

The more abundant results on isolated oxy-PAHs were obtained by Durant et al. (1996). A panel of 67 individual persistent-aromatic compounds identified or suspected to be present in urban aerosol was selected. The mutagenic potential of these compounds was tested in the Human B lymphoblastoid cell lines (h1A1v2) by detecting mutations in tyrosine kinase reporter gene. Over the 19 oxy-PAHs tested, phenalenone, BANTone, cyclopenta[*cd*]pyren-3(4*H*)-one (CPPO), BPO, and anthanthrenequinone were found to be mutagenic at the tested doses, with satisfying dose-response curves. The mutagenic potential of these oxy-PAHs was comparable to nitro-PAHs but lower than BaP except for BPO which exhibits mutagenic potential in the same order of magnitude than BaP. Large interindividual differences were also observed. A 800-fold difference in the lowest mutagenic concentration was calculated between the higher and the lower mutagenic compounds that is, BPO and 3-nitro-6*H*-dibenzo[*b,d*]pyran-6-one, respectively. Authors concluded that it was the first time that substantial mutagenicity attributed to BPO was described, noting that previous results on a bacterial model (*S. Typhimurium*) were negative or slightly positive (Moller et al. 1985).

This difference of mutagenicity between prokaryotic and eukaryotic cells have been also reported by several studies (Wislocki et al. 1976; Chesis et al. 1984; Bolton et al. 2000). Wislocki et al. worked on 29 BaP oxidized congeners in *S. Typhimurium* (Ames test) and Chinese hamster V79 cells. Bacterial assays included TA98, TA100, and TA1538 strains but were limited to the version without metabolic activation. Mutagenicity was variable from one molecule to another and between both *in vitro* models. In particular, BaP-4,5-oxide was strongly mutagenic in both systems while BaP-11,12-oxide was strongly mutagenic only in eukaryotic cells.

In 2012, Sen et al. compared the mutagenicity of different metabolites of BaP associated to the 3 identified metabolic pathways of this PAH by using a functional assay for p53 mutation in the yIG397 yeast strain, in which transfected functional human p53 gene activates transcription of the ADE2, a reporter gene associated to adenine biosynthetic pathway (Sen et al. 2012). The tumor suppressor p53 gene mutations are of particular interest because they are frequently associated to the development of cancers in humans.

In this study, it was demonstrated that BaP-1,6-dione, BaP-3,6-dione and especially BaP-7,8-dione were mutagenic in p53 gene by inducing G>T transversions and G>A transitions primarily, evoking a redox mechanism.

This tumor promoting potential was also highlighted by Misaki et al. in 2016 (Misaki et al. 2016). They applied a recently developed *in vitro* transformation assay on six PAHs, seven oxy-PAHs and seven nitro-PAHs. This assay using mouse embryonic fibroblast cells transfected with the v-Haras gene (Bhas 42 cells) is recognized to detect most of tumor promoting agents by compiling foci of cell transformation (Sasaki et al. 2015). Among the 20 PAHs congeners tested, the highest tumor-promoting activity (TPA) was found for BPO. The results showed similar results for PAHs, nitro- and oxy-PAHs. The order of strength of TPA of oxy-PAHs was BPO > 1,2-NphQ > BAQ > NCQ and 1,2-NphQ exhibited the greatest decrease in cellular viability. In addition, mRNA expression of CYP1A1 (associated with AhR-mediated activation which is involved in PAHs activation) was observed with the exposure to 1,2-NphQ and BPO. Nevertheless, it is important that this test did not detect BaP as a tumor promoting agent.

In complement to direct mutagenic and tumor promoting effects, capacities to induce cellular enzymatic machinery for the metabolism of xenobiotics can be associated to some potential mechanisms of carcinogenicity. The mRNA induction of 6 enzymes including CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1, aldo-keto reductase 1C1 (AKR1C1), NADPH-dependent quinone oxidoreductase 1 (NQO1), and glutathione S-transferase M1 (GSTM1) has been tested in Human hepatoma HepG2 cells exposed to PAHs and oxy-PAHs (Misaki, Matsui et al. 2007). These cells were exposed to thirteen PAHs and seven oxy-PAHs. As expected, the aldo-keto reductase was most activated for ketones. Indeed, AKR1C1 mRNA was significantly induced by B[*a*]FO, 11*H*-benzo[*b*]fluoren-11-one (B[*b*]FO), NCQ, BAQ, and CPPO. NQO1 was also induced by BAQ, NCQ, and B[*b*]FO but in a lower extent compared to other PAHs, probably exhibiting significant antioxidant response and relatively prompt metabolism of these oxy-PAHs. NCQ, BAQ, B[*a*]FO, and B[*b*]FO induced significantly a low induction of CYP1A1 and CYP1A2 (except B[*a*]FO) mRNA contrary to most other PAHs tested. CYP1B1 was only slightly induced by NCQ.

Particularly, the activation of AhR isoforms leading to the induction of crucial enzymes of the metabolism is considered as a probable key event in the particular toxicity of certain oxy-PAHs, beyond the unique genotoxicity/mutagenicity endpoint. As an example, developmental toxicity in the zebrafish environmental model has been reported on the basis on 38 tested oxy-PAHs with different toxic clusters related to structure activity relationship. Comprehensive toxic patterns have been formulated in the light of 22 developmental endpoints including modification of the AhR expression in different tissues (Knecht et al. 2013). Structurally, the more toxic compounds were those constituted with adjacent diones on 6-carbon moieties or terminal, para-diones on muti-ring backbones. Suspected mechanism of developmental toxicity in relation with AhR induction, in particular the AhR2 isoform, is evoked in the same model exposed to contaminated soil extracts (Wincent et al. 2015). In the same manner, AhR

agonist/antagonist activity and human transthyretin-binding activity (TTR-binding activity) have been tested by Bekki et al. and Larsson et al. thanks to the H4IIE-luc transactivation bioassay. AhR activity was demonstrated for several oxy-PAHs and strong TTR-binding activity was detected for every oxy-PAHs with a maximum value for 1,4-benzo[*c*]phenanthrenequinone. These results confirm that oxy-PAHs toxicity may be explained in different ways (Machala et al. 2001; Bekki et al. 2009; Larsson et al. 2014).

Perspectives and further data to collect

PACs belong to a large family of pollutants that are widely spread in the environment, especially since the beginning of industrial area. Some of these compounds are known to be toxic for humans and living organisms and a priority list of 16 compounds has been elaborated in the 1970s by the US EPA. Among different toxic endpoints attributed to these chemicals, carcinogenicity is one of the most concerning, especially in regard to issues associated to potential toxic effects at repeated environmental low concentrations. It has been shown that the total toxicity of the PACs fraction from samples collected in the environment cannot be attributed exclusively, neither to those from the priority list nor to unsubstituted PAHs. Other classes of compounds derived from PAHs, like oxy-PAHs and nitro-PAHs are probably involved in this toxicity, questioning the initial priority list as relevant tool for carcinogenic risk (Andersson and Achten 2015). While nitro-PAHs have been extensively studied, oxy-PAHs have been poorly studied. Nevertheless, when they are searched in the environment, these compounds are always detected at higher concentrations than nitro-PAHs. For this reason, oxy-PAHs are increasingly detected in the environment in any of soil, air, or water as well as in food but unfortunately their toxic endpoints are still poorly studied. Genotoxicity of oxy-PAHs was demonstrated by different biological assays particularly comet and CBMN assays and formation of DNA adducts revealed by ³²P-postlabelling and mass spectrometry. However, few studies were reported concerning the structure of their DNA-adducts, in their *in vitro* or *in vivo* exposures. Concerning mutagenicity, only few molecules are documented while all the oxy-PAHs class can be problematic. Data are missing concerning dose-response for DNA adduct formation, stability, persistence and repair, genetic alterations, epigenetic studies and tumor studies either in animal or in humans. These data are crucial for a satisfying toxicological assessment of these compounds according to the MOA approach.

Taking into account the great diversity of structures of PAHs and their oxidation products, the existence of unknown oxy-PAHs contributing to mutagenic/carcinogenic risk is highly probable. Thus, we believe that it would be interesting to select a set of oxy-PAHs to be studied in priority. This choice can be done from literature on the basis of their occurrence in the environment and their genotoxic/mutagenic potency.

With regard to all fragmented data, four molecules can be selected. BPO, BAQ, NCQ, and B[*b*]FO have the most

hazardous potential according to the different mechanisms of carcinogenicity (genotoxicity, mutagenicity, tumor promotion or enzyme induction) explored. The choice of these compounds can be justified as follows:

- **BPO** is mutagenic in Human cell lines at a concentration three times lower than BaP. Moreover, BPO has been found to be a strong tumor promotor in the Bhas 42 mouse cell transformation assay and is mutagenic on h1A1v2 Human cell line model and HaCat cells. Mechanisms of tumor promoting activity are still unknown but are probably not associated to CYP1A1 mRNA induction (Durant et al. 1996; Misaki, Kawami et al. 2007, 2016; Misaki, Matsui et al. 2007a). BPO has also been detected in all air samples when searched for (Table 1).
- **BAQ** has also been found to be a good tumor promotor and enzymatic inductor in HepG2 cells, HaCat cells, HEIIE cells and H1L1 cells (Misaki, Kawami et al. 2007; Misaki, Matsui et al. 2007; Bekki et al. 2009; Larsson et al. 2014; Misaki et al. 2016; Wincent et al. 2016). Moreover, this compound is probably genotoxic *in vivo* in the light of the elevated DNA single strand break observed in *Japanese Medaka* embryo system, at its lowest tested concentration of 5 µg/L (after 48h of exposure, Dasgupta et al. 2014). Its genotoxic potential is higher than other PAHs like BaP and benz[*a*]anthracene. BAQ is also very present in soil, air, and coastal and river sediments (Table 1).
- **NCQ** is a good tumor promotor and enzymatic inductor in HepG2 cells, HaCat cells, H4IIE cells and H1L1 cells (Misaki, Kawami et al. 2007; Misaki, Matsui et al. 2007; Bekki et al. 2009; Larsson et al. 2014; Misaki et al. 2016; Wincent et al. 2016). Even if it doesn't seem to be mutagenic on h1A1v2 Human cell line model, it can be seen in Table 1 that this compound is very present in soil and air and has been detected in sediments.
- **B[*b*]FO** is a good tumor promotor and enzymatic inductor in HepG2 cells, H1L1 cells and H4IIE cells (Misaki, Kawami et al. 2007; Misaki, Matsui et al. 2007; Bekki et al. 2009). It was preferred to B[*a*]FO because of its mutagenic potency demonstrated by Durant (Durant et al. 1996). It is important to intensify the research efforts on this compound because it is one of the major oxy-PAHs in diesel and gasoline exhaust and it has been found at high concentrations in both urban particulate matter and aerosol (Table 1). Its presence has also been detected in sediments.

We suggest these compounds could be good sentinels for all the oxy-PAH family. To evaluate the impact of these compounds on Human health, it is crucial to develop specific biomarkers of exposure and/or risk. DNA adducts can be those biomarkers. Another approach to characterize relevant biomarkers of oxy-PAHs are protein adducts. Only one study deals with these biomarkers. It was conducted by Waidyanatha et al. on F344 rats exposed to naphthalene metabolites at doses ranging from 100 to 800 mg per kg of body weight (Waidyanatha et al. 2002). Cysteinyl adducts

were described between 1,2-NphQ, 1,4-NphQ, and naphthalene-1,2-oxide with albumin and hemoglobin. Formation of these adducts were dose-dependent with albumin and hemoglobin. Moreover, low levels of 1,2-NphQ and 1,4-NphQ were detected in rats and humans without previous exposure. Even if these compounds are not found at high enough concentrations to be considered as sentinels, their reactivity with DNA and proteins open the possibility to detect adducts formed by the selected compounds.

Finally, concerning DNA adducts, recent advances in technological tools, especially in the mass spectrometry field, associated to more sophisticated analysis of the results, in an adductomic approach will probably contribute efficiently to a better understanding of the carcinogenic risk associated to oxy-PAHs.

Acknowledgements

Adeline Clergé is grateful to the French Ministry of Education and Research for her Ph.D. fellowship. The authors also appreciate the excellent suggestions made by the reviewer. Authors thank Dr. Carla Delépée for her profound insight into the linguistic part of present work and instructive discussion concerning the factual content.

Declaration of interest

The employment affiliation of the authors is as shown on the cover page. However, it should be recognized that each individual participated in the review process and preparation of this article as an independent professional and not as a representative of their employer. Dr Jérémie Le Goff is employed by ADnTox SAS, <http://www.adntox.com/>, a toxicology company dedicated to human and environmental health that brings new solutions for genotoxicity assessment, in relation with DNA adducts detection. The authors have sole responsibility for the writing and content of the article. Preparation of this review was conducted during the normal course of the authors' employment without any external support.

ORCID

Raphaël Delépée  <http://orcid.org/0000-0002-9894-1268>

References

- Abdel-Shafy HI, Mansour MSM. 2016. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egypt J Petrol.* 25:107–123.
- Akimoto Y, Aoki T, Nito S, Inouye Y. 1997. Oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons from MSW incinerator fly ash. *Chemosphere.* 34: 263–273.1
- Albinet A, Leoz-Garziandia E, Budzinski H, Villenave E. 2006. Simultaneous analysis of oxygenated and nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons on standard reference material 1649a (urban dust) and on natural ambient air samples by gas chromatography–mass spectrometry with negative ion chemical ionisation. *J Chromatogr A.* 1121: 106–113.
- Albinet A, Leoz-Garziandia E, Budzinski H, Villenave E. 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), nitrated PAHs and oxygenated PAHs in ambient air of the marseilles area (south of france): concentrations and sources. *Sci Total Environ.* 384:280–292.1
- Allen JO, Dookeran NM, Taghizadeh K, Lafleur AL, Smith KA, Sarofim AF. 1997. Measurement of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons associated with a size-segregated urban aerosol. *Environ Sci Technol.* 31:2064–2070.
- Alsberg T, Strandell M, Westerholm R, Stenberg U. 1985. Fractionation and chemical analysis of gasoline exhaust particulate extracts in connection with biological testing. *Environ Int Genotoxic Air Pollut.* 11:249–257.
- Andersson JT, Achten C. 2015. Time to say goodbye to the 16 EPA PAHs? Toward an up-to-date use of PACs for environmental purposes. *Polycycl Aromat Compd.* 35:330–354.
- Andersson BE, Henrysson T. 1996. Accumulation and degradation of dead-end metabolites during treatment of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons with five strains of white-rot fungi. *Appl Microbiol Biotechnol.* 46:647–652.
- Andersson BE, Lundstedt S, Tornberg K, Schnürer Y, Oberg LG, Mattiasson B. 2003. Incomplete degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil inoculated with wood-rotting fungi and their effect on the indigenous soil bacteria. *Environ Toxicol Chem.* 22: 1238–1243.
- Arlt VM. 2005. 3-Nitrobenzanthrone, a potential human cancer hazard in diesel exhaust and urban air pollution: a review of the evidence. *Mutagenesis.* 20:399–410.
- Atkinson R, Arey J. 2007. Mechanisms of the gas-phase reactions of aromatic hydrocarbons and PAHs with OH and NO₃ radicals. *Polycycl Aromat Compd.* 27:15–40.1
- Bailey PS. 1982. Ozonation in organic chemistry. Nonolefinic Compounds. Vol II. Amsterdam: Elsevier.
- Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B. 2005. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen.* 45:106–114.
- Balu N, Padgett WT, Lambert GR, Swank AE, Richard AM, Nesnow S. 2004. Identification and characterization of novel stable deoxyguanosine and deoxyadenosine adducts of benzo[a]pyrene-7,8-quinone from reactions at physiological pH. *Chem Res Toxicol.* 17:827–838.
- Balu N, Padgett WT, Nelson GB, Lambert GR, Ross JA, Nesnow S. 2006. Benzo[a]pyrene-7,8-quinone-3'-mononucleotide adduct standards for ³²P postlabeling analyses: detection of benzo[a]pyrene-7,8-quinone-calf thymus DNA adducts. *Anal Biochem.* 355:213–223.
- Bandowe BAM, Bigalke M, Boamah L, Nyarko E, Saalia FK, Wilcke W. 2014. Polycyclic aromatic compounds (PAHs and oxygenated PAHs) and trace metals in fish species from Ghana (West Africa): bioaccumulation and health risk assessment. *Environ Int.* 65:135–146.
- Bandowe BAM, Meusel H, Huang R-J, Ho K, Cao J, Hoffmann T, Wilcke W. 2014. PM_{2.5}-bound oxygenated PAHs, Nitro-PAHs and Parent-PAHs from the atmosphere of a Chinese megacity: seasonal variation, sources and cancer risk assessment. *Sci Total Environ.* 473–474:77–87.
- Bandowe BAM, Nkansah MA. 2016. Occurrence, distribution and health risk from polycyclic aromatic compounds (PAHs, oxygenated-PAHs and azaarenes) in street dust from a major West African metropolis. *Sci Total Environ.* 553:439–449.
- Barrado AI, García S, Barrado E, Pérez RM. 2012. PM_{2.5}-Bound PAHs and hydroxy-PAHs in atmospheric aerosol samples: correlations with season and with physical and chemical factors. *Atmos Environ.* 49: 224–232.
- Bayona JM, Casellas M, Fernández P, Solanas AM, Albaigés J. 1994. Sources and seasonal variability of mutagenic agents in the Barcelona city aerosol. *Chemosphere.* 29:441–450.
- Bekki K, Takigami H, Suzuki G, Tang N, Hayakawa K. 2009. Evaluation of toxic activities of polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives using *in vitro* bioassays. *J Health Sci.* 55:601–610.
- Bodzek D, Janoszka B, Dobosz C, Warzecha L, Bodzek M. 1997. Determination of polycyclic aromatic compounds and heavy metals in sludges from biological sewage treatment plants. *J Chromatogr A.* 774:177–192.
- Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ. 2000. Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol.* 13:135–160.
- Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek MEB, Vickers C, Willcocks D, Farland W. 2006. IPCS framework for analyzing the relevance of a cancer mode of action for humans. *Crit Rev Toxicol.* 36: 781–792.
- Boobis AR, Daston GP, Preston RJ, Olin SS. 2009. Application of key events analysis to chemical carcinogens and noncarcinogens. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 49:690–707.
- Boublil L, Assémat E, Borot M-C, Boland S, Martinon L, Sciare J, Baeza-Squiban A. 2013. Development of a repeated exposure protocol of

- human bronchial epithelium *in vitro* to study the long-term effects of atmospheric particles. *Toxicol in Vitro Int J Publ Assoc BIBRA*. 27: 533–542.
- Brooks LR, Hughes TJ, Claxton LD, Austern B, Brenner R, Kremer F. 1999. Bioassay-directed fractionation and chemical identification of mutagens in bioremediated soils. *Res Gate* 106 (Suppl 6):1435–1440.
- Castells P, Santos FJ, Galceran MT. 2003. Development of a sequential supercritical fluid extraction method for the analysis of nitrated and oxygenated derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban aerosols. *J Chromatogr. A*. 1010:141–151.
- Chen Y, Shen G, Su S, Shen H, Huang Y, Li T, Li W, Zhang Y, Lu Y, Chen H, et al. 2014. Contamination and distribution of parent, nitrated, and oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat. *Environ Sci Pollut Res*. 21:11521–11530.
- Chesis PL, Levin DE, Smith MT, Ernster L, Ames BN. 1984. Mutagenicity of quinones: pathways of metabolic activation and detoxification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 81:1696–1700.
- Cho AK, Di Stefano E, You Y, Rodriguez CE, Schmitz DA, Kumagai Y, Miguel AH, Eiguren-Fernandez A, Kobayashi T, Avol E, et al. 2004. Determination of four quinones in diesel exhaust particles, SRM 1649a, and atmospheric PM_{2.5} special issue of aerosol science and technology on findings from the fine particulate matter supersites program. *Aerosol Sci Technol*. 38:68–81.
- Choudhury DR. 1982. Characterization of polycyclic ketones and quinones in diesel emission particulates by gas chromatography/mass spectrometry. *Environ Sci Technol*. 16:102–106.
- Chung MY, Lazaro RA, Lim D, Jackson J, Lyon J, Rendulic D, Hasson AS. 2006. Aerosol-borne quinones and reactive oxygen species generation by particulate matter extracts. *Environ Sci Technol*. 40:4880–4886.
- Cochran RE, Dongari N, Jeong H, Beránek J, Haddadi S, Shipp J, Kubátová A. 2012. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxy-, nitro-, and hydroxy-oxidation products. *Anal Chim Acta*. 740:93–103.
- Cook JW, Hewett CL, Hieger I. 1933. The isolation of a cancer-producing hydrocarbon from coal tar. Parts I, II, and III. *J. Chem Soc*. 106: 395–405.
- Dasgupta S, Cao A, Mauer B, Yan B, Uno S, McElroy A. 2014. Genotoxicity of Oxy-PAHs to Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) embryos assessed using the comet assay. *Environ Sci Pollut Res*. 21:13867–13876.
- Davis EB. 2006. Trends in environmental research. New York (NY): Nova Publishers.
- de Oliveira Galvão MF, de Oliveira Alves N, Ferreira PA, Caumo S, de Castro Vasconcellos P, Artaxo P, de Souza Hacon S, Roubicek DA, Batistuzzo de Medeiros SR. 2018. Biomass burning particles in the Brazilian amazon region: mutagenic effects of nitro and oxy-PAHs and assessment of health risks. *Environ Pollut (Barking, Essex: 1987)*. 233: (February):960–970.
- Del Rosario Sienra M. 2006. Oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air particulate matter. *Atmos Environ* 40:2374–2384.
- Delgado-Saborit JM, Alam MS, Godri Pollitt KJ, Stark C, Harrison RM. 2013. Analysis of atmospheric concentrations of quinones and polycyclic aromatic hydrocarbons in vapour and particulate phases. *Atmos Environ*. 77:974–982.
- Di Filippo P, Pomata D, Riccardi C, Buiarelli F, Gallo V. 2015. Oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in size-segregated urban aerosol. *J Aerosol Sci*. 87:126–134.
- Du Four VA, Van Larebeke N, Janssen CR. 2004. Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples in Flanders, Belgium. *Mutat Res*. 558:155–167.
- Durant JL, Busby WF, Lafleur AL, Penman BW, Crespi CL. 1996. Human cell mutagenicity of oxygenated, nitrated and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons associated with urban aerosols. *Mutat Res Genet Toxicol*. 371:123–157.
- Durant JL, Lafleur AL, Plummer EF, Taghizadeh K, Busby WF, Thilly WG. 1998. Human lymphoblast mutagens in urban airborne particles. *Environ Sci Technol*. 32:1894–1906.
- Enya T, Kawanishi M, Suzuki H, Matsui S, Hisamatsu Y. 1998. An unusual DNA adduct derived from the powerfully mutagenic environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone. *Chem Res Toxicol*. 11:1460–1467.
- Enya T, Suzuki H, Watanabe T, Hirayama T, Hisamatsu Y. 1997. 3-Nitrobenzanthrone, a powerful bacterial mutagen and suspected human carcinogen found in diesel exhaust and airborne particulates. *Environ Sci Technol*. 31:2772–2776.
- Eriksson M, Dalhammar G, Borg-Karlson AK. 2000. Biological degradation of selected hydrocarbons in an old PAH/creosote contaminated soil from a gas work site. *Appl Microbiol Biotechnol*. 53:619–626.
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res Rev Genet Toxicol*. 339:37–59.
- Fenech M. 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ Health Perspect*. 101:101–107.
- Fenech M, Crott J, Turner J, Brown S. 1999. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. *Mutagenesis* 14:605–612.
- Fernandez P, Bayona JM. 1992. Use of off-line gel permeation chromatography-normal-phase liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic compounds in environmental samples and standard reference materials (air particulate matter and marine sediment). *J Chromatogr A*. 625:141–149.
- Fernandez P, Grifoll M, Solanas AM, Bayona JM, Albaiges J. 1992. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. *Environ Sci Technol*. 26:817–829.
- Flowers L, Ohnishi ST, Penning TM. 1997. DNA strand scission by polycyclic aromatic hydrocarbon O-quinones: role of reactive oxygen species, Cu(II)/Cu(I) redox cycling, and O-semiquinone anion radicals. *Biochemistry*. 36:8640–8648.
- Flowers-Geary L, Harvey RG, Penning TM. 1993. Cytotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon O-quinones in rat and human hepatoma cells. *Chem Res Toxicol*. 6:252–260.
- Fujiwara F, Guíñez M, Cerutti S, Smichowski P. 2014. UHPLC-(+)APCI-MS/MS determination of oxygenated and nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulate matter and tree barks collected in Buenos Aires city. *Microchem J*. 116:118–124.
- Gaylor DW, Culp SJ, Goldstein LS, Beland FA. 2000. Cancer risk estimation for mixtures of coal tars. *Risk Anal*. 20:81–86.
- Grifoll M, Solanas AM, Bayona JM. 1992. Bioassay-directed chemical characterization of genotoxic agents in the dissolved and particulate water phases of the besos and llobregat rivers (Barcelona, Spain). *Arch Environ Contam Toxicol*. 23:19–25.
- Hannigan MP, Cass GR, Penman BW, Crespi CL, Lafleur AL, Busby WF, Thilly WG, Simoneit BRT. 1998. Bioassay-directed chemical analysis of los angeles airborne particulate matter using a human cell mutagenicity assay. *Environ Sci Technol*. 32:3502–3514.
- Hargis JC, Schaefer HF, III, Houk KN, Wheeler SE. 2010. Noncovalent Interactions of a benzo[a]pyrene diol epoxide with DNA base pairs: insight into the formation of adducts of (+)-BaP DE-2 with DNA. *J Phys Chem A*. 114:2038–2044.
- Haritash AK, Kaushik CP. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J Hazard Mater*. 169:1–15.
- Harrison RM, Alam MS, Dang J, Ismail IM, Basahi J, Alghamdi MA, Hassan IA, Khoder M. 2016. Relationship of polycyclic aromatic hydrocarbons with oxy(quinone) and nitro derivatives during air mass transport. *Sci Total Environ*. 572: 1175–1183.
- Huang M, Blair IA, Penning TM. 2013. Identification of stable benzo[a]pyrene-7,8-dione-DNA adducts in human lung cells. *Chem Res Toxicol*. 26:685–692.
- Huang M, Liu X, Basu SS, Zhang L, Kushman ME, Harvey RG, Blair IA, Penning TM. 2012. Metabolism and distribution of benzo[a]pyrene-7,8-dione (B[a]P-7,8-dione) in human lung cells by liquid chromatography tandem mass spectrometry: detection of an adenine B[a]P-7,8-dione adduct. *Chem Res Toxicol*. 25:993–1003.
- Huang B, Liu M, Bi X, Chaemfa C, Ren Z, Wang X, Sheng G, Fu J. 2014. Phase distribution, sources and risk assessment of PAHs, NPAHs and OPAHs in a rural site of pearl river delta region, China. *Atmos Pollut Res*. 5:210–218.
- [IARC]. International Agency for Research on Cancer. 2010. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, painting, firefighting, and shiftwork. Vol 98.

- Jakopic J, Colaric M, Veberic R, Hudina M, Solar A, Stampar F. 2007. How much do cultivar and preparation time influence on phenolics content in walnut liqueur? *Food Chem.* 104:100–105.
- Jarabek AM, Pottenger LH, Andrews LS, Casciano D, Embry MR, Kim JH, Preston RJ, Reddy MV, Schoeny R, Shuker D, et al. 2009. Creating context for the use of DNA adduct data in cancer risk assessment: I. Data organization. *Crit Rev Toxicol.* 39:659–678.
- Jha AN. 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis.* 23:207–221.
- Jiang H, Gelhaus SL, Mangal D, Harvey RG, Blair IA, Penning TM. 2007. Metabolism of benzo[a]pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography–mass spectrometry. *Chem Res Toxicol.* 20:1331–1341.
- Josefsson S, Arp PHH, Kleja DB, Enell A, Lundstedt S. 2015. Determination of polyoxymethylene (POM) – water partition coefficients for oxy-PAHs and PAHs. *Chemosphere.* 119:1268–1274.
- Julien E, Boobis AR, Olin SS, The ILSI Research Foundation Threshold Working Group. 2009. The key events dose-response framework: a cross-disciplinary mode-of-action based approach to examining dose-response and thresholds. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 49:682–689.
- Kamiya M, Toriba A, Onoda Y, Kizu R, Hayakawa K. 2005. Evaluation of estrogenic activities of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in cigarette smoke condensate. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Indus Biol Res Assoc.* 43:1017–1027.
- Kazunga C, Aitken MD. 2000. Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 66:1917–1922.
- Keyte IJ, Albinet A, Harrison RM. 2016. On-road traffic emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxy- and nitro- derivative compounds measured in road tunnel environments. *Sci Total Environ.* 566–567:1131–1142.
- Keyte IJ, Harrison RM, Lammel G. 2013. Chemical reactivity and long-range transport potential of polycyclic aromatic hydrocarbons – a review. *Chem Soc Rev.* 42:9333–9391.
- Kim YH, Engesser KH, Cerniglia CE. 2003. Two polycyclic aromatic hydrocarbon O-quinone reductases from a pyrene-degrading mycobacterium. *Arch Biochem Biophys.* 416:209–217.
- Kim CS, Hu SC. 1998. Regional deposition of inhaled particles in human lungs: comparison between men and women. *J Appl Physiol.* 84: 1834–1844.
- Kim HS, Kwack SJ, Lee BM. 2000. Lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and benzo[a]pyrene-quinones in the blood of rats treated with benzo[a]pyrene. *Chem-Biol Interact.* 127:139–150.
- Kim YH, Moody JD, Freeman JP, Brezna B, Engesser KH, Cerniglia CE. 2004. Evidence for the existence of PAH-quinone reductase and catechol-O-methyltransferase in mycobacterium vanbaalenii PYR-1. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 31:507–516.
- Kishikawa N, Morita S, Wada M, Ohba Y, Nakashima K, Kuroda N. 2004. Determination of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulates by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Sci.* 20:129–132.
- Knecht AL, Goodale BC, Truong L, Simonich MT, Swanson AJ, Matzke MM, Anderson KA, Waters KM, Tanguay RL. 2013. Comparative developmental toxicity of environmentally relevant oxygenated PAHs. *Toxicol Appl Pharmacol.* 271:266–275.
- Kojima Y, Inazu K, Hisamatsu Y, Okochi H, Baba T, Nagoya T. 2010. Comparison of Pahs, nitro-Pahs and oxy-Pahs associated with airborne particulate matter at roadside and urban background sites in downtown Tokyo, Japan. *GPOL.* 30:321–333.
- Kopponen P, Törrönen R, Mäki-Paakkanen J, Wright AV, Kärenlampi S. 1994. Comparison of CYP1A1 induction and genotoxicity *in vitro* as indicators of potentially harmful effects of environmental samples. *Arch Toxicol.* 68:167–173.
- Kurihara R, Shiraishi F, Tanaka N, Hashimoto S. 2005. Presence and estrogenicity of anthracene derivatives in coastal Japanese waters. *Environ Toxicol Chem.* 24:1984–1993.
- Kwok ESC, Harger WP, Arey J, Atkinson R. 1994. Reactions of gas-phase phenanthrene under simulated atmospheric conditions. *Environ Sci Technol.* 28:521–527.
- Larsson M, Hagberg J, Giesy JP, Engwall M. 2014. Time-dependent relative potency factors for polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives in the H4IIE-Luc bioassay. *Environ Toxicol Chem.* 33: 943–953.
- Layshock JA, Wilson G, Anderson KA. 2010. Ketone and quinone-substituted polycyclic aromatic hydrocarbons in mussel tissue, sediment, urban dust, and diesel particulate matrices. *Environ Toxicol Chem.* 29: 2450–2460.
- Lee BD, Hosomi M. 2001. A hybrid fenton oxidation–microbial treatment for soil highly contaminated with benz(a)anthracene. *Chemosphere.* 43:1127–1132.
- Lee BD, Hosomi M, Murakami A. 1998. Fenton oxidation with ethanol to degrade anthracene into biodegradable 9,10-anthraquinone: a pretreatment method for anthracene-contaminated soil. *Water Sci Technol Water Qual Int.* 38:91–97.
- Letzel T, Rosenberg E, Wissiack R, Grasserbauer M, Niessner R. 1999. Separation and identification of polar degradation products of benzo[a]pyrene with ozone by atmospheric pressure chemical ionization–mass spectrometry after optimized column chromatographic clean-up. *J Chromatogr A.* 855:501–514.
- Lewis AC, Robinson RE, Bartle KD, Pilling MJ. 1995. Online coupled LC-GC-ITD/MS for the identification of alkylated, oxygenated, and nitrated polycyclic aromatic compounds in urban air particulate extracts. *Environ Sci Technol.* 29:1977–1981.
- Lin Y, Ma Y, Qiu X, Li R, Fang Y, Wang J, Zhu Y, Hu D. 2015. Sources, transformation, and health implications of PAHs and their nitrated, hydroxylated, and oxygenated derivatives in PM_{2.5} in Beijing. *J Geophys Res Atmos.* 120:7219–7228.
- Lintelmann J, Fischer K, Matuschek G. 2006. Determination of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in particulate matter using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 1133:241–247.
- Li W, Wang C, Shen H, Su S, Shen G, Huang Y, Zhang Y, Chen Y, Chen H, Lin N, et al. 2015. Concentrations and origins of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons and oxy-polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air in urban and rural areas in Northern China. *Environ Pollut (Barking, Essex: 1987).* 197:156–164.
- Li G, Wu S, Zeng J, Wang L, Yu W. 2016. Effect of frying and aluminium on the levels and migration of parent and oxygenated PAHs in a popular Chinese fried bread youtiao. *Food Chem.* 209: 123–130.
- Lu D, Harvey RG, Blair IA, Penning TM. 2011. Quantitation of benzo[a]pyrene metabolic profiles in human bronchoalveolar (H358) cells by stable isotope dilution liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Chem Res Toxicol.* 24: 1905–1914.
- Lundstedt S, Haglund P, Öberg L. 2003. Degradation and formation of polycyclic aromatic compounds during bioslurry treatment of an aged gasworks soil. *Environ Toxicol Chem.* 22:1413–1420.
- Lundstedt S, Haglund P, Öberg L. 2006. Simultaneous extraction and fractionation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygenated derivatives in soil using selective pressurized liquid extraction. *Anal Chem.* 78:2993–3000.
- Lundstedt S, Persson Y, Öberg L. 2006. Transformation of PAHs during ethanol-fenton treatment of an aged gasworks' soil. *Chemosphere* 65: 1288–1294.
- Lundstedt S, White PA, Lemieux CL, Lynes KD, Lambert IB, Öberg L, Haglund P, Tysklind M. 2007. Sources, fate, and toxic hazards of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at PAH-contaminated sites. *AMBIO J Hum Environ* 36:475–485.
- Machala M, Ciganek M, Bláha L, Minksová K, Vondrák J. 2001. Aryl hydrocarbon receptor-mediated and estrogenic activities of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons and azaarenes originally identified in extracts of river sediments. *Environ Toxicol Chem.* 20: 2736–2743.
- Madureira DJ, Weiss FT, Van Midwoud P, Helbling DE, Sturla SJ, Schirmer K. 2014. Systems toxicology approach to understand the kinetics of benzo(a)pyrene uptake, biotransformation, and DNA adduct formation in a liver cell model. *Chem Res Toxicol.* 27:443–453.
- Mattsson Å, Lundstedt S, Stenius U. 2009. Exposure of HepG2 cells to low levels of PAH-containing extracts from contaminated soils results

- in unpredictable genotoxic stress responses. *Environ Mol Mutagen*. 50: 337–348.
- McCoull KD, Rindgen D, Blair IA, Penning TM. 1999. Synthesis and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon O-quinone depurinating N7-guanine adducts. *Chem Res Toxicol*. 12:237–246.
- McKinney RA, Pruell RJ, Burgess RM. 1999. Ratio of the concentration of anthraquinone to anthracene in coastal marine sediments. *Chemosphere* 38:2415–2430.
- Meek MEB, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKeeman LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE. 2003. A framework for human relevance analysis of information on carcinogenic modes of action. *Crit Rev Toxicol*. 33:591–653.
- Meyer S, Cartellieri S, Steinhart H. 1999. Simultaneous determination of PAHs, hetero-PAHs (N, S, O), and their degradation products in creosote-contaminated soils. Method development, validation, and application to hazardous waste sites. *Anal Chem*. 71:4023–4029.
- Meyer S, Steinhart H. 2001. Fate of PAHs and hetero-PAHs during biodegradation in a model soil/compost-system: formation of extractable metabolites. *Water Air Soil Pollut*. 132:215–231.
- Miet K, Budzinski H, Villenave E. 2009. Heterogeneous reactions of OH radicals with particulate-pyrene and 1-nitropyrene of atmospheric interest. *Polycycl Aromat Comp*. 29:267–281.
- Miller-Schulze JP, Paulsen M, Kameda T, Toriba A, Hayakawa K, Cassidy B, Naeher L, Villalobos MA, Simpson CD. 2016. Nitro-PAH exposures of occupationally-exposed traffic workers and associated urinary 1-nitropyrene metabolite concentrations. *J Environ Sci*. 49:213–221.
- Mirivel G, Riffault V, Galloo J.-C. 2010. Simultaneous determination by ultra-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization time-of-flight mass spectrometry and nitrated and oxygenated PAHs found in air and soot particles. *Anal Bioanal Chem*. 397: 243–256.
- Misaki K, Kawami H, Tanaka T, Handa H, Nakamura M, Matsui S, Matsuda T. 2007. Aryl hydrocarbon receptor ligand activity of polycyclic aromatic ketones and polycyclic aromatic quinones. *Environ Toxicol Chem*. 26:1370–1379.
- Misaki K, Matsui S, Matsuda T. 2007. Metabolic enzyme induction by HepG2 cells exposed to oxygenated and nonoxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chem Res Toxicol*. 20:277–283.
- Misaki K, Takamura-Enya T, Ogawa H, Takamori K, Yanagida M. 2016. Tumour-promoting activity of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygenated or nitrated derivatives. *Mutagenesis*. 31:205–213.
- Moller M, Hagen I, Ramdahl T. 1985. Mutagenicity of polycyclic aromatic compounds (PAC) identified in source emissions and ambient air. *Mutat Res*. 157:149–156.
- Mosi AA, Reimer KJ, Eigendorf GK. 1997. Analysis of polyaromatic quinones in a complex environmental matrix using gas chromatography ion trap tandem mass spectrometry. *Talanta*. 44:985–1001.
- Nesnow S, Nelson G, Padgett WT, George MH, Moore T, King LC, Adams LD, Ross JA. 2010. Lack of contribution of covalent benzo[a]pyrene-7,8-quinone-DNA adducts in benzo[a]pyrene-induced mouse lung tumorigenesis. *Chem-Biol Interact*. 186:157–165.
- Niederer M. 1998. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and substitutes (nitro-, oxy-PAHs) in urban soil and airborne particulate by GC-MS and NCI-MS/MS. *Environ Sci Pollut Res*. 5: 209–216.
- Nocun MS, Schantz MM. 2013. Determination of selected oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons (Oxy-PAHs) in diesel and air particulate matter standard reference materials (SRMs). *Anal Bioanal Chem*. 405:5583–5593.
- Nowakowski M, Rostkowski P, Andrzejewski P. 2017. Oxidized forms of polycyclic aromatic hydrocarbons (OxyPAHs): Determination in suspended particulate matter (SPM). 15th International Conference on Environmental Science and Technology CEST2017_01337; Aug 31–Sep 2; Rhodes, Greece.
- O'Brien PJ. 1991. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chem Biol Interact*. 80:1–41.
- Oh SM, Kim HR, Park YJ, Lee SY, Chung KH. 2011. Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM_{2.5})-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells). *Mutat Res*. 723:142–151.
- Onat B, Bakal H, Arioglu H, Bozdogan A, Kafkas E, Sabagh AE. 2017. Comparison of volatile composition of raw and roasted halisbey peanut variety using HS-SPME GC/MS techniques. *Fresenius Environ Bull*. 26:5198–5204.
- Park J-H, Gopishetty S, Szewczuk LM, Troxel AB, Harvey RG, Penning TM. 2005. Formation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dGuo) by PAH O-quinones: involvement of reactive oxygen species and copper(II)/copper(I) redox cycling. *Chem Res Toxicol*. 18: 1026–1037.
- Pedersen DU, Durant JL, Taghizadeh K, Hemond HF, Lafleur AL, Cass GR. 2005. Human cell mutagens in respirable airborne particles from the Northeastern United States. 2. Quantification of mutagens and other organic compounds. *Environ Sci Technol*. 39:9547–9560.
- Pottenger LH, Andrews LS, Bachman AN, Boogaard PJ, Cadet J, Embry MR, Farmer PB, Himmelstein MW, Jarabek AM, Martin EA, et al. 2014. An organizational approach for the assessment of DNA adduct data in risk assessment: case studies for aflatoxin B₁, tamoxifen and vinyl chloride. *Crit Rev Toxicol*. 44:348–391.
- Preston RJ, Williams GM. 2005. DNA-reactive carcinogens: mode of action and human cancer hazard. *Crit Rev Toxicol*. 35:673–683.
- Ramdahl T. 1985. Characterization of polar compounds such as polycyclic aromatic ketones in air pollution including wood smoke. *Environ Int Genotox Air Pollut*. 11:197–203.
- Ringuet J, Albinet A, Leoz-Garziandia E, Budzinski H, Villenave E. 2012. Diurnal/nocturnal concentrations and sources of particulate-bound PAHs, OPAHs and NPAHs at traffic and suburban sites in the region of Paris (France). *Sci Total Environ*. 437:297–305.
- Rodgers-Vieira EA, Zhang Z, Adrion AC, Gold A, Aitken MD. 2015. Identification of anthraquinone-degrading bacteria in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol*. 81:3775.
- Saeed M, Higginbotham S, Rogan E, Cavalieri E. 2007. Formation of depurinating N3adenine and N7guanine adducts after reaction of 1,2-naphthoquinone or enzyme-activated 1,2-dihydroxynaphthalene with DNA. Implications for the mechanism of tumor initiation by naphthalene. *Chem-Biol Interact*. 165:175–188.
- Sasaki K, Umeda M, Sakai A, Yamazaki S, Tanaka N. 2015. Transformation assay in Bhas 42 cells: a model using initiated cells to study mechanisms of carcinogenesis and predict carcinogenic potential of chemicals. *J Environ Sci Health Part C, Environ Carcinogen Ecotoxicol Rev*. 33:1–35.
- Schnelle-Kreis J, Gebefügi I, Welzl G, Jaensch T, Kettrup A. 2001. Occurrence of particle-associated polycyclic aromatic compounds in ambient air of the city of Munich. *Atmos Environ*. 35:571–581.
- Schnelle-Kreis J, Sklorz M, Peters A, Cyrys J, Zimmermann R. 2005. Analysis of particle-associated semi-volatile aromatic and aliphatic hydrocarbons in urban particulate matter on a daily basis. *Atmos Environ*. 39:7702–7714.
- Schuetzle D. 1983. Sampling of vehicle emissions for chemical analysis and biological testing. *Environ Health Perspect*. 47:65–80.
- Sen S, Bhojnagarwala P, Francey L, Lu D, Penning TM, Field J. 2012. p53 mutagenesis by benzo[a]pyrene derived radical cations. *Chem Res Toxicol*. 25:2117–2126.
- Sharma A, Singh K, Almasan A. 2012. Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Methods Mol Biol*. 920:613–626.
- Shou M, Harvey RG, Penning TM. 1993. Reactivity of benzo[a]pyrene-7,8-dione with DNA. Evidence for the formation of deoxyguanosine adducts. *Carcinogenesis*. 14:475–482.
- Souza KF, Carvalho LRF, Allen AG, Cardoso AA. 2014. Diurnal and nocturnal measurements of PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH compounds in atmospheric particulate matter of a sugar cane burning region. *Atmos Environ*. 83:193–201.
- Spitzer T, Takeuchi T. 1995. Determination of benzanthrone in environmental samples. *J Chromatogr A Chromatogr Electrophoresis Environ Anal Air Pollut*. 710:109–116.
- Talaska G, Underwood P, Maier A, Lewtas J, Rothman N, Jaeger M. 1996. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), nitro-PAHs and related environmental compounds: biological markers of exposure and effects. *Environ Health Perspect*. 104:901–906.

- Tokiwa H, Sera N, Nakashima A, Nakashima K, Nakanishi Y, Shigematu N. 1994. Mutagenic and carcinogenic significance and the possible induction of lung cancer by nitro aromatic hydrocarbons in particulate pollutants. *Environ Health Perspect.* 102:107–10.
- Tomaz S, Shahpoury P, Jaffrezo J-L, Lammel G, Perraudin E, Villenave E, Albinet A. 2016. One-year study of polycyclic aromatic compounds at an urban site in grenoble (France): seasonal variations, gas/particle partitioning and cancer risk estimation. *Sci Total Environ.* 565: 1071–1083.
- Topinka J, Schwarz LR, Kiefer F, Wiebel FJ, Gajdoš O, Vidová P, Dobiáš L, Fried M, Šrám RJ, Wolff T. 1998. DNA adduct formation in mammalian cell cultures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and nitro-PAH in coke oven emission extract. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 419:91–105.
- Umbuzeiro GA, Franco A, Martins MH, Kummrow F, Carvalho L, Schmeiser HH, Leykauf J, Stiborova M, Claxton LD. 2008. Mutagenicity and DNA adduct formation of PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH fractions of atmospheric particulate matter from São Paulo, Brazil. *Mutat Res.* 652:72–80.
- US EPA, ORD. 2005. Guidelines for carcinogen risk assessment. Policies and Guidance. US EPA. 2005; [accessed 2018 OCT 30]. <https://www.epa.gov/risk/guidelines-carcinogen-risk-assessment>
- Valavanidis A, Fiotakis K, Vlahogianni T, Papadimitriou V, Pantikaki V. 2006. Determination of selective quinones and quinoid radicals in airborne particulate matter and vehicular exhaust particles. *Environ Chem.* 3:118–123.
- Vapenka L, Vavrous A, Votavova L, Kejllova K, Dobias J, Sosnovcova J. 2016. Contaminants in the paper-based food packaging materials used in the Czech Republic. *J Food Nutr Res.* 55:361–373.
- Waidyanatha S, Troester MA, Lindstrom AB, Rappaport SM. 2002. Measurement of hemoglobin and albumin adducts of naphthalene-1,2-oxide, 1,2-naphthoquinone and 1,4-naphthoquinone after administration of naphthalene to F344 rats. *Chem-Biol Interact.* 141:189–210.
- Wang L, Atkinson R, Arey J. 2007. Formation of 9,10-phenanthrenequinone by atmospheric gas-phase reactions of phenanthrene. *Atmos Environ.* 41:2025–2035.
- Wei C, Han Y, Bandowe BAM, Cao J, Huang R-J, Ni H, Tian J, Wilcke W. 2015. Occurrence, gas/particle partitioning and carcinogenic risk of polycyclic aromatic hydrocarbons and their oxygen and nitrogen containing derivatives in Xi'an, Central China. *Sci Total Environ.* 505: 814–822.
- Wei S, Huang B, Liu M, Bi X, Ren Z, Sheng G, Fu J. 2012. Characterization of PM_{2.5}-bound nitrated and oxygenated PAHs in two industrial sites of South China. *Atmos Res.* 109–110:76–83.
- Wickström K, Pyysalo H, Plaami-Heikkilä S, Tuominen J. 1986. Polycyclic aromatic compounds (PAC) in leaf lettuce. *Z Lebensm Unters Forch.* 183:182–185.
- Wild CP, Pisani P. 1997. Carcinogen-DNA and carcinogen-protein adducts in molecular epidemiology. *IARC Sci Publ.* 142:143–158.
- Wincent E, Bihanic FL, Dreij K. 2016. Induction and inhibition of human cytochrome P4501 by oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicol Res.* 5:788–799.
- Wincent E, Jönsson ME, Bottai M, Lundstedt S, Dreij K. 2015. Aryl hydrocarbon receptor activation and developmental toxicity in zebrafish in response to soil extracts containing unsubstituted and oxygenated PAHs. *Environ Sci Technol.* 49:3869–3877.
- Wingfors H, Hägglund L, Magnusson R. 2011. Characterization of the size-distribution of aerosols and particle-bound content of oxygenated PAHs, PAHs, and N-alkanes in urban environments in Afghanistan. *Atmos Environ.* 45:4360–4369.
- Wischmann H, Steinhart H. 1997. The formation of PAH oxidation products in soils and soil/compost mixtures. *Chemosphere* 35:1681–1698.
- Wislocki PG, Wood AW, Chang RL, Levin W, Yagi H, Hernandez O, Dansette PM, Herina DM, Conney AH. 1976. Mutagenicity and cytotoxicity of benzo(a)pyrene arene oxides, phenols, quinones, and dihydrodiols in bacterial and mammalian cells. *Cancer Res.* 36:3350–3357.
- Yao C, Foster WG, Sadeu JC, Siddique S, Zhu J, Feng YL. 2016. Screening for DNA adducts in ovarian follicles exposed to benzo(a)pyrene and cigarette smoke condensate using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Sci Total Environ.* 575:742–749.
- Yassaa N, Meklati BY, Cecinato A, Marino F. 2001. Organic aerosols in urban and waste landfill of Algiers metropolitan area: occurrence and sources. *Environ Sci Technol.* 35:306–311.
- Zeng J, Lin X, Zhang J, Zhu H, Chen H, Wong MH. 2013. Successive transformation of benzo(a)pyrene by laccase of *trametes versicolor* and pyrene-degrading mycobacterium strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97:3183–3194.
- Zhang L, Jin Y, Huang M, Penning TM. 2012. The role of human aldo-keto reductases in the metabolic activation and detoxication of polycyclic aromatic hydrocarbons: interconversion of PAH catechols and PAH O-quinones. *Front Pharmacol.* 3:193.
- Zhao X, Wu S, Gong G, Li G, Zhuang L. 2017. TBHQ and peanut skin inhibit accumulation of PAHs and oxygenated PAHs in peanuts during frying. *Food Control.* 75:99–107.

I.3. Utilisation des biomarqueurs en lien avec l'exposition aux HAP et oxy-HAP

La bonne définition de l'exposition des populations aux contaminants de l'environnement est un point crucial dans l'évaluation du risque. Afin d'étudier l'impact des oxy-HAP sur le développement du cancer, il apparaît primordial de développer des marqueurs d'exposition pertinents des individus à ces polluants. Classiquement, l'exposition est caractérisée par la mesure de la dose externe correspondant à des prélèvements environnementaux ("Qualité de L'air Extérieur - Anses"). Cependant, ces mesures ne tiennent pas compte de l'influence des différentes voies d'absorption, de distribution et de métabolisation ou de réparation des dommages à l'ADN, bien qu'ils soient des paramètres essentiels dans l'étude des effets sur la santé (Perera and Weinstein 2000). Il est donc nécessaire de développer des indicateurs biologiques d'exposition, ou biomarqueurs, correspondant à des altérations biochimiques ou cellulaire détectables au niveau de la cible moléculaire étudiée. Ces biomarqueurs permettraient de signaler précocement ou de prévenir le risque d'apparition d'effets délétères ou de maladies chez l'homme.

Le terme de biomarqueur est apparu en 1982 dans le domaine de l'épidémiologie moléculaire. Il est défini comme tous « changements moléculaires, biochimiques, histologiques ou physiologiques chez des organismes susceptibles d'être utilisés pour estimer soit l'exposition à des contaminants présents dans leur milieu, soit les effets induits par la pollution » (Peakall and Walker 1994). Ce terme implique l'utilisation de l'épidémiologie et de la biologie moléculaire dans l'étiologie des cancers pour ainsi améliorer leur prévention (Perera and Weinstein 2000). La surveillance biologique de l'exposition de l'Homme à ces substances cancérigènes peut se faire grâce à l'utilisation de différents types de biomarqueurs. Après le suivi environnemental (mesure de la contamination des matrices environnementales), la première catégorie correspond aux biomarqueurs d'exposition. Ils peuvent être considérés, premièrement, comme des indicateurs de la dose interne correspondant à des outils capables de mesurer la quantité de substances cancérigènes et/ou de leurs métabolites présents dans l'organisme (par exemple les métabolites urinaires, Perera and Whyatt 1994). La détermination de cette dose interne permet de tenir compte du rôle des barrière

biologiques et non biologiques (équipements de protection individuels, collectifs, ...). D'autre part, ils peuvent correspondre à des indicateurs de la dose biologique efficace au niveau des molécules cibles comme l'ADN (interaction toxique-hôte). Par exemple, différents métabolites urinaires sont étudiés pour évaluer l'exposition des populations aux mélanges de HAP: le 1-hydroxypyrene, le 3-hydroxybenzo[a]pyrene, l'acide mandélique ou l'acide phénylglyoxylique (Yang Y. *et al.* 1999; Brandt and Watson 2003; Leroyer *et al.* 2010; Grova *et al.* 2018; Persoons *et al.* 2018). Ces composés sont largement retrouvés sous forme libre ou conjuguée, facilitant ainsi leur quantification. Les biomarqueurs d'exposition de dose biologique efficace renseignent sur la quantité de substances toxiques ayant interagi avec l'organisme au niveau macromoléculaire. Ils prennent en compte les phénomènes de formation et de réparation des lésions moléculaires dans le noyau. Ces biomarqueurs peuvent être représentés par les adduits à l'ADN qui sont considérés comme des marqueurs précoces de génotoxicité mais qui, à eux seul, sont insuffisants pour introduire le processus d'initiation tumoral.

Ce premier type de biomarqueurs se distingue de ceux indicateurs d'effets biologiques spécifiques ou non de l'exposition à un composé toxique. Ces indicateurs sont dits d'effets précoces lorsqu'ils se développent de manière rapprochée à l'exposition aux substances toxiques et ils sont dit tardifs quand ils sont proches de la survenue de la pathologie. Dans le cas des HAP, les biomarqueurs d'effet précoces sont principalement représentés par les lésions oxydatives, les mutations et les effets cytogénétiques. La 8-oxo-7,8-dihydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) est classiquement utilisée pour évaluer les dommages oxydatifs du BaP sur l'ADN. Elle peut être détectée à la fois sur l'ADN mais aussi dans les urines, ce qui rend sa détection possible dans des études de cohorte (Bessho *et al.* 1993; Weimann, Belling, and Poulsen 2002; Hu *et al.* 2004; Cooke *et al.* 2005; Harri *et al.* 2005). Cependant, l'évaluation de ces dommages oxydatifs peut être influencée par de nombreux facteurs. Par exemple, Hakim *et al.* ont démontrés que la consommation de quatre tasses de thé vert décaféiné par jour pendant quatre mois entraînait une diminution significative de la 8-oxodG détectée dans les urines chez des fumeurs (Hakim *et al.* 2003). La 8-oxodG ne peut donc pas être considérée comme un biomarqueur spécifique du stress oxydatif. D'autre part, les effets cytogénétiques démontrent des effets irréversibles par l'utilisation du test des micro-noyaux et du test d'échange de chromatides sœurs. Cependant, ce type de biomarqueurs n'est pas utilisé

au même titre que les métabolites urinaires (Fenech 2000; De Martinis *et al.* 2002). Ces marqueurs précoces présentent l'avantage d'être utilisables au cours de phases réversibles du processus de développement tumoral mais ne permettent pas d'identifier la nature du composé génotoxique.

L'étude des biomarqueurs d'exposition et d'effet est influencée par les variations interindividuelles que l'on regroupe sous le terme de biomarqueurs de susceptibilité. Les principales variations sont liées au sexe, à l'âge mais aussi à la métabolisation enzymatique et à la détoxification (Autrup 2000; Perera and Weinstein 2000). Ces différents types de biomarqueurs sont regroupés dans la Figure 2.

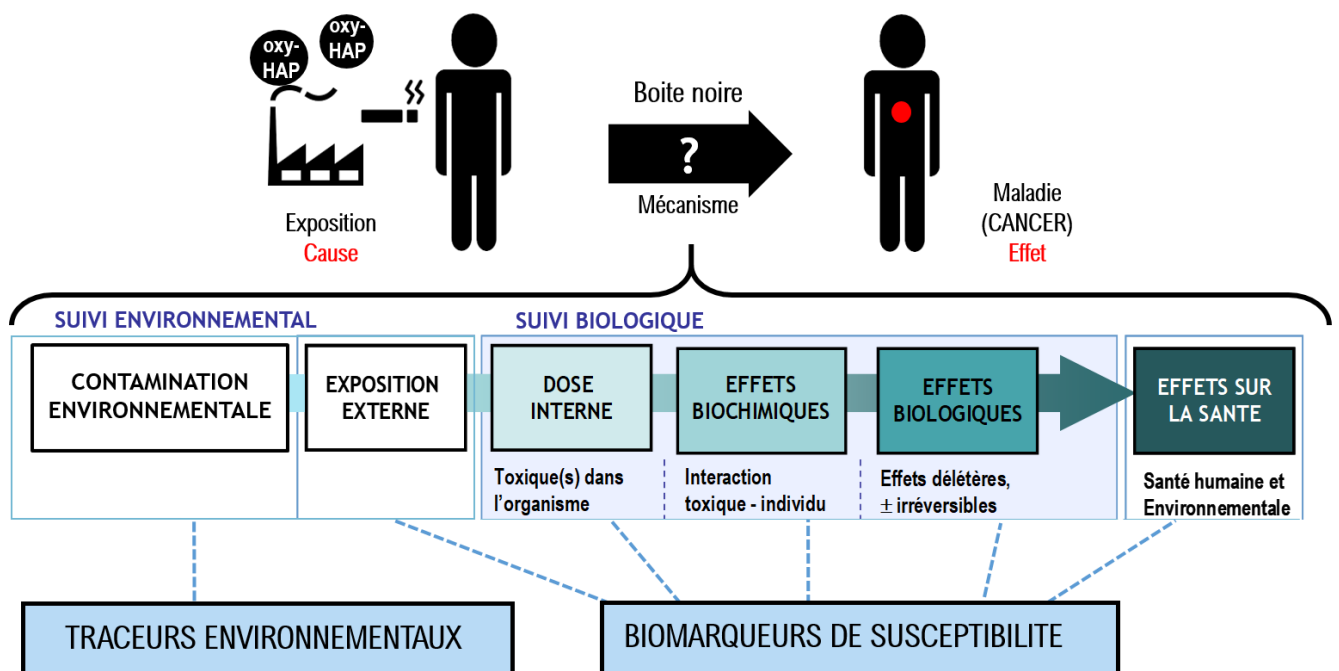


Figure 2. Le continuum des biomarqueurs dans la recherche d'une association entre l'exposition et l'apparition du cancer (adapté de Perera et Weinstein, 2000)

I.4. Les adduits à l'ADN : biomarqueurs de dose efficace

I.4.1. Définition des adduits à l'ADN

D'une manière générale, les études de génotoxicité permettent de déterminer si un composé cause des dommages génétiques de manière directe ou indirecte. Concernant les oxy-HAP, il semble intéressant d'étudier la formation des adduits à l'ADN.

Le terme adduit provient de *adducts* en anglais formé à partir de la contraction de *addition products* (Wild and Pisani 1997). Les adduits résultent de la formation d'une liaison covalente directe entre une substance chimique (ayant subi ou non une activation métabolique) et différents types de macromolécules de type ADN, ARN ou protéines.

Les premiers adduits ont été découverts dans les années 1950 par E.C. Miller. L'auteur a démontré que le BaP se fixait sur certaines protéines présentes dans l'épiderme de la peau de souris (Miller 1951). Quatorze ans plus tard, Brookes et Lawley ont mis en évidence l'interaction entre 6 HAP dont le BaP sur des macromolécules qui sont l'ADN et l'ARN (Brookes and Lawley 1964). L'utilisation de molécules radiomarquées ($^3\text{H}/^{14}\text{C}$) a permis l'obtention de fractions nucléiques et protéiques radiomarquées, affirmant ainsi la fixation covalente de ces composés marqués sur les macromolécules. Les auteurs observaient un temps de latence entre le début de l'exposition et le maximum de radioactivité obtenu dans les différentes fractions. Ce décalage pourrait s'expliquer par l'activation du BaP sous forme d'époxyde permettant ainsi sa fixation aux macromolécules. Contrairement à la fraction protéique, une corrélation a été retrouvée entre la fixation des HAP sur l'ADN et le pouvoir cancérigène de ces molécules (mesuré grâce à l'« Iball index », National Research Council (US) Committee on Chemical Environmental 1983). La cancérigénicité des HAP semble donc liée à leur capacité de fixation sur l'ADN, laissant au second plan les interactions avec l'ARN et les protéines.

La réactivité des acides aminés à un pH physiologique est supérieure à celle des acides nucléiques et ribonucléiques. Lorsque l'on compare à l'eau (force nucléophile=0), la force nucléophile des amines retrouvées dans les structures protéiques est de 4-5 et de 5-6 pour les thiols. Pour les bases nucléiques, elle n'est que de 2 pour l'oxygène et 3,5 pour l'azote N7 de la guanine (Törnqvist *et al.* 2002). En considérant le nombre élevé de sites nucléophiles situés sur les acides aminés et la plus grande disponibilité des protéines dans la cellule (contrairement à l'ADN pour lesquels les composés toxiques doivent passer la barrière du noyau), les adduits vont donc se former de manière préférentielle avec les protéines.

I.4.2. Cinétique de formation et d'élimination des adduits à l'ADN

D'un point de vue purement chimique, la fixation de molécules chimiques sur les macromolécules cellulaires est reliée à l'existence de sites électrophiles au sein des composés d'additions (Miller and Miller 1981). La stabilisation de ces structures peut se faire par la formation de liaisons covalentes au contact de structures nucléophiles. La réalisation de ces liaisons passe par des réactions hétérolytiques de type S_N1/S_N2 , homolytiques, par la formation de radicaux libres, ou par une addition de Michael sans intervention enzymatique (Miller and Miller 1981; Mather *et al.* 2006).

D'un point de vue biologique, les composés porteurs des fonctions chimiques électrophiles sont particulièrement instables et réactifs. Ils ne pourront interagir avec les macromolécules cellulaires qu'après absorption, distribution et pour certaines, bioactivation métabolique. L'interaction se fait généralement proche du lieu de formation du composé électrophile.

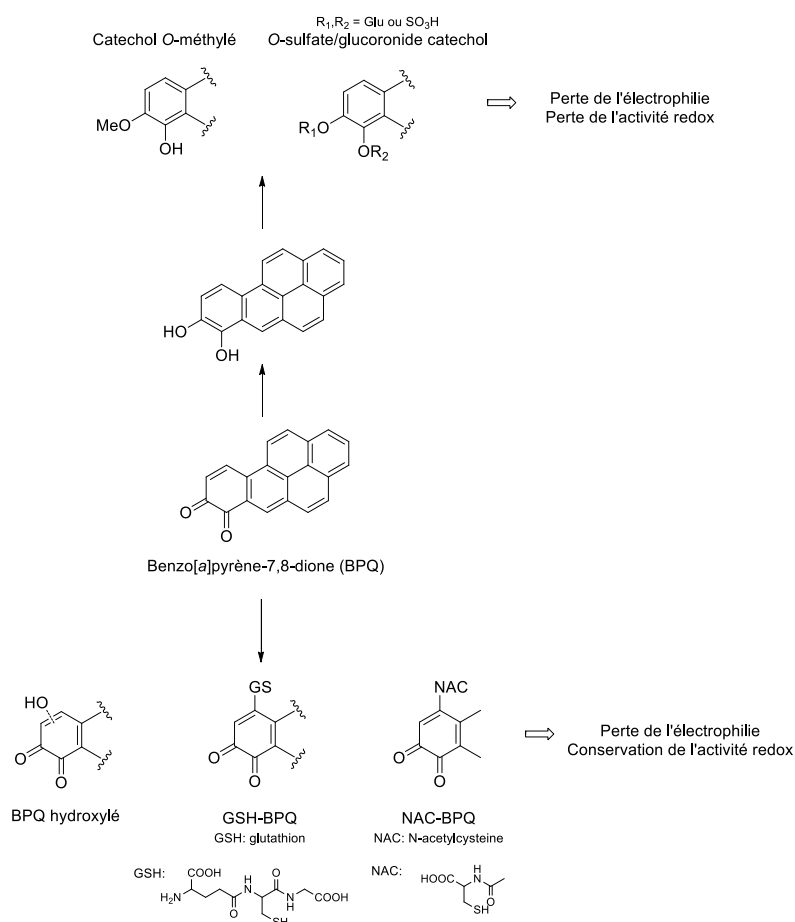


Figure 3. Voies de détoxification des adduits du benzo[a]pyrène-7,8-dione (adapté de Clergé *et al.* 2019)

Certains composés exogènes, tels que les aldéhydes, peuvent interagir de manière directe avec l'ADN par leur caractère électrophile *in situ* marqué (Stein *et al.* 2006; Garden, Wilson, and Wetmore 2019; J. Yang *et al.* 2019). Ne nécessitant aucune métabolisation préalable, ces composés sont dits génotoxiques directs. La plupart du temps, le caractère électrophile des composés exogènes est acquis après métabolisation, en faisant ainsi des génotoxiques indirects. Cette métabolisation est dépendante des systèmes enzymatiques de phase I et/ou de phase II permettant d'augmenter l'hydrophilie de ces molécules dans le but de les éliminer plus facilement. Les réactions enzymatiques de phase I catalysées par les cytochromes P450 (CYP450) peuvent entraîner la formation de fonctions chimiques électrophiles réactives sur des composés toxiques capables de générer des adduits tels que les HAP ou les nitrosamine par exemple (B. K. Park, Pirmohamed, and Kitteringham 1995; INSERM 2000). Les enzymes de phase II les plus fréquemment rencontrées sont les N-acétyltransférases et les glutathion-S-transférases, à l'origine des processus de détoxification de la cellule par perte du caractère électrophile du composé génotoxique. Un exemple de cette détoxification concernant le BaP est illustré en Figure 3.

La métabolisation du BaP a été largement décrite dans la littérature. La bioactivation est réalisée dans différents organes dont les poumons, le foie ou la peau et entraîne la formation d'adduits à l'ADN (schéma 2 de Clergé *et al.* 2019, Flowers-Geary, Harvey, and Penning 1993; Flowers, Ohnishi, and Penning 1997; McCoull *et al.* 1999; J. L. Bolton *et al.* 2000; J.-H. Park *et al.* 2005). De la même manière, des études plus récentes démontrent que l'activation métabolique du naphthalène entraîne la production de métabolites réactifs qui vont à leur tour interagir avec l'ADN et former des adduits (McCoull *et al.* 1999; Saeed *et al.* 2007). La nature de ces adduits dépend de la réactivité des différents sites nucléophiles. Au niveau des nucléotides, les principaux sites réactifs se situent sur les bases nucléiques et dépendent de la molécule d'addition. La Figure 4 reprend les différents sites des nucléobases fréquemment modifiées par les électrophiles (Tretyakova, Goggin, and Janis 2012). Sur ces 4 bases, seules 3 peuvent former des adduits à l'ADN (guanine, adénine et cytosine), la plus réactive étant la guanine (McCoull *et al.* 1999; Balu *et al.* 2004, 2006; Nesnow *et al.* 2010; M. Huang *et al.* 2012; M. Huang, Blair, and Penning 2013; Yao *et al.* 2016; Matsui *et al.* 2019). La thymine n'entraîne pas la formation d'adduits à l'ADN en raison de l'absence de groupement assez nucléophiles

pouvant réagir avec les toxiques. Les HAP se fixeront préférentiellement en position N^2 et N^7 de la guanine. En l'absence de réparation, ces adduits peuvent n'avoir aucune action sur le génome ou peuvent devenir mutagènes (Beach and Gupta 1992).

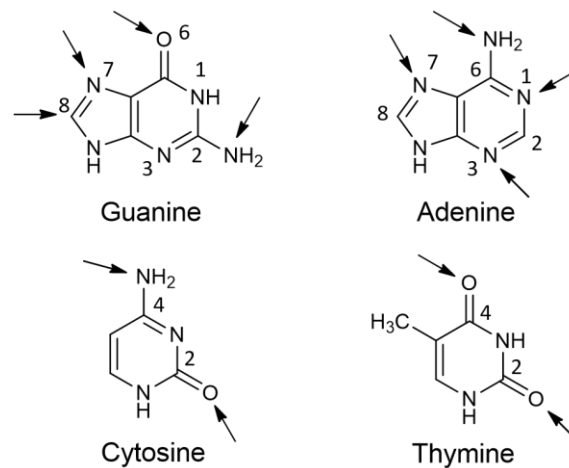


Figure 4. Sites réactifs des bases de l'ADN (adapté de Tretyakova, Goggin, and Janis 2012)

Compte tenu des effets particulièrement néfastes associés à la formation d'adduits sur les macromolécules, la cellule possède divers systèmes de défense, généralement très efficace, comme par exemple la production de glutathion réduit ou l'induction d'enzymes de détoxification (enzymes dites de phase II telles que l'époxyde hydrolase ou la NAD(P)H quinone réductase, Prester *et al.* 1993). Certains de ces systèmes sont spécifiques à l'ADN. Concernant les HAP et leurs dérivés, les principaux mécanismes de réparation des adduits correspondent à l'excision de bases ou de nucléotides (Base Excision Repair and Nucleotide Excision Repair, respectivement BER et NER) et à la réparation des bases mal appariées (DNA mismatch repair system). Le NER est considéré comme le mécanisme de réparation majoritaires des adduits stables mais aussi comme le moins spécifique du fait de sa capacité à réparer un grand nombre de lésions sans similitudes structurales. Les mécanismes de réparation associés au NER sont complexes et impliquent une quarantaine de gènes (de Boer and Hoeijmakers 2000; Cleaver 2005; Mellon *et al.* 1986). Le BER est plus spécifique et concerne les lésions de petite taille incluant les modifications de bases et les pertes de bases entraînant l'apparition de sites abasiques. Concernant le BaP, ces lésions correspondent aux bases oxydées, aux sites abasiques causés par des lésions oxydatives et à la dépurination d'adduits (Fortini *et al.* 1999).

Comme démontré auparavant, les adduits des HAP et des oxy-HAP concernent principalement la guanine. Il devient donc intéressant d'évaluer quels types de mutations résultent de l'élimination de ces adduits. Des études sur les souches *Escherichia Coli* démontrent que les ADN polymérases de bactéries insèrent de manière préférentielle T (de 55 à 81%) > C (de 15 à 20%) ≥ A (4 à 25%) en face de la guanine perdue (Lawrence *et al.* 1990). L'ordre d'insertion est différent chez les mammifères avec A (41%) > T (37%) > C (22%) en face de la guanine perdue (Gentil *et al.* 1992). Ces erreurs de réparation entraînent l'apparition de mutations de type G → T et G → A qui sont principalement réparées par les BER (Frosina *et al.* 1996).

D'autre part, certaines réparations associées à des ADN polymérases peu fiables (telles que la polymérase ϵ) entraînent l'apparition de mutations parfois particulièrement délétères (Chiapperino *et al.* 2005).

Finalement, la concentration d'un adduit représente un équilibre dynamique entre sa formation et son élimination. Il faut donc intégrer l'étude des cinétiques de réparation et d'élimination des adduits dans l'évaluation du risque cancérigène d'un composé. Ces cinétiques ont été évaluées suite à l'exposition au BaP de cellules d'hépatome de souris à court terme (cellules Hepa1c1c7, Madureira *et al.* 2014). A 50 nM de BaP (concentration considérée comme pertinente sur le plan environnemental et pour laquelle des adduits sont formés), aucun effet indésirable n'est observé. Des études supplémentaires sont nécessaires afin d'évaluer l'impact d'une exposition répétée sur cet équilibre dynamique sur le BaP ainsi que sur d'autres HAP et oxy-HAP.

Suite à cela, il nous faudra évaluer quel est l'impact de la mauvaise réparation de ces adduits à l'ADN sur le développement de pathologies telles que le cancer.

1.4.3. Signification biologique des adduits à l'ADN

Différentes études mettent en avant l'association entre l'occurrence des adduits formés et le développement de différentes toxicités. L'étude des adduits à l'ADN et aux protéines permet de déterminer la quantité de matériel génotoxique qui a atteint le tissu (appelé dose biologique efficace, partie 1.3). Plusieurs types d'adduits peuvent être étudiés : les adduits à l'ADN, à l'ARN et aux protéines.

Concernant les adduits à l'ARN, très peu d'études existent et leurs implications biologiques sont mal connues. Sotomayor *et al.* ont montré que l'aflatoxine B1 avait une plus grande affinité pour l'ARN que pour l'ADN en faisant ainsi des biomarqueurs d'exposition très sensible (Sotomayor *et al.* 2003). Cependant, la durée de vie de l'ARN est très limitée. Ces adduits ne traduisent donc qu'une exposition récente et ne peuvent pas être utilisés dans l'études des effets cumulatifs.

Les protéines sont des molécules très réactives dans la formation des adduits. Les principales réactions correspondent à l'alkylation des cystéines, des histidines, des lysines et des extrémités N-terminales des acides aminés. Osterman-Golkar *et al.* ont suggéré que les adduits de l'hémoglobine pouvaient être utilisés comme marqueurs de dose de par leur stabilité, leur facilité d'accès et leur quantité relativement importante (Figure 5, Osterman-Golkar *et al.* 1976; Henderson *et al.* 1989).

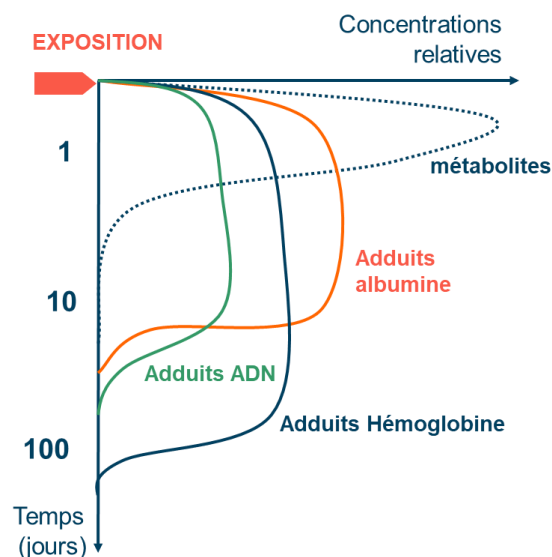


Figure 5. Comparaison de la durée de vie des adduits à l'ADN par rapport aux adduits aux protéines (d'après Henderson *et al.*, 1989)

Contrairement aux adduits à l'ADN qui peuvent subir une décomposition spontanée ou être éliminés par des mécanismes de réparation, les adduits aux protéines sont des adduits persistant au maximum pendant la durée de vie de la cellule étudiée (Figure 5, Farmer 2004). Cependant, l'utilisation de ces adduits nécessite que l'exposition entraîne la formation d'adduits stables, que la protéine se trouve dans des fluides biologiques facilement accessibles tels que le sang et que ces adduits soient présents dans des

concentrations suffisantes (Figure 6, Neumann 1980; Pereira and Chang 1981; Sega and Owens 1978, 1983, 1987).

Les bases de l'ADN ont une réactivité plus faible que les protéines vis-à-vis des composés électrophiles (chapitre 1.4.2). Ce type d'adduits permet d'obtenir des informations quant au caractère génotoxique des composés (Anderson 1987; Wogan 1988). Leur étude permet d'interpréter l'absorption, la distribution, l'activation métabolique et la détoxification de certains toxiques. Dyroff *et al.* ont démontré une corrélation entre la formation des adduit à l'ADN et l'exposition, l'initiation des hépatocytes et l'apparition du carcinome hépatocellulaire suite à une exposition à la diethylnitrosamine (Dyroff *et al.* 1986; Park *et al.* 2009; Tolba *et al.* 2015).

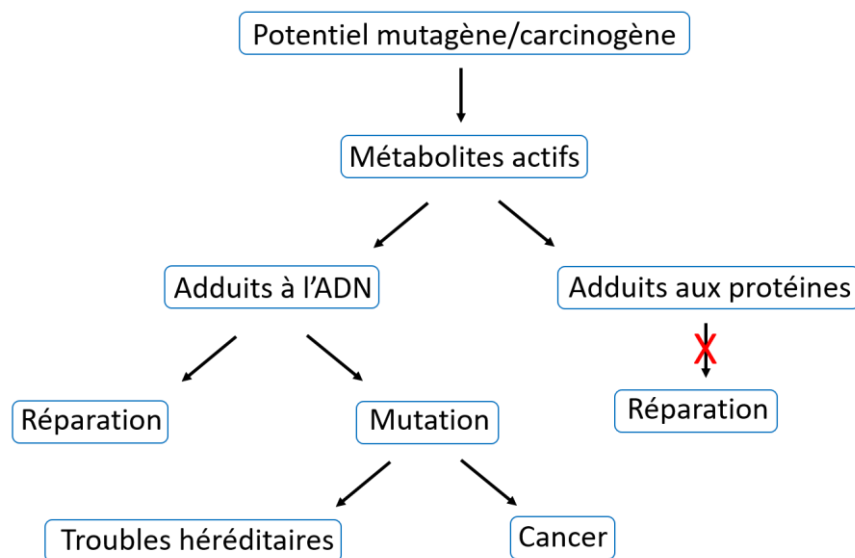


Figure 6. Mécanisme de cancérogenèse génotoxique (adapté de Farmer, 2004)

Les adduits aux protéines présentent donc moins d'intérêt dans les études de génotoxicité et de cancérogénicité mais peuvent être utilisés en tant que biomarqueurs d'exposition. Pour des études en populations, les adduits à l'ADN semblent plus pertinents. Ces derniers permettent d'évaluer la génotoxicité d'un composé sur une cible biologique. De plus, les mutations spécifiques permettent d'obtenir une signature de l'exposition à un composé toxique. Tous ces résultats sont regroupés dans le tableau 2 et nous permettent de justifier de l'utilisation des adduits à l'ADN pour l'étude de la toxicité des oxy-HAP.

Le développement d'une pathologie telle que le cancer est le résultat d'un ensemble de mécanismes complexes affectant à la fois les niveaux cellulaires, tissulaires et l'organisme entier (Boobis *et al.* 2009). Le risque cancérigène d'un composé va dépendre de son mécanisme d'action. Son étude peut se baser sur le concept MoA (dit « mode of action »). Il correspond à une séquence d'évènements et/ou de processus clés débutant par l'interaction du composé toxique avec la cellule se traduisant par des perturbations biologiques et aboutissant en la formation d'une pathologie (Figure 7).

Tableau 2. Avantages et inconvénients des adduits à l'ADN et aux protéines.

	Adduits aux protéines	Adduits à l'ADN
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> - Très bonne réactivité - Grande quantité de protéines dans la cellule - Stabilité : durée de vie de la cellule (absence de réparation) - Facilité d'accès et quantité relativement importante - Biomarqueurs d'expositions pertinents (dose biologique efficace) - Permet l'étude de l'absorption, de la distribution et de l'activation métabolique 	<ul style="list-style-type: none"> - Spécifique d'un tissu/organe/organisme/individu donné - Évalue le caractère génotoxique - Permet l'étude de l'absorption, de la distribution, de l'activation métabolique et de la réparation (équilibre instable) - Estimation de l'exposition cancérigène/génotoxique
Inconvénients	<ul style="list-style-type: none"> - Conséquences biologiques limités - Utilisés en corrélation avec les adduits à l'ADN 	<ul style="list-style-type: none"> - Réactivité plus faible = quantité d'adduits plus faible - Plus faible quantité d'ADN dans la cellule - Stabilité : décomposition spontanée ou réparation

Ces perturbations biologiques peuvent correspondre aux mécanismes de génotoxicité et de mutagénicité. Le concept MoA permet donc la recherche d'un lien causal entre les différents évènements menant au cancer.

Une fois de plus, ces données existent pour les HAP non substitués et sont bien moins abondantes concernant les oxy-HAP. La mutagénicité des HAP a été très étudiée, en particulier grâce à l'utilisation du test de mutagénicité *in vitro* sur salmonelles, dit test

d'Ames (décrit dans la partie II du chapitre 2, Ames *et al.* 1973; Ames 1979; Sakai, Yoshida, and Mizusaki 1985). L'équipe du professeur Loechler (Université de Boston, USA) a étudié le caractère mutagène du BaP suite à la formation d'adduits stables résultant du métabolisme. Ces mutations peuvent se faire par substitution, par inversion, par insertion ou par délétion de bases (Rodriguez and Loechler 1993a, 1993b). Les mutations par substitution de bases sont les plus fréquentes.

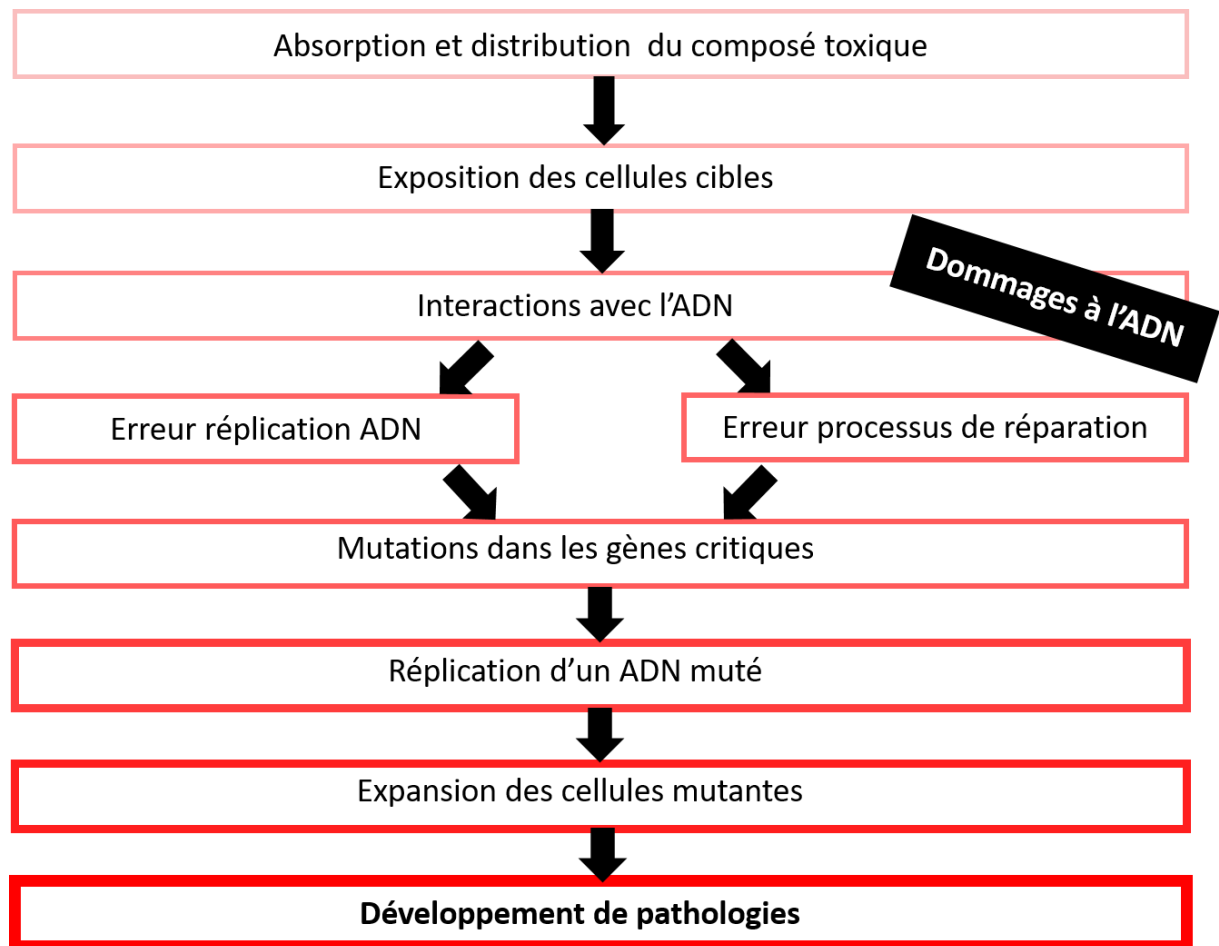


Figure 7. Evènements clés du concept MoA associés à la cancérogenèse (adapté de Boobis *et al.*, 2009).

Le même test réalisé sur *Escherichia Coli* montre 57% de mutations liées aux adduits stables correspondant à des transitions GC → TA par erreur au cours de la répliation enzymatique de l'ADN ou lors de la réparation (Jelinsky *et al.* 1995; Loechler 1995; Shukla, Geacintov, and Loechler 1999). Les mutations par délétion de nucléotides sont à l'origine des sites abasiques qui pourront entraîner un décalage dans le cadre de lecture de la molécule d'ADN. Plus récemment, ces études se sont focalisées sur les oxy-HAP et démontrent des résultats préliminaires prometteurs pour de futures études (tableau 2 de

la publication 1, Dasgupta *et al.* 2014; Misaki *et al.* 2016; Wincent, Bihanic, and Dreij 2016). Cependant, les mécanismes aboutissant à ces mutations restent encore mal connus. La formation des adduits à l'ADN étant considéré comme un évènement initiateur de la mutagenicité et de la cancérogénicité, différentes recherches ont été menées afin d'établir une corrélation entre la quantité d'adduits à l'ADN formés et l'apparition de cancers. Il a été reconnu que des adduits mal ou non réparés pouvaient conduire à l'apparition de mutations lors de la phase de réplication de l'ADN (L. L. Yang, Maher, and McCormick 1982). L'apparition de ces mutations dépend donc de l'efficacité des mécanismes de réparation.

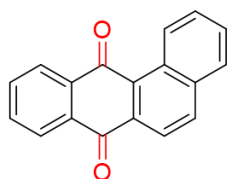
D'autre part, ces mutations peuvent toucher des « gènes du cancer ». De nombreuses études ont porté sur la recherche d'une relation entre la cancérogénicité des HAP et les mutations de ces « gènes du cancer » (Bartsch 1996). Ce terme regroupe (i) les proto-oncogènes qui, après mutation, facilitent la prolifération cellulaire et la formations de tumeurs et (ii) les gènes suppresseurs de tumeur : ces gènes ont un effet négatif en bloquant la transformation cellulaire, aboutissant ainsi à un retour vers un état normal. Concernant les HAP, cette classe est principalement représentée par le gène p53. L'induction de p53 entrainerait un arrêt dans le cycle cellulaire suivi d'une étape de réparation des dommages à l'ADN ou d'un enclenchement du processus d'apoptose (el-Deiry *et al.* 1994; Tanaka *et al.* 2000). Il a été démontré que des xénobiotiques connus pour être des promoteurs de tumeur affecteraient Mdm2 (ubiquitine ligase responsable de la régulation négative de p53) et atténueraient donc la réponse de p53 aux dommages à l'ADN (Högberg, Silins, and Stenius 2009). Par exemple, l'exposition au BaP entraîne des mutations de type GC → TA et G → T sur des régions géniques spécifiques du gène suppresseur de tumeur p53 (Nigro *et al.* 1989; Puisieux *et al.* 1991; Husgafvel-Pursiainen *et al.* 1993; Wolterbeek *et al.* 1995; Quan and States 1996). Puisque les adduits stables et dépurinés du BaP sont respectivement responsables des mutations GC → TA et G → T dans le gène p53, ces deux types d'adduits semblent donc avoir un rôle dans les processus d'initiation du cancer. Les mutations G → T sont des mutations caractéristiques retrouvées dans les cancers du poumon et du foie, démontrant ainsi le lien entre ces mutations et l'apparition de cellules cancéreuses. (Nigro *et al.* 1989; Puisieux *et al.* 1991).

D'autres facteurs peuvent influencer l'efficacité des systèmes de réparation. Des différences ont été observées entre les adduits *cis* et *trans* du 7,8-dihydroxy-9,10-époxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[*a*]pyrene (BPDE, Celotti *et al.* 1993), principal métabolite du BaP. L'adduit *trans* correspond à l'adduit le plus efficacement réparé du fait de sa structure tridimensionnelle qui permet un meilleur accès aux enzymes de réparation (Jernström and Gräslund 1994). Il a été démontré qu'une déficience de ces systèmes de réparation résultait en une augmentation de la fréquence des mutations et donc du risque de développement de cancers chez les rongeurs et chez l'homme (de Vries *et al.* 1997).

L'ensemble des résultats présentés ci-dessus démontre l'intérêt de l'étude des adduits à l'ADN dans la prévention du développement du cancer. Concernant les oxy-HAP, ces études préliminaires associées à l'activité mutagène détectée grâce au test d'Ames (Lemieux *et al.* 2008), démontrent la relation probable entre les mutations et la cancérogénicité des HAP et dérivés. Cependant, le manque de données concernant la formation de ces adduits et les mécanismes impliqués dans le processus de cancérogénicité entraîne une sous-estimation de l'effet de cette exposition chez l'homme. L'étude des adduits aux oxy-HAP en tant que biomarqueur à la fois d'exposition et d'effet précoce est donc essentielle à l'évaluation du risque de développement du cancer à partir d'expositions environnementales.

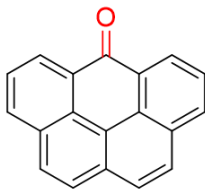
II. Sélection de 7 oxy-HAP d'intérêt

D'après notre revue « Oxy-PAHs : occurrence in the environment and potential genotoxic/mutagenic risk assessment for human health », nous avons sélectionné 4 oxy-HAP considérés comme prioritaires sur des critères d'occurrence dans l'environnement et de potentiel génotoxique/mutagène pour l'Homme :

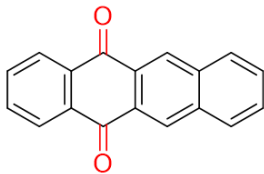


- La 7,12-benz[*a*]anthracènequinone (BAQ) est très retrouvée dans les sols, l'air, les sédiments côtiers et fluviaux (tableau 1 de Clergé *et al.* 2019). Ce

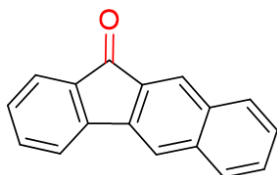
composé démontre un bon effet sur la promotion ou la progression des tumeurs sur les lignées cellulaires de type HepG2 (foie humain), HaCat (peau humaine), H4IIE (foie de rat) et H1L1 (foie de souris, Misaki, Matsui, and Matsuda 2007a; Misaki *et al.* 2007b; Bekki *et al.* 2009; Larsson *et al.* 2014; Misaki *et al.* 2016; Wincent, Bihanic, and Dreij 2016). De plus, le BAQ est suspecté d'être génotoxique compte tenu du nombre élevé de cassures simple brin de l'ADN observées sur des systèmes embryonnaires de medaka japonais (*Oryzias latipes*) suite à des expositions à très faible dose (5 µg/L durant 48h, Dasgupta *et al.* 2014). Ce potentiel génotoxique est supérieur à celui de certains HAP tels que le BaP et le benz[*a*]anthracene.



- Le **6H-benzo[cd]pyrène-6-one** (BPO) a été démontré comme étant un composé mutagène à des concentrations trois fois plus faibles que le BaP. C'est un composé largement retrouvé dans l'air (tableau 1 de Clergé *et al.* 2019). De plus, le BPO agit fortement sur la promotion ou la progression des tumeurs sur les cellules Bhas 42 (fibroblastes de souris, Misaki *et al.* 2016). Le caractère mutagène a été démontré sur les lignées cellulaires H1A1v2 et HaCat.



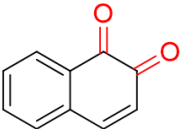
- La **5,12-naphtacènequinone** (NCQ) est un bon promoteur tumoral ainsi qu'un bon inducteur enzymatique sur les lignées cellulaires HepG2, HaCat, H4IIE et H1L1 (Misaki, Matsui, and Matsuda 2007a; Misaki *et al.* 2007b; Bekki *et al.* 2009; Larsson *et al.* 2014; Misaki *et al.* 2016; Wincent, Bihanic, and Dreij 2016). Ce composé est très présent dans les sols, l'air et a été détecté dans les sédiments (tableau 1 de Clergé *et al.* 2019).

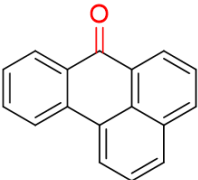


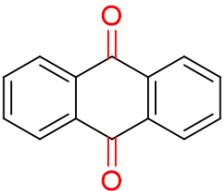
- Le **11H-benzo[*b*]fluorène-11-one** (B[*b*]FO) est un bon promoteur tumoral ainsi qu'un bon inducteur enzymatique sur les lignées cellulaires de type HepG2, H1L1 et H4IIE (Misaki, Matsui, and Matsuda 2007a; Misaki *et al.*

2007b; Bekki *et al.* 2009). Son caractère mutagène a été démontré sur les souches *Salmonella Typhimurium*. Le B[b]FO est détecté à la fois dans les particules d'origine urbaines et dans les aérosols mais aussi à de très fortes concentrations dans les gaz d'échappement des véhicules fonctionnant à l'essence et au diesel (tableau 1 de Clergé *et al.* 2019).

Afin d'obtenir des informations plus complètes sur la classe des oxy-HAP, nous avons décidé dans le cadre de cette thèse d'intégrer 3 autres composés dans les différentes études :

-  La **1,2-naphthoquinone** (1,2-NphQ) est un composé retrouvé en plus faibles quantités dans l'environnement mais démontrant un effet sur la promotion ou la progression des tumeurs sur des cellules Bhas 42 (Misaki *et al.* 2016), et un caractère mutagène sur les souches *Salmonella Typhimurium* (Bolton *et al.* 2000). Plusieurs études ont démontré la formation d'adduits à l'ADN dont la structure a été caractérisée (McCoull *et al.* 1999; Bolton *et al.* 2000; Saeed *et al.* 2007). Cette molécule sera utilisée comme référence pour l'étude des autres oxy-HAP.

-  Le **7H-benz[de]anthracène-7-one** (BANTone) s'est avéré mutagène à la fois sur les souches *Salmonella Typhimurium* et sur la lignée cellulaire h1A1v2 (Moller, Hagen, and Ramdahl 1985; Durant *et al.* 1996). De plus, les fortes concentrations détectées dans les sols, les sédiments côtiers et fluviaux, dans les particules d'origine urbaines et dans les aérosols en font un choix pertinent (tableau 1 de Clergé *et al.* 2019).

-  La **9,10-anthraquinone** (9,10-AQ) a été ajoutée à cette liste suite aux fortes quantités détectées dans tous les compartiments de l'environnement et de par son potentiel mutagène démontré par l'équipe de Durant (Durant *et al.* 1996).

Cependant, aucune autre étude ne traite de cette molécule. Il nous paraît donc important d'intensifier les recherches sur ce composé puisque c'est l'un des oxy-HAP le plus retrouvé dans les gaz d'échappement des véhicules fonctionnant à l'essence et au diesel. Il a aussi été détecté à de fortes concentrations dans les particules atmosphériques d'origine urbaines et dans les aérosols (tableau 1 de Clergé *et al.* 2019).

Afin d'évaluer l'impact de ces sept oxy-HAP sur la santé humaine, il est intéressant de développer des biomarqueurs spécifiques d'exposition et/ou de risque. Nous avons montré dans ce chapitre que les adduits à l'ADN peuvent être utilisés comme biomarqueurs puisqu'ils permettent d'évaluer le potentiel génotoxique et mutagène ainsi que le risque associé à l'apparition du cancer. Contrairement aux HAP, très peu d'études portent sur la formation d'adduits à l'ADN avec les oxy-HAP. Les dernières avancées concernant les outils technologiques, par exemple dans le domaine de la spectrométrie de masse, associées aux méthodes plus sophistiquées d'analyse des résultats permettent ainsi d'apporter une contribution efficace dans la compréhension du risque cancérigène associé à l'exposition aux oxy-HAP.

Dans ce contexte, nous avons, dans les chapitres suivants, évalué l'impact mutagène et génotoxique par le développement de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux sept oxy-HAP sélectionnés. Notre travail se décompose en deux grandes parties :

- Etude du mécanisme d'action : évaluation de la cytotoxicité sur cellules BEAS-2B, du mécanisme de mort cellulaire et du caractère mutagène sur les souches *Salmonella Typhimurium* et *Escherichia Coli*.
- Synthèse de standards analytiques, caractérisation de leur structure en UHPLC-MS/MS et étude de leur cinétique de formation afin d'évaluer leur pertinence en tant que biomarqueur d'exposition.

CHAPITRE 2.

Etudes *in vitro* de cytotoxicité et du caractère mutagène dans l'évaluation du risque des 7 oxy-HAP prioritaires.

CHAPITRE 2

Etudes *in vitro* de cytotoxicité et du caractère mutagène dans l'évaluation du risque des 7 oxy-HAP prioritaires.

I. Démarche méthodologique

L'ADN contenu dans les cellules est constamment exposé à des agents externes qui peuvent endommager les bases de l'ADN. Cette exposition entraîne une génotoxicité et/ou mutagénicité qui peut ensuite aboutir au développement de cancers (Figure 2). Selon le concept du MoA, la détermination du risque cancérigène des oxy-HAP passe par l'évaluation de différents événements clés faisant partie d'une chaîne causale (Figure 7). Dans cette démarche, plusieurs essais de toxicité *in vitro* ont été réalisés. L'une des premières étapes est l'évaluation de la cytotoxicité. Le manque de données concernant l'interaction de ces composés avec les cellules rend cette évaluation indispensable. Différentes approches complémentaires, décrites ci-après, permettent d'évaluer cette cytotoxicité, notamment en relevant la viabilité cellulaire après exposition. Un second événement clé correspond à la formation de mutations dans les gènes critiques (Figure 7). La seconde partie de ce chapitre portera donc sur l'évaluation du caractère mutagène des oxy-HAP sur souches bactériennes selon le test OCDE (Essai n°471 : Essai de mutation réverse sur des bactéries, OCDE 1997) dit test d'Ames. Pour chacun des mécanismes présentés, le peu d'informations concernant les oxy-HAP fait que les principales données traiteront des HAP. Comme cela a été fait il y a de nombreuses années pour les HAP à partir des composés de la liste US EPA, l'étude de ces 7 oxy-HAP permettra d'évaluer d'une manière plus générale la toxicité de la famille des oxy-HAP.

I.1. Test MTS : test de prolifération cellulaire

De nombreuses études ont démontré que le test MTS était une méthode colorimétrique permettant la quantification sensible de la viabilité cellulaire (Berg *et al.* 1994; Malich, Markovic, and Winder 1997). Son principe repose sur la détection de

l'activité des déshydrogénases des mitochondries contenues dans les cellules métaboliquement actives. Ce test est basé sur la réduction du composé de tétrazolium MTS (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxyméthoxyphényl)-2-(4-sulfophényl)-2*H*-tétrazolium) par des cellules viables. Cette réduction entraîne la formation d'un formazan coloré soluble dans le milieu de culture cellulaire (Figure 8). Le colorant formazan produit par ces cellules peut être quantifié par mesure spectrophotométrique.

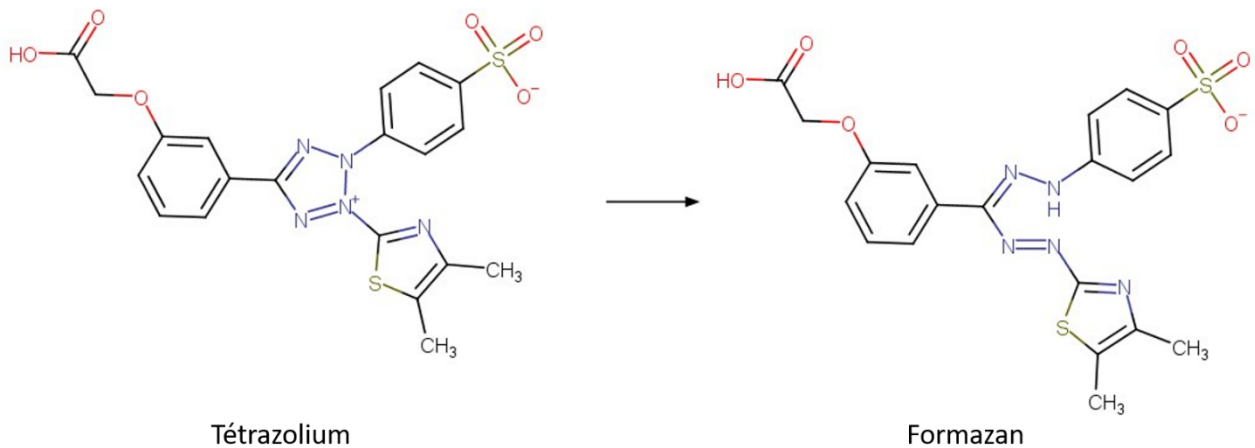


Figure 8. Réduction du composé de tétrazolium MTS en produit de formazan.

Ce test MTS permettrait ainsi de démontrer la cytotoxicité de l'exposition aux oxy-HAP. De plus, il donne une idée précise des doses à utiliser dans les tests suivants. Il nous faudra par la suite évaluer quels sont les mécanismes de cette cytotoxicité, notamment par l'étude des voies induisant la mort cellulaire.

1.2. La mort cellulaire

1.2.1. Test CellTox™ Green

D'une manière générale, le test de cytotoxicité « CellTox™ Green » permet de mesurer les changements d'intégrité membranaire résultant d'une mort cellulaire. Le réactif « CellTox™ Green cytotoxicity assay » correspond à un colorant de cyanine asymétrique. Ce composé a la capacité de se lier aux acides nucléiques des cellules en mort cellulaire et d'émettre une fluorescence (Figure 9). L'intensité du signal de fluorescence obtenu est donc proportionnelle à la cytotoxicité de l'oxy-HAP étudié. Cette méthode possède l'avantage d'effectuer une lecture en temps réel et d'obtenir une cinétique de mort cellulaire selon un mécanisme d'action différent de celui du MTS. Ce test permet donc

d'obtenir des informations complémentaires concernant la cytotoxicité causée par l'exposition aux oxy-HAP. L'étape suivante correspond à l'élucidation du mécanisme de mort cellulaire : l'exposition aux oxy-HAP prioritaires entraîne-t-elle la mort par apoptose ?

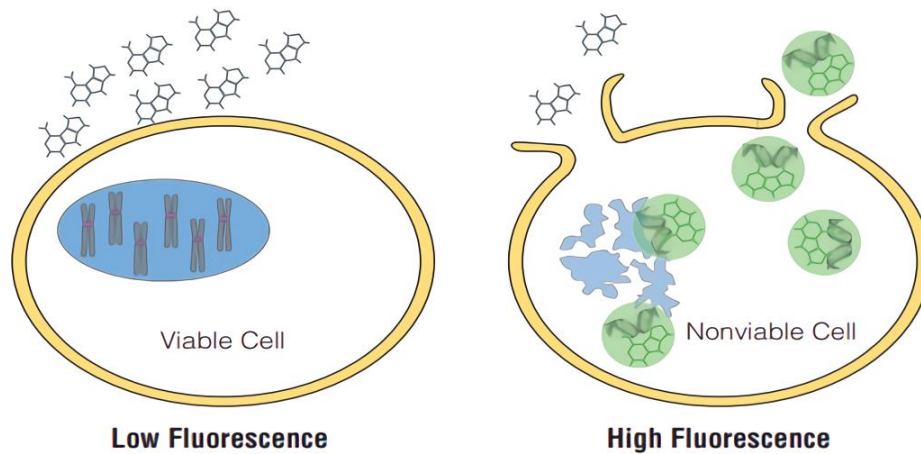


Figure 9. Mode d'action du CellTox™ Green sur les cellules en mort cellulaire (reproduite de "CellTox™ Green Cytotoxicity Assay | Cell Death Assay | Cytotoxicity" n.d.).

1.2.2. Les mécanismes de mort cellulaire : apoptose vs nécrose

L'apoptose a été décrite pour la première fois en 1972 (Kerr, Wyllie, and Currie 1972). Elle correspond à une mort cellulaire dite « volontaire » ou « programmée » caractérisée par une suite d'évènements en cascade. C'est le principal mécanisme par lequel les cellules sont physiologiquement éliminées. L'apoptose joue un rôle déterminant dans l'embryogenèse, dans l'homéostasie cellulaire, dans l'atrophie, dans le fonctionnement et l'homéostasie du système immunitaire, dans la réparation des tissus et dans la régression des tumeurs. Ce processus débute par un rétrécissement cellulaire suivi d'une condensation et une fragmentation nucléaire puis d'un clivage de l'ADN chromosomique en fragments internucléosomiques. Des corps apoptotiques se forment autour de ces fragments tout en évitant une rupture de la membrane plasmique. Ils vont ensuite être reconnus et retirés par les cellules phagocytaires (Figure 10, Robertson and Orrenius 2000). L'élément caractéristique de l'apoptose correspond donc à l'absence d'inflammation autour de la cellule mourante. Cependant, le dérèglement du processus d'apoptose ou de son contrôle est à l'origine de différentes maladies telles que le cancer ou les maladies neurodégénératives.

La nécrose correspond quant à elle à une mort cellulaire accidentelle durant laquelle des changements irréversibles surviennent dans le noyau et/ou le cytoplasme. Cette mort cellulaire est morphologiquement caractérisée par une vacuolisation du cytoplasme, une dégradation de la membrane plasmique et une inflammation du milieu extracellulaire suite à la libération du contenu cellulaire (Figure 10).

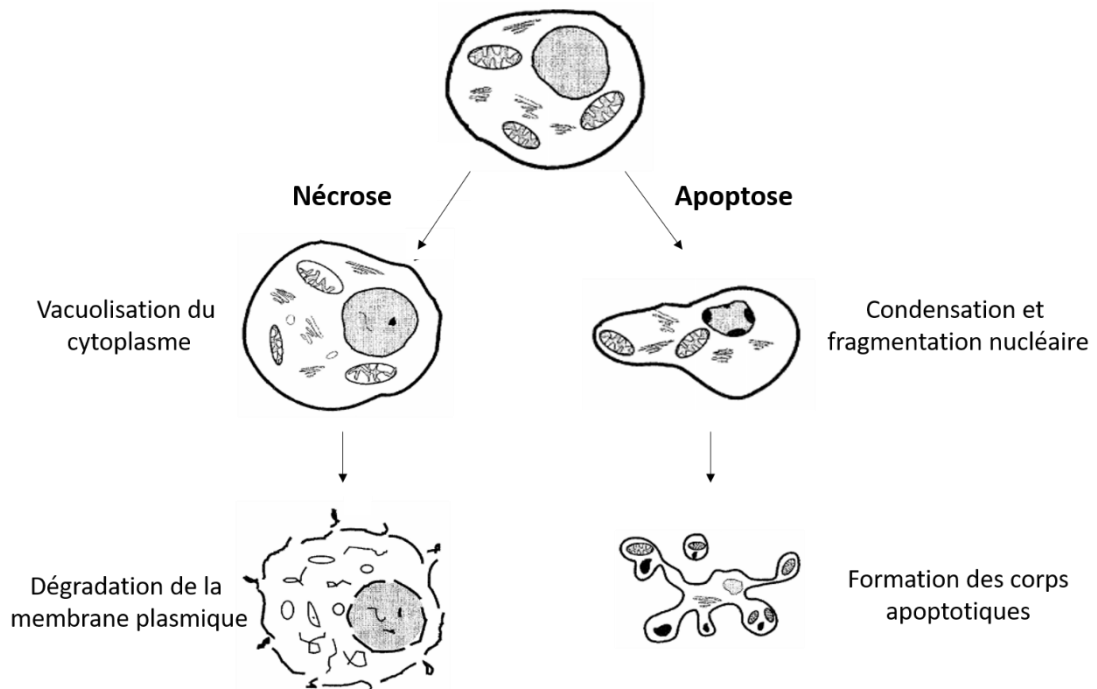


Figure 10. Représentation schématique de l'apoptose et de la nécrose (adapté de Robertson et Orrenius 2000)

L'exposition à différents toxiques peut entraîner l'activation de ces mécanismes de mort cellulaire. Plusieurs études ont permis de mettre en évidence l'induction de l'apoptose suite à l'exposition à différents HAP (Burchiel *et al.* 1993; Venkatachalam *et al.* 1994; Lei *et al.* 1998; Salas and Burchiel 1998; Yoshii *et al.* 2001; Roth and Reed 2002; Chen *et al.* 2003; Raychoudhury and Kubinski 2003; Solhaug *et al.* 2005; Andrysík *et al.* 2007; Topinka *et al.* 2008). Dans ce cas précis, la mort cellulaire semble être liée à la formation d'adduits à l'ADN et aux perturbations associées. Concernant les oxy-HAP, Pálková *et al.* ont évalué l'impact d'un extrait brut (contenant les HAP et dérivés) et de la fraction polaire (contenant principalement des dérivés de type oxy-HAP, nitro-HAP) composant le matériel standard de référence SRM 1650b (matière particulaire de diesel) sur des cellules hépatiques, pulmonaires et prostatiques ((i) cellules d'hépatome de rat H4IIEGud.Luc1.1 transfectées avec un gène rapporteur codant pour la luciférase ; (ii)

cellules épithéliales de foie de rat WB-F344 ; (iii) cellules alvéolaires de rat de type II RLE-6TN ; (iv) cellules de carcinomes humains de la prostate LNCaP, Pálková *et al.* 2015). Ces particules sont collectées à la sortie des moteurs diesel de véhicules lourds et sont donc porteuses de nombreux polluants chimiques dont les HAP (NIST 2006). L'exposition des différentes lignées cellulaires démontre une induction de la mort cellulaire, à la fois par l'extrait brut et par la fraction polaire. Cette dernière entraîne une augmentation de la mort par apoptose contrairement aux fractions apolaires et peu polaires. De plus, les résultats indiquent que la majorité des adduits à l'ADN formés sont causés par la fraction polaire. Comme démontré précédemment pour les HAP, cette mort cellulaire pourrait donc être causée par formation d'adduits à l'ADN avec des composés de la fraction polaire.

Ces résultats confirment bien qu'une attention particulière doit être portée à la fraction polaire des HAP.

Dans le but de toujours mieux comprendre ces mécanismes de toxicité associés à l'exposition aux oxy-HAP et d'étudier l'apoptose plus en détail, différents tests ont été développés en lien avec les médiateurs participants à la formation et à la réalisation de ce processus. Les caspases-3/7 en sont un exemple.

1.2.3. Les caspases-3/7 : médiateurs cellulaires d'apoptose

La plupart des changements morphologiques et biochimiques observés durant le processus d'apoptose résultent de l'activation de protéases intracellulaires dénommées caspases. Ces protéases possèdent une spécificité de clivage du substrat protéique après un résidu aspartique d'où le terme de caspase formé à partir de cystéine-aspartate protéases (Alnemri *et al.* 1996). Cette famille est impliquée dans la signalisation cellulaire apoptotique et partage une similitude de séquence avec le gène pro-apoptotique ced-3 de *Caenorhabditis elegans*, dont le premier homologue mammifère ayant été identifié est le gène ICE (interleukin-1 β -converting enzyme), ou CASP1, donnant la caspase-1 (Thornberry and Lazebnik 1998; Samali *et al.* 1999). Cependant, le mode d'action précis des caspases reste encore mal connu. Depuis la découverte de la caspase 1, treize autres caspases ont été découvertes (Alnemri *et al.* 1996; Thornberry and Lazebnik 1998; S. Wang *et al.* 1998). Initialement, les caspases sont synthétisées sous une forme inactive

qui doit être clivée par voie protéolytique pour être activée (Thornberry and Lazebnik 1998). Elles sont communément séparées en trois sous-familles sur la base de la structure primaire du pro-domaine de leur extrémité N-terminale :

- Initiatrices : caspases -2, -8, -9 et -10
- Effectrices : caspases -3, -6 et -7.
- Activatrices : caspases -1, -4, -5, -11, -12, -13 et -14

L'activation d'une caspase résulte du clivage protéolytique et de l'auto-association de deux pro-caspases formant un tétramère contenant deux sites actifs. Le pro-domaine N-terminal semble être à l'origine des interactions protéine-protéine et est impliqué dans la régulation de l'activité de ces caspases. Par exemple, les pro-caspases initiatrices sont activées à l'aide de molécules adaptatrices telles que Apaf 1 dans le cas de la caspase-9. Une fois activées, les caspases initiatrices sont responsables du clivage et de l'activation des pro-caspases effectrices (Figure 11). Ces dernières vont cliver différentes protéines menant à des traits morphologiques et biochimiques caractéristiques de l'apoptose.

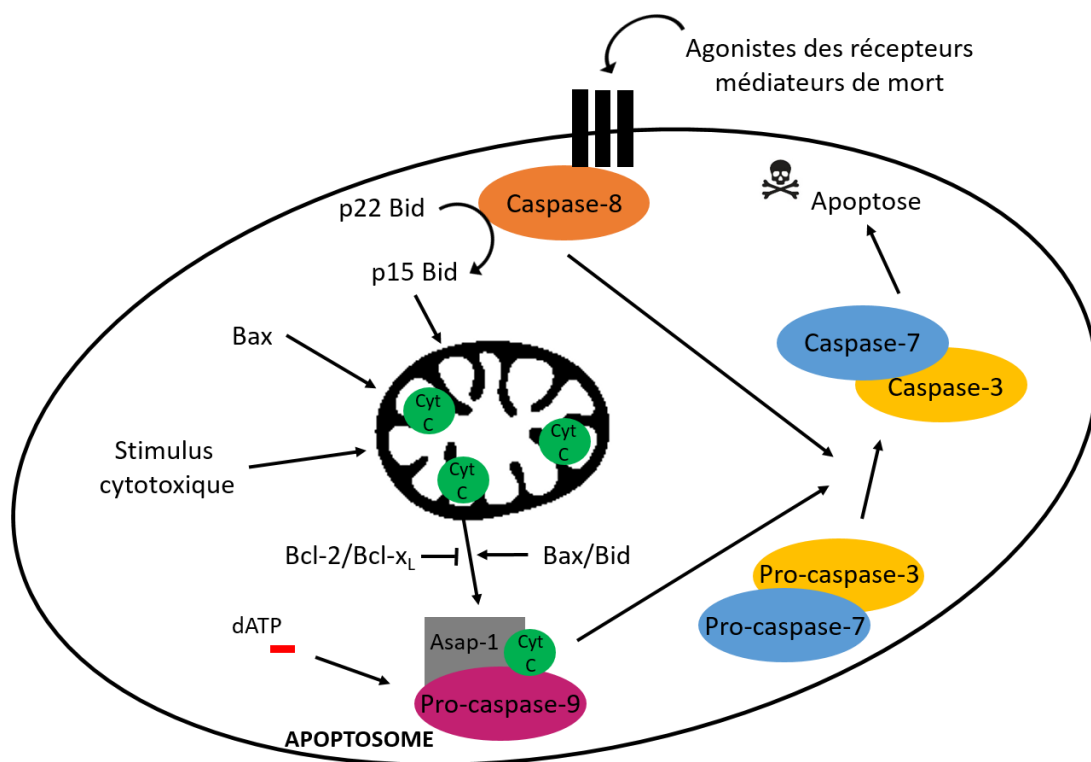


Figure 11. Proposition de mécanisme impliquant les caspases dans le processus d'apoptose (adapté de Robertson et Orrenius 2000 et Li *et al.* 1997).

Les caspases-3 et -7 sont les médiateurs critiques des événements de l'apoptose. La caspase-3 a été particulièrement étudiée du fait de sa capacité à prévenir les changements nucléaires liés à l'apoptose. Une hypothèse du mécanisme d'action s'est basée sur le fait que la caspase-3 entraînait la dissociation et la dégradation de l'ICAD/DFF45, inhibiteur du CAD/DFF40 (dit « DNA fragmentation factor », DFF40 ou « caspase-activated DNase », CAD), libérant ainsi cette endonucléase et conduisant à l'induction de l'activité nucléase, à la condensation nucléaire et à la fragmentation de l'ADN (Liu *et al.* 1997; Enari *et al.* 1998; Mitamura *et al.* 1998; Tang and Kidd 1998). La caspase-7 a pendant longtemps été considéré comme ayant un rôle redondant par rapport à la caspase-3 du fait de leur faible différence de spécificité. Des études ont été réalisées sur des souris déficientes en caspase-3, en caspase-7 ou les deux (Leonard *et al.* 2002; Lakhani *et al.* 2006). Les souris déficientes en caspase-3 et -7 vont mourir de manière très rapide. Une déficience en caspase-3 ou -7 entrainera une vie normale pour les souris mais avec un phénotype apoptotique limité. D'autre part, les deux caspases démontrent une activité différente envers de nombreux substrats protéiques, la caspase-7 étant plus spécifique (Slee, Adrain, and Martin 2001; Walsh *et al.* 2008). Elle est considérée comme un marqueur de l'inflammation et du détachement cellulaire (Lamkanfi and Kanneganti 2010). Ces deux caspases démontrent donc des rôles similaires ainsi que des rôles distincts mais la caspase-3 reste le principal effecteur associé à l'apoptose.

D'autre part, plusieurs études ont démontré qu'une exposition à différents HAP entraînait l'activation des caspases-3, -8 et -9 (Page *et al.* 2002; Ko *et al.* 2004; Kim *et al.* 2005; Ryu *et al.* 2005; Gao and W. Burchiel 2014). Malheureusement, de telles données n'existent pas pour les oxy-HAP. La mesure de la cinétique des caspase-3 et -7 permettrait d'obtenir des informations préliminaires quant à l'induction du processus d'apoptose par les oxy-HAP.

L'exposition aux oxy-HAP peut résulter en d'autres processus tels que les arrêts dans le cycle cellulaire ou les modifications de la morphologie cellulaire.

I.3. Etude du cycle cellulaire

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, afin de faire face aux agressions extérieures, les cellules ont développé des processus de réparation des dommages cellulaires dont ceux faits sur l'ADN. Comme il existe divers types de lésions, divers mécanismes de réparation existent (Hartwell and Kastan 1994). L'un des principaux processus correspond à l'arrêt de la progression du cycle cellulaire permettant à la cellule de réparer. De nombreuses études ont porté sur le BaP pris comme référence pour l'étude des HAP. Cependant, très peu de données concernent les oxy-HAP. La plupart, du temps ils sont étudiés sous forme de mélange, sous la dénomination de « fraction des oxy-HAP » ou de « fraction polaire » (A. Mattsson, Lundstedt, and Stenius 2009; de Oliveira Galvão *et al.* 2018).

I.3.1. Les points de contrôle du cycle cellulaire

Afin de permettre une grande fidélité de transmission du matériel génétique au cours de la division cellulaire, des mécanismes de contrôle se sont développés au cours de l'évolution (Weinert and Hartwell 1988). Le cycle cellulaire comporte donc des points de contrôle permettant de rendre compte de la présence éventuelle de dommages à l'ADN. Il se compose de quatre phases durant lesquelles les cellules vont répliquer leur ADN (phase de synthèse, phase S) puis vont le séparer selon deux pôles où se formeront les deux cellules filles (mitose, phase M, Figure 12). Les phases S et M sont elles-mêmes séparées par les phases G1 et G2 durant lesquelles les cellules vont principalement synthétiser les protéines nécessaires à leur fonctionnement. La progression de ces phases est contrôlée par des complexes de kinases cycline-dépendantes (*cyclin-dependent kinase*, CDK). Les cellules qui ne se divisent plus sortent du cycle cellulaire et entrent dans une phase de sénescence dite phase G0. Les points de contrôle interviennent durant les phases G1, S et G2. Si les dommages à l'ADN générés par une exposition toxique ne sont pas trop importants, les différents points de contrôle vont induire une pause dans le cycle cellulaire permettant la réparation de l'ADN suivi par une ré-initiation du cycle cellulaire. Si les dommages sont trop nombreux, la cellule cesse de

se diviser et reste en phase G0 ou entre dans le processus d'apoptose (Zhou and Elledge 2000).

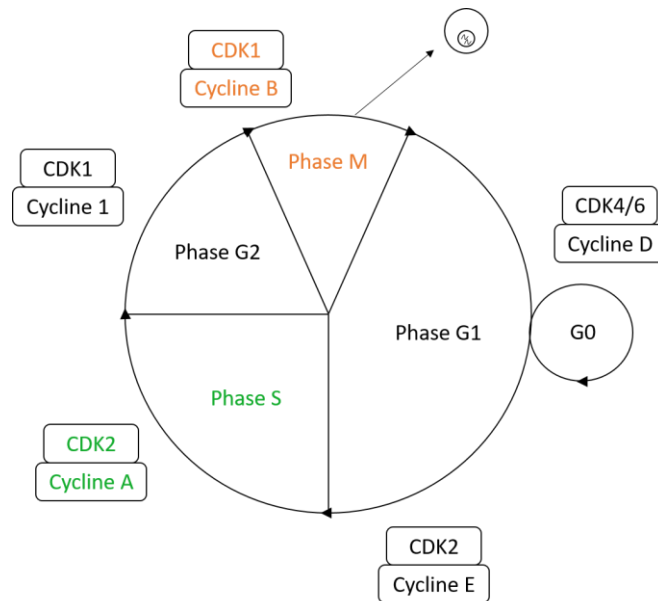


Figure 12. Le cycle cellulaire et l'intervention des complexes CDK-cyclines dans la progression des cellules (adaptée de Grunwald, Mayol, and Ronot 2010).

1.3.2. Inhibition et promotion du cycle cellulaire

Les arrêts de cycle sont une possibilité de réponse cellulaire aux dommages à l'ADN. Ils peuvent permettre de stopper le cycle d'une cellule comportant de nombreuses lésions. Ces arrêts permettent donc de limiter la diffusion de l'information génétique dégradée par des lésions et mutations, à l'origine de pathologies.

Concernant l'évaluation de la toxicité des HAP, différentes études ont porté sur les effets du BaP sur le cycle cellulaire et ont permis de démontrer qu'il était à la fois un initiateur par induction des arrêts de cycle mais aussi un promoteur par inhibition des arrêts du cycle cellulaire.

L'équipe de Khan a démontré que suite à l'exposition de cellules cancéreuses (cellules de carcinome humain du sein MCF-7, cellules cancéreuses humaines du colon (RKO) et plusieurs lignées cellulaires humaines de cancer du poumon) au BPDE, aucun arrêt de cycle n'est observé en phase G1 mais une accumulation des cellules en phase S pourrait entraîner une réplication sur un modèle endommagé (Khan, Vousden, and Dipple 1999; Khan and Anderson 2001). À leur tour, Guo *et al.* ont montré un ralentissement

dans la progression de la phase S lors de l'exposition au BaP (Guo, Faller, and Vaziri 2002). L'accumulation de ces cellules lésées en phase S pourrait contribuer à l'apparition d'un désordre tissulaire suivi du développement d'une pathologie. *A contrario*, des arrêts de cycle cellulaire et une accumulation en phase G2/M ont été observés suite à une exposition au BaP-diol de cellules de carcinome broncho-épithélial mutées sur le gène p53 (cellules H358) et de cellules épithéliales bronchiques humaines immortalisées (cellules BEAS-2B, Caino *et al.* 2007). Cette exposition entraîne également l'induction des voies de métabolisation des CYP450 résultant en la formation du BPDE pour lequel de nombreuses études ont démontré la formation d'adduits à l'ADN (Buterin *et al.* 2000). Ces adduits pourraient être l'origine des arrêts dans le cycle cellulaire. Quant à elle, la voie de métabolisation des AKR, aboutissant à la formation des quinones, ne démontre aucun effet d'inhibition sur le cycle cellulaire. Cette étude montre à nouveau l'importance de l'étude des quinones et autres dérivés oxydés.

À l'inverse de cet effet d'inhibition du cycle cellulaire, il a été montré que le BaP avait aussi une action de prolifération par inhibition des arrêts de cycle. Jia *et al.* ont démontré une surexpression de la cycline D1 (Figure 12) participant à la régulation du passage de la phase G1 à S lors de l'exposition au BaP de cellules embryonnaires humaines et non cancéreuses de poumons (cellules HELF, Jia *et al.* 2005). Cette surexpression entrainerait une prolifération anormale des cellules. Cependant, les auteurs ont aussi démontré que des facteurs alimentaires pouvait impacter cette régulation du cycle cellulaire. Les acides transrétinoïques sont des métabolites de la vitamine A qui entraînent une diminution de la surexpression de la cycline D1 et donc une diminution de cette prolifération incontrôlée. Oguri *et al.* ont exposés des cellules squameuses de carcinome de poumon (128-88T) au BPDE (Oguri *et al.* 2003). L'exposition à ce métabolite du BaP entraîne la surexpression de la protéine Cdc25B qui est une tyrosine phosphatase à l'origine de l'activation des complexes CDK-cycline du cycle cellulaire (Figure 12). Cette surexpression entraîne la suppression des arrêts du cycle en phase G2 et le développement d'une prolifération incontrôlée favorisant l'instabilité génétique.

Concernant les oxy-HAP, aucune étude ne traite de l'effet de ces composés pris individuellement. Ils sont regroupés sous le terme de « fraction polaire » parmi lesquels d'autres composés polaires, tels que les nitro-HAP, sont retrouvés. Pálková *et al.* ont

démontré que les composés polaires d'un extrait brut fractionné provenant d'un matériau standard de référence – SRM 1650b – étaient de puissants agonistes des récepteurs intracellulaires aux xénobiotiques sur un ensemble de lignées cellulaires représentatives des tissus du foie, des poumons et de la prostate (NIST 2006; Pálková *et al.* 2015). Les récepteurs AhR sont des facteurs de transcription dont l'activation est dépendante de la fixation d'un ligand (dont font partie de nombreux polluants environnementaux tels que les HAP). Ils jouent un rôle important dans la régulation de la biotransformation enzymatique, comme par exemple lors de la détoxification des HAP ou bien lors de leur bioactivation en métabolites génotoxiques (Baird, Hooven, and Mahadevan 2005). Contrairement aux HAP, cette étude a démontré que l'exposition aux fractions polaires du matériau de référence entraînait un dérèglement de la progression du cycle cellulaire par accumulation des cellules en phase S mais aussi qu'elle contribuait de manière importante à la formation d'adduits à l'ADN stables (détectés par post-marquage au phosphore 32), et à l'induction de la mort cellulaire.

De manière plus spécifique, Reed *et al.* ont étudié l'effet de trois métabolites oxygénés du BaP sur des cellules épithéliales pulmonaires humaines : les 1,6-, 3,6- et 6,12-benzo[*a*]pyrènedione (Reed *et al.* 2003). Une exposition à de très faibles concentrations (submicromolaire) entraîne une inhibition du développement cellulaire (détecté par utilisation d'un test de viabilité cellulaire). Là encore, cette inhibition pourrait s'expliquer par un arrêt dans le cycle cellulaire, par l'enclenchement des mécanismes de mort cellulaire ou par la formation de mutations dans des régions codantes de l'ADN pouvant aboutir à la formation de pathologies.

1.4. Mutagénicité

L'identification de substances capables d'induire des mutations représente un point important dans les évaluations de sécurité. Les modifications dans la séquence nucléotidique de certains gènes créées par les composés mutagènes sont susceptibles d'être une cause majeure de l'initiation du développement du processus de formation tumoral (Ames 1979). L'étude de ce pouvoir mutagène peut se faire grâce au test d'Ames qui correspond à un test de mutation reverse sur modèle bactérien. Ce test est pratiqué sur des souches de *Salmonella typhimurium* et d'*Escherichia coli* auxotrophes à l'égard

d'un acide aminé, essentiellement l'histidine (Mortelmans and Zeiger 2000). Il permet de détecter, suite à l'exposition à des agents toxiques, des mutations ponctuelles résultant d'une substitution, d'une addition ou d'une délétion d'une ou plusieurs paires de bases de l'ADN (Ames, Mccann, and Yamasaki 1975). Ces mutations réversent des mutations initialement présentes dans les souches génétiquement modifiées (par un plasmide contenant le gène « histidine » muté) et rétablissent ainsi les capacités fonctionnelles de ces bactéries qui vont pouvoir croître sur milieu déficient en histidine. L'abondance des colonies révertantes est donc directement liée.

Il existe différents types de souches. La spécificité des différentes souches peut fournir des informations utiles sur les types de mutations induites par les agents actifs. D'après les lignes directrices de l'OCDE (organisation de coopération et de développement économique, OCDE 1997), le test doit contenir au moins cinq souches bactériennes parmi lesquelles quatre doivent être *Salmonella typhimurium*. Suite à des comparaisons entre plusieurs laboratoires, quatre souches ont été sélectionnées en fonction de la fiabilité et la reproductibilité de leur réponse :

- *S. typhimurium* TA1535
- *S. typhimurium* TA1537
- *S. typhimurium* TA98
- *S. typhimurium* TA100.

Les souches TA1535 et TA100 sont utilisées pour détecter les mutations par substitution de paires de base. Les souches TA1537 et TA98 sont quant à elle utilisées pour mettre en avant les mutations par décalage du cadre de lecture. Contrairement aux souches TA1535 et TA1537, TA98 et TA100 possèdent un plasmide pKM101 rendant ainsi ces souches plus sensibles à une variété de molécules. Ces souches peuvent cependant ne pas détecter les mutagènes de type oxydants ou agents réticulants. Il faut donc inclure une cinquième souche bactérienne telle que la souche *uvrA* (pKM101) de *Escherichia coli*.

L'étude du caractère mutagène d'un composé peut se faire en présence ou en l'absence d'un activateur métabolique. La fraction microsomale S9 d'hépatocyte de rat induits par de l'Aroclor 1254, appelé S9 mix, en est un bon exemple. Comme la plupart

des composés nécessite une activation pour devenir mutagène, la fraction microsomale de foie de rat obtenue par centrifugation d'un broyat d'organes et récupération du surnageant contient de nombreux systèmes enzymatiques liés à la métabolisation des xénobiotiques chez les mammifères. Plusieurs études ont démontré le caractère mutagène de HAP tels que le benzo[*a*]anthracène et le naphhtacène. Le benzo[*a*]anthracène est mutagène sur la souche TA100 en présence d'une activation métabolique et le naphhtacène sur la TA1535, en présence aussi d'une activation métabolique. L'activation de ces composés pourrait résulter en la formation de composés oxydés pouvant être à l'origine du caractère mutagène.

1.5. Résumé de la démarche méthodologique

Les différents tests de toxicité *in vitro* composant cette démarche méthodologique sont regroupés dans la Figure 13. Cet arbre dichotomique nous permet de représenter le choix des différents tests en fonction des résultats obtenus à chaque étape. Cette démarche nous permettra d'évaluer, d'un point de vue général, la toxicité de la famille des oxy-HAP.

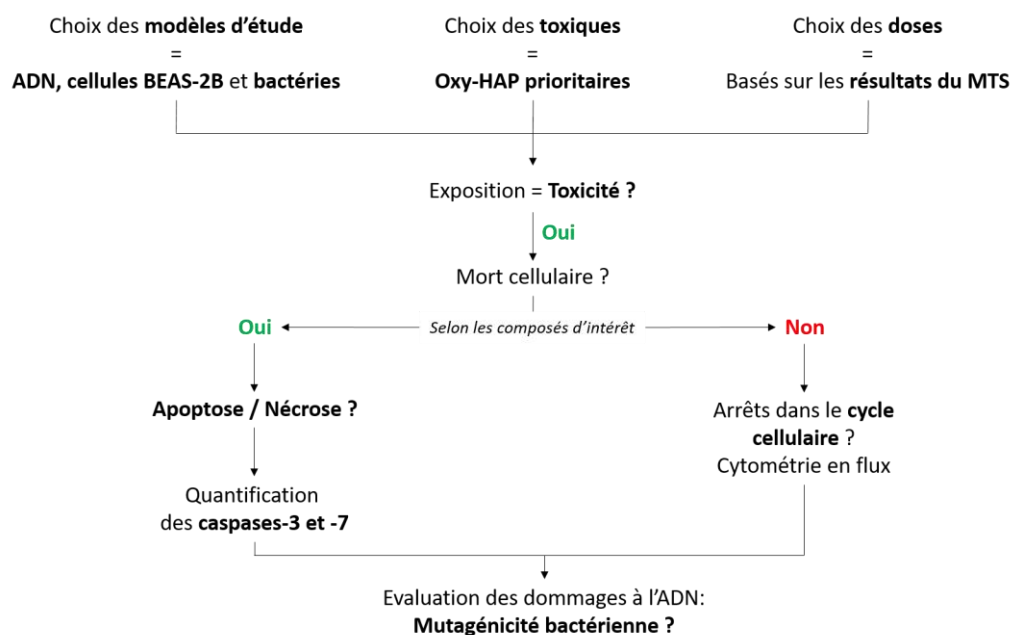


Figure 13. Résumé de la démarche méthodologique portant sur l'évaluation de la cytotoxicité et du caractère mutagène des oxy-HAP prioritaires.

Les différents résultats seront regroupés dans une publication (présentée en partie III.2). Les matériels et méthodes détaillés ainsi que les résultats non présentés dans la publication seront regroupés ci-après.

II. Matériel et méthodes

II.1. Culture cellulaire

Dans le cadre de cette thèse, des cellules épithéliales bronchiques humaines immortalisées, dites BEAS-2B, ont été sélectionnées car l'épithélium pulmonaire et en contact avec les oxy-HAP. Dans le poumon, les cellules épithéliales bronchiques représentent les premières cellules exposées suite à l'inhalation de polluants aériens. Ces cellules jouent un rôle dans les mécanismes de défense. Les BEAS-2B proviennent de chez ATCC (ATCC® CRL-9609TM, Molsheim, France). A l'origine, ces cellules ont été isolées à partir de l'épithélium bronchique de patients exempt de cancer (Lechner *et al.* 1982; Reddel *et al.* 1988; Zhao and Klimecki 2015). Elles ont ensuite été infectées par un adénovirus 12-SV40 puis clonées de manière à les immortaliser. De plus, ces cellules sont métaboliquement compétentes permettant d'étudier l'effet toxique produit par un métabolite.

Les BEAS-2B sont cultivées en tant que cellules adhérentes avec un passage inférieur ou égal à 10 dans des plaques 12 puits ou 96 puits (Eppendorf) à l'aide du milieu LHC-9 (acheté chez Fisher Scientific Bioblock, Illkirch, France et supplémenté avec 3% de sérum de veau fœtal et 33 mM de bicarbonate de sodium). En format 96 puits, les cellules sont repiquées à 7000 cellules par puit et pour les plaques 12 puits, 60000 cellules par puits (le choix de ce nombre de cellules est expliqué dans les résultats de ce chapitre). Les cellules sont ensuite placées dans un incubateur à 37°C en présence de 5% de CO₂. Le milieu de culture est renouvelé toutes les 48 heures.

II.2. Test MTS : test de prolifération cellulaire

Afin de déterminer la cytotoxicité de nos 7 oxy-HAP, les cellules BEAS-2B sont repiquées en plaque 96 puits dans un volume de 100 µL et placées à l'incubateur durant 24h. Les solutions mères sont préparées dans le DMSO et passées aux ultrasons afin

d'obtenir une parfaite homogénéité. Les dilutions en cascade sont ensuite réalisées dans le milieu de culture. Les BEAS-2B sont placées durant 24h à l'incubateur de manière à obtenir un tapis cellulaire uniforme. Suite à cela, 100 µL de chaque solution fille est ajouté en triplicat dans un volume total de 200 µL par puit. Ces plaques sont à nouveau incubées durant 24h. Le traitement est ensuite retiré et remplacé par du nouveau milieu suivi d'une nouvelle incubation de 24h. La viabilité cellulaire est déterminée grâce à l'utilisation du réactif MTS (principe décrit auparavant, partie I.1. Produit acheté chez Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Un volume de 50 µL de ce réactif est directement ajouté dans chaque puit puis incubé durant 2h à 37°C. L'absorbance est ensuite enregistrée à 490 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Champigny sur marne, France). La quantité de formazan produite (Figure 8) par les enzymes déshydrogénases est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes en culture.

Une moyenne de chaque triplicat est ensuite réalisée puis les pourcentages de survie sont calculés à l'aide de l'équation 1 :

$$\% \text{ survie} = \frac{DO \text{ x} - DO \text{ blanc}}{DO \text{ témoin} - DO \text{ blanc}} \times 100 \quad (\text{Equation 1})$$

DO x : densité optique d'un puit contenant le traitement

DO blanc : densité optique du puit ne contenant que du milieu de culture

DO témoin : densité optique du puit contenant des cellules non traitées

Les résultats sont ensuite représentés sur un histogramme en fonction de la concentration en oxy-HAP.

II.3. Cinétique de la cytotoxicité : test CellTox™ Green

Le test de cytotoxicité « CellTox™ Green » mesure les changements d'intégrité membranaire résultant d'une mort cellulaire. Les cellules BEAS-2B sont repiquées en plaque 96 puits dans un volume de 100 µL et sont cultivées à 37°C en présence de 5% de CO₂ durant 24h dans un IncuCyte® S3 (Essen BioScience, Royaume-Uni). Pour chaque oxy-HAP, quatre concentrations sont sélectionnées (en fonction des résultats du

test MTS présentés dans la publication n°2) et le traitement est réalisé dans les mêmes conditions que celles du test MTS. Suite aux 24h d'exposition, le traitement est retiré puis remplacé par du nouveau milieu. Le réactif « CellTox™ Green cytotoxicity assay » (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) est ensuite ajouté puis les images sont acquises grâce à l'objectif x10. Ce réactif est un colorant de type cyanine asymétrique qui n'affecte que les cellules en mort cellulaire (Figure 9).

Lorsque le colorant se lie à l'ADN de ces cellules, ses propriétés fluorescentes sont alors enrichies. Les cellules viables quant à elles ne produisent pas cette fluorescence. L'intensité du signal de fluorescence est donc proportionnelle à la cytotoxicité de la molécule étudiée. Des images de fluorescence et de contraste de phase sont acquises en temps réel toutes les heures dans deux régions distinctes du puit. Les images prises en contraste de phase sont utilisées pour calculer la confluence à l'aide du logiciel IncuCyte® et permettent d'obtenir des informations sur la morphologie des cellules. Chaque expérience est réalisée en triplicat et l'accumulation du colorant CellTox™ Green dans le temps est normalisée par rapport à la confluence cellulaire.

II.4. Quantification cinétique des caspases-3/7 pour l'étude du processus d'apoptose

Comme expliqué précédemment, les premières étapes de l'apoptose sont marquées par l'activation de la caspase qui participe au clivage des substrats protéiques et à la destruction de la cellule. L'activité des caspases-3/7 a été évaluée grâce à l'utilisation du réactif « IncuCyte® caspase-3/7 Green Apoptosis Assay » (Sartorius, Aubagne, France) comme décrit précédemment (Artymovich and Appledorn 2015). Brièvement, le réactif de ce test est composé d'un peptide inerte possédant un site de reconnaissance des caspases-3/7 associé à un peptide NucView™ 488 (Sartorius). L'association de ces deux peptides donne un composé non fluorescent confiné dans le cytoplasme. Après induction de l'apoptose, l'activation des caspase-3/7 entraîne la rupture de la liaison entre le peptide inerte et le NucView™ 488. Le NucView™ 488 possède une forte affinité pour l'ADN nucléaire et devient fluorescent dans le spectre vert. L'activation des caspase-3/7 peut donc être corrélée avec l'augmentation de la fluorescence verte du noyau.

Afin d'évaluer le mécanisme de mort cellulaire, les cellules BEAS-2B sont cultivées de la même manière que pour le test MTS et le test du CellTox™ Green (7000 cellules/puit). Grâce à l'IncuCyte® S3 (objectif x10), des images de fluorescence et de contraste de phase sont acquises en temps réel toutes les heures dans deux régions distinctes du puit. Les images prises en contraste de phase sont utilisées pour calculer la confluence à l'aide du logiciel IncuCyte® et permettent d'obtenir des informations sur la morphologie des cellules. L'accumulation de la caspase-3/7 dans le temps est normalisée par rapport à la confluence cellulaire. Chaque expérience est réalisée en triplicat au sein de la plateforme de la structure fédérative ICORE Impedancell.

II.5. Cytométrie en flux

Les cellules BEAS-2B sont cultivées en plaque 12 puits (60000 cellules/puit) à 37°C et en présence de 5% de CO₂ durant 24h. Le traitement est ensuite réalisé à deux concentrations spécifiques en lien avec les résultats obtenus lors des tests de CellTox™ Green et de caspase-3/7 (publication n°2). Une analyse est réalisée aussitôt après les 24h d'exposition et une seconde analyse est réalisée 24h après la fin de l'exposition. Les cellules traitées et les cellules en suspension sont collectées, rincées au PBS et centrifugées durant 5 min à 2800 g. Le PBS est ensuite retiré et 500 µL de réactif du kit de cycle cellulaire (colorant ayant une forte affinité avec l'ADN tel que l'iodure de propidium, acheté chez Beckman Coulter, Villepinte, France) est ajouté aux cellules durant 20 min à température ambiante à l'abri de la lumière. Chaque échantillon est analysé grâce au cytomètre en flux Gallios (Beckman Coulter). La lumière d'excitation du cytomètre est produite par des lasers bleus, rouges et violets. Des billes « FlowCheck Pro » sont utilisées afin de vérifier l'alignement optique et la dynamique des fluides puis des billes « FlowSet Pro » permettent de vérifier la sensibilité du cytomètre. Les données sont recueillies par le logiciel Gallios (Beckman Coulter) et analysées par le logiciel Kaluza (Beckman Coulter). La fluorescence rouge émise par l'iodure de propidium contenu dans le kit est collectée sur le canal « FL3 ».

Une zone « singulet » a été définie dans l'histogramme représentant l'aire en fonction de la quantité maximale en ADN afin d'exclure les doublets de cellules lors de l'analyse. La teneur en ADN est analysée sur un histogramme mono-paramétrique FL3 lin.

II.6. Etude du caractère mutagène : test d'Ames

II.6.1. Principe

Afin d'étudier la mutagénicité des 7 oxy-HAP d'intérêt, un kit contenant un activateur métabolique (extrait de foie de rat appelé S9 mix) fourni par Xenometrics (Ames MPF™ Penta I, Allschwil, Suisse) a été utilisé suivant le protocole décrit par le fabricant (<https://www.xenometrix.ch/ames-test-kits.html>, Figure 14).

Le kit contenait 5 souches : TA98, TA100, TA1535 et TA1537 pour *Salmonella Thyphimurium* et UC uvra PKM Y07 pour *Escherichia Coli* (sélectionnées selon les lignes directrices de l'OCDE concernant les tests sur produits chimiques, OCDE 1997). Un criblage est réalisé afin d'évaluer les concentrations d'exposition aux différents oxy-HAP. La quantité maximale soluble de chaque oxy-HAP est tout d'abord diluée dans le DMSO suivi d'une dilution en cascade au 1/2 log. Les différentes concentrations sont ensuite exposées sur les différentes souches.

Brièvement, les différentes bactéries sont exposées à 6 concentrations différentes de chaque oxy-HAP (Annexe, tableau A, article n°2) ainsi qu'au contrôle positif (déterminé par le fournisseur, dépend de la souche et de la présence ou non de S9) et au contrôle négatif (concentration maximale en solvant dans le milieu de culture : 0,3%) en présence ou non d'activateur métabolique. Cette exposition est réalisée durant 90 minutes (à l'exception de *E. Coli* en présence de S9 : 20 minutes) dans un milieu contenant assez d'histidine ou de tryptophane pour permettre deux divisions cellulaires successives. Après ces 90 minutes, le milieu indicateur déficient en histidine ou tryptophane est ajouté puis les plaques 24 puits sont transférées en plaque 384 puits. Ces dernières sont incubées durant 2 jours à 37°C. Le nombre de révertants (puit jaune) est compté pour chaque doses puis comparé au témoin négatif. Chaque dose est réalisée en triplicat afin de pouvoir effectuer des tests statistiques.

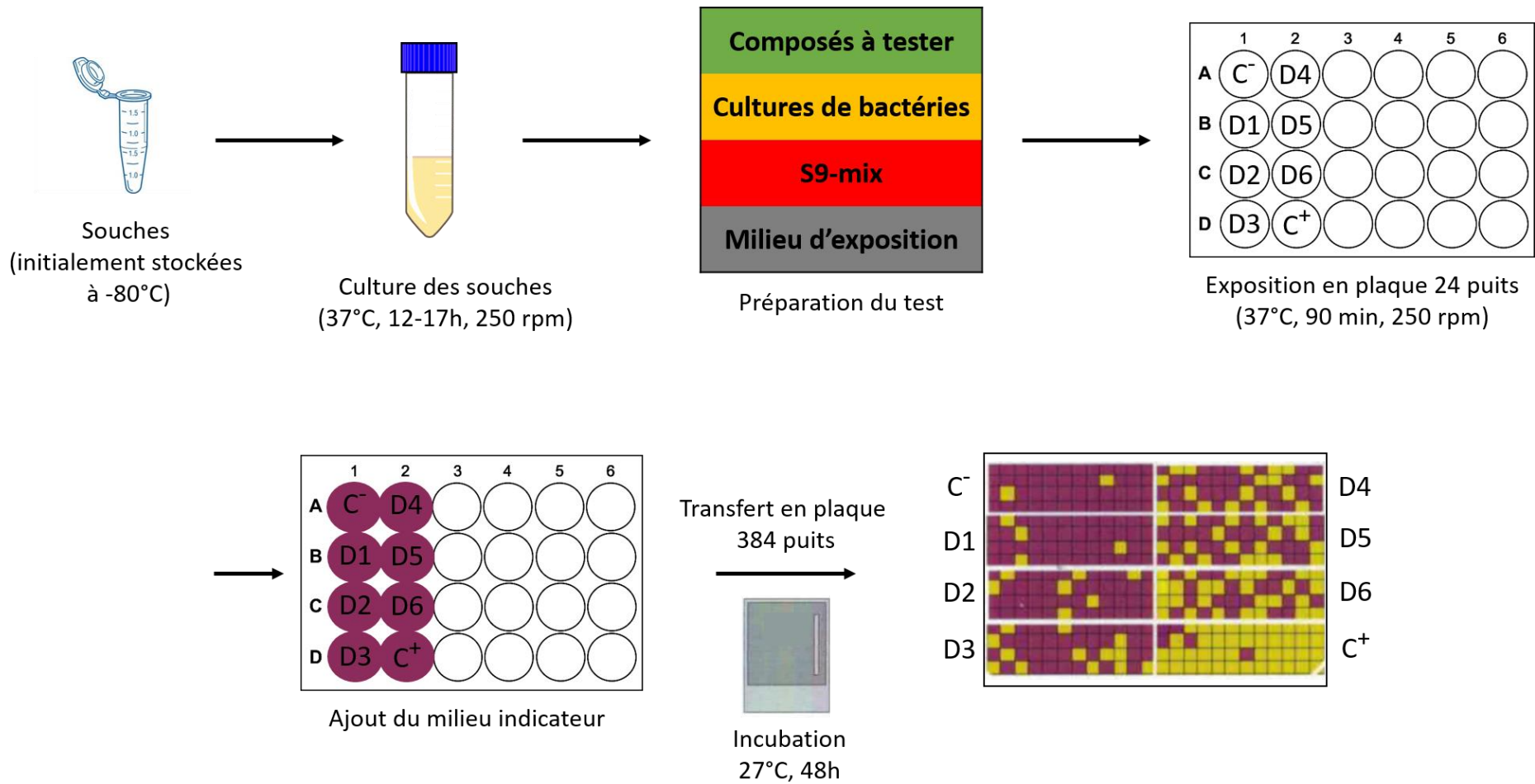


Figure 14. Protocole de réalisation du test d'Ames grâce à l'utilisation du kit Xenometrics

II.6.2. Analyses statistiques

Les données obtenues ont été analysées selon trois méthodes distinctes :

- La méthode habituellement utilisée consistant à « deux fois le blanc » (Ames 1979; Claxton *et al.* 1987) dans laquelle une molécule est considérée mutagène dès que son nombre de révertants dépasse le double du nombre de révertants obtenu pour le blanc. Une petite amélioration a été faite par le fournisseur afin d'appliquer « deux fois le blanc + coefficient de variation ». Cependant, l'élaboration de cette méthode d'analyse statistique reste empirique. Certains choisissent même d'appliquer la limite à « trois fois le blanc ». De manière à obtenir des données plus fiables, les deux tests suivants ont été sélectionnés en lien avec le faible nombre d'échantillons.

- Test de Mann-Whitney : test de comparaison non-paramétrique intergroupe par rapport au blanc réalisé à l'aide du logiciel R ($p \leq 0,05$)

- Test de Margolin : régression non linéaire comprenant un paramètre pouvant être utilisé comme indice mutagène et qui permet de mettre en avant une relation dose-réponse concernant la toxicité d'un composé. Un deuxième paramètre permet de quantifier la variabilité entre les différentes plaques. Ce test n'exclut pas la variabilité de poisson et s'effectue à l'aide du logiciel R ($p \leq 0,05$, Margolin, Kaplan, and Zeiger 1981).

III. Résultats

III.1. Optimisation des conditions de culture des cellules BEAS-2B.

III.1.1. Influence du nombre de passages sur les tests de cytotoxicité.

Le nombre de passages correspond au nombre de fois où la culture a été sous-cultivée, c'est-à-dire trypsinée puis repiquée dans plusieurs flacons de culture. Les cultures cellulaires ont le potentiel de changer avec le temps en raison d'une certaine sélectivité observée dans l'environnement de culture. Lorsque le nombre de passages augmente, les cellules sont soumises à de nombreux cycles de division et vont inclure des cellules plus éloignées de l'isolat de départ. La prolifération cellulaire va donc se poursuivre mais elle pourra être associée à des modifications phénotypiques et/ou

génotypiques pouvant entraîner l'initiation de la mort cellulaire (Briske-Anderson, Finley, and Newman 1997; Pradel *et al.* 2008). Il est donc recommandé d'utiliser un faible nombre de passages afin de représenter le plus étroitement le tissu d'origine (ECACC 2017).

Au cours de notre étude, nous avons évalué l'impact du nombre de passages sur la cytotoxicité obtenue par le biais du test MTS. Deux cultures de cellules BEAS-2B ont été exposées au différents oxy-HAP selon les mêmes conditions (temps d'exposition, renouvellement du milieu de culture,...), seul le nombre de passages variait. Suite aux 24 heures d'exposition, le test MTS est réalisé nous permettant d'obtenir les histogrammes ci-dessous.

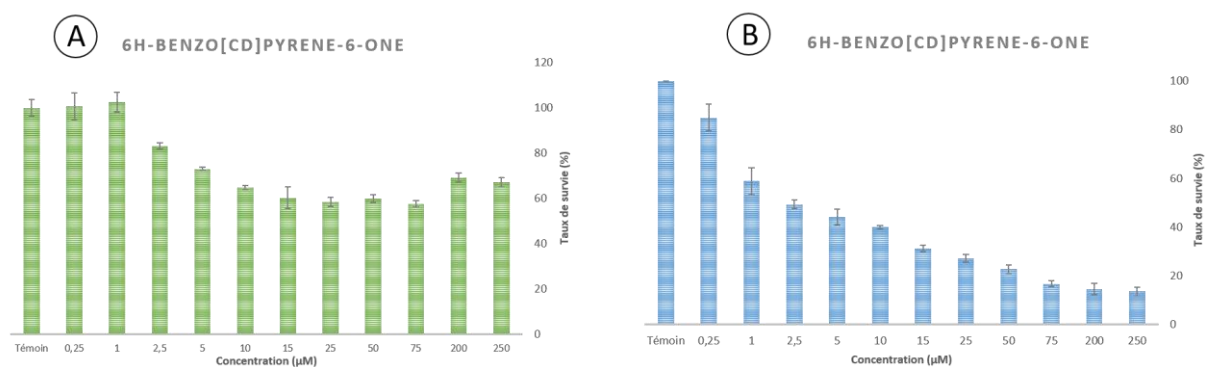


Figure 15. Impact du nombre de passages des cellules BEAS-2B observé sur les courbes de cytotoxicité du test MTS. A. Passage n°10. B. Passage n°40.

La figure 15 nous permet de montrer que le nombre de passage influence fortement la cytotoxicité des cellules BEAS-2B. Concernant le BPO, lorsque le nombre de passage est inférieur ou égal à 10, nous observons une stabilisation de la cytotoxicité aux alentours de 60%. Sur des cellules BEAS-2B ayant subi 40 passages, une dose-réponse est observée. Ces résultats montrent bien que l'augmentation du nombre de passages entraîne une dérive de la lignée cellulaire. Ces cellules ne représentent donc plus correctement les culture cellulaires primaires de BEAS-2B.

Les différents tests de toxicité seront donc effectués sur des cultures de BEAS-2B de passage inférieur ou égal à 10 de manière à représenter le plus étroitement possible le tissu d'origine.

III.1.2. Influence de la confluence cellulaire sur les tests de cytotoxicité

L'une des étapes préalables aux études de cytotoxicité correspond à l'évaluation de l'influence de la confluence cellulaire sur le test du CellTox™ Green. Plusieurs études ont démontré que le niveau de confluence modifiait le degré de lésions des cellules exposées (Pentland *et al.* 1987; Carvalho *et al.* 2003; Yalcin, Perry, and Ghadiali 2007). Des cellules en sur-confluence vont conduire à une apoptose réduite et retardée contrairement à des cellules à plus faible confluence (Carvalho *et al.* 2003). La sur-confluence va créer une résistance mécanique de par la formation d'un attachement cellules à cellules lié à l'actine et la tubuline. Cette dernière va former un réseau relativement uniforme pour des cellules à haute confluence alors que pour des cellules à plus faible confluence, la tubuline reste principalement située au centre de la cellule. Cette résistance diminuera l'impact des lésions et ne représentera pas de manière significative l'effet de l'exposition à différents composés toxiques. La sous-confluence quant à elle entrainera un mauvais développement cellulaire. Les cellules BEAS-2B nécessite une confluence minimale pour pouvoir se développer convenablement.

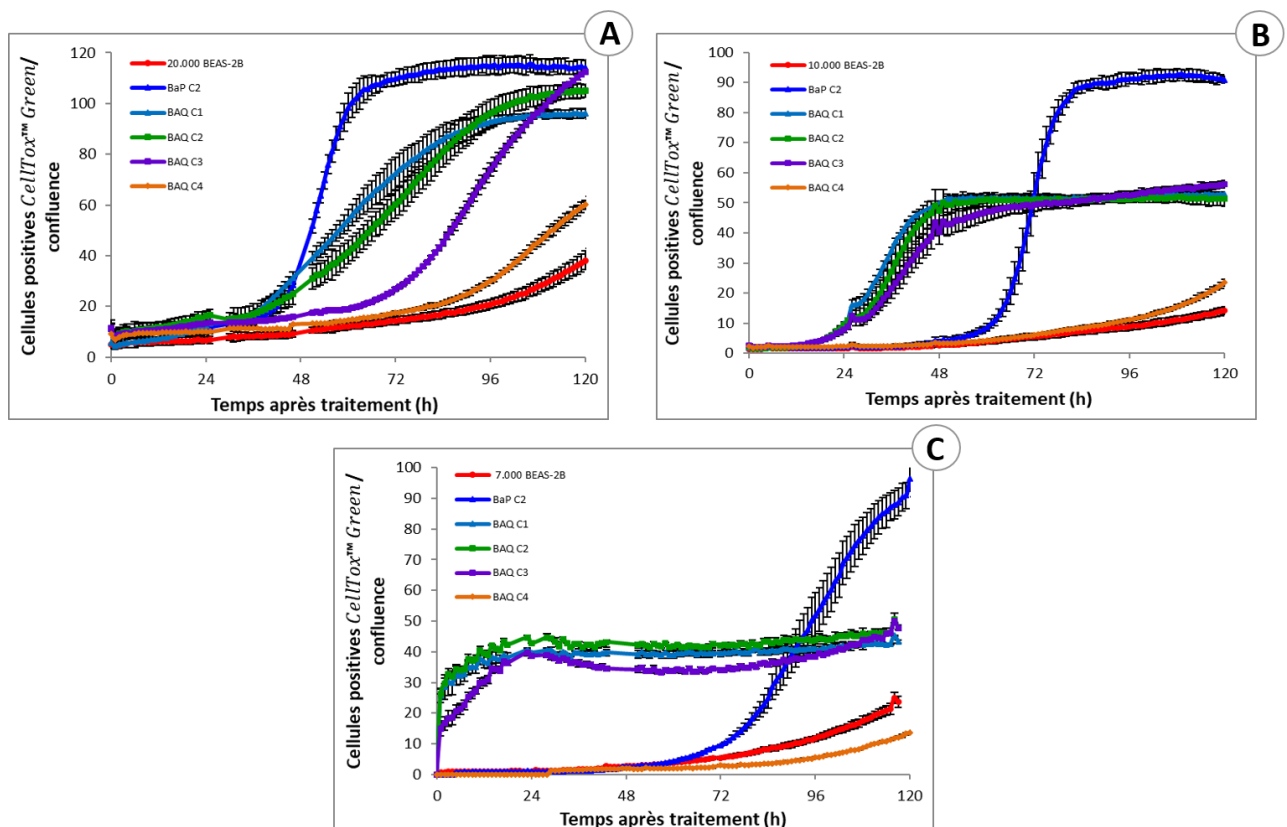


Figure 16. Impact de la confluence cellulaire sur les cellules BEAS-2B observé grâce au test du CellTox™ Green. A. 20 000 cellules par puit. B. 10 000 cellules par puit. C. 7 000 cellules par puit.

Trois confluences cellulaires ont été testées : 20 000 cellules par puit correspondant à la sur-confluence, 10 000 cellules par puit relatif à la confluence et 7 000 cellules par puit correspondant à une densité cellulaire légèrement inférieure à la confluence. En sur-confluence, les courbes de mort cellulaire montre un effet retardé par une augmentation progressive de la mort cellulaire dans le temps. A 10 000 et 7 000 cellules par puit, l'effet est plus rapide (Figure 16).

Les différents tests de toxicité seront donc effectués sur des cultures de BEAS-2B en légère sous-confluence de manière à observer un effet immédiat.

III.2. Article n°2: Evaluation of cytotoxicity and mutagenicity of 7 oxy-PAHs.

Evaluation of cytotoxicity and mutagenicity of 7 oxy-PAHs

*Adeline Clergé¹, Jérémie Le Goff², Emilie Brotin^{3,4,5,6}, Edwige Abeillard^{4,6}, Marilyne Guillamin⁷,
Isabelle Vaudorne¹, Christophe Denoyelle^{3,4,6}, Raphaël Delépée^{1,6,8*}*

(1) Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, ABTE, Caen, France

(2) ADn'tox SAS, Caen, France

(3) UNICAEN, Normanide University, UFR Santé, Faculté des sciences pharmaceutiques, Caen
France

(4) INSERM U1086 ANTICIPE (Interdisciplinary Research Unit for Cancers prevention and
Treatment) – Axis BioTICLA (Biology and Innovative Therapeutics for Ovarian Carcinomas)

(5) Normandie Univ, UNICAEN, Federative structure 4206 ICORE, ImpedanCELL, Caen, France

(6) Comprehensive Cancer Center François Baclesse, UNICANCER, Caen, France

(7) Normandie Université, UNICAEN, Plateau de Cytométrie en Flux, ICORE, Caen, France

(8) PRISMM, Plateforme de Recherche et d'Innovation en Spectrométrie de Masse et
Métabolomique, ICORE, Caen, France

* Corresponding author:

raphael.delepee@unicaen.fr

Comprehensive Cancer Center François Baclesse, UNICANCER, Caen, France

3 avenue Général Harris, 14032 Caen Cedex 05, France

+33 2 31 45 51 13

Abstract

In view of their large prevalence in polluted environment and demonstrated toxicity among them carcinogenicity, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) have been widely studied since the establishment of the 16 PAH priority list. However, these 16 compounds do not explain the entire toxic activity associated to PAHs and derivatives. Compounds such as oxy-PAHs were detected in the environment and are able to generate DNA damages, mutagenicity and probably cancers. Because of the limited data available in the literature, seven oxy-PAHs were selected in terms of occurrence in the environment and their potential genotoxic/mutagenic risks. Thanks to the MTS assay, CellTox™ Green assay, kinetic quantification of caspase-3/7 and Ames assay, cytotoxicity and mutagenicity of these seven oxy-PAHs was highlighted. These data allowed to gather preliminary data on the mechanism of action of these poorly studied compounds.

1. Introduction

Over the years, many studies have demonstrated correlations between air pollution and adverse health effects (US EPA 2002). Recently, exposure to outdoor air pollution has been classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC), as carcinogen to humans (group 1) concerning lung cancer (Loomis *et al.* 2013; Straif, Cohen, and Samet 2013). Among the main air pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) have been widely studied to construct, in 1976, to the establishment of the 16 PAH priority list by the United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA). Among this list, benzo[*a*]pyrene (BaP) belongs to the first chemical carcinogens to be discovered. Its mutagenic/carcinogenic risks have been extensively documented (Sen *et al.* 2012; M. Huang, Blair, and Penning 2013). One particular end-point for carcinogenicity assessment is the genotoxic/mutagenic potential. Considering this potential, results reveal that the 16 associated PAH are far from explaining the observed mutagenicity (Umbuzeiro *et al.* 2008). Other additional compounds such as nitro-PAHs and oxy-PAHs can be incriminated (Clergé *et al.* 2019).

Oxy-PAHs can be formed thanks to hydroxyl radicals, organic oxidation or ozonolysis and may interact with the respiratory tract cells to create DNA damages (Finlayson-Pitts and Pitts 2000). These compounds have been detected in the different compartments of the environment at concentrations of the same order of magnitude of unsubstituted PAHs and

approximately ten times higher than nitro PAH concentrations (Clergé *et al.* 2019). However, the specific genotoxicity and mutagenicity of oxy-PAHs is not well determined especially concerning their mode of action.

Improving knowledge about the mode of action in term of genotoxicity/mutagenicity goes through the evaluation of key events ranging from the interaction between toxic compound and the exposed cell that leads to disturbances in the cell's activities and to the emergence of a pathology. In this approach, *in vitro* toxicity assays were of particular importance. One of the first steps of this study is the evaluation of cytotoxicity (Boobis *et al.* 2009). The lack of data concerning the interaction of oxy-PAHs with cells makes this assessment essential. After exposure of eukaryotic and prokaryotic cells to pollutants, different response mechanisms of toxicity are possible such as (i) cell cycle modulation allowing reparation and preservation of tissue integrity (Hartwell and Kastan 1994), (ii) induction of programmed cell death or (iii) formations of DNA damages that can lead to mutations in critical genes (Ames 1979). Concerning oxy-PAHs, such relevant investigations are missing in the literature. Assays were realized concerning each of these mechanisms and obtained data will be compared to those of unsubstituted PAHs in literature.

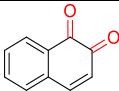
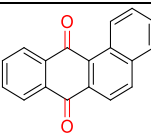
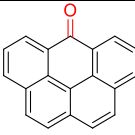
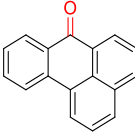
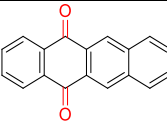
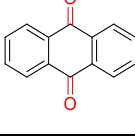
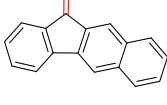
In a recent review, 4 oxy-PAHs were selected as priority compounds on the basis of their occurrence in the environment and their genotoxic/mutagenic potency (table 1): 7,12-benz[*a*]anthracenequinone, 6*H*-benzo[*cd*]pyrene-6-one, 5,12-naphthacenequinone and 11*H*-benzo[*b*]fluorene-11-one (Clergé *et al.* 2019). In order to obtain a more complete information, 3 additional compounds were selected according to the same criteria as above (table 1): 1,2-naphthoquinone, 7*H*-benz[*de*]anthracene-7-one and 9,10-anthraquinone. As it has been done for parent PAHs, these compounds are proposed as priority for the evaluation of the toxicity of the whole oxy-PAH family. The purpose of this study is the evaluation of the cytotoxic and the mutagenic impact of these seven oxy-PAHs *in vitro*.

2. Materials and methods

Chemicals and reagents. BEAS-2B cells were purchased from ATCC (ATCC® CRL-9609™, Molsheim, France). LHC-9 medium, fetal bovine serum, sodium bicarbonate and trypsin (0.05% trypsin – ethylenediamine-tetra-acetic acid (EDTA)) were provided by Gibco (Fisher Scientific Bioblock, Illkirch, France). Phosphate-Buffered Saline (PBS) comes from PAN-biotech

(Germany). Dimethylsulfoxide (DMSO) for cell culture, 5,12-naphthacenequinone (purity: 97%), benzo[*a*]pyrene (purity: greater than 96%), 9,10-anthraquinone (purity: 97%) and 6*H*-benzo[*cd*]pyrene-6-one (purity: 99%) were purchased from Sigma Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). CellTiter 96[®] AQUEOUS One Solution reagent and CellTox Green Cytotoxicity Assay reagent were purchased from Promega (Charbonnières-les-Bains, France). 7,12-benzo[*a*]anthracenequinone and 1,2-naphthoquinone (purity: 90%) were provided from TRC (Toronto, Canada). Alfa Aesar (Schiltigheim, France) provided *N,N*-dimethylformamide (DMF) and 7*H*-benz[*de*]anthracen-7-one (purity: 99%). 11*H*-benzo[*b*]fluoren-11-one (purity: greater than 98%) was purchased from TCI (Paris, France).

Table 1. List of the 7 selected molecules

Name	Structure	Log P	Abbreviation
1,2-naphthoquinone		1.47	1,2-NphQ
7,12-benz[<i>a</i>]anthracenequinone		3.62	BAQ
6 <i>H</i> -benzo[<i>cd</i>]pyren-6-one		4.54	BPO
7 <i>H</i> -benz[<i>de</i>]anthracen-7-one		4.05	BANTone
5,12-naphthacenequinone		3.62	NCQ
9,10-anthraquinone		2.46	9,10-AQ
11 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>]fluoren-11-one		4.05	B[<i>b</i>]FO

Cell cycle kit, FlowCheck Pro beads and FlowSet Pro beads used used for flow cytometry analysis and calibration were provided by Beckman Coulter (Villepinte, France). The IncuCyte[®]

caspase-3/7 Green Apoptosis Assay Reagent was provided by Sartorius (Hertfordshire, United Kingdom).

Cell culture. These cells were grown as adherent cultures in 12- or 96-well plates (Eppendorf) using LHC-9 medium (supplemented with fetal bovine serum [Gibco, 15 mL/500 mL medium] and sodium bicarbonate [Gibco, 33 mM]). They were plate at 7000 cells/well (40% of confluence in 96-well format) or 60,000 cells/ well (40% of confluence in 12-well format) and placed in a humidified 5% CO₂ incubator at 37°C.

Cell proliferation assay (MTS assay). BEAS-2B cells were plated as described above and allowed to stabilize during 24h. Then, medium was aspirated and replaced by another one containing the different oxy-PAHs during 24h. For each molecule, a decreasing range of concentrations was selected carefully (according to molecules and their solubility, a wide range of concentrations was first selected (1 µM to 600 µM according to solubility) then refined according to the results obtained). Negative control corresponded to non-exposed cells. Treatment medium was removed and replaced by fresh LHC-9 medium and plates were incubated again during 24 hours. Cell viability was determined by the use of Promega's CellTiter 96® AQUEOUS One Solution reagent composed of a tetrazolium compound [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS] and an electron coupling reagent (phenazine ethosulfate; PES). Assay is performed by adding 50 µL of the reagent directly to culture wells, incubating for 2 hours and then recording absorbance at 490 nm with a 96-well plate reader (FLUOstar OPTIMA, BMG LABTECH, Champigny sur marne, France). The amount of formazan produced by dehydrogenase enzymes is directly proportional to the number of living cells in culture. Each experiment was realized in triplicate to obtain an average and a standard deviation. Results are expressed as the ratio between the proportion of viable cells in the well and the negative control (cells exposed only to the vehicle)

Kinetic measurement of cytotoxicity. BEAS-2B cells were seeded in a 96-well format at 7000 cell/well in media. Cells were cultured at 37°C with 5% of CO₂ and monitored using an IncuCyte® S3 (Essen BioScience). BaP (1 µM) was used as positive control and negative control corresponded to non-exposed cells. CellTox™ Green Cytotoxicity Assay reagent (Promega) was added the next day following treatment and baseline images were taken using 10x objective. The plate was scanned and fluorescent and phase-contrast images were acquired in real time

every 1 hour from 2 separate regions per well. The CellTox™ Green reagent labels dead cells yielding green fluorescence. The live-cell phase contrast images were used to calculate confluence using the IncuCyte® software, and to provide morphology information. Each experiment was done in triplicate and images were taken at three different places in the well in order to obtain an average and a standard deviation. Accumulation of CellTox™ Green over time was normalized to confluence of cells.

Kinetic quantification of caspase-3/7 mediated apoptosis using live-cell time-lapse imaging (IncuCyte® technology). Caspase-3/7 activity was assessed using the IncuCyte® caspase-3/7 Green Apoptosis Assay Reagent (Sartorius, Aubagne, France) as described previously (Artymovich and Appledorn 2015). To assess apoptosis, BEAS-2B cells were cultured in 96-well plates format (7000 cells/well) and monitored in the IncuCyte® S3 acquiring images (objective x 10) every 1 hour in 2 separate regions per well after exposure to oxy-PAHs. The live-cell phase contrast images were used to calculate confluence using the IncuCyte® software, and to provide morphology information. BaP (1 µM) was used as positive control and negative control corresponded to non-exposed cells. Each experiment was done in triplicate and accumulation of caspase 3/7 over time was normalized to confluence of cells.

Exposure and staining of BEAS-2B cells for Flow Cytometry. Cells were plated in a 12-well plate at 60,000 cells/well and allowed to stabilize during 24 hours. Like other assays, BaP (1 µM) was used as positive control and negative control corresponded to non-exposed cells. Then, medium was aspirated and replaced by the other one containing the different oxy-PAHs for 24h. For each molecule, 2 concentrations were selected according to results obtained for CellTox™ Green Assay and Caspase assay (corresponding to the NOAEL and LOAEL, table 2). These cells were treated during 24 hours. After treatment, cells in suspension were collected. Adherent cells were treated with trypsin and harvested. All cells were washed with 1X PBS and centrifuged 5min at 2800g. PBS was removed and 500 µL of Cell Cycle Kit (Beckman Coulter) was added to cells and incubated during 20min at room temperature and kept away from light. After incubation, each samples were analyzed thanks to a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter). The excitation light of this cytometer was produced by a Blue, a Red and a Violet laser. FlowCheck Pro beads were used to check optical alignment and fluid dynamics and FlowSet Pro beads were used for the sensitivity of the cytometer. Data were collected thanks to Gallios software (Beckman Coulter) and analyzed thanks to Kaluza software (Beckman Coulter). After

excitation with Blue laser (488 nm), red fluorescence emitted by Propidium Iodide (contained in Cell Cycle Kit) is collected on a specific channel, called "FL3" (620 nm). An area "singulet" was defined on the histogram area versus maximal DNA content in order to exclude cell doublets of the analysis. The DNA content was analyzed on monoparametric histogram FL3 lin.

Ames assay. A commercial kit with Rat liver subcellular fractions S9 containing many drug-metabolizing enzymes was purchased from Xenometrics® (Ames MPF™ Penta I, Allschwil, Switzerland) and used as recommended by the manufacturer. 5 stains were provided: TA98, TA100, TA1535 and TA1537 for *Salmonella Thyphimurium* and EC uvrA PKM Y07 for *Escherichia Coli* (*E. Coli*). TA98 and TA1537 are used to reveal frameshifts mutations. TA100, TA1535 and *E. Coli* strains are used for base-pair substitution mutations. Contrary to TA1535 and TA1537, TA98 and TA100 possess R factor plasmid pKM101 that makes these strains more responsive to a variety of molecules. A pre-screening was realized in order to determine oxy-PAH concentrations that were used in the mutagenicity assay. The higher chosen concentration was that for which no precipitation and no cytotoxicity (evaluated by the turbidity of the well) were observed (OCDE 1997). The concentration range was prepared by successive dilutions at ½ log of this higher concentration in 96-well plate. Then, bacteria were exposed to the 6 concentrations of each oxy-PAHs in 24-well plate, as well as positive control (specific for each stains with or without metabolic activation: 2-nitrofluorene, 4-nitroquinoline N-oxide, N⁴-aminocytidine, 9-aminoacridine, 2-aminoanthracene, 2-aminofluorene) and negative control in the presence or not of metabolic activation (rat liver extract called S9 mix). This exposure was performed during 90min (except for *E. Coli* with activation: 20min) in medium containing sufficient histidine or tryptophan to support approximately 2 cell divisions cycles. At 90min, pH indicator medium lacking histidine or tryptophan was added and each culture was transferred in 384 well-plate. These plates were incubated at 37°C during 2 days. For each concentration, the number of well containing revertant colonies were counted in the 48 wells associated to each dose and was compared to negative control. Each dose was done in triplicate for statistical analysis of the data. This assay, realized in microplate, has many advantages in comparison with the traditional Ames assay on agarose (Flückiger-Isler *et al.* 2004; Kamber *et al.* 2009). This version gives a high sensitivity, a better efficiency for a low consumption of chemicals. Moreover, the use of microplate limits error prone during counting of revertants.

Statistical analysis of Ames results. In order to estimate mutagenicity potential, the induction ratio, corresponding to the ratio of induced vs spontaneous revertants, was used (Kim and Margolin 1999). This ratio was calculated between the highest mean of induced revertants and the mean of spontaneous revertants (table 3). Data were analyzed using 3 different statistical tests: (i) The first one was the classical “two-fold only” rule (Ames 1979; Claxton *et al.* 1987). A little adaptation was realized by the provider to obtain “two-fold + relative standard deviation (RSD)” model. (ii) The second one was an intergroup comparison based on the non-parametric Mann-Whitney test. It allows to determine the possible existence of a statistically significant difference between mutagenicity of a compound at one concentration compared to those of reference. Analysis was realized using statistical software R and *p*-value was fixed to 5%. Minimum concentrations for which mutagenicity measurement is significant are presented in table 4. (iii) The last one correspond to Margolin test which consists to appreciate a dose-response effect (*p*-value was also fixed to 5%, Margolin, Kaplan, and Zeiger 1981) by the use of equation 1 on R software.

$$P_D = \{ 1 - \exp [-H_M(D)] \} \exp [-H_T(D)] \quad \text{Equation 1}$$

This test was developed with the aim to complement the lack of flexibility observed with the Poisson model. The Margolin test could reflect internal variability among a set a replicate plates on a specific laboratory, technician, strain or any other influencing factors (Margolin, Kaplan, and Zeiger 1981).

Responses were considered as mutagenic when significant results were obtained from at least one of the three tests.

3. Results

Cytotoxicity

Evaluation of the cytotoxicity of the 7 priority oxy-PAHs on the BEAS-2B cells was first realized by MTS assay (Figure 1). Selection of concentrations of exposure was determined by the solubility limit of the selected oxy-PAH (table 2). A wide range of concentrations was first adopted then refined according to the preliminary results of cytotoxicity. After 24 hours of exposure, most molecules gave dose-response curve except for BPO and BANTone. Then, it was possible to determine different concentrations of exposure.

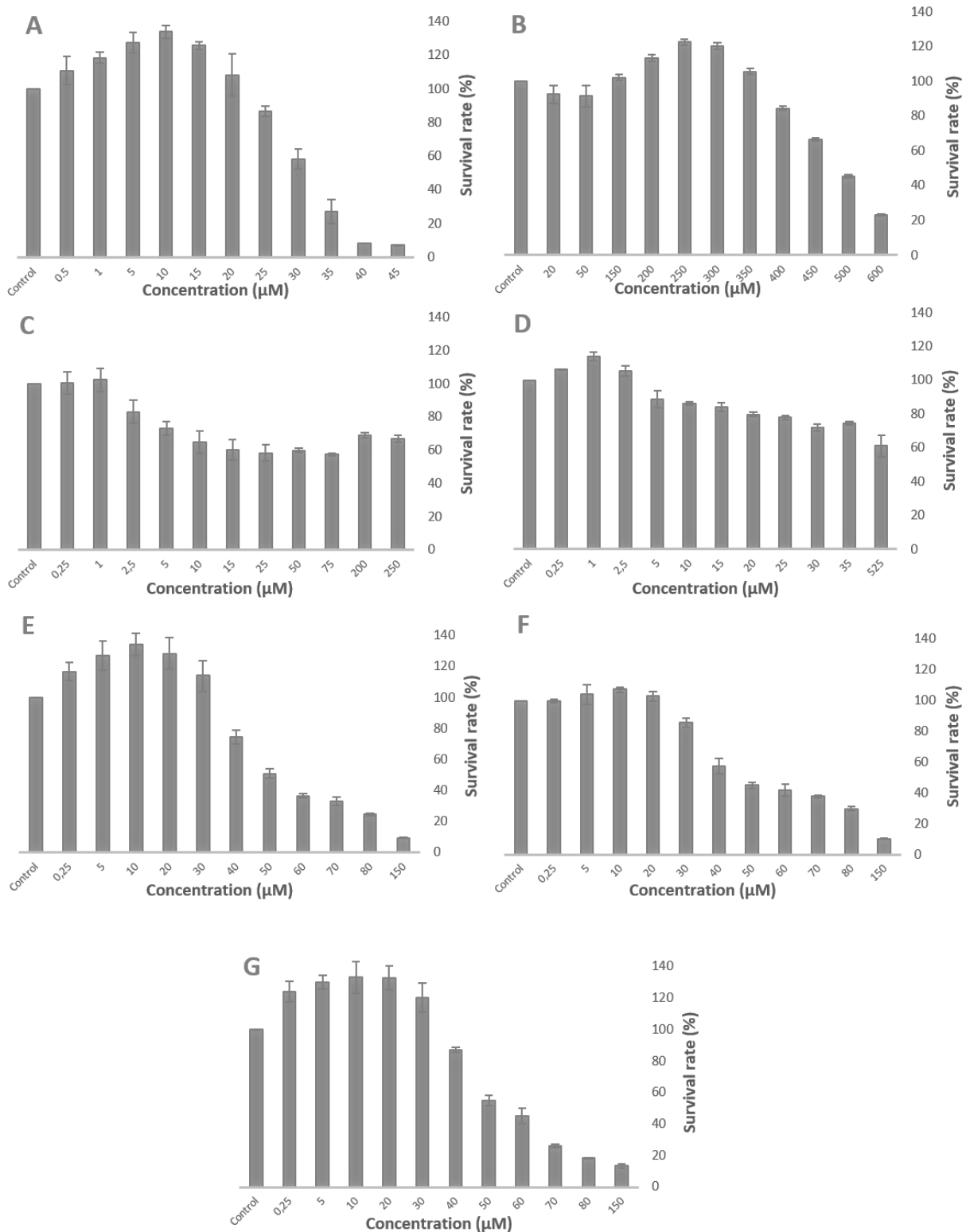


Figure 1. BEAS-2B cell proliferation assay after exposure of 24 hours to micromolar concentrations of oxy-PAHs. **A.** 1,2-NphQ; **B.** BAQ; **C.** BPO; **D.** BANTone; **E.** NCQ; **F.** 9,10-AQ and **G.** B[b]FO. Proliferation experiment was performed 24 hours after exposure and cell survival was determined by MTS assay. The percentage of survival was calculated as a ratio of $A_{490\text{nm}}$ of oxy-PAHs-treated cells and control cells related to 100%. Results show are the mean \pm SD for triplicate samples at each treatment.

The table 2 regroups concentrations corresponding to inhibition of 10, 25 and 50% of cellular growth (IC_{10} , IC_{25} and IC_{50}) determined thanks to figure 1. Due to the over-estimation of cytotoxicity linked to the MTS assay itself (explained in part 4), CellTox™ Green assay was realized on each oxy-PAHs. This assay allowed to obtained kinetics of cellular death and gave also information concerning the evolution of cell confluence during exposure and recovery periods (part C, figure 2). Different results were obtained according to oxy-PAH: (i) cell death were obtained for BAQ (at 25, 20 and 10 μ M) and BPO (at 25 and 10 μ M) (ii) for 1,2-NphQ, exposure did not lead to cell death but resulted in a slowdown of cellular development by a progressive increasing of cell confluence depending on molecular concentration. (iii) for 9,10-AQ, no cellular death was observed but confluence increases faster than BEAS-2B reference. This behavior was explained by a morphological change corresponding to cell elongation after exposure. Concerning the other oxy-PAH, non-significant behavior was observed compared to control. B[b]FO gave surprising curves in relationship with the autofluorescence of this molecule, yielding to incorrect data. Thanks to these assays, it was possible to check the plausibility of concentrations determined for cytotoxic and mutagenic assays (table 2). Only BAQ concentrations were adjusted. These concentrations included IC_{10} , IC_{25} and one or two lower concentrations.

Table 2. Determination of exposure concentrations used for cytotoxic and mutagenic assays.

	MTS assay			Selected concentrations for cytotoxicity assays C1 / C2 / C3 / C4 (μ M)	Selected concentration for cell cycle C1 / C2 (μ M)
	IC_{10} (μ M)	IC_{25} (μ M)	IC_{50} (μ M)		
1,2-NphQ	20	25	30	25 / 20 / 10 / 1	25 / 20
BAQ	350	400	450	25 / 20 / 10 / 1	10 / 1
BPO	1	2.5	-	25 / 10 / 2.5 / 1	10 / 2.5
BANTone	5	20	-	20 / 10 / 5 / 1	20 / 10
NCQ	30	40	50	40 / 30 / 20 / 10	30 / 20
9,10-AQ	20	30	40	30 / 20 / 15 / 10	30 / 20
B[b]FO	30	40	50	40 / 30 / 20 / 10	30 / 20
BaP (ref)	-	-	-	1	-

These assay highlighted the variable ranges of concentrations obtained according to the oxy-PAHs. BPO and BANTone represented the most toxic compounds. In order to evaluate if cell death observed for BAQ and BPO corresponds to apoptosis or necrosis, a kinetic quantification of caspase-3/7 was realized. BEAS-2B cells were exposed during 24 hours to each oxy-PAH and fluorescence associated to active caspases-3 and -7 was measured as a function of time

(IncuCyte® caspase-3/7 Green Apoptosis Assay Reagent, part D, figure 2). It was concluded that cell death corresponds to apoptosis by a significant increasing of fluorescence observed on the different graphics.

Cell cycle

To explain the obtained results of BPO and BANTone, the second part of this study concerns the investigation of cell cycle by flow cytometry (part B, figure 2). Concerning BPO, a significant slowdown in the cell cycle was observed at G0-G1 (61.2% of cells in G0-G1 phase for BPO contrary to 52.9% of cells for the cell control). At 48 hours, the same behavior was observed (data not shown). Similarly, exposure to BANTone create a little slowdown in G0-G1 of the cell cycle at 24 hours (54.3% of cells in G0-G1 phase for BANTone contrary to 52.9% of cells for the cell control) and at 48 hours (data not shown). Regarding the other oxy-PAHs, different results were obtained: (i) a significant slowdown in G2-M phase was observed for 1,2-NphQ (29.9% of cells in G2-M phase for 1,2-NphQ contrary to 16.6% of cells for the cell control) (ii) a slowdown in G0-G1 for BAQ (56.4% of cells in G0-G1 phase for BAQ contrary to 52.9% of cells for the cell control) and a slowdown in G2-M for NCQ and 9,10-AQ (19.6% of cells in G2-M phase for NCQ and 23.0% for 9,10-AQ contrary to 16.6% of cells for the cell control) and (iii) concerning B[b]FO, no significant effect was observed.

Mutagenicity

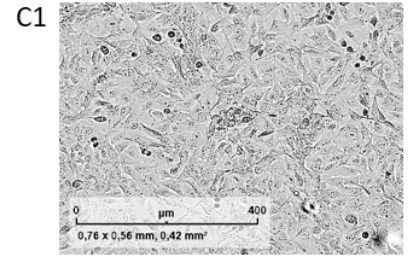
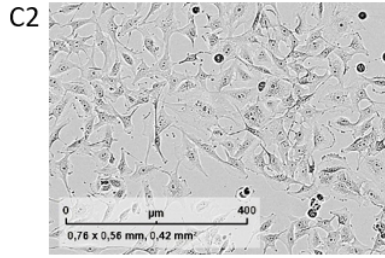
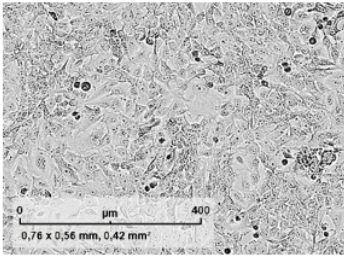
The last part of this study concerns the evaluation of the *in vitro* mutagenicity of the seven priority oxy-PAHs by the Ames assay on different strains of *Salmonella Thyphimurium* and *Escherichia Coli* (*E. Coli*) using a concentration range determined from the highest non cytotoxic concentrations. This assay was realized in microplate according to procedure provided by Xenometrics®, with and without additive S9 rat liver extract using as metabolic activator. For each dose tested, a triplicate was realized and all data were analyzed thanks to the three different statistical test (described in materials and methods parts) by the use of R software. In table 3, mutagenic responses were pooled according to the tester strain with or without metabolic activation with a significant threshold of 0.05. Responses were considered as mutagenic when significant results from the three different tests were found. Similarly, table 4 represent minimum concentration for which mutagenicity measurement is significant by the use of Mann-Whitney test.

Cell control

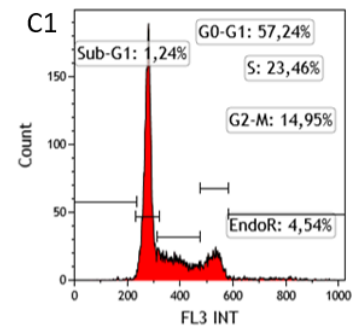
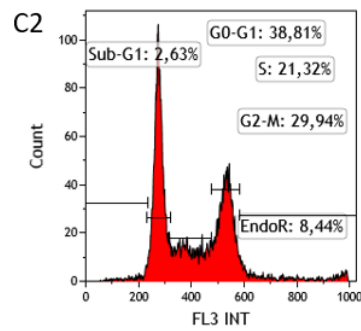
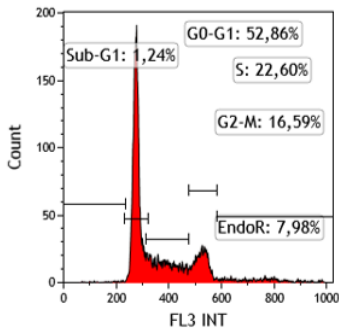
1,2-NphQ

BAQ

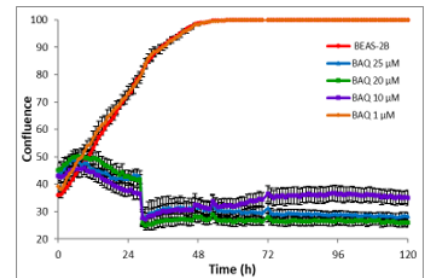
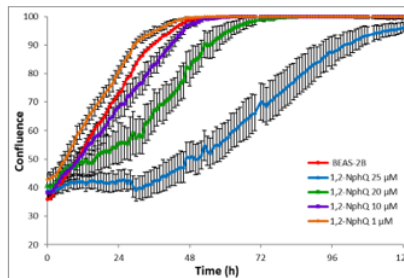
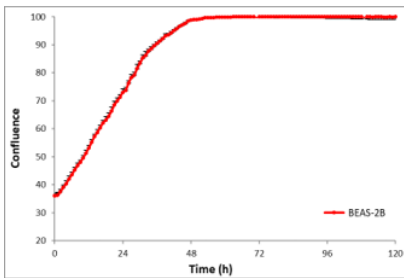
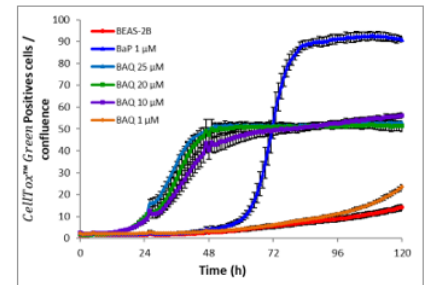
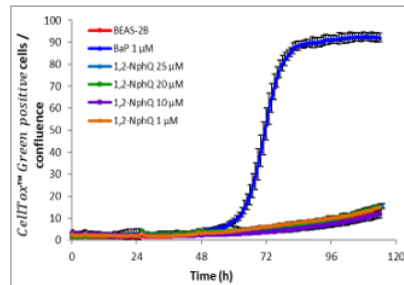
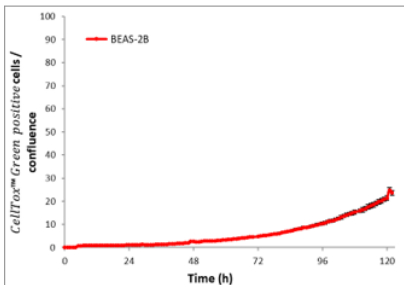
A Cell morphology (Microscopy, 24h)



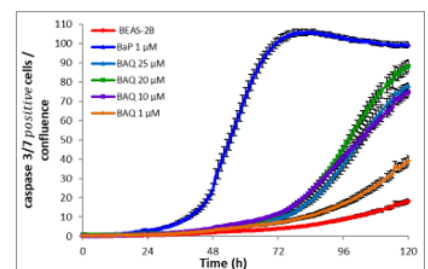
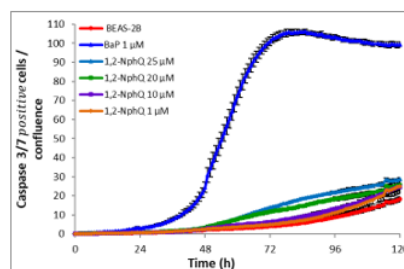
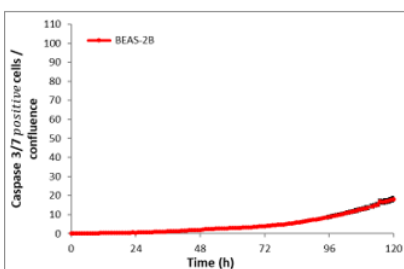
B Cell cycle (flow cytometry, 24h)



C Cytotoxicity (CellTox™ Green Assay)



D Apoptosis (caspase-3/7 assay)



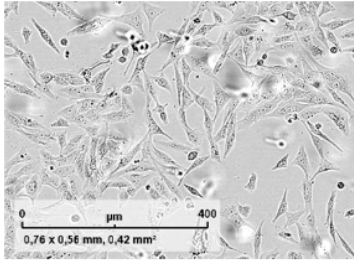
NCQ

BPO

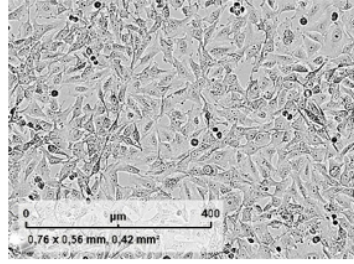
9,10-AQ

A Cell morphology (Microscopy, 24h)

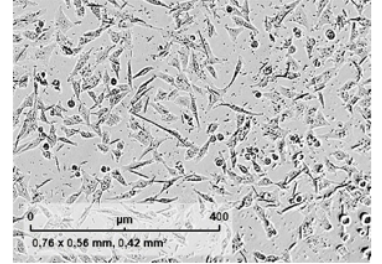
C1



C1

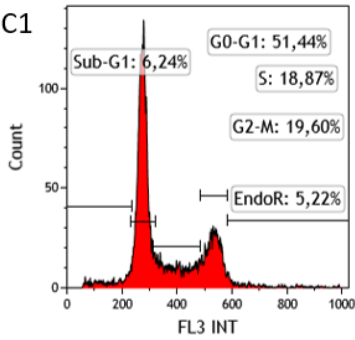


C1

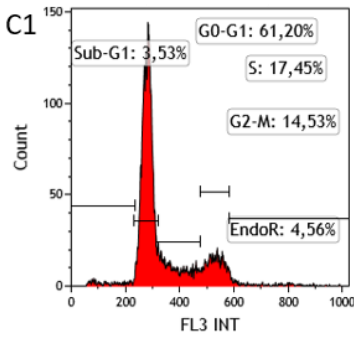


B Cell cycle (flow cytometry, 24h)

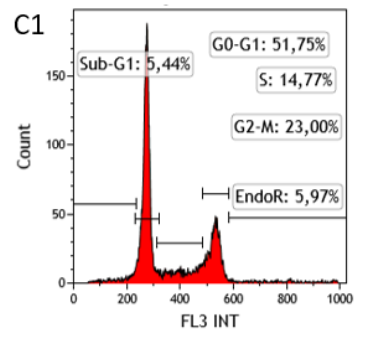
C1



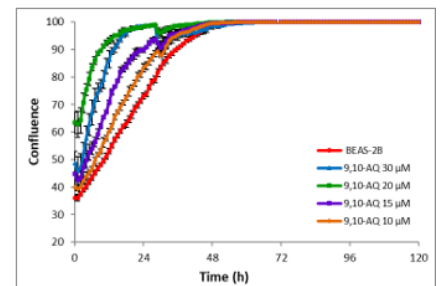
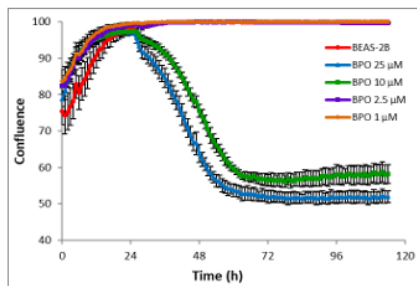
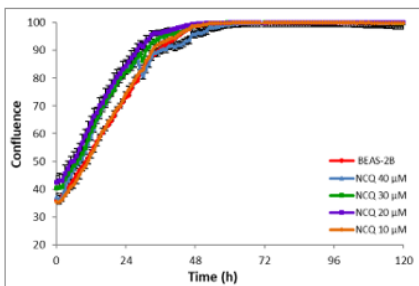
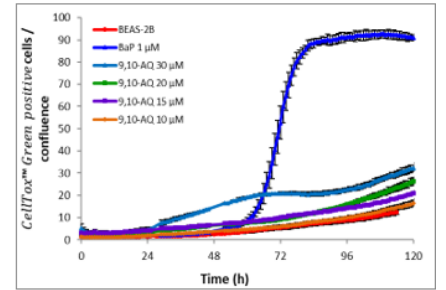
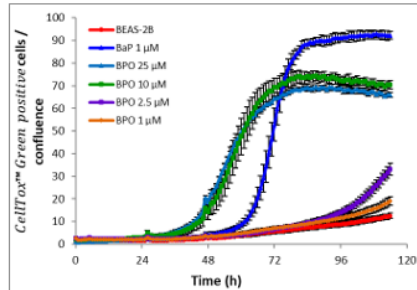
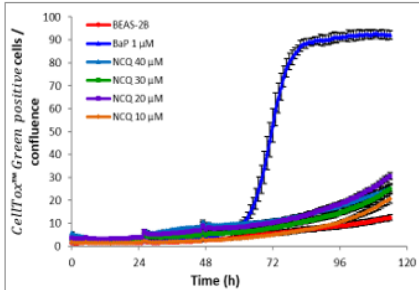
C1



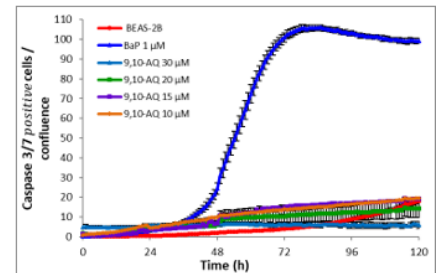
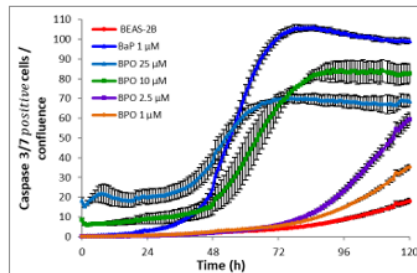
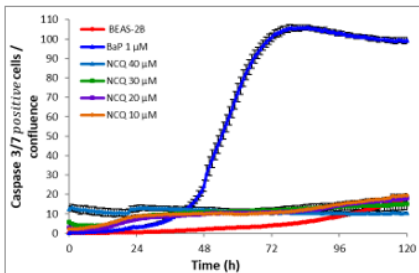
C1



C Cytotoxicity (CellTox™ Green Assay)



D Apoptosis (caspase-3/7 assay)



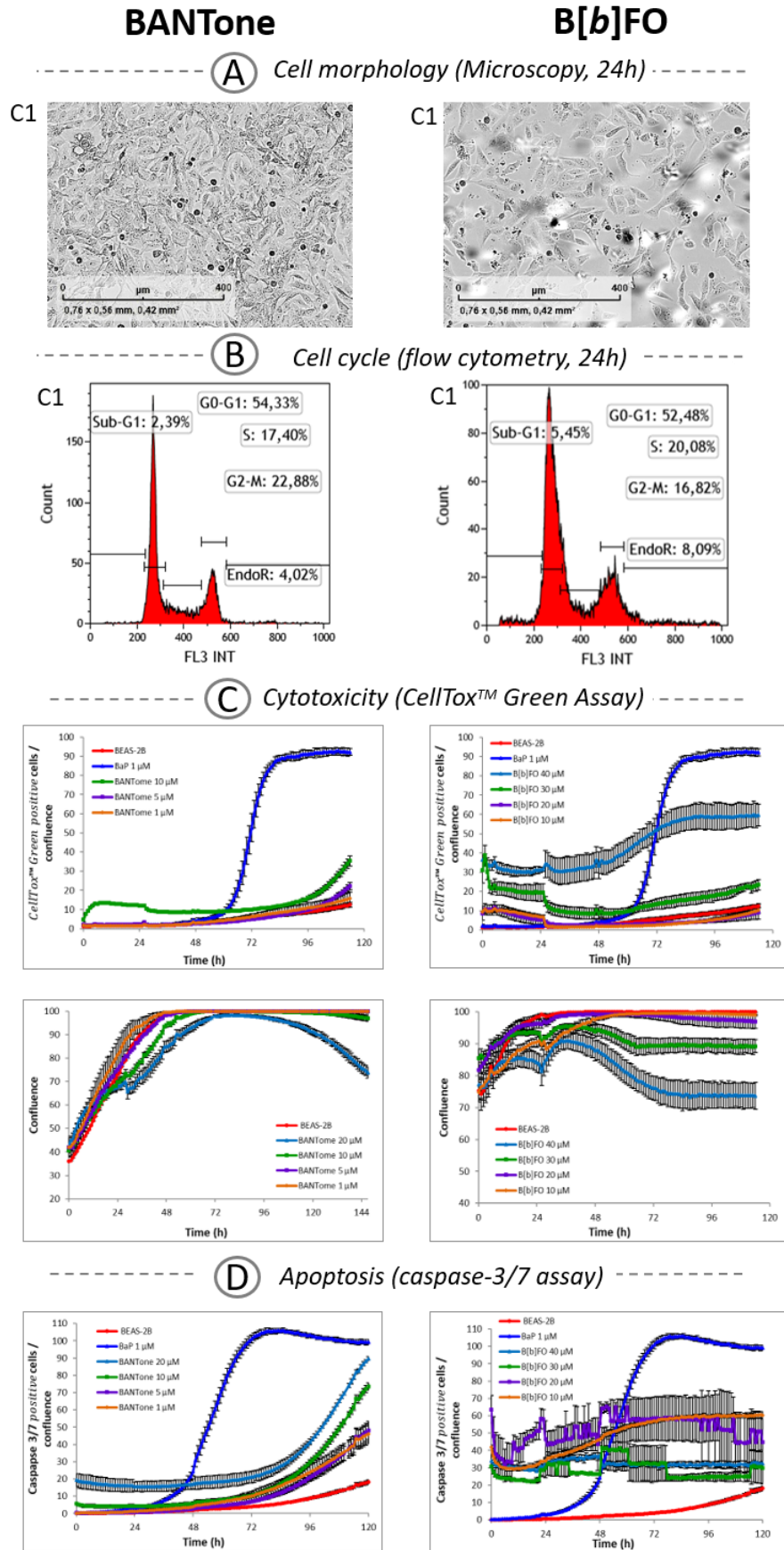


Figure 2. Investigation of the mechanism of cellular death on BEAS-2B cells exposed to oxy-PAHs. **A.** Cells observed I microscopy by IncuCyte® S3 acquiring images (objective x 10) at 24 hours of exposure. **B.** Analysis of the cell cycle at 24 hours of exposure. **C.** CellTox™ Green assay after exposure during 24 hours. The reagent was added after the exposure. The upper plot represents time after treatment as a function of green fluorescence. For the lower plot, time after treatment is represented as a function of confluence. **D.** Kinetic quantification of caspase-3/7 mediated apoptosis after exposure during 24 hours. The reagent was added after 24 hours of exposure.

As previous assays described above, different results were obtained. BAQ and 9,10-AQ were mutagenic without the addition of metabolic activation on TA100, TA1535 and *E. Coli* and on TA100, TA1535, TA1537 and *E. Coli* respectively. By contrast, 1,2-NphQ and BANTone gave mutagenic activity with and without metabolic activation on TA98 and TA100 for 1,2-NphQ and TA100 and TA1535 for BANTone. For NCQ and B[b]FO, mutagenic activity was obtained only in presence of metabolic activation on TA98 and TA100 for NCQ and TA98, TA100 and *E. Coli* for B[b]FO. Concerning the last molecule, BPO, mutagenic activity was observed for each tested strains, with and without metabolic activation.

4. Discussion

Genotoxicity and mutagenicity are relevant endpoints for cancer risk assessment, especially by contribution to uncover the mode of action of toxicants. Concerning unsubstituted PAHs, a lot of data are available about their toxicity *in vitro*, especially on cytotoxicity, genotoxicity or mutagenicity whether on PAHs fraction or on the individual 16 priority PAH (Sen *et al.* 2012; M. Huang, Blair, and Penning 2013). In regard to oxy-PAHs, which are considered as “dead-end” product of PAHs, such information are still lacking to date (Clergé *et al.* 2019). In the current study, *in vitro* cytotoxicity and mutagenicity were investigated for the 7 oxy-PAHs of different chemical structures (4 quinones and 3 α - β insaturated ketones) and compared with BaP.

Cytotoxicity

To investigate the effect of oxy-PAHs on the normal cell line from immortalized human bronchial epithelium (BEAS-2B cells), a cell proliferation assay, called MTS assay, was first realized (Figure 1). The BEAS-2B cell line was selected in a way to reproduce in the best conditions the interactions between lung epithelium and oxy-PAHs. Maximum passage number was fixed to 10 and medium was changed every 48 hours. Concerning the seven oxy-PAHs, except for BPO and BANTone, survival rate of BEAS-2B cells after exposure demonstrated a cytotoxic effect of oxy-PAHs by obtaining a dose-dependent inhibition of normal cell growth. In most cases (1,2-NphQ, BAQ, BANTone, NCQ and B[b]FO), an increase of the cell activity was observed at low concentrations before its diminution at higher doses.

Table 3. Mutagenicity measurements (maximum induction ratio) according to the oxy-PAHs of exposure (-S9 without S9 mix, +S9 with S9 mix)

Molecules	TA98		TA100		TA1535		TA1537		E. Coli	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
1,2-NphQ	1.2	3.5 ^c	1.7 ^{b,c}	1.6 ^{b,c}	1.4	1.0	1.0	1.0	0.9	0.8
BAQ	1.2	1.7	1.5 ^c	1.3	2.5 ^c	1.3	3.7	1.8	2.2 ^c	1.3
BPO	2.2	2.2	2.1	2.0	11.1 ^{b,c}	2.0 ^{a,c}	1.3	4.4 ^a	1.5	1.8 ^c
BANTone	1.8	2.3	2.1 ^c	2.3 ^c	3.7	2.0 ^{a,c}	2.0	1.2	1.3	2.0
NCQ	1.0	3.3 ^{b,c}	1.2	1.8 ^{b,c}	1.3	1.3	1.5	1.8	1.4	0.8
9,10-AQ	1.0	2.5	1.8 ^c	1.3	1.3 ^c	1.0	3.0 ^c	1.0	2.2 ^{a,c}	1.6
B[b]FO	1.8	2.7 ^{a,c}	1.5 ^b	1.6 ^c	0.9	2.0	0.7	1.0	3.9 ^{a,b,c}	1.9 ^c

^a statistically significant with "2xB+RSD"

^b statistically significant with Margolin test

^c statistically significant with Mann-Whitney test.

Table 4. Minimum concentration (expressed in µg/mL) for which mutagenicity measurement is significant by the use of Mann-Whitney test (-S9 without S9 mix, +S9 with S9 mix).

Molecules	TA98		TA100		TA1535		TA1537		E. Coli	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
1,2-NphQ	NS	1.96 [*]	0.64 [*]	6.24 [*]	NS	NS	NS	NS	NS	NS
BAQ	NS	NS	2.52 [*]	80.00 [*]	2.52 [*]	NS	NS	7.92 [*]	0.80 [*]	NS
BPO	3.28 [*]	0.33 [*]	0.01 [*]	0.33 [*]	0.01 [*]	0.33 [*]	NS	0.033 [*]	NS	0.33 [*]
BANTone	3.16 [*]	NS	0.003 [*]	3.16 [*]	0.32 [*]	0.08 [*]	NS	NS	NS	0.08 [*]
NCQ	NS	3.00 [*]	NS	3.00 [*]	NS	NS	NS	NS	NS	NS
9,10-AQ	NS	1.24 [*]	1.24 [*]	NS	3.96 [*]	NS	1.24 [*]	NS	0.40 [*]	NS
B[b]FO	17.64 [*]	5.57 [*]	NS	56.00 [*]	NS	0.099 [*]	NS	NS	5.57 [*]	5.57 [*]
Positive control	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*

*: p value <0.1

*: p value <0.05

NS: non-significant

To explain this phenomenon, two different hypotheses can be proposed:

- an artifact was created by the method itself: i) increasing of the mitochondrial activity in link with the mechanism of defense after exposure (Rai *et al.* 2018) (ii) induction of measured mitochondrial reductase without effect on cellular viability at low doses or (iii) the metabolic activation of quinones create an equilibrium between quinones and hydroxyl-PAHs which can interact with MTS compound directly and created over-estimation of cytotoxicity (Wang, Henning, and Heber 2010; Clergé *et al.* 2019).
- induction of proliferation at low dose, as frequently observed with BaP and PAHs mixtures containing oxy-PAHs (Du *et al.* 2006; Mattsson *et al.* 2009). Mechanism is supposed to be in relation with the dose-dependent increasing of the cyclin D1 protein, leading to an abnormal cell proliferation.

Concerning BPO and BANTone, the increase of exposure concentration did not result in a decrease of the cell viability but rather by appearance of a stability zone. This phenomenon can be explained by two different ways: (i) the limit of solubility in medium was reached for the higher concentrations (starting from 25 μM for BPO and from 20 μM for BANTone). After checking the bottom of each well, this hypothesis was excluded (ii) this stability zone could be due to a possible stop in the cell cycle resulting from DNA damages.

Due to the variability generated by MTS assay itself, CellTox™ Green assay was realized to reveal loss of membrane integrity associated to cell death (Figure 2, Part. C). Previous study demonstrated that exposure to polar fraction, which contain oxy-PAHs, caused induction of cell death (Pálková *et al.* 2015). This assay gave also information concerning cell confluence during exposure and recovery periods. Different behaviors were demonstrated according to the oxy-PAH: (i) Cellular death was clearly observed for BAQ and BPO. The readjusting of BAQ exposure concentrations coincide with the hypothesis of overestimation of the cytotoxicity generated by the MTS test; (ii) A different behavior was observed with cells exposed with 9,10-AQ. After exposure, confluence exceeded that of unexposed BEAS-2B cells (control): the morphological change observed by cell elongation after exposure could be the result of different cellular mechanisms. These two assay highlighted the variable ranges of concentrations obtained according to the oxy-PAHs. BPO and BANTone represented the most toxic compounds.

In order to evaluate if clear cell death observed for BAQ and BPO corresponds to apoptosis or necrosis, a kinetic quantification of caspase-3/7 was realized. Caspase plays an essential role in the initiation and the progression of apoptosis process (Alnemri 1997; Cryns and Yuan 1998). The obtained results indicated that BAQ and BPO induce apoptosis in BEAS-2B cells by the activation of caspase-3 and/or -7 (part D, figure 2). For all of the others molecules, mechanism of cellular death could be represented by necrosis, autophagy, ... Such difference in death induction observed between chemicals of the same family has already been described with amino-PAHs and nitro-PAHs on BEAS-2B cells (Ovrevik *et al.* 2010). Other studies on PAHs demonstrated the complexity of the apoptosis process because induction of apoptosis can be related to phosphorylation of pro-apoptotic proteins such as p53 and/or p38 mitogen activated protein kinase (Solhaug, Refsnes, and Holme 2004). These proteins are involved in maintaining of cells completeness.

Cell cycle

To better determine the effect of the different oxy-PAHs on BEAS-2B cells, cell cycle was analyzed by flow cytometry. As for cytotoxicity, previous study demonstrated that exposure to polar fraction, which contain oxy-PAHs, disrupted the cell cycle progression (Pálková *et al.* 2015). Concerning BPO, a significant slowdown in the cell cycle was observed at G0-G1. Associated to the observed apoptosis, this study allows to demonstrate that exposure to BPO could result in two different ways: (i) stop of cells development until DNA damages are repaired or (ii) elimination of persistent DNA damages by cellular death. This arrest in cell cycle has been described in several studies concerning PAH and oxy-PAH, especially by phosphorylation of the transcription factor p53 allowing cell cycle regulation (Reed *et al.* 2003; Henkler, Stolpmann, and Luch 2012; Heijink, Krajewska, and van Vugt 2013). In the same manner, exposure to BANTone did not lead to a stop in cell cycle but create a little slowdown in G0-G1 of the cell cycle. We observed only that cells had difficulties entering into cell cycle, thereby justifying the really slow decrease of cell viability. Concerning 1,2-NphQ, the cell cycle accumulation in G2-M associated to the significant slowdown in cell development followed by an incremental recovering of the cells density allowed to formulate the hypothesis that cells may be able to repair DNA damages formed after exposure. Different studies concerning repair of DNA damages (such as DNA adducts in BALB/c cells and CHO cells realized with BaP and its oxidative

derivatives) support this hypothesis by demonstrating the rapid repair of DNA adducts (Nakayama, Yuspa, and Poirier 1984; MacLeod *et al.* 1991).

Mutagenicity

The second part of this study concerned the evaluation of mutagenicity of the selected oxy-PAHs by the Ames assay. To determine the significant variations of the revertant number with the highest sensitivity, we analyzed the results thanks to different methods: (i) “two-fold rule” (i.e. ratio of induced vs spontaneous revertants ≥ 2), (ii) “two-fold rule + RSD”, (iii) Mann-Whitney test and (iv) Margolin test. The different results obtained are grouped in table 3 and 4. With the empirical “two-fold rule” and “two-fold rule + RSD”, several significant results were obtained. However, the use of these approaches has been questioned due to the large number of false negative (ref Cariellon 1996). Statistical analyses were thus carried out thanks to Mann-Whitney test (allowing the obtaining of a minimum concentration for which mutagenicity measurement is significant, table 4) and Margolin test (allow to appreciate a dose-response effect). A significant mutagenic activity was observed for BAQ and 9,10-AQ without the addition of mammalian enzymatic activation. These results confirmed those obtained previously for 9,10 AQ on TA98, TA1537 and TA1538 without metabolic activation (Lieberman *et al.* 1982). Concerning BAQ, the parent compound benz[*a*]anthracene gave also a positive mutagenic response on TA100 but with metabolic activation (IARC 1983). These results showed that (i) BAQ and 9,10-AQ don’t need mammalian enzymatic activation to be mutagenic (ii) that BAQ is one of the final products behind mutagenicity of benzo[*a*]anthracene and (iii) that this exposure created base-pair substitution mutations (TA100, TA1535 and *E. Coli* strains). These results are in accordance with mutagenicity mechanism proposed for numerous quinones and α,β -unsaturated ketones leading to consider particular mutagenic and carcinogenic structural alerts (Eder *et al.* 1993; Plošnik, Vračko, and Sollner Dolenc 2016; Penning 2017). At least two main mechanisms are proposed. The relative importance depended on the particular chemical, as demonstrated by comparison of the mutagenicity of 12 benzoquinone derivatives (Hakura *et al.* 1995):

(i) The first mechanisms correspond to the redox-cycling of unsaturated carbonyl compounds that conducts to the conversion of quinones into mutagen semiquinones by a one electron reduction step catalyzed by NADPH-P450 reductase. This pathway produced different reactive oxygen species (ROS), among them superoxide anion, hydroxyl radical or

H₂O₂. Specific oxidative DNA damage like 8-oxo-2'-deoxyguanosine and base propenals have been associated to ROS and can conduct in mutational effect detected in the Ames assay, in particular in TA102, TA104 and *E. Coli* strains that are especially sensitive to oxidative damage (Patrinely, Clifford, and Ioannides 1996).

(ii) The second proposed mode of mutagenic action is related to covalent modification of DNA with the formation of stable bulky adducts. Quinones and α,β -unsaturated ketones are Michael acceptors and can react with nucleophiles by 1,4 or 1,6 Michael addition. Such stable and unstable adducts were observed *in vitro* on ketones (Manso *et al.* 2011), on *ortho*-quinone (Huang, Blair, and Penning 2013; Yao *et al.* 2016; Matsui *et al.* 2019) and on *para*-quinone (Schmied-Tobies, Paschke, and Reemtsma 2016). Interestingly, DNA adducts were mostly formed with 2'-deoxyguanosine and contributed significantly to substitution and frameshift mutations on G:C sequences that are detected by several salmonella strains (TA98, TA100, TA1535 or TA1537) in the Ames assay (Hakura *et al.* 1995). Associated to all these observations, high molecular weight quinones, especially *ortho*-quinones, may probably induce DNA strand breaks by intercalating the DNA molecule thanks to their particular planar structures (Penning 2017).

1,2-NphQ, BPO and BANTone were mutagenic with and without metabolic activation. As for BAQ and 9,10-AQ, metabolic activation was probably not necessary required for the obtaining of mutagenic activity for these oxy-PAHs. Previous studies on these two molecules confirmed these results (Moller, Hagen, and Ramdahl 1985; Bolton *et al.* 2000). Concerning 1,2-NphQ, several studies demonstrated the formation of DNA adducts with 2'-deoxyguanosine and guanosine through a non-enzymatic pathway (Saeed *et al.* 2007; Matsui *et al.* 2019). With metabolic activation, concentrations for detectable mutagenicity were greater than those without activation, particularly in TA100. The lower observed mutagenicity with the S9 fraction could be explained by presence of high level of glutathione and glutathione-S-transferase included in the additive mixture used as metabolic activator (Summer, GöggeImann, and Greim 1980). It has been demonstrated that glutathione conjugation is a crucial step in the mutagenic impact of PAH and oxygenated metabolites and can act as efficient detoxifying pathway (Romert *et al.* 1989). Similarly, previous studies on the metabolism of naphthalene have shown that this PAH is mainly metabolized by the cytochrome P450 to the reactive epoxide, naphthalene-1,2-oxide, which is converted into 1,2-NphQ, 1,4-NphQ and into S-glutathione conjugates by soluble glutathione S-transferase (Saeed *et al.* 2007; Pinho *et al.* 2012; ANSES

2013). Conjugation of 1,2-NphQ and BANTone with glutathione mediated by the S9 fraction could represent an important detoxification mechanism which may decrease the mutagenicity of these direct mutagens (Summer, Göggelmann, and Greim 1980). Moreover, the addition of S9 fraction is considered as another potential detoxifying pathway by the action of the NAD(P)H:quinone reductase. These enzyme allow to generate hydroquinones derivatives which are generally less mutagenic than the related quinones or semiquinones (Dinkova-Kostova and Talalay 2000).

A different behavior was obtained for the two last molecules, ie. NCQ and B[b]FO. Mutagenicity was only obtained in the presence of enzymatic activation in TA98 and TA100 for NCQ and TA98, TA100 and *E. Coli* for B[b]FO. Associated to previous results on naphtacene (parent compound of NCQ, Gibson, Smart, and Smith 1978), these results suggested that these oxy-PAHs were not final products which led to mutagenic activity. The addition of rat-liver S9 fraction and associated enzyme cocktail caused the formation of unidentified products which are probably not or poorly inactivated by glutathione conjugation and other detoxifying pathways and are at the origin of mutagenicity. Chesis *et al.* demonstrated that different quinones were mutagenic on TA104 strain by the way of an enzymatic one electron reduction catalyzed by cytochrome P450 reductase (Chesis *et al.* 1984). This metabolic pathway generates ROS at the origin of mutagenicity. This mutagenicity completes the non-significant mutagenicity obtained for B[b]FO by the team of Moller (Moller, Hagen, and Ramdahl 1985).

5. Conclusion

PAHs and derivatives are pollutants of special concern in regard to the large variety of compounds, their abundance in the environment and their potential toxicity for human and living organisms. To better evaluate the associated risks, especially those associated to chronic exposure, large toxicological data are necessary. This study demonstrates the cytotoxic and mutagenic risk of oxy-PAH family. Seven representative oxy-PAH were selected on the basis of their occurrence in the environment and their genotoxic/mutagenic potency. Apoptosis by activation of caspase-3 and -7 was demonstrated for two molecules, BAQ and BPO. Concerning mutagenicity, different results were obtained according to the molecule of interest. In a conventional way, almost all DNA-reactive carcinogens require *in-vivo* enzymatic activation to be chemically reactive species. However, some oxy-PAHs proved to be direct mutagens and did not require activation to become mutagenic. All these results demonstrated that oxy-PAHs

compounds are problematic. To evaluate the impact of these compounds on Human health, it is crucial to develop specific biomarkers of exposure and/or risk, such as DNA adducts.

Acknowledgment

Authors would like to thank Dr. Carla Delépée for her profound insight into the linguistic part of present work and Antoine Géry for his precious help in drawing figures. Adeline Clergé is grateful to the French Ministry of Education and Research for her Ph.D. fellowship.

REFERENCES

Alnemri, E. S. 1997. "Mammalian Cell Death Proteases: A Family of Highly Conserved Aspartate Specific Cysteine Proteases." *Journal of Cellular Biochemistry* 64 (1): 33–42.

Ames, B.N. 1979. *Identifying Environmental Chemicals Causing Mutations and Cancer*. Vol. 204. <https://doi.org/10.1126/science.373122>.

ANSES. 2013. "Valeur toxicologique de référence par inhalation pour le naphthalène - Avis de l'Anses. Rapport d'expertise collective." Édition scientifique. <https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2009sa0345Ra.pdf>.

Artymovich, K., and D. M. Appledorn. 2015. "A Multiplexed Method for Kinetic Measurements of Apoptosis and Proliferation Using Live-Content Imaging." *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 1219: 35–42. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1661-0_4.

Bolton, J. L., M. A. Trush, T. M. Penning, G. Dryhurst, and T. J. Monks. 2000. "Role of Quinones in Toxicology." *Chemical Research in Toxicology* 13 (3): 135–60. <https://doi.org/10.1021/tx9902082>.

Boobis, A. R., G. P. Daston, R. J. Preston, and S. S. Olin. 2009. "Application of Key Events Analysis to Chemical Carcinogens and Noncarcinogens." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49 (8): 690–707. <https://doi.org/10.1080/10408390903098673>.

Chesis, P. L., D. E. Levin, M. T. Smith, L. Ernster, and B. N. Ames. 1984. "Mutagenicity of Quinones: Pathways of Metabolic Activation and Detoxification." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81 (6): 1696–1700. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.6.1696>.

Claxton, L. D., J. Allen, A. Auletta, K. Mortelmans, E. Nestmann, and E. Zeiger. 1987. "Guide for the Salmonella Typhimurium/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity." *Mutation Research/Genetic Toxicology* 189 (2): 83–91. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(87\)90014-0](https://doi.org/10.1016/0165-1218(87)90014-0).

Clergé, A., J. Le Goff, C. Lopez, J. Ledauphin, and R. Delépée. 2019. "Oxy-PAHs: Occurrence in the Environment and Potential Genotoxic/Mutagenic Risk Assessment for Human Health." *Critical Reviews in Toxicology* 49 (September). <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408444.2019.1605333>.

Cryns, V., and J. Yuan. 1998. "Proteases to Die for." *Genes & Development* 12 (11): 1551–70. <https://doi.org/10.1101/gad.12.11.1551>.

Dinkova-Kostova, A. T., and P. Talalay. 2000. "Persuasive Evidence That Quinone Reductase Type 1 (DT Diaphorase) Protects Cells against the Toxicity of Electrophiles and Reactive Forms of Oxygen." *Free Radical Biology & Medicine* 29 (3–4): 231–40. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00300-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00300-2).

Du, H. J., N. Tang, B. C. Liu, B. R. You, F. H. Shen, M. Ye, A. Gao, and C. S. Huang. 2006. "Benzo[a]pyrene-Induced Cell Cycle Progression Is through ERKs/Cyclin D1 Pathway and Requires the Activation of JNKs and p38 Mapk in Human Diploid Lung Fibroblasts." *Molecular and Cellular Biochemistry* 287 (1–2): 79–89. <https://doi.org/10.1007/s11010-005-9073-7>.

Eder, E., S. Scheckenbach, C. Deininger, and C. Huffman. 1993. "The Possible Role of A, β -Unsaturated Carbonyl Compounds in Mutagenesis and Carcinogenesis." *Toxicology Letters* 67 (1): 87–103. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(93\)90048-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(93)90048-3).

Finlayson-Pitts, B., and J.N. Pitts. 2000. "Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Derivatives: Atmospheric Chemistry and Toxicological Implications." *Chemistry of the Upper and Lower Atmosphere*, January, 436–546.

Flückiger-Isler, S., M. Baumeister, K. Braun, V. Gervais, N. Hasler-Nguyen, R. Reimann, J. Van Gompel, H.-G. Wunderlich, and G. Engelhardt. 2004. "Assessment of the Performance of the Ames II Assay: A Collaborative Study with 19 Coded Compounds." *Mutation Research* 558 (1–2): 181–97. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.12.001>.

Gibson, T. L., V. B. Smart, and L. L. Smith. 1978. "Non-Enzymic Activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons as Mutagens." *Mutation Research* 49 (2): 153–61.

Hakura, A., H. Mochida, Y. Tsutsui, and K. Yamatsu. 1995. "Mutagenicity of Benzoquinones for Ames Salmonella Tester Strains." *Mutation Research* 347 (1): 37–43. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(95\)90031-4](https://doi.org/10.1016/0165-7992(95)90031-4).

Hartwell, L. H., and M. B. Kastan. 1994. "Cell Cycle Control and Cancer." *Science* 266 (5192): 1821–28. <https://doi.org/10.1126/science.7997877>.

Heijink, A. M., M. Krajewska, and M. A. T. M. van Vugt. 2013. "The DNA Damage Response during Mitosis." *Mutation Research* 750 (1–2): 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2013.07.003>.

Henkler, F., K. Stolpmann, and A. Luch. 2012. "Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Bulky DNA Adducts and Cellular Responses." *Experientia Supplementum* (2012) 101: 107–31. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_5.

Huang, M., I. A. Blair, and T. M. Penning. 2013. "Identification of Stable Benzo[a]pyrene-7,8-Dione-DNA Adducts in Human Lung Cells." *Chemical Research in Toxicology* 26 (5): 685–92. <https://doi.org/10.1021/tx300476m>.

IARC. 1983. "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data, Volume 32." <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono32.pdf>.

Kamber, M., S. Flückiger-Isler, G. Engelhardt, R. Jaeckh, and E. Zeiger. 2009. "Comparison of the Ames II and Traditional Ames Test Responses with Respect to Mutagenicity, Strain Specificities, Need for Metabolism and Correlation with Rodent Carcinogenicity." *Mutagenesis* 24 (4): 359–66. <https://doi.org/10.1093/mutage/geb017>.

Kim, B. S., and B. H. Margolin. 1999. "Statistical Methods for the Ames Salmonella Assay: A Review." *Mutation Research* 436 (1): 113–22.

Lieberman, D. F., R. Fink, F. L. Schäfer, R. Mulcahy, and A. A. Stark. 1982. "Mutagenicity of Anthraquinone and Hydroxylated Anthraquinones in the Ames/Salmonella Microsome System." *Applied and Environmental Microbiology* 43 (6): 1354–59.

Loomis, D., Y. Grosse, B. Lauby-Secretan, F. El Ghissassi, V. Bouvard, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, et al. 2013. "The Carcinogenicity of Outdoor Air Pollution." *The Lancet. Oncology* 14 (13): 1262–63.

MacLeod, M. C., A. Daylong, G. Adair, and R. M. Humphrey. 1991. "Differences in the Rate of DNA Adduct Removal and the Efficiency of Mutagenesis for Two Benzo[a]pyrene Diol Epoxides in CHO Cells." *Mutation Research/Genetic Toxicology* 261 (4): 267–79. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(91\)90042-K](https://doi.org/10.1016/0165-1218(91)90042-K).

Manso, J. A., I. F. C. Camacho, E. Calle, and J. Casado. 2011. "Alkylating Potential of α,β -Unsaturated Compounds." *Organic & Biomolecular Chemistry* 9 (18): 6226–33. <https://doi.org/10.1039/c1ob05298e>.

Margolin, B. H., N. Kaplan, and E. Zeiger. 1981. "Statistical Analysis of the Ames Salmonella/Microsome Test." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (6): 3779–83.

Matsui, T., N. Yamada, H. Kuno, and R. A. Kanaly. 2019. "Formation of Bulky DNA Adducts by Non-Enzymatic Production of 1,2-Naphthoquinone-Epoxide from 1,2-Naphthoquinone under Physiological Conditions." *Chemical Research in Toxicology*, August. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00088>.

Mattsson, Å., B. Jernström, I. A. Cotgreave, and E. Bajak. 2009. "H2AX Phosphorylation in A549 Cells Induced by the Bulky and Stable DNA Adducts of Benzo[a]pyrene and Dibenzo[a,l]pyrene Diol Epoxides." *Chemico-Biological Interactions* 177 (1): 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.09.015>.

Moller, M., I. Hagen, and T. Ramdahl. 1985. "Mutagenicity of Polycyclic Aromatic Compounds (PAC) Identified in Source Emissions and Ambient Air." *Mutation Research* 157 (August): 149–56. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(85\)90110-7](https://doi.org/10.1016/0165-1218(85)90110-7).

Nakayama, J., S. H. Yuspa, and M. C. Poirier. 1984. "Benzo(a)pyrene-DNA Adduct Formation and Removal in Mouse Epidermis in Vivo and in Vitro: Relationship of DNA Binding to Initiation of Skin Carcinogenesis." *Cancer Research* 44 (9): 4087–95.

OCDE. 1997. "Essai N° 471: Essai de Mutation Réverse Sur Des Bactéries, Lignes Directrices de l'OCDE Pour Les Essais de Produits Chimiques." Éditions OCDE, Paris Section 4. <https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264071254-fr>.

Ovrevik, J., V. M. Arlt, E. Oya, E. Nagy, S. Mollerup, D. H. Phillips, M. Låg, and J. A. Holme. 2010. "Differential Effects of Nitro-PAHs and Amino-PAHs on Cytokine and Chemokine Responses in Human Bronchial Epithelial BEAS-2B Cells." *Toxicology and Applied Pharmacology* 242 (3): 270–80. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.10.017>.

Pálková, L., J. Vondráček, L. Trilecová, M. Ciganek, K. Pěnčíková, J. Neča, A. Milcová, J. Topinka, and M. Machala. 2015. "The Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated and Genotoxic Effects of Fractionated Extract of Standard Reference Diesel Exhaust Particle Material in Pulmonary, Liver and Prostate Cells." *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 29 (3): 438–48. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.12.002>.

Patrineli, A., M. N. Clifford, and C. Ioannides. 1996. "Contribution of Phenols, Quinones and Reactive Oxygen Species to the Mutagenicity of White Grape Juice in the Ames Test." *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 34 (9): 869–72. [https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(96\)00048-8](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(96)00048-8).

Penning, T. M. 2017. "Genotoxicity of Ortho-Quinones: Reactive Oxygen Species versus Covalent Modification." *Toxicology Research* 6 (6): 740–54. <https://doi.org/10.1039/c7tx00223h>.

Pinho, B., C. Sousa, J. Oliveira, P. Valentão, and P. Andrade. 2012. "Naphthoquinones' Biological Activities and Toxicological Effects." *Bioactive Compounds: Types, Biological Activities and Health Effects*, March, 181–218.

Plošnik, A., M. Vračko, and M. Sollner Dolenc. 2016. "Mutagenic and Carcinogenic Structural Alerts and Their Mechanisms of Action." *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju* 67 (3): 169–82. <https://doi.org/10.1515/aiht-2016-67-2801>.

Rai, Y., R. Pathak, N. Kumari, D. K. Sah, S. Pandey, N. Kalra, R. Soni, B. S. Dwarakanath, and A. N. Bhatt. 2018. "Mitochondrial Biogenesis and Metabolic Hyperactivation Limits the Application of MTT Assay in the

Estimation of Radiation Induced Growth Inhibition.” *Scientific Reports* 8 (1): 1531. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19930-w>.

Reed, M., M. Monske, F. Lauer, S. Meserole, J. Born, and S. Burchiel. 2003. “Benzo[a]pyrene Diones Are Produced by Photochemical and Enzymatic Oxidation and Induce Concentration-Dependent Decreases in the Proliferative State of Human Pulmonary Epithelial Cells.” *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 66 (13): 1189–1205. <https://doi.org/10.1080/15287390306409>.

Romert, L., L. Dock, D. Jensen, and B. Jernström. 1989. “Effects of Glutathione Transferase Activity on Benzo[a]pyrene 7,8-Dihydrodiol Metabolism and Mutagenesis Studied in a Mammalian Cell Co-Cultivation Assay.” *Carcinogenesis* 10 (9): 1701–7. <https://doi.org/10.1093/carcin/10.9.1701>.

Saeed, M., S. Higginbotham, E. Rogan, and E. Cavalieri. 2007. “Formation of Depurinating N3adenine and N7guanine Adducts after Reaction of 1,2-Naphthoquinone or Enzyme-Activated 1,2-Dihydroxynaphthalene with DNA. Implications for the Mechanism of Tumor Initiation by Naphthalene.” *Chemico-Biological Interactions* 165 (3): 175–88. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.12.007>.

Schmied-Tobies, M. I. H., H. Paschke, and T. Reemtsma. 2016. “Combined Chemoassay and Mass Spectrometric Approach to Study the Reactive Potential of Electrophiles towards Deoxynucleosides as Model for DNA.” *Chemosphere* 151 (May): 263–70. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.052>.

Sen, S., P. Bhojnarwala, L. Francey, D. Lu, T. M. Penning, and J. Field. 2012. “p53 Mutagenesis by Benzo[a]pyrene Derived Radical Cations.” *Chemical Research in Toxicology* 25 (10): 2117–26. <https://doi.org/10.1021/tx300201p>.

Solhaug, A., M. Refsnes, and J. A. Holme. 2004. “Role of Cell Signalling Involved in Induction of Apoptosis by Benzo[a]pyrene and Cyclopenta[c,d]pyrene in Hepa1c1c7 Cells.” *Journal of Cellular Biochemistry* 93 (6): 1143–54. <https://doi.org/10.1002/jcb.20251>.

Straif, K., A. Cohen, and J. Samet. 2013. IARC Scientific Publication. *Air Pollution and Cancer*. 161. <http://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Scientific-Publications/Air-Pollution-And-Cancer-2013>.

Summer, K. H., W. Göggelmann, and H. Greim. 1980. “Glutathione and Glutathione S-Transferases in the Salmonella Mammalian-Microsome Mutagenicity Test.” *Mutation Research* 70 (3): 269–78.

Umbuzeiro, G. A., A. Franco, M. H. Martins, F. Kummrow, L. Carvalho, H. H. Schmeiser, J. Leykauf, M. Stiborova, and L. D. Claxton. 2008. “Mutagenicity and DNA Adduct Formation of PAH, Nitro-PAH, and Oxy-PAH Fractions of Atmospheric Particulate Matter from São Paulo, Brazil.” *Mutation Research* 652 (1): 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.12.007>.

US EPA. 2002. "U.S. Environmental Protection Agency. Third External Review Draft of Air Quality Criteria for Particulate Matter, Vol. 1. Research Triangle Park, NC: Office of Research and Development, EPA 600/P-99/002aC."

Wang, P., S. M. Henning, and David Heber. 2010. "Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols." PloS One 5 (4): e10202. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010202>.

Yao, C., W. G. Foster, J. C. Sadeu, S. Siddique, J. Zhu, and Y. L. Feng. 2016. "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, September. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.122>.

Annexes

Table A. Exposure concentration of Ames assay

	TA98 -S9	TA98 +S9	TA100 -S9	TA100 +S9	TA1535 -S9	TA1535 +S9	TA1537 -S9	TA1537 +S9	E. Coli -S9	E. Coli +S9
1,2NphQ	0,64 - 200 µg/mL									
BAQ	0,24 - 80 µg/mL									
BPO	0,01 - 3,275 µg/mL									
BANTone	0,003 - 10 µg/mL									
NCQ	0,08 - 24 µg/mL									
9,10-AQ	0,12 - 40 µg/mL									
B[b]FO	0,031 - 56 µg/mL									
Positive control	2-NF 2 µg/mL	2-AA 0,5 µg/mL	4-NQO 0,1 µg/mL	2-AA 1,25 µg/mL	N ⁴ -ACT 100 µg/mL	2-AA 2,5 µg/mL	9-AAc 15 µg/mL	2-AA 2,5 µg/mL	4-NQO 4 µG/mL	2-AF 400 µg/mL

IV. Discussion et conclusions

Au cours des années, bon nombre d'études ont démontré une corrélation entre la pollution de l'air et les effets néfastes sur la santé. Bien qu'ils soient très présents dans l'environnement et que des premières études démontrent leur toxicité, les oxy-HAP demeurent bien souvent absents des études environnementales et toxicologiques. Notre

travail montre, pour la première fois, le caractère cytotoxique et mutagène des 7 oxy-HAP prioritaires.

Selon l'oxy-HAP d'intérêt, différents effets ont été observés. Ils se sont avérés soit temporaires, soit définitifs :

- L'exposition au BAQ et au BPO résultait en une mort cellulaire par apoptose suite à un ralentissement ou à un arrêt dans le cycle cellulaire associé à l'activation des caspase-3 et -7.

- L'exposition à la 1,2-NphQ, quant à elle, ne résultait pas en une mort cellulaire mais entraînait un ralentissement du développement cellulaire. Une analyse du cycle cellulaire a permis de mettre en évidence un blocage en phase G2-M. Comme démontré auparavant (Nakayama, Yuspa, and Poirier 1984; MacLeod *et al.* 1991), ce blocage pourrait permettre à la cellule d'entrer dans des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN, à l'origine de la reprise progressive de l'augmentation de la confluence cellulaire.

- Concernant les quatre autres oxy-HAP (BANTone, 9,10-AQ, NCQ et B[b]FO) aucun effet significatif n'est observé après l'exposition. Seul un faible blocage observé en phase G0-G1 pourrait être à l'origine de mécanismes de réparation masquant ainsi les effets de l'exposition à ces molécules.

Comme observé pour les amino-HAP et les nitro-HAP (Ovrevik *et al.* 2010), la cytotoxicité d'un composé n'est pas représentative d'une famille. La toxicité dépend du composé étudié et du mécanisme d'action qui lui est propre. Concernant le caractère mutagène, différents résultats ont été observés :

- Mutagènes sans activation métabolique (mutagènes directs) : BAQ et 9,10-AQ
- Mutagènes en présence et en absence d'activation : 1,2-NphQ, BPO et BANTone
- Mutagènes seulement en présence d'une activation (mutagènes indirects) : NCQ B[b]FO.

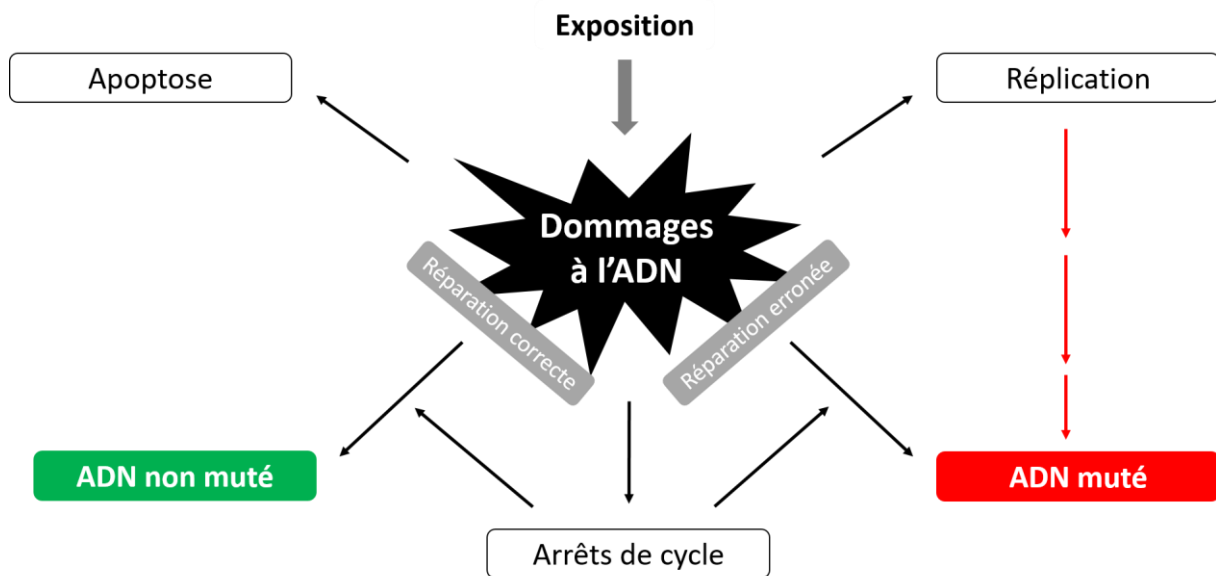


Figure 17. Conséquences biologiques des dommages à l'ADN.

Cette étude permet de démontrer que tous les oxy-HAP ne sont pas des composés mutagènes directs et que certains nécessitent une activation métabolique à l'origine du caractère mutagène observé.

Tous ces résultats démontrent bien que l'exposition aux oxy-HAP peut avoir des conséquences biologiques irréversibles. Comme démontré dans la Figure 17, ce caractère cytotoxique et mutagène observé après exposition semble être la conséquence biologique des lésions à l'ADN. Il est donc nécessaire de pouvoir mesurer ces lésions à l'ADN qui, comme démontré dans le concept du MoA, représente une étape clé du processus de cancérogénèse.

Par conséquent, le chapitre suivant sera consacré à la formation et à la détection d'un type de dommages à l'ADN : les adduits.

CHAPITRE 3.

Formation et identification d'adduits à l'ADN aux oxy-HAP dans le cadre de l'évaluation du risque génotoxique.

CHAPITRE 3

Formation et identification d'adduits à l'ADN aux oxy-HAP dans le cadre de l'évaluation du risque génotoxique.

Comme démontré dans les chapitres précédents, la mesure précise de l'exposition des populations aux contaminants de l'environnement est un point crucial dans l'évaluation du risque. Afin de prévenir l'apparition d'effets délétères ou de maladies chez l'homme, le développement de biomarqueurs pertinents, tels que les adduits, s'est avéré nécessaire. Pour être efficace, le biomarqueur doit être en lien direct avec l'exposition et/ou avec la pathologie étudiée. Différentes études *in vivo* sur de l'épiderme de souris ont montré la relation entre la formation des adduits, la survenue de mutations et le développement de cancers (Miller 1951; Brookes and Lawley 1964). Chez la souris, l'équipe de Nesnow a démontré que l'exposition *in vivo* à différents HAP par voie intrapéritonéale, dont le BaP, aboutissait en la formation d'adénomes pulmonaires de façon dose dépendante (Nesnow *et al.* 1995). Associé à cela, des adduits à l'ADN ont été détectés de manière spécifique dans les tissus pulmonaires par post-marquage au phosphore 32. Pour le BaP, ces adduits étaient majoritairement détectés sur la guanine. La structure et l'emplacement de ces adduits au sein de la séquence d'ADN peut avoir une implication dans la capacité d'induction de mutations. Pour les HAP, 50% des mutations détectées dans le proto-oncogène *Ki-ras* correspondant à des transversions impliquant à nouveau la guanine (GGT>TGT, Ross and Nesnow 1999). La formation de l'adduit pourrait être à l'origine d'une erreur dans le processus de réparation dont la conséquence serait l'apparition d'une mutation pouvant initier le développement du processus tumoral.

De manière à appliquer cette démarche aux oxy-HAP, la première étape correspond à la détection puis à l'identification d'adduits à l'ADN. Cependant, très peu d'études traitent de la formation des adduits avec les oxy-HAP (McCoull *et al.* 1999; Saeed *et al.* 2007; Matsui *et al.* 2019). Ce chapitre sera consacré à l'étude des adduits à

l'ADN formés avec les oxy-HAP prioritaires : quels en sont les mécanismes de formations possibles et quelles méthodes permettent leur détection.

I. Principales méthodes de détections des dommages à l'ADN

De nombreuses techniques peuvent être utilisées pour détecter les adduits à l'ADN. Leur principale caractéristique est de présenter une grande sensibilité afin de pouvoir détecter les adduits à l'état de trace (un adduit pour 10^6 à 10^{10} nucléotides normaux). Cependant, bon nombre de techniques privilégient la sensibilité au détriment de la spécificité de détection. Les méthodes les plus couramment utilisées pour détecter les adduits seront regroupées dans cette partie, sans pour autant en réaliser une liste exhaustive.

II.1. Le test des comètes

Le test des comètes est une méthode couramment utilisées dans la détection des cassures de l'ADN induites par des agents génotoxiques. Cette méthode permet aussi de détecter de manière indirecte les processus de réparation des dommages à l'ADN ou la fragmentation de l'ADN liée à l'apoptose. Elle correspond à une technique d'électrophorèse dans laquelle un champ électrophorétique permettra la migration de l'ADN sur gel d'agarose (Cotelle and Féraud 1999; Frenzilli, Nigro, and Lyons 2009). En présence d'un ADN non endommagé, une sphère compacte sera observée au microscope. Si l'ADN a subi des lésions, les fragments simples et doubles brins migreront en dehors de cette sphère formant ainsi un « halo » d'ADN décrit comme la queue de la comète. La quantification de l'ADN présent dans cette queue permet de mesurer la quantité d'ADN endommagé.

Plusieurs études ont été réalisées sur différents modèles cellulaires (vers marins, moules, souris) exposés aux HAP, dont le BaP (De Boeck and Kirsch-Volders 1997; Sasaki *et al.* 2000; Large *et al.* 2002; Dhawan, Bajpayee, and Parmar 2009; Kienzler *et al.* 2012; Langan *et al.* 2018; Pannetier *et al.* 2018). Les auteurs ont démontré qu'une exposition à différentes concentrations induisait une augmentation statistiquement significative des ruptures simple brin et/ou double brin de l'ADN détectées par le test des

comètes. Une étude récente a évalué l'effet génotoxique des oxy-HAP *in vitro* (cellules HBEC et HepG2) et *in vivo* (embryons du zebrafish, McCarrick *et al.* 2019). Tous les oxy-HAP testés individuellement (dont trois appartiennent à la liste des oxy-HAP prioritaires : BPO, BAQ et BANTone) ou sous la dénomination de « fraction des oxy-HAP » ont induit des ruptures de l'ADN de manière dose-dépendante. De plus, ces effets génotoxiques sont du même ordre de grandeur ou supérieurs à ceux observés pour le BaP. Ces résultats démontrent bien que les oxy-HAP contribuent de manière significative au potentiel carcinogène des mélanges de HAP contenus dans l'environnement.

Le test des comètes est une technique sensible permettant la mise en évidence de nombreux dommages à l'ADN. Cependant, cette méthode n'est pas spécifique. Elle permet la détection de cassures de l'ADN et de lésions instables à pH alcalin pouvant avoir des origines différentes (Collins 2004; Dhawan, Bajpayee, and Parmar 2009). Les lésions plus spécifiques comme les adduits à l'ADN ou les lésions oxydatives ne pourront pas être mesurées par la version alcaline. L'utilisation d'une enzyme spécifique entraînant leur conversion en une cassure permettrait leur détection.

II.2. Les méthodes immunologiques

Ces méthodes permettent une détection par la reconnaissance d'un anticorps par un antigène. Les tests de type ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*) et immunohistochimiques sont les plus souvent utilisées pour la quantification des adduits à l'ADN (Hsu *et al.* 1981; Santella 1999). De nombreux anticorps sont disponibles. Ils peuvent être spécifiques de l'exposition aux HAP et plus précisément des adduits d'oxydation ou d'alkylation (Farmer and Shuker 1999). Selon les conditions expérimentales, la sensibilité reste faible par rapport aux autres méthodes et peut atteindre 1 à 4 adduits pour 10^8 nucléosides normaux (Poirier and Weston 1996).

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* portent sur la détection et l'identification par des méthodes immunochimiques d'adduits spécifiques entre l'ADN et les HAP. *In vitro*, l'identification d'adduits au BPDE a été réalisée sur des kératinocytes de souris ainsi que sur des globules blancs humains (Poirier *et al.* 1982; Santella *et al.* 1985; van Schooten *et al.* 1991). *In vivo*, les différentes études ont permis de quantifier la formation

d'adduits à l'ADN chez des sujets fumeurs, non-fumeurs, exposés aux HAP professionnellement ou par le biais de l'environnement (Motykiewicz *et al.* 1995, 1998; Mancini *et al.* 1999; Romano *et al.* 1999; Borska *et al.* 2014). Cette détection *in vivo* permettrait de réaliser un biomonitoring de l'exposition au HAP.

Ces méthodes possèdent l'avantage d'être facilement mises en œuvre, d'être répétables et peu coûteuses. Elles permettent aussi de localiser les adduits au niveau tissulaire. Cette détection est réalisée sur des cellules fixées ou sur des sections tissulaires congelées ou fixées dans la paraffine. Cependant, elles nécessitent de grandes quantités d'ADN (de quelques μg à quelques centaines de μg d'ADN), ce qui peut représenter un facteur limitant. De plus, les méthodes immunologiques présentent une faible spécificité dû à la réactivité croisée observée sur les adduits à l'ADN mais aussi sur les composés non adduits. Il a été démontrés que des anticorps dirigés contre les adduits du BPDE présentaient une grande réactivité envers des adduits diol-époxydes formés avec d'autres HAP (Van Schooten *et al.* 1987; Koc and Swenberg 2002). Jusqu'à ce jour, aucune étude impliquant l'utilisation d'une méthode immunologique ne porte sur les oxy-HAP.

II.3. Phosphorylation des histones H2AX

Une autre méthode d'évaluation de la réponse aux dommages à l'ADN correspond à la phosphorylation des histones H2AX. L'histone H2A est l'un des cinq types de protéines histones formant le nucléosome à l'origine de la structure de la chromatine des cellules eucaryotes. Une variante de l'histone H2A correspond à l'histone H2AX possédant une extension C-terminale utilisée dans les processus de réparation de l'ADN. L'histone H2AX est un facteur important dans le processus de sauvegarde de la stabilité génomique (Kopp, Khoury, and Audebert 2019). Il a été démontré que suite à l'exposition à un composé toxique puis à la formation de rupture double brins, l'histone H2AX subit une phosphorylation de la sérine 139 située sur l'extrémité C-terminale, dénommée γ -H2AX (Rogakou *et al.* 1998; Fernandez-Capetillo *et al.* 2004). Cette phosphorylation permet la formation de foci dans la chromatine, favorisant ainsi la réparation des dommages à l'ADN.

Plusieurs méthodes permettent la mesure de la phosphorylation des histones H2AX :

- L'immunohistochimie permet l'étude des dommages à l'ADN sur cellules isolées ou sur tissus par la mesure de l'interaction antigène - anticorps (Zenzes *et al.* 1999). La détection se fait par immunofluorescence à l'aide d'un logiciel.

- Le Western blot, comme l'immunohistochimie, permet d'évaluer l'interaction antigène – anticorps. Sa détection s'effectue de manière différente. Après séparation des protéines sur gel d'électrophorèse, elles sont transférées sur une membrane (nitrocellulose ou polyfluorure de vinylidène) qui sera ensuite exposée aux anticorps d'intérêts, eux-mêmes associés à une enzyme émettant un signal photométrique ou colorimétrique. Enfin, une quantification est réalisée à l'aide d'un logiciel.

Ces différentes techniques ont été utilisées pour mesurer la phosphorylation des histones H2AX suite à l'exposition aux HAP (Shimohara, Sawai, and Yagi 2008; Audebert *et al.* 2010; Yu *et al.* 2019). Similairement, Mattsson *et al.* ont démontré que l'exposition de cellules épithéliales humaines de carcinome de poumon (cellules A549) à deux métabolites diol-époxyde de HAP entraînait la formation d'adduits à l'ADN résultant en une augmentation de la phosphorylation des γ -H2AX et de la formation de foci dans la chromatine (Mattsson *et al.* 2009).

II.4. Le post-marquage au phosphore 32

Cette méthode a été décrite pour la première fois en 1981 par Randerath, Reddy et Gupta (Randerath, Reddy, and Gupta 1981). Elle se compose de 5 à 6 étapes successives : extraction de l'ADN – hydrolyse en nucléosides 3'phosphate - enrichissement en adduits - marquage radioactif des adduits au phosphore 32 - séparation par chromatographie multidirectionnelle sur couche mince - quantification des adduits par comptage de la radioactivité (Gupta 1985; Reddy and Randerath 1986; Watson 1987; Laws *et al.* 1994; Pfau *et al.* 1994; G. Keith and Dirheimer 1995; Godschalk *et al.* 1998). Toute ces étapes sont regroupées dans la Figure 18.

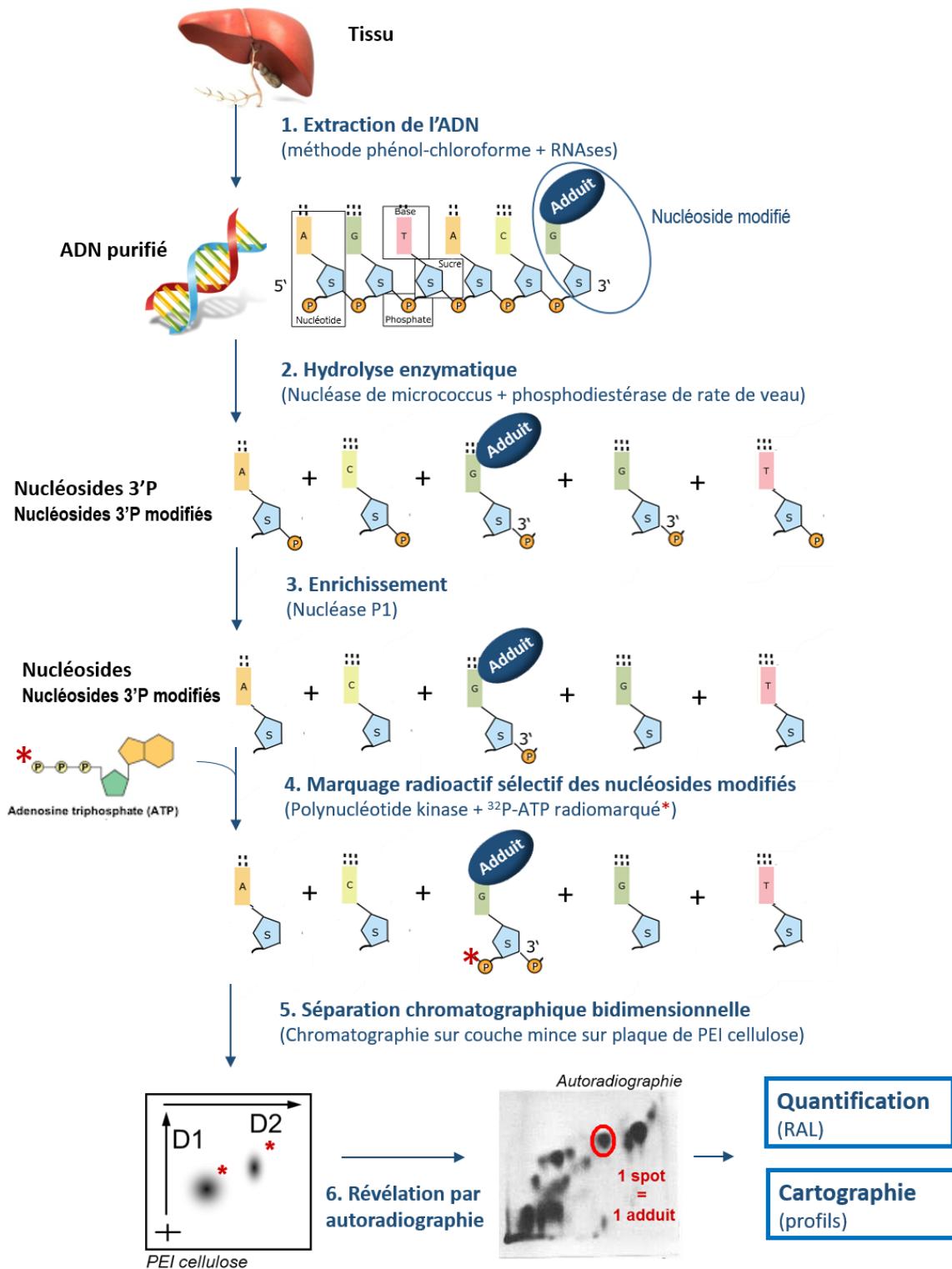


Figure 18. Etapes de la technique du post-marquage au phosphore 32.

Au cours des dernières années, le post-marquage a été l'une des techniques les plus utilisées dans l'étude des adduits à l'ADN, notamment avec les HAP (Szyfter *et al.* 1994; van Delft *et al.* 2001; Teixeira *et al.* 2002; Le Goff *et al.* 2006; Taioli *et al.* 2007; Umbuzeiro *et al.* 2008; Topinka *et al.* 2009; Wilson *et al.* 2011). Contrairement aux HAP,

aucune étude ne porte sur l'évaluation par post-marquage de la formation d'adduits entre les oxy-HAP pris individuellement et l'ADN. Une première étude, réalisée par Umbuzeiro *et al.*, a permis de montrer la formation d'adduits dans la fraction des oxy-HAP, démontrant ainsi le manque de données concernant cette classe (Umbuzeiro *et al.* 2008).

Cette méthode s'est avérée très sensible pour la faible quantité d'ADN nécessaire (entre 1 et 10 microgrammes). Elle permet de détecter jusqu'à un adduit pour 10^{10} nucléosides normaux. Cependant, cette technique ne donne aucune information structurale. Des standards d'adduits peuvent être utilisés mais la résolution de la chromatographie sur couche mince ne permet pas d'affirmer la structure (Koc and Swenberg 2002). De plus, des spots artéfactuels peuvent être observés en réponse à différents métabolites (ribonucléotides, impuretés, ...) (Gorelick 1993).

II.5. La chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse

Contrairement aux techniques évoquées précédemment, l'UHPLC-MS/MS permet d'obtenir une identification structurale. L'analyse des adduits à l'ADN est réalisée en trois à quatre étapes :

- Extraction de l'ADN (si nécessaire)
- Hydrolyse de l'ADN
- Enrichissement en adduits d'intérêt (extraction sur phase solide, séparation chromatographique, ...)
- Détection et quantification en chromatographie liquide ou gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Tretyakova, Villalta, and Kotapati 2013).

L'analyse en chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS) n'est compatible qu'avec les molécules volatiles. L'analyse des nucléosides modifiés nécessite une dérivation préliminaire (Saha *et al.* 1988). Cette approche d'analyse rend la procédure de préparation de l'échantillon plus complexe associée à une efficacité de dérivation incertaine des adduits à l'état de trace (Ravanat *et al.* 1995). La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse semble donc être la technique la plus facile à mettre en œuvre dans cette étude. Cette méthode permet la

séparation des composés en fonction de leur rapport masse sur charge et possède une sensibilité élevée de l'ordre de quelques adduits pour 10^8 nucléosides normaux (Koc and Swenberg 2002).

Il existe différents types de spectromètres et les principales caractéristiques dépendent de la source d'ionisation et de l'analyseur. Le couplage de la chromatographie liquide à la spectrométrie de masse en tandem possédant une source électrospray a été une avancée majeure dans l'analyse des adduits à l'ADN. Cette technique peut être utilisée pour détecter de nombreux adduits polaires qui, autrement, subirait une décomposition thermique en GC/MS (Turesky and Vouros 2004; Singh and Farmer 2006; S. Liu and Wang 2015). Elle a permis d'obtenir, par exemple, une limite de détection située à 20 amol d'adduits, soit 5 adduits pour 10^9 nucléosides normaux dans seulement 1,25 μg d'ADN (Randall *et al.* 2010).

De nombreux spectromètres de masse peuvent être utilisés pour l'analyse des adduits à l'ADN. Nous détaillerons uniquement les systèmes utilisés durant cette étude. Nos analyses ont été tout d'abord réalisées sur un spectromètre possédant une source d'ionisation de type électrospray et un analyseur de masse triple quadripolaire. La source électronébulisation est la principale source d'analyse des adduits. Elle permet d'ioniser les composés à pression atmosphérique à la sortie de la chromatographie liquide (partie A, Figure 19). Sous la pression d'un gaz de nébulisation (argon), l'échantillon va être vaporisé. Dans la chambre d'ionisation, l'application d'un champ électrique accompagné d'azote chaud va entraîner la désorption des ions par éclatement des gouttelettes (Bruins, Covey, and Henion 1987; Tretyakova, Villalta, and Kotapati 2013). Ce processus d'ionisation doux permettra de conserver les structures intactes avant l'entrée dans le premier quadripôle (Q1, partie B, Figure 19, Fenn *et al.* 1989). Un quadripôle est constitué de quatre électrodes parallèles de section hyperbolique ou cylindrique. Il est soumis à un champ électrique oscillant et à un champ électrique fixe qui se superpose au premier. Selon les conditions appliquées, seuls certains ions, appelés ions parents, peuvent traverser le quadripôle (Farmer and Singh 2008). Ces ions entreront dans le deuxième quadripôle (Q2), appelé cellule de collision, dans lequel l'utilisation d'un gaz inerte permettra la fragmentation des ions parents. Le dernier quadripôle (Q3) permet de sélectionner les ions fils obtenu après fragmentation (généralement $[M+H-116]^+$ associé

à la perte du deoxyribose, Wolf and Vouros 1994) . Enfin, un détecteur d'ion associé à un système de conversion permettra d'obtenir des spectres de masse. L'analyse MS/MS peut se faire selon différents modes. Le mode le plus utilisé au cours de cette étude est le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) permettant de sélectionner un ion parent et un ion fils selon leurs rapports m/z .

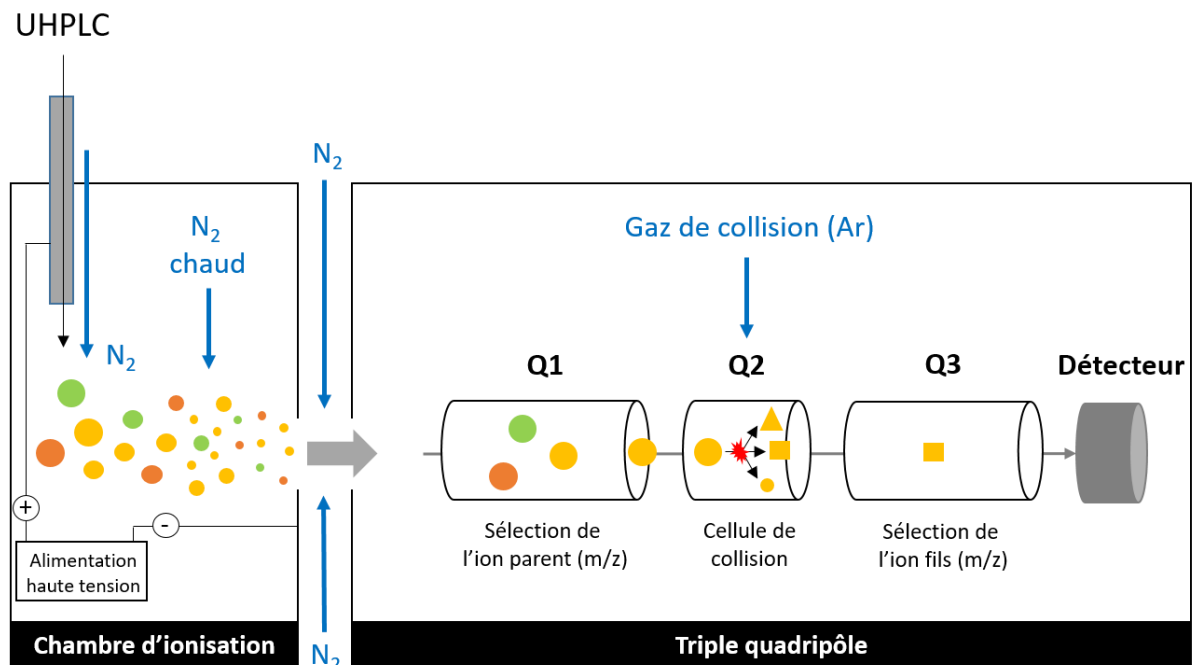


Figure 19. Représentation schématique de la source électrospray et du triple quadripôle utilisés durant cette étude.

Le développement d'une nouvelle technique, la spectrométrie de masse haute résolution pourrait entraîner une meilleure identification des adduits par l'apport d'une haute précision de masse permettant de déterminer la composition élémentaire de l'adduit et de ses fragments. L'utilisation de la technologie Tof (temps de vol, littéralement « Time of flight ») permet une augmentation considérable de la résolution (Boesl 2017). Le deuxième appareil utilisé au cours de cette étude correspond à une UHPLC-IMS/QToF/HRMS. Le principe de la technologie QToF utilisée ici correspond à une rampe d'énergie réalisée dans le stepware détectée dans le Tof (Wang *et al.* 2003; Gao *et al.* 2009; Dementeva *et al.* 2016). Sur cet appareil, la mobilité ionique (IMS) a été ajoutée en amont de la technologie QToF. L'IMS permet de séparer les ions en fonction de leur taille, de leur forme et de leur charge dans un gaz tampon sous l'effet d'un champ électrique (Gabelica and Marklund 2018). A ce jour, très peu d'études utilisent l'IMS pour l'analyse

des adduits à l'ADN (Kafle *et al.* 2013). Or, cette technologie permet de mesurer la section efficace de collision (« collision cross section », CCS) spécifique d'un composé. Le CCS reflète les propriétés physico-chimiques d'un composé, comme sa masse et sa structure, permettant ainsi son identification (Joshi *et al.* 2018). De plus, les valeurs de CCS restent fiables et constantes au cours des analyses, indépendamment de la matrice ou de la concentration.

Plusieurs structures d'adduits à l'ADN réalisées avec les HAP et les oxy-HAP ont été décrites grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse (McCoull *et al.* 1999; Balu *et al.* 2004, 2006; Nesnow *et al.* 2010; M. Huang *et al.* 2012; M. Huang, Blair, and Penning 2013; Yao *et al.* 2016; Matsui *et al.* 2019). Cependant, les études portant sur les oxy-HAP restent peu nombreuses. Le développement de ces nouvelles technologies devrait permettre une mesure quantitative des adduits à l'ADN dans les études épidémiologiques conçues pour évaluer l'étiologie des cancers. La plupart des études sur les adduits à l'ADN étaient menées sur des triples quadripôles et ne portaient que sur un ou deux adduits à la fois. Il devient donc crucial d'utiliser des technologies robustes permettant d'identifier un large éventail d'adduits en même temps (Yun *et al.* 2018).

II.6. Critère de choix des méthodes

Le tableau 3 reprend les avantages et les inconvénients des différentes méthodes d'analyse des dommages à l'ADN.

Le test des comètes et les immuno-essais possèdent l'avantage d'une quantification importante pour un faible coût d'utilisation. Cependant, la faible sensibilité associée à l'impossibilité d'identifier des adduits non connus ne convient pas pour l'étude des adduits aux oxy-HAP. Le post-marquage et à la détection par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse semblent le mieux correspondre. La haute sensibilité du post-marquage permet de détecter le très faible nombre d'adduits présent dans les échantillons biologiques. Cependant, cette méthode ne permet pas d'obtenir des informations structurales, d'où l'intérêt de la spectrométrie de masse pour laquelle une haute sensibilité et une haute spécificité sont observées.

Tableau 3. Principales méthodes utilisables pour la recherche de dommages à l'ADN

	Critères	Sensibilité	Spécificité	Besoins en matériel génétique	Détection d'adduits non connu	Quantification	Qualification des adduits	Coût
	Tests							
Domages à l'ADN	Test des comètes	☆☆	-	☆☆☆	☆	☆☆☆	-	☆☆
Adduits à l'ADN	Immuno-essais	☆	☆☆	☆	-	☆☆	☆☆	☆☆☆
	Spectrométrie de masse	☆☆☆	☆☆☆	☆☆	☆☆	☆☆☆	☆☆☆	☆☆
	Post-marquage	☆☆☆ ☆	☆☆	☆☆	☆☆☆ ☆	☆☆	-	☆

- : pas applicable



: inconvenient



: avantage

II. Réactivité des oxy-HAP vis-à-vis des nucléosides.

Différents mécanismes peuvent être à l'origine de la formation des adduits. Ils résultent de la formation d'une liaison covalente entre un composé chimique et des macromolécules telles que l'ADN, l'ARN ou les protéines. Ces liaisons peuvent se former soit par réaction hétérolytiques de type S_N1/S_N2 , soit par réaction homolytique par la formation de radicaux libres ou soit par addition de Michael. La plupart des études concernant les oxy-HAP décrivent des mécanismes en lien avec une addition de Michael (McCoull *et al.* 1999; Saeed *et al.* 2007; Matsui *et al.* 2019). Dans cette réaction, un composé nucléophile appelé « donneur de Michael » va réagir avec un composé électrophile dit « accepteur de Michael ». Ce mécanisme peut s'appliquer à différentes réactions :

- 1,2-naphthoquinone avec la 2'-deoxyguanosine (décrit dans le Figure 20, Waidyanatha *et al.* 2002; Saeed *et al.* 2007; Matsui *et al.* 2019)
- 1,4-naphthoquinone ou ménadione (2-méthyl-1,4-naphthoquinone) avec le glutathion dans les processus de détoxification (Ross *et al.* 1985; Grant *et al.* 1986; Takahashi *et al.* 1987; Monks *et al.* 1992)
- 7,8-benzo[*a*]pyrènequinone avec la 2'-deoxyadénosine, la 2'-deoxyguanosine ou la 2'-deoxycytidine (McCoull *et al.* 1999; Balu *et al.* 2004, 2006; Nesnow *et al.* 2010; M. Huang *et al.* 2012; M. Huang, Blair, and Penning 2013; Yao *et al.* 2016)
- ...

Cette réaction entraîne la formation d'adduits purinés et dépurinés (correspondant à la perte du ribose, Figure 20). Il faut ensuite vérifier si ces réactions chimiques ont effectivement lieu dans des matrices biologiques, notamment au niveau cellulaire. Par la suite, afin d'évaluer les conséquences biologiques de ces adduits, il faudra pouvoir détecter et quantifier ces lésions qui représentent un événement clé dans le processus de cancérogénèse chimique (Figure 17).

Dans ce chapitre, nous nous sommes donc focalisés sur 3 oxy-HAP possédant des structures différentes : la 1,2-naphthoquinone, la 7,12-benz[*a*]anthracènequinone et le 6*H*-benzo[*cd*]pyrène-6-one. Des méthodes ont été développées en post-marquage au

^{32}P ainsi qu'en spectrométrie de masse afin de déterminer la structure des différents adduits à l'ADN.

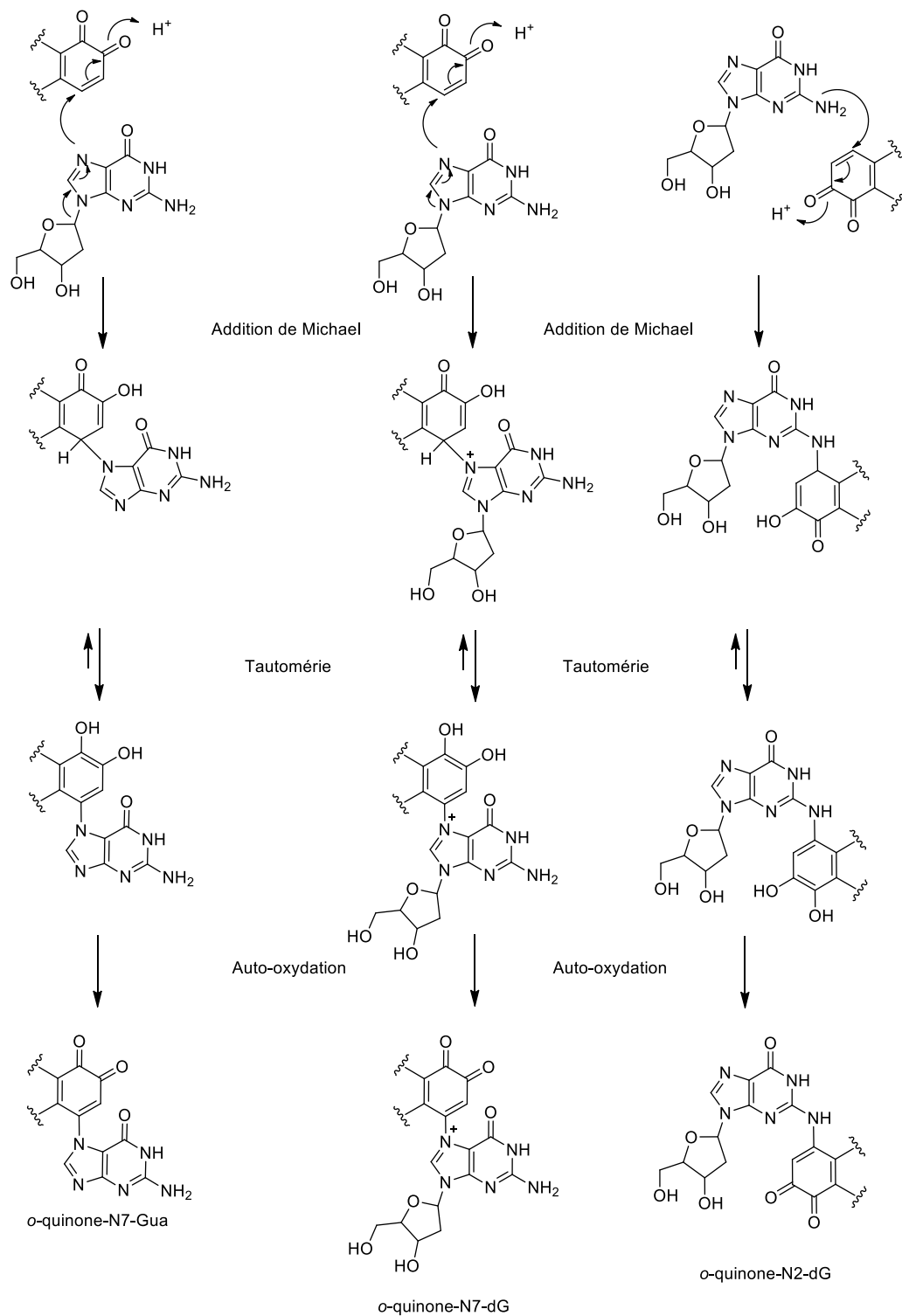


Figure 20. Mécanisme proposé concernant la formation des adduits à l'ADN (adapté de McCoull *et al*, 1999 et de Balu *et al*, 2004)

III. Synthèse des adduits à l'ADN

III.1. Adduits de la 1,2-naphthoquinone

Le naphthalène représente le composé le plus simple des HAP et a été détecté dans les différents compartiments de l'environnement. Ce composé est considéré comme carcinogène en raison des études réalisées par le programme national de toxicologie sur l'inhalation chronique du naphthalène par des rongeurs. Ces principaux métabolites correspondent aux composés en 1,2 tels que la 1,2-NphQ. Bien qu'elle soit peu détectée dans l'environnement, quelques études ont portées sur l'interaction de la 1,2-NphQ avec l'ADN entraînant la formation d'adduits dépurinés majoritairement (McCoull *et al.* 1999; Saeed *et al.* 2007; Matsui *et al.* 2019).

Au cours de cette étude, des adduits ont été synthétisés par réaction de la 1,2-NphQ avec la 2'-dG et l'ADN de thymus de veau puis ont été analysés en post-marquage au phosphore 32, en HPLC-UV et en UHPLC-MS/MS. Des adduits purinés et dépurinés ont été formés par le biais d'une addition de Michael en 1,4 avec la 2'-dG mais aussi avec la 2'-deoxyxanthosine après une déamination spontanée de la 2'-dG selon les conditions réactionnelles. Ces adduits pourraient ensuite être utilisés en tant que biomarqueurs permettant l'évaluation de l'exposition au naphthalène et à ses dérivés dans le développement de pathologies telles que le cancer.

III.1.1. Article n°3: Synthesis, purification and characterization of stable deoxyguanosine adducts of 1,2-naphthoquinone, an oxydated metabolite of naphthalene (soumise dans Talanta).

Synthesis, purification, and characterization of stable deoxyguanosine adducts of 1,2-naphthoquinone, an oxydated metabolite of naphthalene.

Adeline Clergé¹, Jérémie Le Goff², Claire Lopez-Piffet^{1,4}, Stéphanie Lagadu^{1,3,4}, Isabelle Vaudorne¹, Victor Babin^{5,6}, Thomas Cailly^{5,6}, Raphaël Delépée^{1,3,4}

(1) Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, ABTE, Caen, France

(2) ADn'tox SAS, Caen, France

(3) Comprehensive Cancer Center François Baclesse, UNICANCER, Caen, France

(4) PRISMM, Plateforme de Recherche et d'Innovation en Spectrométrie de Masse et Métabolomique, ICORE, Caen, France

(5) Centre d'Etudes et de Recherche sur le Médicament de Normandie, UPRES EA 4258, INC3M FR-CNRS 3038

(6) UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université de Caen Basse-Normandie, boulevard Becquerel, 14032 Caen cedex France

* Corresponding author:

raphael.delepee@unicaen.fr

Comprehensive Cancer Center François Baclesse, UNICANCER, Caen, France

3 avenue Général Harris, 14032 Caen Cedex 05, France

+33 2 31 45 51 13

Abstract

Naphthalene represented the simplest constituent of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) chemical family and is detected as major pollutants in the different compartment of the environment. Since 2002, this compound is considered by the International agency for research on cancer (IARC) as possible carcinogenic (group 2A) based on studies of the national toxicology program on chronic inhalation in rodent. Its main metabolites correspond to derivative in 1,2-position such as 1,2-naphthoquinone (1,2-NphQ). Based on previous studies, 1,2-NphQ is supposed to react with DNA to form mostly depurinating adducts, a possible initiating step for carcinogenicity. To confirm this potentiality, adducts were synthesized by the reaction of 1,2-NphQ with 2'-deoxyguanosine (2'-dG) and calf thymus DNA and were analyzed by ³²P post-labelling, HPLC with ultra-violet detection and ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). We concluded that purinating and depurinating adducts were formed by 1,4-Michael addition with 2'-dG but also with 2'-deoxyxanthosine after a spontaneous deamination of 2'-dG. These adducts could be used as biomarkers allowing evaluation of exposure to naphthalene and its derivatives in the development of pathologies such as cancer.

1. Introduction

Naphthalene (C₁₀H₈, CAS: 91-20-3, molecular weight: 128.19 g.mol⁻¹) is the structurally simplest constituent of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), a large chemical family that is composed of thousands pollutants widely spread in the environment. It is a natural constituent of coal tar and crude oil (1). More than 90% of the naphthalene entering in the environment is released in the atmospheric compartment. This release results mainly from the combustion of wood and fossil fuels (residential, industrial and natural sources, (2,3). It has been also found in wood smoke, cigarette smoke and is generated during grilling of meats (4). In industry, naphthalene is used as precursor for production of phthalic anhydride used in plastics, for carbamate insecticides and was produced by the destructive distillation of high-temperature coal tar, which is called carbonization or cooking (1).

Different studies reported naphthalene levels in ambient air, in residential air, in workplace and its range from 0.001 to 3000 µg/m³ (5–8). Moreover, naphthalene was detected in the ultrafine fraction of particulate matter (with aerodynamic diameter ranging from 0.3 to 2.5 µm) of the air of Dunkerque, a French industrial and coastal city (9). Naphthalene released in the

atmosphere may be transported to surface water (5%) and/or soil (3%) by wet or dry deposition and by river discharge for many years (10,11). Several authors demonstrated that naphthalene was the most significant PAH in different biomass residues (12–15). A particularly high concentration was detected in the Nemunas River Delta region (Lithuania, Baltic sea) and in the Stradomka river estuary (Poland) in which naphthalene represented the predominant PAH (16,17). Due to its hydrophobicity, this compound can be absorbed on suspended particles and be carried into seabed sediments from which it can be released slowly, causing a long term pollution (18,19). In water, naphthalene was known to have a short half-life and was degraded by photolysis and biological process, which results in a possibility to accumulate in the environment (20).

In view of this potentially high wide variety of exposure routes, the US Environmental Protection Agency evaluated the contribution of each media, except water, by measuring concentrations of naphthalene in these compartments. Due to its high volatility at room temperature, exposure to naphthalene occurs mainly through inhalation (an average of 1.127 µg/kg body weight per day, (21–24).

Few data were available concerning naphthalene toxicity. Experimental studies on animals demonstrate the possible carcinogenic potential of this compound after a chronic inhalation of naphthalene to mice and rats (22,23). An increase in the incidence of bronchiolo-alveolar adenomas, carcinomas and neuroblastomas of the olfactory epithelium was observed. Concerning humans, no epidemiologic studies of people exposed to naphthalene were reported. Several cases of hemolytic anemia were described after inhalation and dermal penetration in newborn babies for which clothes and bed clothes were kept with mothballs (3). Moreover, it was alleged that cancer risk to humans was not associated to the exposure to naphthalene. This compound is bioactivated by cytochrome P450 enzymes which are very efficient in the lung tissues of rodents contrary to those of humans. It is assumed that carcinogenesis of naphthalene in rodents could be rely to an indirect mechanism of repeated cycles of injury and repair in lung epithelial (25). The anatomic and metabolic differences observed between rodents and humans suggested that relevancy of rat nasal tumors and mice lung cancer is questionable (24).

All these studies demonstrated that effects of exposure to naphthalene were highly controversial. It explained the classification of naphthalene as possible carcinogen for human

(group 2B) since 2002, as possible carcinogen for US-EPA since 1998 (class C) and as worrisome substance for human by the European Union (Category 2, 1,42).

From a genotoxic point of view, naphthalene did not induced mutations in *Salmonella typhimurium*, with or without metabolic activation (1,27). The same absence of genotoxic effect was observed in Human lymphoblastoid cells metabolically competent at two tested loci. Clastogenic potential (micronucleus, sister chromatid exchange and chromosomal aberrations) was demonstrated *in vitro* for naphthalene and its two metabolites, 1,2-naphthoquinone (1,2-NphQ) and 1,4-naphthoquinone (1,4-NphQ, 22,28–30).

As for many chemical carcinogens, the toxicity of naphthalene can be relied to its metabolic activation. Different pathways led to the formation of naphthalene-1,2-oxide, 1,4-NphQ and 1,2-NphQ (1,3,31,32). The formation of these products may lead to futile redox cycles which generate reactive semiquinone intermediates in the presence of Cu(II) or reactive oxygen species (ROS), including $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , and OH^{\cdot} , which are toxic and carcinogenic and create DNA damages in human lung cells (Scheme 1, 33–35). DNA-damaging activity of 1,2-NphQ was significantly increased in the presence of NADH and Cu(II) contrary to those of 1,4-NphQ (35). Moreover studies based on toxicokinetic demonstrated that the main metabolites generated corresponded to naphthalene derivatives in 1,2 position (36). According to all these fact, we decided to work specifically on 1,2-NphQ.

1,2-NphQ is an electrophilic compound which is not much detected in the different compartment of the environment (37). It may bind to nucleophilic molecules such as DNA, RNA, and proteins to form adducts (38). When tissues were incubated with 1,2-NphQ, levels of DNA adduct of unknown structures were 70-80-fold higher than those detected after exposure to naphthalene, which proved that 1,2-NphQ was even more potent than unsubstituted compound. To identify DNA adducts structure, previous studies demonstrated that 1,2-NphQ can react with 2'-deoxyguanosine (2'dG), 2'-deoxyadenosine (2'dA), guanine (Gua), or adenine (Ade). Both purinating and depurinating adducts (with or without ribose moieties) are formed with adenine and 2'-dA while depurinating adducts are predominantly formed with 2'dG (32,33,39).

In this article, we demonstrate the capacity of 1,2-NphQ to react with DNA to form both purinating and depurinating adducts. These adducts were detected thanks to the ultra-sensitive

³²P post-labelling method and identified thanks to the use of analytical standard synthesized with 2'-dG and analyzed by mass spectrometry. The kinetics of formation of the different adducts were studied and demonstrate that the purinating adduct is initially formed followed by the depurinating adduct which increased with the decreasing of purinating adduct.

2. Materials and methods

Chemicals, reagents, and enzyme.

1,2-NphQ (purity: 90%) was purchased from TRC (Toronto, ON, Canada). Alfa Aesar (Schiltigheim, France) provided 2'-dG and N,N-dimethylformamide (DMF). Acetonitrile and water are of HPLC quality and were purchased from VWR (Fontenay-sous-bois, France). Deoxyribonucleic acid sodium salt from calf thymus, nuclease P1 from *Penicillium Citrinum*, alkaline phosphatase grade I from calf intestine, phosphodiesterase I from *Crotalus adamenteus*, deoxyribonuclease II (DNase II) type V from bovine, urea, formic acid, lithium hydroxide, Micrococcal Nuclease, ribonuclease A and T1, buffer saturated-phenol, proteinase K, zinc sulfate, calcium chloride, succinic acid and EDTA were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Phosphodiesterase type II was provided by Worthington Biochemical Corporation (Entraigues, France). Sodium acetate and sodium chloride were purchased from Merck (Darmstadt, Deutschland). Hydrochloric acid came from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). Carrier-free [γ -³²P] ATP (3000 Ci/mmol, 11.6 μ Ci/ μ L, use of 40.9 μ L) was provided by Perkin Elmer (Villebon-sur-Yvette, France). T4 polynucleotide kinase (PNK) and phosphodiesterase type II (calf spleen, SPD) were from Obiogen (Courbevoie, France). PEI-cellulose plastic sheets were purchased from Macherey-Nagel (Duren, Allemagne).

Covalent binding of 1,2-NphQ to Calf Thymus DNA. A volume of 6.7 μ L of a solution of 1,2-NphQ (24 mg, 0.15 mmol) in DMF was added to a solution of calf thymus DNA (1 mg) in water (1 mL). The reaction mixture was stirred during 72h at 37°C and subjected to DNA hydrolysis.

DNA hydrolysis for mass spectrometry. The first part of the hydrolysis was realized thanks to 0.05 unit of phosphodiesterase II, 5 units of DNase II and 1 unit of nuclease P1 in MNSPDE buffer (composed of succinic acid and zinc sulfate). This reaction mixture was incubated during 2h at 37°C. The second part of hydrolysis was conducted by the use of 4.6 units of phosphatase alkaline and 0.03 unit of phosphodiesterase I in Palk buffer (composed of EDTA and trizma base). This reaction mixture was incubated during 2h at 37°C and stopped thanks to HCl 0.1 M.

The use of sodium chloride 5 mM and cold ethanol allowed to precipitate non-hydrolyzed DNA and proteins. Nucleosides remain in the supernatant (40).

DNA hydrolysis for ³²P-postlabelling and analysis. DNA adduct measurement were performed using a ³²P-postlabelling protocol based on previous protocol (41). Benzo[*a*]pyrene (BaP) was selected as reference. In brief, 5 µg of DNA were digested by micrococcal nuclease and SPD during 3.5 h at 37°C. Enrichment of adducts was realized by use of nuclease P1 during 45 min at 37°C and stopped by addition of Tris-base. Adduct labelling step was performed during 30 min at 37°C by addition of 10 units of PNK with 25 µCi ³²P-γATP per sample. Separation of DNA adducts was realized thanks to thin layer chromatography (TLC) on 12 cm x 12 cm PEI-cellulose plates. Four migration solvents were used successively: 1M sodium phosphate, pH 6.0; 8.5 M urea with 4.5 M lithium formate, pH 3.5; 8.5 M urea with 0.5 M Tris-HCl and 1.6 M lithium chloride, pH 8; 1 M sodium phosphate, pH 6.8. Autoradiograms were obtained after exposure of TLC-plates to Kodak Biomax films during 24h at -80°C with intensifying screens. Samples were analyzed at least three times or more in case of discordant results.

Quantitative analysis was based on the ratio between radioactive intensity of the spots revealing adducts and radioactive intensity produced by a known quantity of labeled nucleotides (42) . Most of the time, results are expressed in “Relative adducts Level” and can be calculated according to the following equation:

$$RAL = \frac{cpm\ adducts}{cpm\ nucleotides\ N \times\ dilution\ factor} \quad \text{Equation}$$

cpm: counts per minute

Reaction of 1,2-NphQ with 2'-dG in DMF. In a round bottom flask equipped with a magnetic stirrer, a solution of 2'-dG (27 mg, 0.1 mmol) in DMF (2.5 mL) was added to a solution of 1,2-NphQ (24 mg, 0.15 mmol) in DMF (2.5 mL) at room temperature. The reaction mixture was stirred at the same temperature during 72 hours. Analysis and purification were performed on HPLC as described below.

Reaction of 1,2-NphQ with 2'-dG in water. In a round bottom flask equipped with a magnetic stirrer, a solution of 2'-dG (1.75 mg, 6.5 µmol) in water (2 mL) was added to a solution of 1,2-NphQ (1.6 mg, 10 µmol) in water (10 mL) at room temperature. The reaction mixture was stirred at the same temperature during 72 hours.

HPLC. Analysis and purification of adducts in reaction mixture were realized by preparative HPLC on a Shimadzu Nexera X2 system equipped with SPD-20A UV detector (Shimadzu, Kyoto). A volume of 2.2 mL of reaction mixture was loaded on an Atlantis® T3 ODB™ C18 column (100 Å, 5 µm, 10 mm x 250 mm, Waters, France) thermostated at 30°C. Samples were initially eluted isocratically with a mobile phase composed of 20% CH₃CN in H₂O during 3 minutes, followed by a linear gradient to 100% of CH₃CN in 10 minutes at the rate of 2 mL/min. This mobile phase composition was conserved during 7 minutes. The eluents were monitored at 254nm and 320 nm.

Ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Samples were analyzed by a UHPLC Shimadzu Nexera X2 system equipped with a LC-MS 8030 plus triple quadrupole system. The 2 µL injections were performed on a Waters Acquity UPLC® HSS C18 SB column (1,8 µm, 1 mm x 150 mm) thermostated at 30°C. Samples were eluted isocratically with 95% of CH₃CN in water which contain 0.5 mM of citric acid with a flow rate of 0.1 mL/min. The instrument was operated in positive electrospray ionization mode and all aspects of analysis were controlled using LabSolutions software (version 5.54, Shimadzu). Ionization was performed with the following settings: capillary voltage 4 kV; cone voltage 10-20 V; source block temperature 200°C; DL temperature 150°C with a nitrogen flow of 3L/min. Nitrogen was used as desolvation gas and argon as collision gas.

Optimization of MS/MS transitions. One transition was monitored for each analytes. For data acquisition, a time segment approach was used to arrange the transitions based on retention time, enhancing method sensitivity for detection. Instrumental parameters are shown in Table 1.

	tR (min)	Transitions	CE (V)
1,2-NphQ-N7-dX	1.24	425.20 → 224.10	-10
1,2-NphQ-N7-dG	1.21	424.10 → 307.80	-19
1,2-DHNphQ-N7-dG	1.21	426.00 → 309.95	-14
1,2-NphQ-N7-Gua	1.20	308.10 → 266.95	-5

Table 1. Optimization of UHPLC-MS/MS transitions.

Kinetics of adduct formation. 1,2-NphQ (24 mg, 0.15 mmol) in 2,5 mL of DMF was mixed with 2'dG (27 mg, 1 mmol) in 5 mL of total reaction mixture. This reaction was realized at 4°C, 25°C,

37°C, 43°C and 50°C for 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 24, 27, 31, 48, 52, 55, 72, 76, and 80h. At each point, the level of DNA adduct was measured by UHPLC-MS/MS.

3. Results

³²P post-labelling

In a way to evaluate the formation of DNA adducts, calf thymus DNA was exposed to 16.3 μmol of 1,2-NphQ. After a classical hydrolysis, DNA adducts were radiolabeled and separate on a PEI-cellulose plate. The obtained autoradiograms are presented in figure 1. In this figure, one spot was associated to one adduct. In comparison with the positive control, benzo[*a*]pyrene (BaP), seven significant spots were detected. To quantify these adducts, a ratio was measured between radioactive intensity of the spots revealing adducts and radioactive intensity detected for a known quantity of labeled nucleotides (table 2). This ratio was called “Relative Adducts Levels” (RAL, 60).

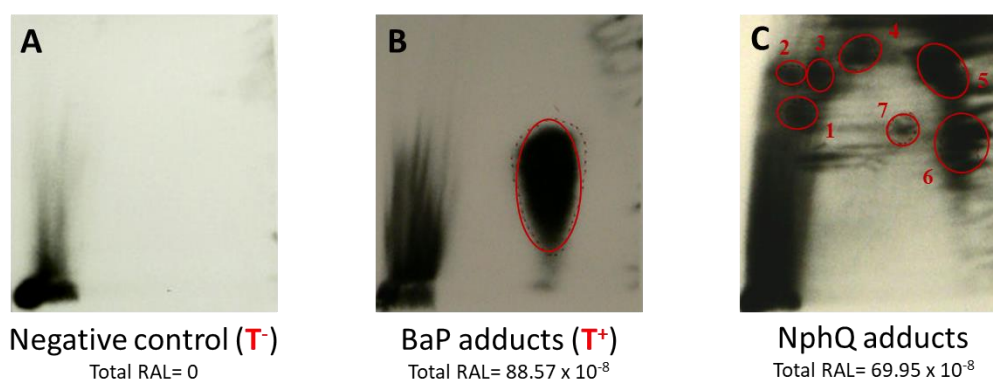


Figure 1. Autoradiograms obtained by ³²P post-labelling for (A) blank, (B) BaP adducts and (C) 1,2-NphQ adducts on calf thymus DNA.

Spot	RAL	Percent
1	8.73	12.48
2	4.32	6.18
3	6.41	9.16
4	9.81	14.02
5	21.50	30.74
6	16.37	23.40
7	2.81	4.02
Total	69.95	100.00

Table 2. RAL obtained for each spots by ³²P post-labelling analysis.

Synthesis of standards and analysis by HPLC-UV and UHPLC-MS/MS

In a way to identify these compounds, the synthesis of 2'-dG adducts was realized by the use of 0.15 mmol of 1,2-NphQ with 0.1 mmol of 2'-dG at room temperature during 72h in DMF. The same reaction was performed in water but with lower concentrations (6.5 μ mol of 1,2-NphQ and 10 μ mol of 2'-dG) due to the low solubility of 1,2-NphQ in water (<1 mg/mL at 21°C) (43). Analysis by HPLC-UV demonstrate the formation of 2 new compounds in the chromatogram (data not shown). After purification of these compounds (HPLC conditions are described in section 2), two peaks were isolated with retention times of 12.4 min and 13.1 min. Identification was realized thanks to UHPLC-MS/MS (conditions are described in section 2).

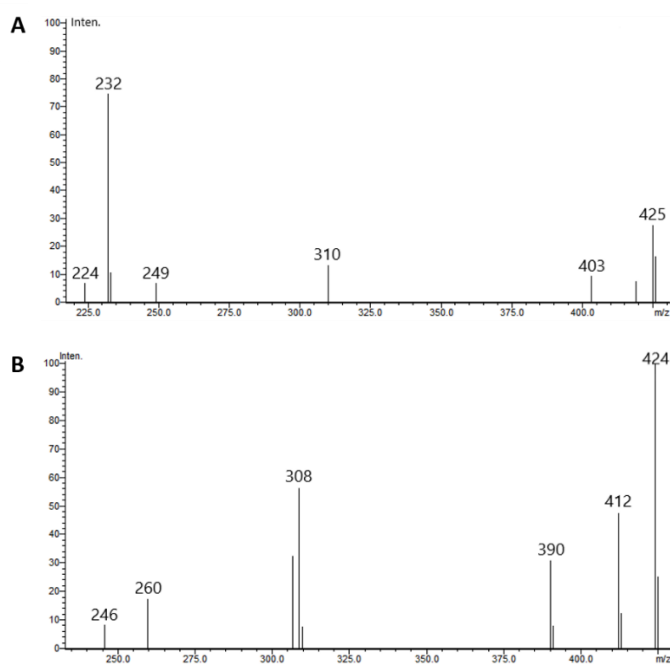


Figure 2. Scan spectra of the reaction mixture of 1,2-NphQ with 2'-dG.

A. Synthesis realized in DMF. **B.** Synthesis realized in water.

First analysis by UHPLC/electrospray ionization/ tandem mass spectrometry in conventional full scan mode showed different results. According to synthesis conditions, different ions were formed (Figure 2).

When molecules reacted in DMF, a majority ion was formed at m/z 425 with the same retention time as the second product in HPLC separation. Similarly, different products were formed in water; (i) an ion at m/z 424 at the same retention time as the second product in HPLC separation and (ii) an ion at m/z 308 at the same retention time as the first product in HPLC separation. To identify each of these compounds, collision-induced dissociation was realized.

The obtained spectrum demonstrated that these two adducts had different fragmentation (figure 3). m/z 425 gave only one product at m/z 224. Concerning m/z 424, different fragmentation products were obtained, including m/z 308 which correspond to the loss of the ribose part.

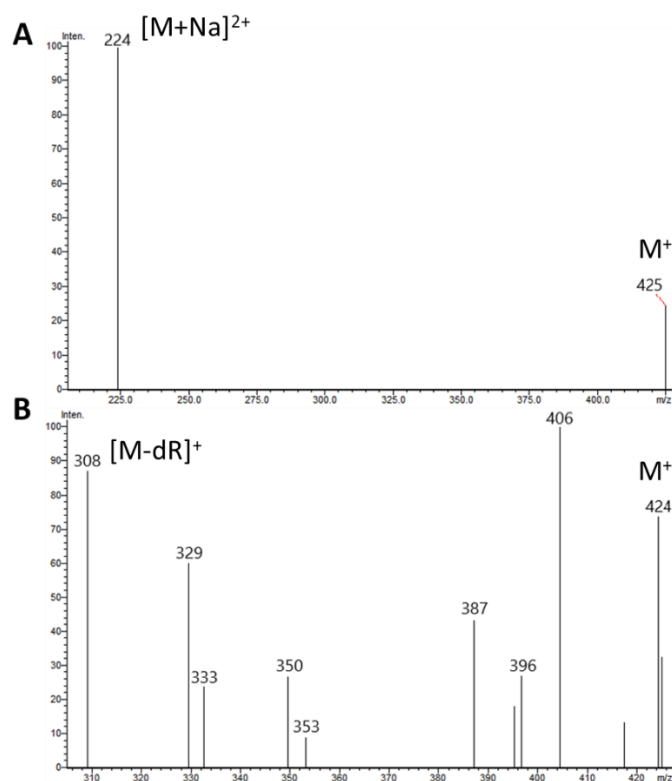


Figure 3. Collision-induced dissociation spectrum of m/z 425 (A) and m/z 424 (B) of the 1,2-naphthoquinone-2'-deoxyguanosine adducts.

To study the formation of these addition products on an entire double-stranded DNA molecule, adducts synthesized for post-labelling were analyzed in UHPLC-MS/MS by two different manners: (i) a research of adducts was realized in the supernatant after filtration of the solution to removed DNA and (ii) the reaction mixture was hydrolyzed to release purinating adducts. Quantification of adducts was carried out by the monitoring of the major fragmentations of 1,2-NphQ-dG (m/z 425 > 224, m/z 424 > 308 et m/z 308 > 267). Reaction of 1,2-NphQ with DNA demonstrated that both types of adducts were formed, with a prevalence for m/z 425 (Figure 4).

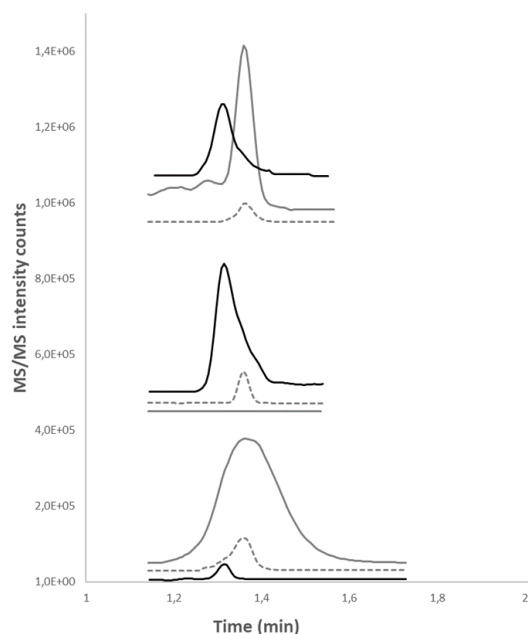


Figure 4. Chromatogram of each adducts according to synthesis conditions.

	<i>m/z</i> 425	<i>m/z</i> 424	<i>m/z</i> 308
DNA in water	59.4 %	2.5 %	38.1 %
2'-dG in water	0.0 %	15.2 %	84.8 %
2'-dG in DMF	98.2 %	0.8 %	1.0 %

Table 2. Percentage of each adducts according to synthesis conditions.

Kinetics of adduct formation

The last part of this study was focused on kinetics of formation of adducts. Synthesis conditions are described in section 2. Reaction was conducted at different temperatures (4°C, 23°C, 37°C, 43°C and 50°C). Aliquots were collected and analyzed by UHPLC-MS/MS at several time points. Detectable adducts were formed at each tested temperature (Figure 5). However, the rate of formation depends of the type of adducts and the temperature of the reaction. Concerning the ion at *m/z* 425, the greatest amount was formed at the highest temperature (50°C, figure 5A). At each temperature, adducts were formed increasingly with no evidence of a plateau. The second adduct (*m/z* 424) exhibited a different behavior. The greatest amount of adduct was formed at 4°C and decreased with the increasing temperature (Figure 5B). A synthesis at 4°C allows to stabilize and accumulate this adduct until approximately 30 hours. Then, this adduct was degraded followed by the progressive formation of the second product at *m/z* 308 (Figure

5C). Contrary to the two last product, the largest amount of m/z 308 was formed at 50°C. At this temperature, a very small amount of m/z 424 was formed.

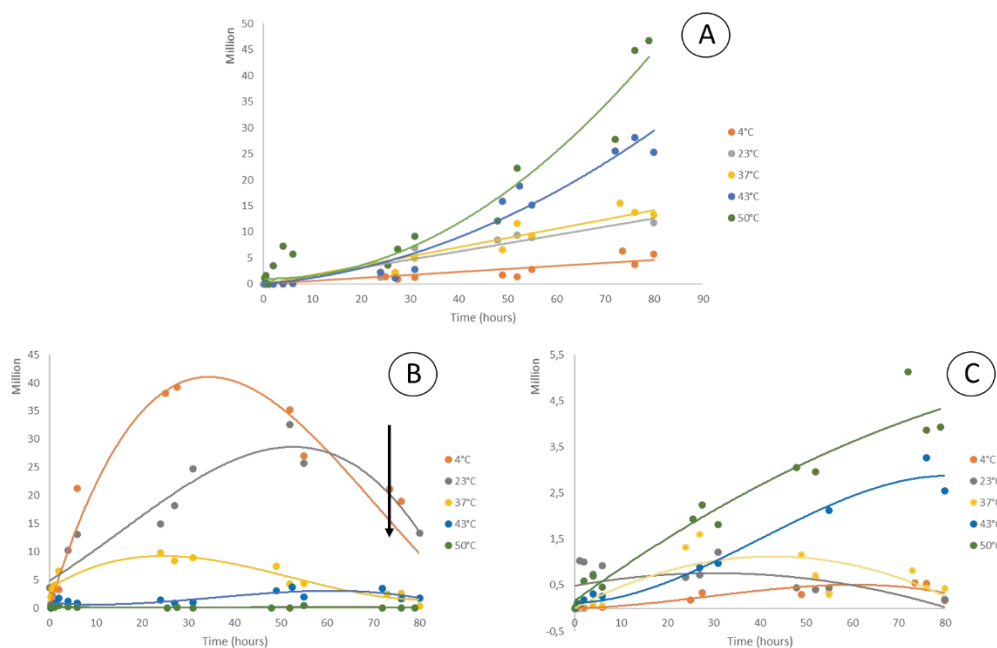


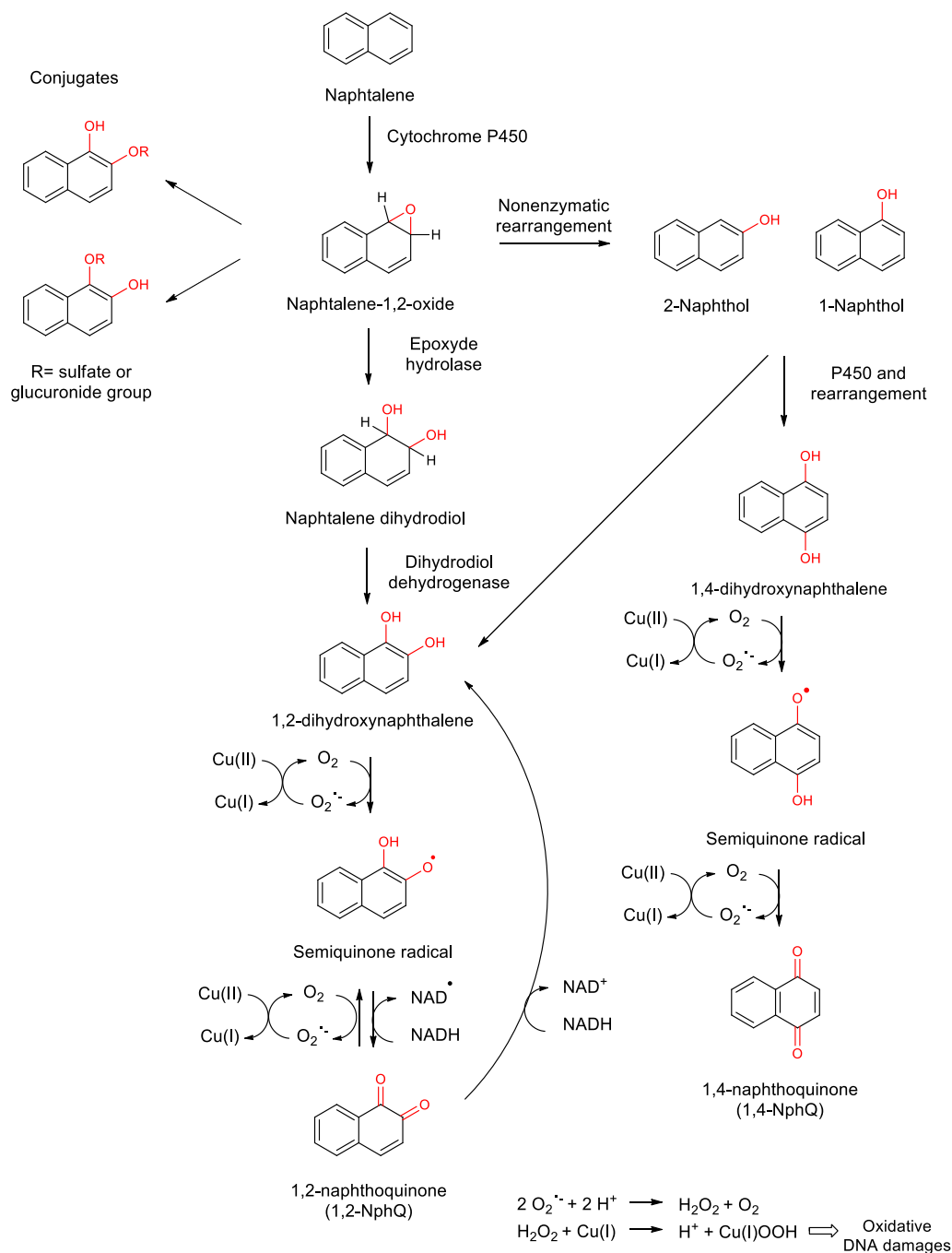
Figure 5. Kinetics of formation of the different NphQ-dG adducts.

The arrow represents the selected time for DNA adducts synthesis.

A. NphQ-dG purinating adducts (m/z 425); **B.** NphQ-dG purinating adducts (m/z 424); **C.** NphQ-dG depurinating adduct (m/z 308)

4. Discussion

As for many chemical carcinogens, the toxicity of naphthalene can be relied to its mechanism of action. Its study is based on the concept of Mode of Action (MoA, 44). This concept can be defined as a sequence of events and/or key processes starting with the interaction of the toxic compound with cells resulting in an observed effect. Concerning naphthalene, the interaction with cells, and more precisely DNA, required metabolic activation. This reactivity has been demonstrated by different *in vitro* study (Scheme 1). One pathway involves the formation of 1,4-NphQ. Epoxidation of naphthalene, catalyzed by cytochrome P450 led to formation of naphthalene-1,2-oxide which is unstable and can form conjugate (sulfated/glucuronidated) or, thanks to a subsequent chemical isomerization, yield to 1-naphthol or 2-naphthol. A second P450-catalyzed epoxidation followed by a rearrangement result in 1,4-NphQ. Naphthalene-1,2-oxide can also be activated enzymatically by epoxide hydrolase to form naphthalene dihydrodiol which can be oxidized by dihydrodiol dehydrogenase to form 1,2-dihydroxynaphthalene. A subsequent P450-catalyzed oxidation yields to 1,2-NphQ.



Scheme 1. Metabolic activation of naphthalene (adapted from IARC, 2002, Waidyanatha *et al.*, 2002, Saeed *et al.*, 2007 and ANSES, 2013, Ohnishi *et al.* 2018).

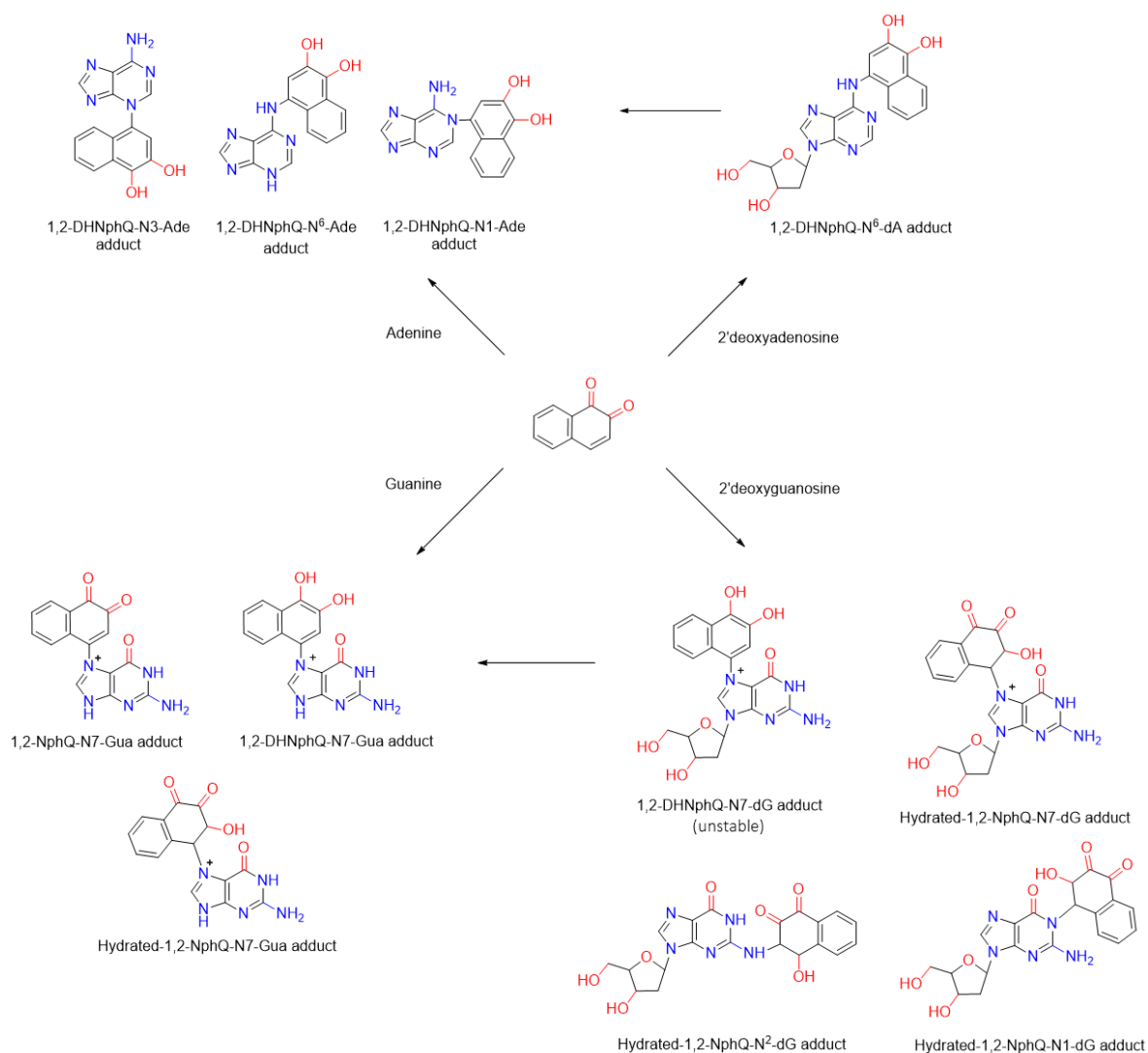
³²P post-labelling analysis

In a way to evaluate the formation of DNA adducts, 1,2-NphQ was placed in contact with calf thymus DNA in 7% DMF/water at 37°C during 72h. After hydrolysis, possible adducts were analyzed in post-labelling (figure 1). Seven spots corresponding to different unidentified adducts were obtained. On the four different DNA bases, only three can formed DNA adducts (45). Guanine represents the most reactive base. These 7 adducts could correspond to adducts

formed on the different reactive sites of these three bases. A comparison of the obtained RAL with that of BaP (selected as reference, $69.95 \cdot 10^{-8}$ for $88.57 \cdot 10^{-8}$) demonstrated the formation of a high amount a DNA adducts. Although this method was sensitive, no structural identification can be achieved. A synthesis of analytical standards is therefor necessary.

Synthesis of standards and analysis by HPLC-UV and UHPLC-MS/MS

Previous work demonstrates that 1,2-NphQ can react with 2'dG, 2'dA, Gua or Ade. Both purinating and depurinating adducts are formed with 2'dA and Ade (Scheme 2). With 2'dG, 1,2-NphQ react preferentially at the N² and the N7 positions, leading to the formation of purinating and depurinating adducts (32,33,39). In this study, various synthesis conditions were tested and different ions were formed (Figure 2).



Scheme 2. Standard adducts obtained after reaction of 1,2-NphQ with Ade, Gua, 2'-dG or 2'-dA (adapted from 51,52,63).

After a comparison of results obtained in DMF and in water, two purinating ions were obtained separated by one unit of mass. According to the nitrogen rule, this unit mass gap could be due to a difference of one nitrogen atom between the two molecular formula (46). In water, the ion at m/z 424 can be attributed to a protonated molecular ion (MH^+) or a positively charged molecule (M^+). In DMF, the ion observed at m/z 425 could be associated to a possible deamination of 2'-dG ($C_{10}H_{13}N_5O_4$) resulting in formation of 2-deoxyxanthosine (2'-dX, $C_{10}H_{12}N_4O_5$).

In physiological conditions, different studies demonstrated that spontaneous deamination of guanine can result in formation of xanthine (47). In an acceptor of hydrogen bonds solvent such as DMF, deamination reaction could be facilitated by the increase of acidity of the N^2 group of the nucleoside. The low quantity of water in DMF allowed formation of 2'-deoxyxanthosine. With a solvent only composed of water, this reaction seems to be impossible to realize.

The Collision-induced dissociation spectrum (CID) of the deaminated adduct synthesized in DMF demonstrated a limited fragmentation. m/z 425 gave only one product ion at m/z 224 (Figure 3A). Similarly, the products ions observed in the CID of the MH^+ or M^+ ions synthesized in water correspond to structures proposed in Figure 3B. Fragment ions observed are consistent with possible losses from 1,2-NphQ or 2'-dG portion of this adduct, i.e. m/z 406 ($M^+ - H_2O$), m/z 396 ($M^+ - CO$), m/z 353 ($M^+ - CO, HNCO$), m/z 350 ($M^+ - C_3O_2H_6$), m/z 333 ($M^+ - C_3O_2H_6, NH_3$), and m/z 308 which correspond to the loss of deoxyribose moieties and formation of depurinating form. These fragment ions are consistent with those published by McCoull *et al.* (33) and allow to confirm the formation of the M^+ ion in water to the detriment of MH^+ ion. This was the first time that formation of stable purinating adduct on N7 was demonstrated with 2'-dG and 2'-dX on DNA.

Following this, a synthesis on double-stranded DNA molecule demonstrated the formation of each different type of adducts, both purinating (m/z 425 and m/z 424) and depurinating (m/z 308, figure 4). Formation of the deaminated adduct (m/z 425) could be due to the DNA double helix structure. Hydrogens bonds realized between the different bases allowed to increase acidity of the N^2 group of base. 2'-dX possesses a stability similar to that of 2'-dG and the same fragmentation (48). The main fragment corresponds to the loss of ribose moieties. The second obtained adduct, m/z 424, was detected in stable and unstable form (m/z 308). This could be due to (i) the spontaneous elimination of the ribose part or (ii) the hydrolysis of DNA which may

involve the formation of depurinating adducts and influenced the purinating/depurinating proportion.

Kinetics of adduct formation

To assess the adduct stability kinetics were conducted at five different temperatures (4°C, 23°C, 37°C, 43°C and 50°C). According to reaction temperature, some adducts were mainly formed to the detriment of others. The purinating adduct detected at m/z 425 at proven to be stable at each tested temperature with a maximum at 50°C (figure 5A). Lindahl and Nyberg demonstrated that an increasing a temperature result in an increasing of the deamination of the bases in deoxyribonucleic acid (49). The second purinating adduct (m/z 424) seemed to be less stable. The greatest amount of adduct was formed at 4°C and decreased with the increasing temperature in favor of the progressive formation of the corresponding depurinating adduct (m/z 308, figure 5B and 5C). At 50°C, few purinating adducts were synthesized in comparison with the depurinating adducts. One possible explanation is that the addition at N7 position of 2'-dG destabilized the glycosidic bond and caused the loss of the sugar moiety. In theory, the purinating adduct was first formed followed by a degradation into the depurinating adduct. The achievement of this experience at 4°C allowed to stabilize this glycosidic bond and resulted in the accumulation of purinating adduct. Thanks to Figure 5, it was possible to determine an optimal time for synthesis of adducts with DNA. We selected 72 hours due to the high level of the two different purinating forms and the low amount of depurinating adducts.

Associated to these results, finding of lung tumors in female mice and respiratory epithelial adenomas in male rats raised concern that humans could be similarly affected by naphthalene exposure (22,50). To answer this, the Naphthalene Research Committee (NRC), which is a consortium of industry associations and individual companies, work on a research program with the aim to elucidate potential risks of humans exposed to naphthalene and address existing uncertainties concerning risk assessment of naphthalene. This program is based on a mode of action/human relevance framework (MoA/HRF) allowing the evaluation of assumptions and a hypothesis for a science-based risk assessment of naphthalene (51,52). The first assumption corresponds to the difference in metabolism between the two studied species. For rodent, the initial step in metabolism is allowed through CYP2F4 and CYP2F2 versus in humans, CYP2A13 predominates (53). After metabolism, reactive metabolites can interact with glutathione and formed conjugates underlying the removal of these substances. At higher exposure doses, a

glutathione depletion is observed, allowing secondary reactions such as formation of 1,2-NphQ-DNA adducts, cytotoxicity, chronic inflammation, regenerative hyperplasia and tumor formation (54). This metabolite was detected in *in vitro* rat nasal epithelial tissue exposure to high naphthalene concentrations. However, with the limited available human data, the carcinogenic response observed in rodents seems to be not relevant for humans according to the MOA.

5. Conclusion

Naphthalene is a ubiquitous environmental contaminant associated to combustion pollution and industrial processes. Human exposure, mainly associated to chronic low doses by inhalation, is admitted. However, toxicity for human, and particularly carcinogenicity, is not yet well known. Only few researchers demonstrated positive results for carcinogenicity in rodents. Studies based on toxicokinetic demonstrated that metabolites generated corresponded to naphthalene derivatives in 1,2 position. Reaction of 1,2-NphQ with 2'-dG and calf thymus DNA leads to the formation of different purinating and depurinating adducts which were detected by two different methods: post-labelling and mass spectrometry. This study allows to demonstrate for the first time the formation of stable DNA adducts. Moreover, modulation of reaction conditions can allow to select the formation of one specific adduct. These adducts can probably be advantageously used especially within the development of biomarkers for a better monitoring of human populations chronically exposed to naphthalene.

Acknowledgment

Authors would like to thank Dr. Carla Delépée for her profound insight into the linguistic part of present work and instructive discussion concerning the factual content. Adeline Clergé is grateful to the French Ministry of Education and Research for her Ph.D. fellowship.

Reference

1. IARC. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene. 2002 Feb;82.
2. Jia C, Batterman S. A critical review of naphthalene sources and exposures relevant to indoor and outdoor air. *Int J Environ Res Public Health*. 2010 Jul;7(7):2903–39.

3. ANSES. Valeur toxicologique de référence par inhalation pour le naphthalène - Avis de l'Anses. Rapport d'expertise collective [Internet]. 2013 Oct [cited 2019 Jun 5] p. 86. Available from: <https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2009sa0345Ra.pdf>
4. ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry - Toxicological Profile for Naphthalene, 1-Methylnaphthalene, and 2-Methylnaphthalene. US Dep Health Hum Serv Public Health Serv. 2005 Aug;1-291.
5. Egeghy PP, Hauf-Cabalo L, Gibson R, Rappaport SM. Benzene and naphthalene in air and breath as indicators of exposure to jet fuel. *Occup Environ Med*. 2003 Dec;60(12):969-76.
6. Reisen F, Arey J. Atmospheric Reactions Influence Seasonal PAH and Nitro-PAH Concentrations in the Los Angeles Basin. *Environ Sci Technol*. 2005 Jan 1;39(1):64-73.
7. Griego FY, Bogen KT, Price PS, Weed DL. Exposure, epidemiology and human cancer incidence of naphthalene. *Regul Toxicol Pharmacol RTP*. 2008 Jul;51(2 Suppl):S22-26.
8. Price PS, Jayjock MA. Available data on naphthalene exposures: Strengths and limitations. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2008 Jul 1;51(2, Supplement):15-21.
9. Landkocz Y, Ledoux F, André V, Cazier F, Genevray P, Dewaele D, et al. Fine and ultrafine atmospheric particulate matter at a multi-influenced urban site: Physicochemical characterization, mutagenicity and cytotoxicity. *Environ Pollut Barking Essex 1987*. 2017 Feb;221:130-40.
10. Wang M, Wang C, Hu X, Zhang H, He S, Lv S. Distributions and sources of petroleum, aliphatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface sediments from Bohai Bay and its adjacent river, China. *Mar Pollut Bull*. 2015 Jan 15;90(1-2):88-94.
11. Zhao M, Wang W, Liu Y, Dong L, Jiao L, Hu L, et al. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments from the Bering Sea and western Arctic Ocean. *Mar Pollut Bull*. 2016 Mar 15;104(1-2):379-85.
12. Bignal KL, Langridge S, Zhou JL. Release of polycyclic aromatic hydrocarbons, carbon monoxide and particulate matter from biomass combustion in a wood-fired boiler under varying boiler conditions. *Atmos Environ*. 2008 Dec 1;42(39):8863-71.
13. Yu W, Liu R, Xu F, Men C, Shen Z. Identifications and seasonal variations of sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the Yangtze River Estuary, China. *Mar Pollut Bull*. 2016 Mar 15;104(1-2):347-54.
14. Colom-Díaz JM, Alzueta MU, Fernandes U, Costa M. Emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons during biomass combustion in a drop tube furnace. *Fuel*. 2017 Nov 1;207:790-800.

15. Lin L, Dong L, Meng X, Li Q, Huang Z, Li C, et al. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons and phthalic acid esters in water and surface sediment from the Three Gorges Reservoir. *J Environ Sci*. 2018 Jul 1;69:271–80.
16. Pohl A, Kostecki M, Jureczko I, Czaplicka M, Łozowski B. Polycyclic aromatic hydrocarbons in water and bottom sediments of a shallow, lowland dammed reservoir (on the example of the reservoir Blachownia, South Poland). *Arch Environ Prot*. 2018 Jan 1;44:10–23.
17. Stakėnienė R, Jokšas K, Galkus A, Raudonytė-Svirbutavičienė E. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments from the Curonian Lagoon and the Nemunas River Delta (Lithuania, Baltic Sea): distribution, origin, and suggestions for the monitoring program. *Environ Monit Assess*. 2019 Mar 9;191(4):212.
18. Harris KA, Yunker MB, Dangerfield N, Ross PS. Sediment-associated aliphatic and aromatic hydrocarbons in coastal British Columbia, Canada: Concentrations, composition, and associated risks to protected sea otters. *Environ Pollut*. 2011 Oct 1;159(10):2665–74.
19. Li J, Dong H, Zhang D, Han B, Zhu C, Liu S, et al. Sources and ecological risk assessment of PAHs in surface sediments from Bohai Sea and northern part of the Yellow Sea, China. *Mar Pollut Bull*. 2015 Jul 15;96(1):485–90.
20. Ravindra K, Sokhi R, Van Grieken R. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. *Atmos Environ*. 2008 Apr 1;42(13):2895–921.
21. Williams DT, Nestmann ER, LeBel GL, Benoit FM, Otson R, Lee EGH. Determination of mutagenic potential and organic contaminants of Great Lakes drinking water. *Chemosphere*. 1982 Jan 1;11(3):263–76.
22. National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of naphthalene (cas no. 91-20-3) in F344/N rats (inhalation studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*. 2000 Dec;(500):1–173.
23. Carratt SA, Kovalchuk N, Ding X, Van Winkle LS. Metabolism and Lung Toxicity of Inhaled Naphthalene: Effects of Postnatal Age and Sex. *Toxicol Sci* [Internet]. 2019a [cited 2019 Jun 24]; Available from: <https://academic.oup.com/toxsci/advance-article/doi/10.1093/toxsci/kfz100/5478577>
24. Jeffrey Lewis R. Naphthalene animal carcinogenicity and human relevancy: overview of industries with naphthalene-containing streams. *Regul Toxicol Pharmacol RTP*. 2012 Feb;62(1):131–7.
25. Buchholz BA, Carratt SA, Kuhn EA, Collette NM, Ding X, Winkle LV. Naphthalene DNA adduct formation and tolerance in the lung. *Nucl Instrum Methods Phys Res Sect B Beam Interact Mater At*. 2019 Jan 1;438:119–23.
26. US EPA. Toxicological Review of naphthalene - In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS). 1998 Aug.

27. NTP. Toxicology and carcinogenesis studies of naphthalene (cas no. 91-20-3) in F344/N rats (inhalation studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser*. 2000 Dec;(500):1–173.
28. Harper BL, Ramanujam VMS, Gad-El-Karim MM, Legator MS. The influence of simple aromatics on benzene clastogenicity. *Mutat Res Mol Mech Mutagen*. 1984 Sep 1;128(2):105–14.
29. Tingle MD, Pirmohamed M, Templeton E, Wilson AS, Madden S, Kitteringham NR, et al. An investigation of the formation of cytotoxic, genotoxic, protein-reactive and stable metabolites from naphthalene by human liver microsomes. *Biochem Pharmacol*. 1993 Nov 2;46(9):1529–38.
30. Wilson AS, Davis CD, Williams DP, Buckpitt AR, Pirmohamed M, Park BK. Characterisation of the toxic metabolite(s) of naphthalene. *Toxicology*. 1996 Dec 18;114(3):233–42.
31. Waidyanatha S, Troester MA, Lindstrom AB, Rappaport SM. Measurement of hemoglobin and albumin adducts of naphthalene-1,2-oxide, 1,2-naphthoquinone and 1,4-naphthoquinone after administration of naphthalene to F344 rats. *Chem Biol Interact*. 2002 Oct;141(3):189–210.
32. Saeed M, Higginbotham S, Rogan E, Cavalieri E. Formation of depurinating N3adenine and N7guanine adducts after reaction of 1,2-naphthoquinone or enzyme-activated 1,2-dihydroxynaphthalene with DNA. Implications for the mechanism of tumor initiation by naphthalene. *Chem Biol Interact*. 2007 Feb;165(3):175–88.
33. McCoull KD, Rindgen D, Blair IA, Penning TM. Synthesis and characterization of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinone depurinating N7-guanine adducts. *Chem Res Toxicol*. 1999 Mar;12(3):237–46.
34. Bolton JL, Trush MA, Penning TM, Dryhurst G, Monks TJ. Role of Quinones in Toxicology. *Chem Res Toxicol*. 2000 Mar 1;13(3):135–60.
35. Ohnishi S, Hiraku Y, Hasegawa K, Hirakawa K, Oikawa S, Murata M, et al. Mechanism of oxidative DNA damage induced by metabolites of carcinogenic naphthalene. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 2018 Mar;827:42–9.
36. Bakke J, Struble C, Gustafsson JA, Gustafsson B. Catabolism of premercapturic acid pathway metabolites of naphthalene to naphthols and methylthio-containing metabolites in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Feb;82(3):668–71.
37. Clergé A, Le Goff J, Lopez C, Ledauphin J, Delépée R. Oxy-PAHs: occurrence in the environment and potential genotoxic/mutagenic risk assessment for human health. *Crit Rev Toxicol* [Internet]. 2019 Sep 12 [cited 2019 Sep 13];49. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408444.2019.1605333>

38. Doherty MA, Makowski R, Gibson GG, Cohen GM. Cytochrome P-450 dependent metabolic activation of 1-naphthol to naphthoquinones and covalent binding species. *Biochem Pharmacol*. 1985 Jul 1;34(13):2261–7.
39. Matsui T, Yamada N, Kuno H, Kanaly RA. Formation of Bulky DNA Adducts by Non-Enzymatic Production of 1,2-Naphthoquinone-Epoxy from 1,2-Naphthoquinone under Physiological Conditions. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 2019 Aug 20 [cited 2019 Oct 2]; Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.chemrestox.9b00088>
40. Genies C, Maître A, Lefèbvre E, Jullien A, Chopard-Lallier M, Douki T. The Extreme Variety of Genotoxic Response to Benzo[a]pyrene in Three Different Human Cell Lines from Three Different Organs. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 Nov 8;8(11). Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3832631/>
41. Le Goff J, Gallois J, Pelhuet L, Devier MH, Budzinski H, Pottier D, et al. DNA adduct measurements in zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, Pallas. Potential use for genotoxicant biomonitoring of fresh water ecosystems. *Aquat Toxicol Amst Neth*. 2006 Aug 12;79(1):55–64.
42. Gupta RC, Reddy MV, Randerath K. 32P-postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen--DNA adducts. *Carcinogenesis*. 1982;3(9):1081–92.
43. Keith LH, Walters DB. *National Toxicology Program's Chemical Solubility Compendium*. CRC Press; 1991. 452 p.
44. Boobis AR, Daston GP, Preston RJ, Olin SS. Application of key events analysis to chemical carcinogens and noncarcinogens. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2009 Sep;49(8):690–707.
45. Tretyakova N, Goggin M, Janis G. Quantitation of DNA adducts by stable isotope dilution mass spectrometry. *Chem Res Toxicol*. 2012 Oct 15;25(10):2007–35.
46. Pellegrin V. Molecular Formulas of Organic Compounds: The Nitrogen Rule and Degree of Unsaturation. *J Chem Educ*. 1983 Aug;60(8):626–33.
47. Uddin KM, Almatarneh MH, Shaw DM, Poirier RA. Mechanistic Study of the Deamination Reaction of Guanine: A Computational Study. *J Phys Chem A*. 2011 Mar 17;115(10):2065–76.
48. Vongchampa V, Dong M, Gingipalli L, Dedon P. Stability of 2'-deoxyxanthosine in DNA. *Nucleic Acids Res*. 2003 Feb 1;31(3):1045–51.
49. Lindahl T, Nyberg B. Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid. *Biochemistry (Mosc)*. 1974 Jul 1;13(16):3405–10.

50. National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis studies of naphthalene (CAS No. 91-20-3) in B6C3F1 mice (inhalation studies). Natl Toxicol Program Tech Rep Ser. 1992 Apr;410:1–172.
51. Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek MEB, Vickers C, et al. IPCS framework for analyzing the relevance of a cancer mode of action for humans. Crit Rev Toxicol. 2006 Dec;36(10):781–92.
52. Meek MEB. Recent developments in frameworks to consider human relevance of hypothesized modes of action for tumours in animals. Environ Mol Mutagen. 2008 Mar;49(2):110–6.
53. Piccirillo VJ, Bird MG, Lewis RJ, Bover WJ. Preliminary evaluation of the human relevance of respiratory tumors observed in rodents exposed to naphthalene. Regul Toxicol Pharmacol RTP. 2012 Apr;62(3):433–40.
54. Bailey LA, Nascarella MA, Kerper LE, Rhomberg LR. Hypothesis-based weight-of-evidence evaluation and risk assessment for naphthalene carcinogenesis. Crit Rev Toxicol. 2016;46(1):1–42.

III.1.2. Bilan sur la synthèse des adduits à la 1,2-naphthoquinone

La première étape de cette étude portait sur la vérification de la formation d'adduits à l'ADN avec la 1,2-NphQ. Une première analyse en post-marquage au phosphore 32 a démontré la formation de plusieurs adduits de structure inconnue. De plus, une comparaison avec la quantité d'adduit formée pour le BaP (prit comme référence) nous a permis de montrer qu'on obtenait une grande quantité d'adduits à la 1,2-NphQ.

Afin d'identifier ces structures, des standards analytiques ont été synthétisés. De précédentes études ont permis de démontrer que la 1,2-NphQ réagissait de manière préférentielle en position N² et N7 de la 2'-dG (McCoull *et al.* 1999; Saeed *et al.* 2007; Matsui *et al.* 2019). Dans cette étude, les adduits ont été synthétisés premièrement dans le DMF puis dans l'eau. Deux adduits purinés majoritaires séparés d'une unité de masse ont été obtenus par le biais d'une addition de Michael. Le premier (*m/z* 424) a été associé à un adduit formé en N7 de la 2'-dG. Le second a été proposé comme un produit issu de la désamination spontanée de la 2'-dG entraînant la formation de la 2'-deoxyxanthosine (2'-dX). Ces adduits purinés n'ont encore jamais été décrit dans la littérature. La réaction de la 1,2-NphQ avec de l'ADN de thymus de veau a démontré la formation de ces mêmes adduits.

La dernière partie de cette étude porte sur l'étude des cinétiques de formation des différents adduits. Selon la température de réaction, les adduits se sont avérés plus ou moins stables dans le temps. La dégradation de l'adduit correspondant au m/z 424 en m/z 308 montre que cet adduit pourrait être réparé en condition physiologique, jouant ainsi sur la toxicité du naphthalène. La formation de ces adduits peut donc représenter un des évènements clé du concept du MoA pouvant aboutir à l'apparition de pathologies.

III.2. Adduits de la 7,12-benz[*a*]anthracènequinone

Le BAQ est un composé largement retrouvé dans les différents compartiments de l'environnement. Bien que peu de données soient disponibles dans la littérature concernant le caractère mutagène et génotoxique de cet oxy-HAP, quelques études mettent en avant des résultats sans équivoques (Misaki *et al.* 2016; Wincent, Bihanic, and Dreij 2016). De la même manière que la 1,2-NphQ, il semble intéressant d'évaluer la formation des adduits à l'ADN telle que l'une des étapes clé dans le processus de toxicité du BAQ.

III.2.1. Article n°4: Synthesis and characterization of new DNA adduct with oxy-PAH: stable deoxyguanosine adducts of 7,12-benz[*a*]anthracenequinone (à soumettre dans *Analytica Chimica Acta*).

Synthesis and characterization of new DNA adduct with oxy-PAH: stable deoxyguanosine adducts of 7,12-benz[*a*]anthracenequinone.

Adeline Clergé¹, Jérémie Le Goff², Claire Lopez-Piffet^{1,4}, Stéphanie Lagadu^{1,3,4}, Isabelle Vaudorne¹, Raphaël Delépeé^{1,3,4}

(1) Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, ABTE, Caen, France

(2) ADn'tox SAS, Caen, France

(3) Comprehensive Cancer Center François Baclesse, UNICANCER, Caen, France

(4) PRISMM, Plateforme de Recherche et d'Innovation en Spectrométrie de Masse et Métabolomique, ICORE, Caen, France

** Corresponding author:*

raphael.delepee@unicaen.fr

Comprehensive Cancer Center François Baclesse, UNICANCER, Caen, France

3 avenue Général Harris, 14032 Caen Cedex 05, France

+33 2 31 45 51 13

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are environmental pollutants which may lead to cancer development. Several studies demonstrated that mutagenic activity of the 16 priority PAHs is not representative of the mutagenic activity of the whole PAHs class. That is why other compounds such as oxygenated PAHs (oxy-PAHs) are now integrated in many studies. Four oxy-PAHs considered as priorities were selected on criteria of environmental occurrence and suspected toxicity for human. Among these oxy-PAHs, BAQ is a widely detected compound in the different compartments of the environment and many studies demonstrated its genotoxicity and its tumor promotion capacity. Based on previous studies, the electrophilic behavior of 7,12-benz[*a*]anthracenequinone (BAQ) allows the interaction with DNA to form adducts. In this study, adducts were synthesized for the first time by the direct reaction of BAQ with 2'-deoxyguanosine (2'-dG) and calf thymus DNA and were analyzed by ³²P post-labelling and ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Purinating and depurinating adducts were formed by 1,4-Michael addition with 2'-dG but also with 2'-deoxyxanthosine after a spontaneous deamination of 2'-dG.

1. Introduction

Many studies deal with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Most of the time, monitoring is based on the 16 priority list created by the U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) or sometimes only on benzo[*a*]pyrene (BaP) which is considered as the reference compound of PAHs family (IARC 1987; Sen *et al.* 2012; M. Huang, Blair, and Penning 2013). However, some derivatives of PAHs are regularly detected in the different compartment of the environment (IARC 2010). It was demonstrated that mutagenic activity of the 16 priority PAHs is not representative of the mutagenic activity of the whole PAHs class (Umbuzeiro *et al.* 2008). Other compounds such as nitrated PAHs (nitro-PAHs) and oxygenated PAHs (oxy-PAHs) could complemented this toxicity, challenging the U.S. priority list (Andersson and Achten 2015). Nitro-PAHs were most commonly studied. Several studies reported the occurrence, fate and effect of this class (Arlt 2005; Miller-Schulze *et al.* 2016). Oxy-PAHs, which have been so far neglected, were detected at concentrations of the same order of magnitude as unsubstituted PAHs and therefore higher than those of nitro-PAHs (Wei *et al.* 2015; Tomaz *et al.* 2016). Unfortunately, their toxic endpoints are still poorly studied.

In a recent review, a set of four oxy-PAHs considered as priorities has been selected (Clergé *et al.* 2019). In this list, 7,12-benz[*a*]anthracenequinone (BAQ, C₁₈H₁₀O₂, CAS: 2498-66-0, molecular weight: 258.27 g.mol⁻¹) was chosen due to its environmental occurrence and suspected toxicity for human.

Several studies demonstrated its occurrence in soils (Lundstedt, Haglund, and Öberg 2006; Mattsson, Lundstedt, and Stenius 2009; Layshock, Wilson, and Anderson 2010), in water and sediments (Machala *et al.* 2001; Lundstedt, Haglund, and Oberg 2003) and in air (B. Huang *et al.* 2014; Keyte, Albinet, and Harrison 2016; Tomaz *et al.* 2016). Human exposure to this compound may also happen by ingestion of contaminated food, by method used for storage of food or by process of cooking (Li *et al.* 2016; Onat *et al.* 2017; Zhao *et al.* 2017). This contamination results in a daily exposure which can result in serious health issues.

In order to study the specific toxicity of oxy-PAH family after exposure and absorption, different key events such as genotoxicity or mutagenicity could be studied in order to evaluate the carcinogenic risk (Boobis *et al.* 2009). However, few data are available in the literature. Durant *et al.* worked on the mutagenic potential of BAQ on Human B lymphoblastoid cell lines and reported a negative result (Durant *et al.* 1996). However, a high tumor promoting potential was demonstrated on mouse embryonic fibroblast cells by the obtaining of a dose-response curve between 0.001-0.05 µg/mL (Misaki *et al.* 2016). Moreover, the ability of BAQ to induce enzymes involved in the metabolism process of carcinogenic compounds can be associated to potential mechanism of toxicity. The exposure of 4 different cellular models (Human liver cancer cell line (HepG2), mouse hepatoma cell line (H1L1), human keratinocyte cell line (HaCat) and rat hepatoma cell lines (H4IIE)) to BAQ demonstrated the induction of aldo-keto reductase 1C1, NADPH-dependent quinone oxidoreductase 1, cytochrome P450 family and AhR receptor (Machala *et al.* 2001; Misaki, Matsui, and Matsuda 2007a; Misaki *et al.* 2007b; Bekki *et al.* 2009; Larsson *et al.* 2014; Misaki *et al.* 2016; Wincent, Bihanic, and Dreij 2016). All these enzymes are involved in activation and detoxification mechanisms of xenobiotics. Furthermore, genotoxicity of BAQ was studied in *Japanese medaka (Oryzias latipes)* embryos thanks to the comet assay (Dasgupta *et al.* 2014). A dose-dependent DNA breakage response was obtained and was 1.5 higher than that obtained for BaP. These results are unequivocal regarding toxicity of BAQ.

With regard to all these data, the next key event in the evaluation of carcinogenic risks corresponds to the formation of DNA damages such as DNA adducts. Due to its electrophilic

behavior, BAQ may bind to nucleophilic macromolecules and formed adducts. These DNA-adducts are generally represented as one of the earliest steps in PAH carcinogenesis (Benford, Dinovi, and Setzer 2010). Different studies demonstrated the formation of DNA adducts with *ortho*-quinones, namely benzo[*a*]pyrene-7,8-dione and 1,2-naphthoquinone contrary to *para*-quinones (McCoull *et al.* 1999; Saeed *et al.* 2007; Matsui *et al.* 2019).

The aim of this article is the study of the capacity of BAQ to react with DNA to form purinating and depurinating adducts. These adducts were studied thanks to the ultra-sensitive ³²P post-labelling and identified by mass spectrometry.

2. Materials and methods

Chemicals, reagents, and enzyme.

BAQ was purchased from TRC (Toronto, ON, Canada). Alfa Aesar (Schiltigheim, France) provided 2'-dG and *N,N*-dimethylformamide (DMF). Acetonitrile and water are of HPLC quality and were purchased from VWR (Fontenay-sous-bois, France). Calf thymus DNA, nuclease P1 from *Penicillium Citrinum*, alkaline phosphatase grade I from calf intestine, phosphodiesterase I from *Crotalus adamanteus*, deoxyribonuclease II (DNAse II) type V from bovine, zinc sulfate, calcium chloride, succinic acid, urea, formic acid, lithium hydroxide, Micrococcal Nuclease, ribonuclease A and T1, buffer saturated-phenol, proteinase K, and EDTA were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Phosphodiesterase II SPH was obtained from Worthington Biochemical Corporation (Entraigues, France). Sodium acetate and sodium chloride were provided by Merck (Darmstadt, Deutschland). Hydrochloric acid came from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). Carrier-free [γ -³²P] ATP (3000 Ci/mmol, 11.6 μ Ci/ μ L, use of 40.9 μ L) was obtained from Perkin Elmer (Villebon-sur-Yvette, France). T4 polynucleotide kinase (PNK) and phosphodiesterase type II (calf spleen, SPD) were purchased from Obiogen (Courbevoie, France). PEI-cellulose plastic sheets were obtained from Macherey-Nagel (Duren, Allemagne).

Covalent binding of BAQ to calf thymus DNA. A volume of 6.7 μ L of a solution of BAQ (39 mg, 0.15 mmol) in DMF was added to a solution of calf thymus DNA (1 mg) in water (1 mL). The reaction mixture was stirred during 72h at 37°C and submitted to DNA hydrolysis.

DNA hydrolysis for mass spectrometry. The first part was realized thanks to 0.05 unit of phosphodiesterase II, 5 units of DNase II and 1 unit of nuclease P1 in MNSPDE buffer (composed of succinic acid and zinc sulfate). This reaction mixture was incubated during two hours at 37°C. The second part of hydrolysis was realized by the use 0.03 unit of phosphodiesterase I in Palk buffer (which is composed of EDTA and trizma base) and 4.6 units of phosphatase alkaline. The reaction mixture was incubated during 2h at 37°C and stopped thanks to HCl at 0.1 M. The use of sodium chloride 5 mM and cold ethanol allowed to precipitate non-hydrolyzed DNA and proteins. Nucleosides stay in the supernatant (Genies *et al.* 2013).

DNA hydrolysis for ³²P-postlabelling and analysis. DNA adduct measurement were performed using a ³²P-postlabelling protocol based on previous protocol (Le Goff *et al.* 2006). Benzo[*a*]pyrene (BaP) was selected as reference. Briefly, 5 µg of DNA were digested by micrococcal nuclease and SPD during 3.5 h at 37°C. Enrichment of adducts was realized by use of nuclease P1 during 45 min at 37°C and stopped by addition of Tris-base. Adduct labelling step was performed during 30 min at 37°C by addition of 10 units of PNK with 25 µCi ³²P-γATP per sample. Separation of DNA adducts was realized thanks to thin layer chromatography (TLC) on 12 cm x 12 cm PEI-cellulose plates. Four migration solvents were used successively: 1M sodium phosphate, pH 6.0; 8.5 M urea with 4.5 M lithium formate, pH 3.5; 8.5 M urea with 0.5 M Tris-HCl and 1.6 M lithium chloride, pH 8; 1 M sodium phosphate, pH 6.8. Autoradiograms were obtained after exposure of TLC-plates to Kodak Biomax films during 24h at -80°C with intensifying screens. Samples were analyzed at least three times or more in case of discordant results.

Quantitative analysis was based on the ratio between radioactive intensity of the spots revealing adducts and radioactive intensity produced by a known quantity of labeled nucleotides (Gupta, Reddy, and Randerath 1982). Most of the time, results are expressed in “Relative adducts Level” and can be calculated according to the following equation:

$$RAL = \frac{cpm\ adducts}{cpm\ nucleotides\ N \times\ dilution\ factor} \quad \text{Equation 1}$$

cpm: counts per minute

Reaction of BAQ with 2'-dG in DMF. In a round bottom flask equipped with a magnetic stirrer, a solution of BAQ (39 mg, 0.15 mmol) in DMF (5 mL) was added to a solution of 2'-dG (27 mg, 0.1

mmol) in DMF (5 mL) at room temperature. The reaction mixture was stirred during 72 hours at the same temperature. Analysis was performed on UHPLC-MS/MS as described below.

Reaction of BAQ with 2'-dG in water. In a round bottom flask equipped with a magnetic stirrer, 10 μ L of a solution of BAQ (39 mg, 0.15 mmol) in DMF was added to a solution of 2'-dG (1.75 mg, 6.5 μ mol) in water (12 mL) at room temperature. The reaction mixture was stirred at the same temperature during 72 hours.

Ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Samples were analyzed on a UHPLC Shimadzu Nexera X2 system equipped with a LC-MS 8030 plus triple quadrupole system. The 2 μ L injections were performed on a Waters Acquity UPLC[®] HSS C18 SB column (1,8 μ m, 1 mm x 150 mm) thermostated at 30°C. Samples were eluted isocratically with 95% of CH₃CN in water which contain 0.5 mM of citric acid (to avoid chelation in the column) with a flow rate of 0.1 mL/min. The instrument was operated in positive electrospray ionization mode and all aspects of analysis were controlled using LabSolutions software (version 5.54, Shimadzu). Ionization was performed with the following settings: capillary voltage 4 kV; cone voltage 10-20 V; source block temperature 200°C; DL temperature 185°C with a nitrogen flow (desolvation gas) of 3L/min and an argon flow (collision gas) of 15 L/min.

Optimization of MS/MS transition. One or two transitions were monitored for each analyte associated to a time segment approach during data acquisition in a way to enhance sensitivity of detection. Instrumental parameters are shown in table 1.

3. Results

³²P post-labelling

In order to study DNA adducts formation with BAQ, the first part of this work was focused on the detection of adduct by ³²P post-labelling method.

A solution of calf thymus DNA at 1 mg/mL was prepared and agitated at 37°C during 2 days until complete solubilization.

	tR (min)	Transitions	CE (V)
BAQ-N7-dG	1.28	524.20 --> 406.80	-13
		524.20 --> 256.00	-11
BAQ-N7-dX	1.28	524.20 --> 407.80	-10
		524.20 --> 257.00	-15
BAQ-N7-Gua	1.30	406.90 --> 376.20	-19
		406.90 --> 306.10	-15
BAQ-N7-Xan	1.30	407.90 --> 366.90	-5
		407.90 --> 141.00	-17

Table 1. Optimization of UHPLC-MS/MS transitions

A volume of 6.7 μ L of a solution of BAQ at 0.15 mmol in DMF was added to DNA and incubated at 37°C during 72h. After enzymatic hydrolysis of 5 μ g of DNA, the different adducts were radiolabeled and separated by the use of 2-dimension thin layer chromatography described in section 2. After a comparison with the positive control (BaP), four spots corresponding to different adducts were detected (Figure 1). The result is expressed in “Relative Adducts Levels” (RAL, Gupta, Reddy, and Randerath 1982).

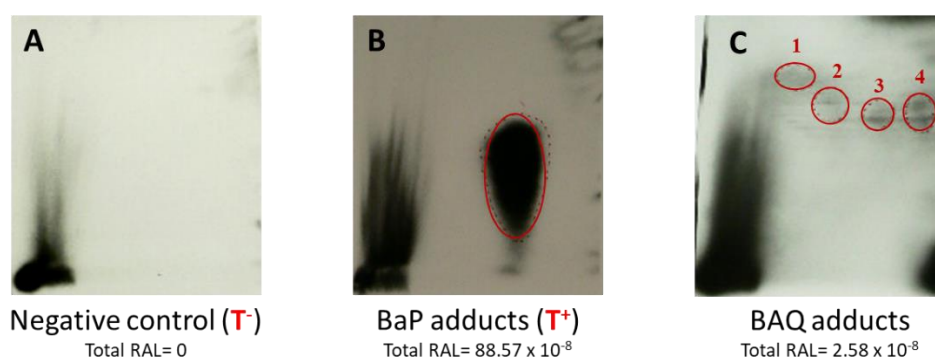


Figure 1. Autoradiograms obtained by 32 P post-labelling for (A) blank, (B) BaP adducts and (C) BAQ adducts on calf thymus DNA.

Spot	RAL	Percent
1	0.39	15.11
2	0.22	8.53
3	0.76	29.46
4	1.21	46.90
Total	2.58	100.00

Table 2. RAL obtained for each spots by 32 P post-labelling analysis.

In order to identify each adducts obtained on these autoradiograms, the synthesis of 2'-dG adducts was realized in DMF by the use of 0.15 mmol of BAQ in the presence of 0.1 mmol of 2'-dG at room temperature during 72h. The same reaction was performed in water but with lower concentrations (0.13 μ mol of BAQ and 6.5 μ mol of 2'-dG), due to the low solubility of BAQ in water (<10 mg/L, Lookchem website). Analysis of the different reaction mixtures were realized by UHPLC-MS/MS (conditions are described in section 2). In a conventional full scan mode, different ions corresponding to adducts were detected in both conditions: m/z 524 at a retention time of 3.875 min and m/z 525 at 3.789 min (data not shown). Following this, collision-induced dissociation was realized and mass spectra were represented in figure 2. In DMF and in water, mass spectra demonstrated that m/z 524 and m/z 525 possessed similar fragmentation.

The last part of this study concerned the evaluation of adducts formation on calf thymus DNA. Adducts synthesized for post-labelling were analyzed in UHPLC-MS/MS according to two different procedures: (i) reaction mixture was filtered in order to remove DNA and evaluate formation release of adducts in the supernatant (ii) DNA underwent an enzymatic hydrolysis to isolate each adduct. Study of DNA adducts formation was realized by the monitoring of specific fragments (m/z 524>408, m/z 525>409, m/z 408>376 and m/z 409>142). After reaction of BAQ with 2'-dG, only m/z 524 and m/z 408 were obtained.

4. Discussion

Generally, DNA-adducts are represented as one of the earliest steps in PAH carcinogenesis (Benford, Dinovi, and Setzer 2010). Previous work demonstrated the formation of DNA adducts with oxy-PAHs and more specially with *ortho*-quinones, namely benzo[*a*]pyrene-7,8-dione and 1,2-naphthoquinone (McCoull *et al.* 1999; Saeed *et al.* 2007; Matsui *et al.* 2019). However, no study concerned adducts formed with *para*-quinones.

³²P post-labelling analysis

To evaluate the formation of addition products on an entire double-stranded DNA molecule, BAQ was placed in contact with calf thymus DNA and analyzed by the use of ³²P-postlabelling method. Four different spots corresponding to unidentified adducts were detected (Figure 1).

On the four DNA bases, only three can form adducts and guanine is the more reactive (Tretyakova, Goggin, and Janis 2012).

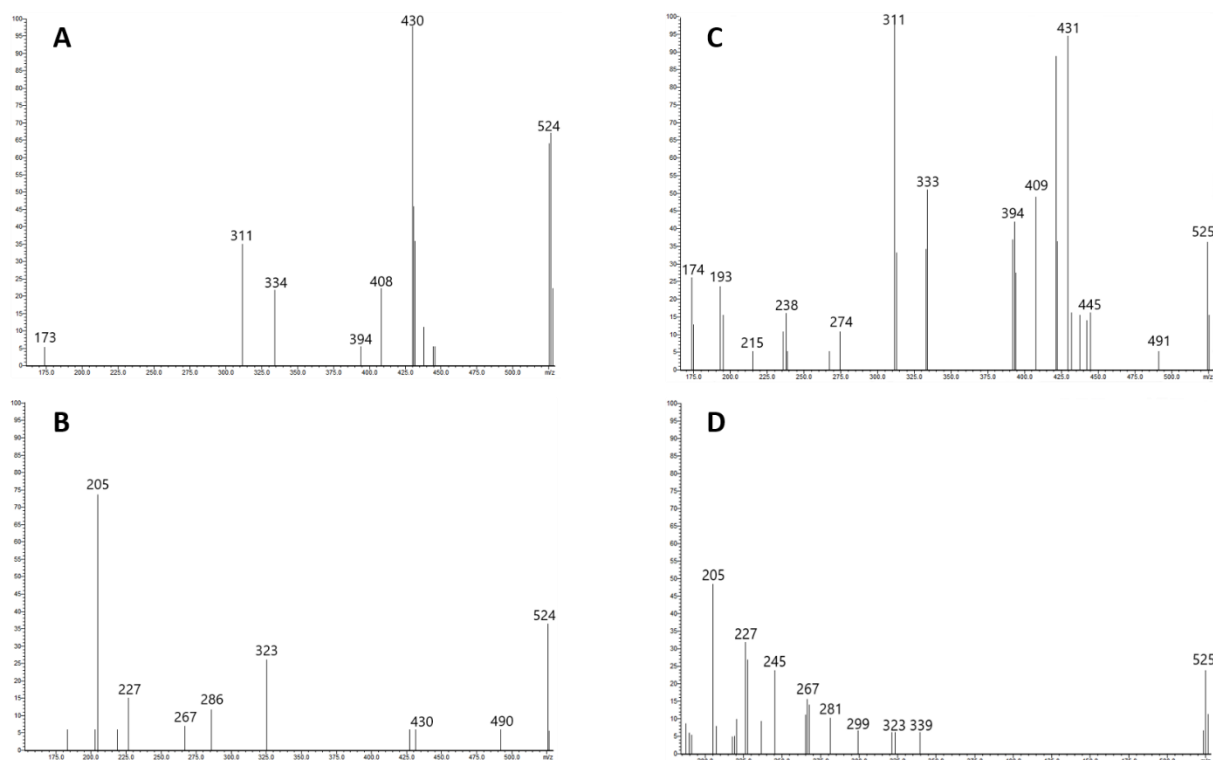


Figure 2. Collision-induced dissociation spectrum of (A) m/z 524 at low collision energy, (B) m/z 524 at high collision energy obtained by UHPLC-MS/MS, (C) m/z 525 at low collision energy and (D) m/z 525 at high collision energy.

Moreover, these bases possess different reactive sites allowing formation of several adducts types. A comparison of the obtained RAL with that of the reference BaP ($2.59 \cdot 10^{-8}$ compared to $88.57 \cdot 10^{-8}$) showed a significant formation of these adducts. This first analysis allowed to demonstrate that BAQ formed DNA adducts. However, this method does not provide any structural information. Synthesis of adducts standards is necessary to elucidate these structures.

Synthesis of standards and analysis by HPLC-UV and UHPLC-MS/MS

According to previous protocol, 1.5 equivalent of BAQ was reacted with 1 equivalent of 2'-dG in DMF. Scan spectra obtained by UHPLC-MS/MS (conditions described in section 2) demonstrated the formation of different compounds separated by one unit of mass: two compounds at m/z 524 and m/z 525 which correspond to M^+ or $[M+H]^+$ form, called purinating adducts and two other at m/z 408 and m/z 409 associated to the loss of ribose moieties, namely the depurinating form. Due to the electrophilic behavior of BAQ, formation of these adducts

was believed to occur by 1,4-Michael addition (McCoull *et al.* 1999). According to the nitrogen rule, this unit mass gap could be due to a difference of one nitrogen atom between the two molecular formula (Pellegrin 1983). Concerning the purinating product, four different structures were proposed in relation with oxy-PAH adduct structures already published (figure 3, McCoull *et al.* 1999; Saeed *et al.* 2007; Matsui *et al.* 2019). Three were suggested according to the main reactive sites of 2'-dG (N² and N7, C₁₀H₁₃N₅O₄, Tretyakova, Goggin, and Janis 2012). One form was proposed as 2'-deoxyxanthosine (2'-dX, C₁₀H₁₂N₄O₅) adduct. In physiological conditions, studies demonstrated that spontaneous deamination of guanine results in production of xanthine (Uddin *et al.* 2011). This nucleoside, like 2'-dG, possesses reactive sites that can interact with BAQ to form DNA adducts.

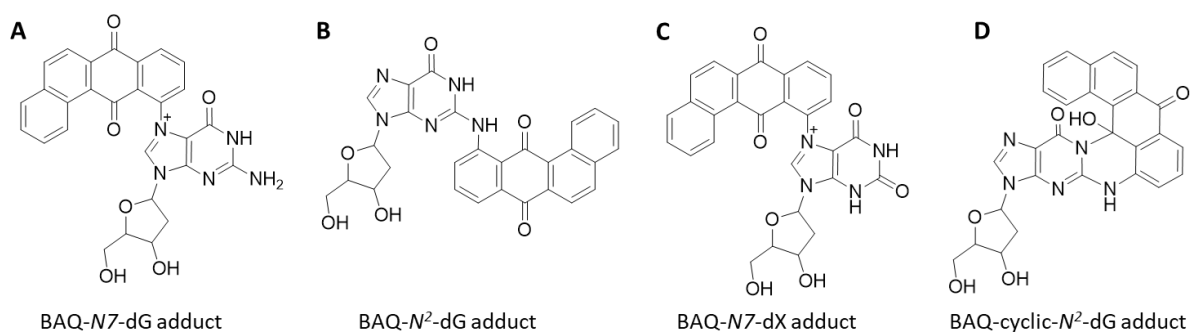


Figure 3. Structure proposal corresponding to the purinating form of BAQ adducts.

In order to determine the structure of these adducts, tandem mass spectrometry was realized (figure 2). The collision-induced dissociation spectra demonstrated a similar fragmentation for the two purinating adducts according to collision energy. At low collision energy, m/z 524 gave two specific product ions at m/z 430 and m/z 408 and m/z 525 gave m/z 431 and m/z 409. These ions corresponded to M^+ and $[M+Na]^+$ purinating adducts (figure 4). The others ions obtained at low and high collision energy were consistent with possible losses from BAQ or 2'-dG portion of this adduct. The observed ions at m/z 323 and m/z 311 correspond to fragmentation of 2'-dG allowing to demonstrate that N² atom of this nucleoside was not involved in formation of this adducts. Moreover, the observed mass to charge ratios were not compatible with the exocyclic structure. All these fragmentations are consistent with BAQ-N7-dG and BAQ-N7-dX adducts represented by structures A and C of figure 3. BAQ-N²-dG adduct was not excluded but no specific fragment allowed to justified its formation.

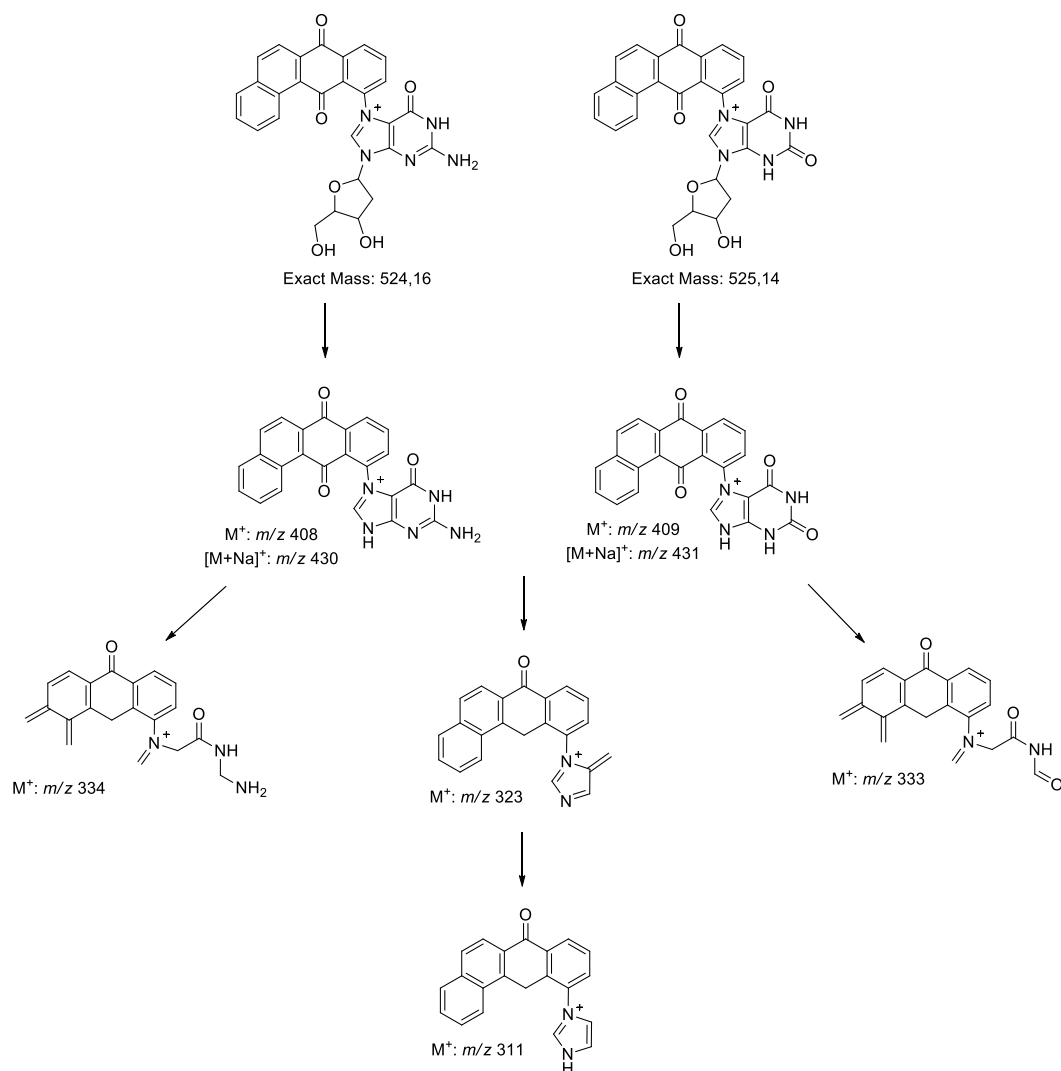


Figure 4. Proposed fragmentation concerning m/z 524 and m/z 525.

In the evaluation of the carcinogenic risk of BAQ, formation of DNA adducts represent an important key event. Different studies demonstrated that formation of bulky adducts with oxy-PAHs contributed significantly to frameshift and substitution mutations on G:C sequences which can be detected by *Salmonella typhimurium* strains in the Ames assay (Hakura *et al.* 1995). Similarly, deamination of guanine followed by formation of adducts can lead to stop in production of DNA or mutations due to a misincorporation or a misrepair (Caulfield, Wishnok, and Tannenbaum 1998). Owing to the acid labile character of the N-glycoside bond of 2'-dX (Shapiro and Pohl 1968), deamination could lead to apurinic sites and resulted in G:C → A:T or G:C → T:A mutations (Loeb and Preston 1986; Kamiya *et al.* 1992). These mutations were observed in many human diseases such as Alzheimer disease and cancers (Goate *et al.* 1991; Hollstein *et al.* 1991).

5. Conclusion

This study allows to demonstrate that BAQ react with DNA by 1,4-Michael addition to form purinating and depurinating adducts. The purinating BAQ-N7-dG adduct was realized directly on 2'-dG while the second adduct, namely BAQ-N7-dX, was realized after deamination of 2'-dG. These structures were similar to those obtained for oxy-PAHs and metabolites of PAHs (McCoull *et al.* 1999; Saeed *et al.* 2007; Matsui *et al.* 2019). Formation and reparation of these adducts could result in mutations that can initiate pathology. These adducts could be used in further studies as biomarkers of exposure to BAQ allowing to determine effects of a chronic exposure to these pollutants.

Acknowledgment

Authors would like to thank Dr. Carla Delépée for her profound insight into the linguistic part of present work and instructive discussion concerning the factual content. Adeline Clergé is grateful to the French Ministry of Education and Research for her Ph.D. fellowship.

References

- Andersson, J. T., and C. Achten. 2015. "Time to Say Goodbye to the 16 EPA PAHs? Toward an Up-to-Date Use of PACs for Environmental Purposes." *Polycyclic Aromatic Compounds* 35 (2–4): 330–54. <https://doi.org/10.1080/10406638.2014.991042>.
- Arlt, V. M. 2005. "3-Nitrobenzanthrone, a Potential Human Cancer Hazard in Diesel Exhaust and Urban Air Pollution: A Review of the Evidence." *Mutagenesis* 20 (6): 399–410. <https://doi.org/10.1093/mutage/gei057>.
- Bekki, K., H. Takigami, G. Suzuki, N. Tang, and K. Hayakawa. 2009. "Evaluation of Toxic Activities of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Derivatives Using in Vitro Bioassays." *Journal of Health Science* 55 (4): 601–10. <https://doi.org/10.1248/jhs.55.601>.
- Benford, D., M. Dinovi, and R. W. Setzer. 2010. "Application of the Margin-of-Exposure (MoE) Approach to Substances in Food That Are Genotoxic and Carcinogenic E.g.: Benzo[a]pyrene and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 48 Suppl 1 (January): S42-48. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.039>.
- Boobis, A. R., G. P. Daston, R. J. Preston, and S. S. Olin. 2009. "Application of Key Events Analysis to Chemical Carcinogens and Noncarcinogens." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49 (8): 690–707. <https://doi.org/10.1080/10408390903098673>.

Caulfield, J. L., J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum. 1998. "Nitric Oxide-Induced Deamination of Cytosine and Guanine in Deoxynucleosides and Oligonucleotides." *Journal of Biological Chemistry* 273 (21): 12689–95. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.21.12689>.

Clergé, A., J. Le Goff, C. Lopez, J. Ledauphin, and R. Delépée. 2019. "Oxy-PAHs: Occurrence in the Environment and Potential Genotoxic/Mutagenic Risk Assessment for Human Health." *Critical Reviews in Toxicology* 49 (September). <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408444.2019.1605333>.

Dasgupta, S., A. Cao, B. Mauer, B. Yan, S. Uno, and A. McElroy. 2014. "Genotoxicity of Oxy-PAHs to Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*) Embryos Assessed Using the Comet Assay." *Environmental Science and Pollution Research* 21 (24): 13867–76. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2586-4>.

Durant, J. L., W. F. Busby, A. L. Lafleur, B. W. Penman, and C. L. Crespi. 1996. "Human Cell Mutagenicity of Oxygenated, Nitrated and Unsubstituted Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Associated with Urban Aerosols." *Mutation Research/Genetic Toxicology* 371 (3): 123–57. [https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(96\)90103-2](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(96)90103-2).

Genies, C., A. Maître, E. Lefèbvre, A. Jullien, M. Chopard-Lallier, and T. Douki. 2013. "The Extreme Variety of Genotoxic Response to Benzo[a]pyrene in Three Different Human Cell Lines from Three Different Organs." *PLoS ONE* 8 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078356>.

Goate, A., M. -C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, et al. 1991. "Segregation of a Missense Mutation in the Amyloid Precursor Protein Gene with Familial Alzheimer's Disease." *Nature* 349 (6311): 704–6. <https://doi.org/10.1038/349704a0>.

Gupta, R. C., M. V. Reddy, and K. Randerath. 1982. "32P-Postlabeling Analysis of Non-Radioactive Aromatic Carcinogen--DNA Adducts." *Carcinogenesis* 3 (9): 1081–92. <https://doi.org/10.1093/carcin/3.9.1081>.

Hakura, A., H. Mochida, Y. Tsutsui, and K. Yamatsu. 1995. "Mutagenicity of Benzoquinones for Ames Salmonella Tester Strains." *Mutation Research* 347 (1): 37–43. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(95\)90031-4](https://doi.org/10.1016/0165-7992(95)90031-4).

Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein, and C. C. Harris. 1991. "p53 Mutations in Human Cancers." *Science* (New York, N.Y.) 253 (5015): 49–53. <https://doi.org/10.1126/science.1905840>.

Huang, B., M. Liu, X. Bi, C. Chaemfa, Z. Ren, X. Wang, G. Sheng, and J. Fu. 2014. "Phase Distribution, Sources and Risk Assessment of PAHs, NPAHs and OPAHs in a Rural Site of Pearl River Delta Region, China." *Atmospheric Pollution Research* 5 (2): 210–18. <https://doi.org/10.5094/APR.2014.026>.

Huang, M., I. A. Blair, and T. M. Penning. 2013. "Identification of Stable Benzo[a]pyrene-7,8-Dione-DNA Adducts in Human Lung Cells." *Chemical Research in Toxicology* 26 (5): 685–92. <https://doi.org/10.1021/tx300476m>.

IARC. 1987. "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human - Overall Evaluation of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs." 1–42. <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/Suppl7.pdf>.

———. 2010. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans: Painting, Firefighting, and Shiftwork. Vol. 98. International Agency for Research on Cancer.

Kamiya, H., M. Suzuki, Y. Komatsu, H. Miura, K. Kikuchi, T. Sakaguchi, N. Murata, C. Masutani, F. Hanaoka, and E. Ohtsuka. 1992. "An Abasic Site Analogue Activates a c-Ha- Ras Gene by a Point Mutation at Modified and Adjacent Positions." *Nucleic Acids Research* 20 (17): 4409–15. <https://doi.org/10.1093/nar/20.17.4409>.

Keyte, I. J., A. Albinet, and R. M. Harrison. 2016. "On-Road Traffic Emissions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Oxy- and Nitro- Derivative Compounds Measured in Road Tunnel Environments." *Science of The Total Environment* 566–567 (October): 1131–42. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.152>.

Larsson, M., J. Hagberg, J. P. Giesy, and M. Engwall. 2014. "Time-Dependent Relative Potency Factors for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Derivatives in the H4IIE-Luc Bioassay." *Environmental Toxicology and Chemistry* 33 (4): 943–53. <https://doi.org/10.1002/etc.2517>.

Layshock, J. A., G. Wilson, and K. A. Anderson. 2010. "Ketone and Quinone-Substituted Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mussel Tissue, Sediment, Urban Dust, and Diesel Particulate Matrices." *Environmental Toxicology and Chemistry* 29 (11): 2450–60. <https://doi.org/10.1002/etc.301>.

Le Goff, J., J. Gallois, L. Pelhuet, M. H. Devier, H. Budzinski, D. Pottier, V. André, and J. Cachot. 2006. "DNA Adduct Measurements in Zebra Mussels, *Dreissena Polymorpha*, Pallas. Potential Use for Genotoxicant Biomonitoring of Fresh Water Ecosystems." *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 79 (1): 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.05.002>.

Li, G., S. Wu, J. Zeng, L. Wang, and W. Yu. 2016. "Effect of Frying and Aluminium on the Levels and Migration of Parent and Oxygenated PAHs in a Popular Chinese Fried Bread Youtiao." *Food Chemistry* 209 (October): 123–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.036>.

Loeb, L. A., and B. D. Preston. 1986. "Mutagenesis by Apurinic/Apyrimidinic Sites." *Annual Review of Genetics* 20: 201–30. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.20.120186.001221>.

Lundstedt, S., P. Haglund, and L. Oberg. 2003. "Degradation and Formation of Polycyclic Aromatic Compounds during Bioslurry Treatment of an Aged Gasworks Soil." *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (7): 1413–20.

- Lundstedt, S., P. Haglund, and L. Öberg. 2006. "Simultaneous Extraction and Fractionation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Oxygenated Derivatives in Soil Using Selective Pressurized Liquid Extraction." *Analytical Chemistry* 78 (9): 2993–3000. <https://doi.org/10.1021/ac052178f>.
- Machala, M., M. Ciganek, L. Bláha, K. Minksová, and J. Vondráck. 2001. "Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated and Estrogenic Activities of Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Azaarenes Originally Identified in Extracts of River Sediments." *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (12): 2736–43.
- Matsui, T., N. Yamada, H. Kuno, and R. A. Kanaly. 2019. "Formation of Bulky DNA Adducts by Non-Enzymatic Production of 1,2-Naphthoquinone-Epoxy from 1,2-Naphthoquinone under Physiological Conditions." *Chemical Research in Toxicology*, August. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00088>.
- Mattsson, A., S. Lundstedt, and U. Stenius. 2009. "Exposure of HepG2 Cells to Low Levels of PAH-Containing Extracts from Contaminated Soils Results in Unpredictable Genotoxic Stress Responses." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 50 (4): 337–48. <https://doi.org/10.1002/em.20486>.
- McCoull, K. D., D. Rindgen, I. A. Blair, and T. M. Penning. 1999. "Synthesis and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon O-Quinone Depurinating N7-Guanine Adducts." *Chemical Research in Toxicology* 12 (3): 237–46. <https://doi.org/10.1021/tx980182z>.
- Miller-Schulze, J. P., M. Paulsen, T. Kameda, A. Toriba, K. Hayakawa, B. Cassidy, L. Naeher, M. A. Villalobos, and C. D. Simpson. 2016. "Nitro-PAH Exposures of Occupationally-Exposed Traffic Workers and Associated Urinary 1-Nitropyrene Metabolite Concentrations." *Journal of Environmental Sciences* 49 (November): 213–21. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.06.007>.
- Misaki, K., H. Kawami, T. Tanaka, H. Handa, M. Nakamura, S. Matsui, and T. Matsuda. 2007b. "Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Activity of Polycyclic Aromatic Ketones and Polycyclic Aromatic Quinones." *Environmental Toxicology and Chemistry* 26 (7): 1370–79. <https://doi.org/10.1897/06-465R.1>.
- Misaki, K., S. Matsui, and T. Matsuda. 2007a. "Metabolic Enzyme Induction by HepG2 Cells Exposed to Oxygenated and Nonoxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." *Chemical Research in Toxicology* 20 (2): 277–83. <https://doi.org/10.1021/tx060197u>.
- Misaki, K., T. Takamura-Enya, H. Ogawa, K. Takamori, and M. Yanagida. 2016. "Tumour-Promoting Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Oxygenated or Nitrated Derivatives." *Mutagenesis* 31 (2): 205–13. <https://doi.org/10.1093/mutage/gev076>.
- Onat, B., H. Bakal, H. Arioglu, A. Bozdogan, E. Kafkas, and A. EL Sabagh. 2017. "Comparison of Volatile Composition of Raw and Roasted Halisbey Peanut Variety Using HS-SPME GC/MS Techniques." *Fresenius Environmental Bulletin* 26 (June): 5198–5204.

Pellegrin, V. 1983. "Molecular Formulas of Organic Compounds: The Nitrogen Rule and Degree of Unsaturation." *Journal of Chemical Education* 60 (8): 626–33.

Saeed, M., S. Higginbotham, E. Rogan, and E. Cavalieri. 2007. "Formation of Depurinating N3adenine and N7guanine Adducts after Reaction of 1,2-Naphthoquinone or Enzyme-Activated 1,2-Dihydroxynaphthalene with DNA. Implications for the Mechanism of Tumor Initiation by Naphthalene." *Chemico-Biological Interactions* 165 (3): 175–88. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.12.007>.

Sen, S., P. Bhojnarwala, L. Francey, D. Lu, T. M. Penning, and J. Field. 2012. "p53 Mutagenesis by Benzo[a]pyrene Derived Radical Cations." *Chemical Research in Toxicology* 25 (10): 2117–26. <https://doi.org/10.1021/tx300201p>.

Shapiro, R., and S. H. Pohl. 1968. "The Reaction of Ribonucleosides with Nitrous Acid. Side Products and Kinetics." *Biochemistry* 7 (1): 448–55. <https://doi.org/10.1021/bi00841a057>.

Tomaz, S., P. Shahpoury, J.-L. Jaffrezo, G. Lammel, E. Perraudin, E. Villenave, and A. Albinet. 2016. "One-Year Study of Polycyclic Aromatic Compounds at an Urban Site in Grenoble (France): Seasonal Variations, Gas/Particle Partitioning and Cancer Risk Estimation." *The Science of the Total Environment* 565 (September): 1071–83. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.137>.

Tretyakova, N., M. Goggin, and G. Janis. 2012. "Quantitation of DNA Adducts by Stable Isotope Dilution Mass Spectrometry." *Chemical Research in Toxicology* 25 (10): 2007–35. <https://doi.org/10.1021/tx3002548>.

Uddin, K. M., M. H. Almatarneh, D. M. Shaw, and R. A. Poirier. 2011. "Mechanistic Study of the Deamination Reaction of Guanine: A Computational Study." *The Journal of Physical Chemistry A* 115 (10): 2065–76. <https://doi.org/10.1021/jp1120806>.

Umbuzeiro, G. A., A. Franco, M. H. Martins, F. Kummrow, L. Carvalho, H. H. Schmeiser, J. Leykauf, M. Stiborova, and L. D. Claxton. 2008. "Mutagenicity and DNA Adduct Formation of PAH, Nitro-PAH, and Oxy-PAH Fractions of Atmospheric Particulate Matter from São Paulo, Brazil." *Mutation Research* 652 (1): 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.12.007>.

Wei, C., Y. Han, B. A. M. Bandowe, J. Cao, R.-J. Huang, H. Ni, J. Tian, and W. Wilcke. 2015. "Occurrence, Gas/Particle Partitioning and Carcinogenic Risk of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Oxygen and Nitrogen Containing Derivatives in Xi'an, Central China." *The Science of the Total Environment* 505 (February): 814–22. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.054>.

Wincent, E., F. L. Bihanic, and K. Dreij. 2016. "Induction and Inhibition of Human Cytochrome P4501 by Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." *Toxicology Research* 5 (3): 788–99. <https://doi.org/10.1039/C6TX00004E>.

Zhao, X., S. Wu, G. Gong, G. Li, and L. Zhuang. 2017. "TBHQ and Peanut Skin Inhibit Accumulation of PAHs and Oxygenated PAHs in Peanuts during Frying." *Food Control* 75 (May): 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.029>.

III.2.2. Bilan sur la synthèse des adduits à la 7,12-benz[*a*]anthracènequinone

Notre étude démontre pour la première fois la formation d'adduits à l'ADN avec la 7,12-benz[*a*]anthracènequinone. Ces adduits ont tout d'abord été détectés en post marquage au phosphore 32 par réaction du BAQ avec de l'ADN de thymus de veau. Après comparaison des spots obtenus avec ceux du BaP (utilisé comme référence), une quantité non négligeable d'adduits de structure inconnue a été détectée.

De manière à identifier ces différents composés d'addition, une méthode analytique a été développée en spectrométrie de masse associée à la synthèse de standards analytiques. La réaction du BAQ avec la 2'-deoxyguanosine par le biais d'une addition de Michael a permis de former spécifiquement des adduits situés, comme pour la 1,2-NphQ, à une unité de masse d'écart. L'adduit en m/z 524 correspond à l'interaction directe du BAQ en N7 de la 2'-deoxyguanosine. Le second adduit semble se former suite à la désamination spontanée de la 2'-dG en 2'-dX, permettant aussi l'interaction du BAQ en N7 de la 2'-dX. La réaction du BAQ avec de l'ADN de thymus de veau a démontré la formation des mêmes adduits.

Ces résultats préliminaires nous permettent donc de mettre en avant l'interaction de notre composé avec l'ADN. Il nous faudra ensuite évaluer l'impact des conditions réactionnelles sur la synthèse des différents adduits ainsi que leur stabilité dans le temps.

III.3. Adduits de la 6*H*-benzo[*cd*]pyrene-6-one

De nombreuses études traitent du BPO dans l'environnement ainsi que dans les aliments. Malgré cela, il est encore rarement inclus dans les études de toxicité. Quelques études démontrent bien que son caractère mutagène et sa génotoxicité sont élevés et qu'il est nécessaire de l'intégrer dans les prochaines études. Comme pour la 1,2-NphQ et le BAQ, nous allons ici étudier la formation des adduits entre le BPO et l'ADN dans le contexte du concept du MoA.

III.3.1. Article n°5: Synthesis and characterization of new DNA adduct with oxy-PAH: stable deoxyguanosine adducts of 6H-benzo[cd]pyrene-6-one (à soumettre dans Analytica Chimica Acta).

Synthesis and characterization of new oxy-PAH-DNA adduct: stable deoxyguanosine adducts of 6H-benzo[cd]pyren-6-one.

Adeline Clergé¹, Jérémie Le Goff², Claire Lopez-Piffet^{1,4}, Stéphanie Lagadu^{1,3,4}, Isabelle Vaudorne¹, Raphaël Delépée^{1,3,4}

(1) Normandie Univ, UNICAEN, UNIROUEN, ABTE, Caen, France

(2) ADn'tox SAS, Caen, France

(3) Comprehensive Cancer Center François Baclesse, UNICANCER, Caen, France

(4) PRISMM, Plateforme de Recherche et d'Innovation en Spectrométrie de Masse et Métabolomique, ICORE, Caen, France

** Corresponding author:*

raphael.delepee@unicaen.fr

Comprehensive Cancer Center François Baclesse, UNICANCER, Caen, France

3 avenue Général Harris, 14032 Caen Cedex 05, France

+33 2 31 45 51 13

Abstract

DNA adducts are considered as particularly relevant biomarkers of genotoxicity because they are specific of the structure of the genotoxic compound and seems to be at the origin of mutagenic process. Concerning polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), most studies about toxicity have demonstrated that mutagenic activity of the 16 priority PAHs is not representative of the mutagenic activity of the whole PAHs class. Now, other compounds such as oxygenated-PAHs (oxy-PAHs) or nitrated PAH (nitro-PAHs) are frequently integrated in study and have been shown as responsible of a large part of the total PAHs toxicity. According to these results, four oxy-PAHs selected as priority compounds were selected on both criteria of environmental occurrence and suspected genotoxicity for human. Among these compounds, 6*H*-benzo[*cd*]pyren-6-one (BPO) is of particular interest because it has been detected in the different compartments of the environment and has been found to be a strong tumor indicator. Based on previous studies on oxy-PAHs, the electrophilic character of BPO could allow its interaction with DNA to form adducts. In this study, synthesis and identification of BPO-DNA adducts was realized for the first time thanks to ³²P post-labelling and ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS).

1. Introduction

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) are major concerns about environmental pollution. Generally, the 16 priority list created by the U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) is used for monitoring of human and environmental exposure (M. Huang *et al.* 2012; Sen *et al.* 2012; M. Huang, Blair, and Penning 2013). However, some studies demonstrated that mutagenic activity of the priority list was not representative of the mutagenic activity of the whole PAHs class (Umbuzeiro *et al.* 2008). In this category of compounds, some derivatives such as nitrated PAHs (nitro-PAHs) and oxygenated PAHs (oxy-PAHs) are regularly detected in the environment and can contributed to the toxicity (IARC 2010; Andersson and Achten 2015). Among these derivatives, nitro-PAHs were the most commonly studied concerning their occurrence, fate and effects (Arlt 2005; Miller-Schulze *et al.* 2016). Oxy-PAHs have been neglected for a long time. Despite being detected at concentrations higher than those of nitro-PAHs and of the same order of magnitude as unsubstituted PAHs, toxicological data are still missing (B. Huang *et al.* 2014; C. Wei *et al.* 2015; Tomaz *et al.* 2016).

In order to evaluate the impact of these compounds on Human health, four oxy-PAHs were selected as priority in recent review (Clergé *et al.* 2019). Among these compounds, 6*H*-benzo[*cd*]pyren-6-one (BPO, C₁₉H₁₀O, CAS: 3074-00-8, molecular weight: 254.3 g/mol) was chosen due to its environmental occurrence and toxicity for human.

Many studies deal with occurrence of BPO in air (Wingfors, Hägglund, and Magnusson 2011; S. Wei *et al.* 2012; Nocun and Schantz 2013), in water and sediments (Grifoll, Solanas, and Bayona 1992; Kurihara *et al.* 2005; Layshock, Wilson, and Anderson 2010) and in soils (A. Mattsson, Lundstedt, and Stenius 2009). Humans can also be exposed to this compound by ingestion of food contaminated by the environment, by storage technique or by cooking process. Human exposure to this compound may also happen by ingestion of contaminated food, by method used for storage of food or by process of cooking (Layshock, Wilson, and Anderson 2010; Bandowe *et al.* 2014; Abdel-Shafy and Mansour 2016). This contamination results in a daily exposure which can cause serious health issues.

The carcinogenic risk of a compound can be rely to its Mode of Action (MoA). The MoA concept correspond to a sequence of key events starting with interaction of toxic compound with cells resulting in biological consequences and leading to formation of a pathology (Boobis *et al.* 2009). Genotoxicity and mutagenicity are considered as important key events for the evaluation of the carcinogenic risk. However, few study deal with the toxic character of BPO. Mutagenicity was demonstrated in two studies separated by few years. By the use of *Salmonella thyphimurium* strains, a slightly positive result was obtained with and without metabolic activation (Moller, Hagen, and Ramdahl 1985). A second study confirmed this mutagenicity on Human B lymphoblastoid cell lines (Durant *et al.* 1996). Mechanism of toxicity can be due to the induction of enzymes involved in the metabolism process of carcinogenic compounds. The exposure of 4 different cellular models (Human liver cancer cell line (HepG2), human keratinocyte cell line (HaCat), mouse hepatoma cell line (H1L1), and rat hepatoma cell lines (H4IIE)) demonstrate that BPO is an agonist of AhR receptor and an inhibitor of CYP1A1 (Misaki, Matsui, and Matsuda 2007a; Misaki *et al.* 2007b; Larsson *et al.* 2014; Wincent, Bihanic, and Dreij 2016). Inhibition of this cytochrome may result in BPO build-up in the organism thereby increasing its bioavailability. Moreover, exposure of mouse embryonic fibroblast cells to 0.001-0.05 µg/mL of BPO highlighted the high tumor promoting potential by the obtaining of a dose-response curve (Misaki *et al.* 2016).

Based on the MoA concept, the next key event includes DNA damages such as DNA adducts. BPO is an electrophilic compound which can bind to nucleophilic macromolecules such as DNA, RNA or proteins. Generally, DNA adducts are considered as one of the earliest steps in PAH carcinogenesis (Benford, Dinovi, and Setzer 2010). Some studies bring out formation of DNA adducts with quinones such as benzo[*a*]pyrene-7,8-dione and 1,2-naphthoquinone (McCoull *et al.* 1999; Balu *et al.* 2006; Saeed *et al.* 2007; M. Huang, Blair, and Penning 2013; Yao *et al.* 2016; Matsui *et al.* 2019). No studies have been carried out on DNA adducts with ketones.

The aim of this article is the study of DNA adduct formation with BPO by the ultra-sensitive ³²P post-labelling method. Then, identification was realized by analysis in mass spectrometry of analytical standards synthesized with 2'-deoxyguanosine (2'-dG).

2. Materials and methods

Chemicals, reagents, and enzyme.

BPO (purity: 99%), calf thymus DNA and dimethyl sulfoxide (DMSO), nuclease P1 from *Penicillium Citrinum*, alkaline phosphatase grade I from calf intestine, phosphodiesterase I from *Crotalus adamanteus*, deoxyribonuclease II (DNase II) type V from bovine, zinc sulfate, calcium chloride, succinic acid, urea, formic acid, lithium hydroxide, Micrococcal Nuclease, ribonuclease A and T1, buffer saturated-phenol, proteinase K, and EDTA were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). 2'-deoxyguanosine (2'-dG) was purchased from Alfa Aesar (Schiltigheim, France). Acetonitrile and water are of HPLC quality and were purchased from VWR (Fontenay-sous-bois, France). Phosphodiesterase II SPH was obtained from Worthington Biochemical Corporation (Entraigues, France). Sodium acetate and sodium chloride were provided by Merck (Darmstadt, Deutschland). Hydrochloric acid came from Carlo Erba (Val-de-Reuil, France). Carrier-free [γ -³²P] ATP (3000 Ci/mmol, 11.6 μ Ci/ μ L, use of 40.9 μ L) was obtained from Perkin Elmer (Villebon-sur-Yvette, France). T4 polynucleotide kinase (PNK) and phosphodiesterase type II (calf spleen, SPD) were purchased from Obiogen (Courbevoie, France). PEI-cellulose plastic sheets were obtained from Macherey-Nagel (Duren, Allemagne).

Covalent binding of BPO to calf thymus DNA. A volume of 6.7 μ L of a solution of BPO (14 mg, 55 μ mol) in DMSO was added to a solution of calf thymus DNA (1 mg) in water (1 mL). The reaction mixture was stirred during 72h at 37°C and submitted to DNA hydrolysis described below.

DNA hydrolysis for mass spectrometry. The first part was realized thanks to 0.05 unit of phosphodiesterase II, 5 units of DNase II and 1 unit of nuclease P1 in MNSPDE buffer (composed of succinic acid and zinc sulfate). This reaction mixture was incubated during two hours at 37°C. The second part of hydrolysis was realized by the use 0.03 unit of phosphodiesterase I in Palk buffer (which is composed of EDTA and trizma base) and 4.6 units of phosphatase alkaline. The reaction mixture was incubated during 2h at 37°C and stopped thanks to HCl at 0.1 M. The use of sodium chloride 5 mM and cold ethanol allowed to precipitate non-hydrolyzed DNA and proteins. Nucleosides stay in the supernatant (Genies *et al.* 2013).

DNA hydrolysis for ³²P-postlabelling and analysis. DNA adduct measurement were performed using a ³²P-postlabelling protocol based on previous protocol (Le Goff *et al.* 2006). Benzo[*a*]pyrene (BaP) was selected as reference. Briefly, 5 µg of DNA were digested by micrococcal nuclease and SPD during 3.5 h at 37°C. Enrichment of adducts was realized by use of nuclease P1 during 45 min at 37°C and stopped by addition of Tris-base. Adduct labelling step was performed during 30 min at 37°C by addition of 10 units of PNK with 25 µCi ³²P-γATP per sample. Separation of DNA adducts was realized thanks to thin layer chromatography (TLC) on 12 cm x 12 cm PEI-cellulose plates. Four migration solvents were used successively: 1M sodium phosphate, pH 6.0; 8.5 M urea with 4.5 M lithium formate, pH 3.5; 8.5 M urea with 0.5 M Tris-HCl and 1.6 M lithium chloride, pH 8; 1 M sodium phosphate, pH 6.8. Autoradiograms were obtained after exposure of TLC-plates to Kodak Biomax films during 24h at -80°C with intensifying screens. Samples were analyzed at least three times or more in case of discordant results.

Quantitative analysis was based on the ratio between radioactive intensity of the spots revealing adducts and radioactive intensity produced by a known quantity of labeled nucleotides (Gupta, Reddy, and Randerath 1982) . Most of the time, results are expressed in “Relative adducts Level” and can be calculated according to the following equation:

$$RAL = \frac{cpm\ adducts}{cpm\ nucleotides\ N \times\ dilution\ factor} \quad \text{Equation}$$

cpm: counts per minute

Reaction of BPO with 2'-dG in DMSO. In a round bottom flask equipped with a magnetic stirrer, a solution of BPO (14 mg, 55 µmol) in DMSO (5 mL) was added to a solution of 2'-dG (11 mg,

40 μmol) in DMSO (5 mL) at room temperature. The reaction mixture was stirred during 72 hours at the same temperature. Analysis was performed on UHPLC-MS/MS as described above.

Reaction of BPO with 2'-dG in water. In a round bottom flask equipped with a magnetic stirrer, 10 μL of a solution of BPO (14 mg, 55 μmol) in DMSO was added to a solution of 2'-dG (2 mg, 7.5 μmol) in water (12 mL) at room temperature. The reaction mixture was stirred at the same temperature during 72 hours.

Ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS).

Samples were analyzed on a UHPLC Shimadzu NexeraX2 system equipped with a LC-MS 8030plus triple quadrupole system (Shimadzu, Kyoto). The 2 μL injections were performed on a Waters Acquity UPLC[®] HSS C18 SB column (1,8 μm , 1 mm x 150 mm) thermostated at 30°C. Samples were eluted isocratically with 95% of CH_3CN in water which contain 0.5 mM of citric acid (to avoid chelation in the column) with a flow rate of 0.1 mL/min. The instrument was operated in positive electrospray ionization mode and all aspects of analysis were controlled using LabSolutions software (Shimadzu). Ionization was performed with the following settings: capillary voltage 4 kV; cone voltage 10-20 V; source block temperature 200°C; DL temperature 185°C with a nitrogen flow (desolvation gas) of 3L/min and an argon flow (collision gas) of 15 L/min.

UHPLC-IMS/HRMS/MS. Structure confirmation was realized with a Waters Acquity UPLC I-Class system coupled with a Vion IMS QTof mass spectrometer. The 2 μL injection were performed on a Waters UPLC HSS C18 SB column (1.8 μm , 1 mm x 150 mm) with a flow rate of 0.2 mL/min. The column was thermostated at 40°C during analysis. Samples were eluted in 8 min in gradient elution mode with water containing 0.1% of formic acid and acetonitrile with 0.1% of formic acid. The instrument was operated in positive electrospray ionization mode and UNIFI Scientific Information system was used for data acquisition and processing. Mass spectrometry conditions were: capillary voltage 1.5 kV, cone voltage 40 V, cone gas flow 50 L/h, source temperature 90°C, source offset 80 V, desolvation gas temperature 350°C and desolvation gas flow 800 L/h. Nitrogen was used as desolvation and collision gas.

3. Results

³²P post-labelling

The first technic used for study DNA adducts with BPO is post-labelling. In order to obtain a homogeneous solution, DNA at a concentration of 1 mg/mL was agitated during 2 days at 37°C. A volume of 6.7 µL of BPO solution (55 µmol in DMSO) was added to DNA and incubated at 37°C during 72h. After an enzymatic hydrolysis, the possible adducts were radiolabeled and separated by the use of a two-dimension thin layer chromatography. The obtained autoradiograms are shows in figure 1. Eight spots corresponding to different adducts were detected. To quantify every spots, a ratio was calculated between radioactive intensity of the spots revealing adducts and radioactive intensity detected for a known quantity of labeled nucleotides. This ratio was called "Relative Adducts Levels" (RAL, Gupta, Reddy, and Randerath 1982).

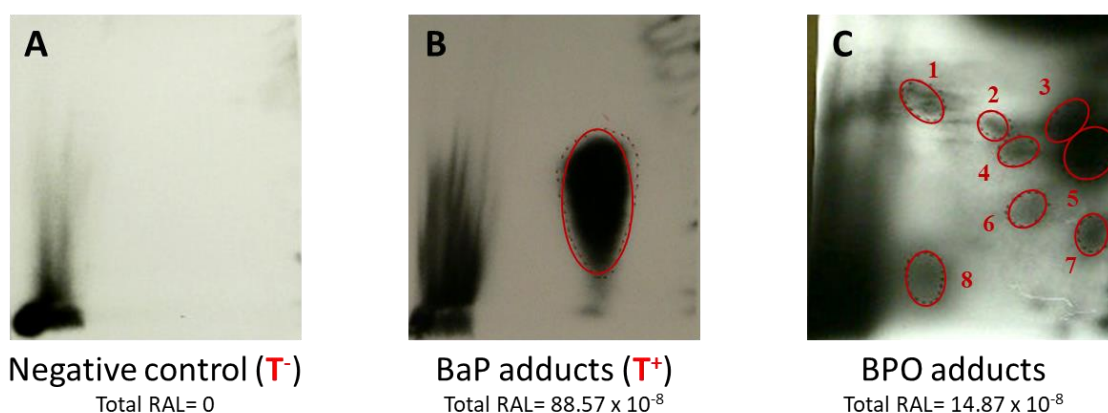


Figure 1. Autoradiograms obtained by ³²P post-labelling for (A) blank, (B) BaP adducts and (C) BPO adducts on calf thymus DNA.

Table 1. RAL obtained for each spots by ³²P post-labelling analysis.

Spot	RAL	Percent
1	1.31	8.82
2	0.49	3.30
3	3.77	25.37
4	0.76	5.12
5	4.22	28.40
6	1.13	7.60
7	1.74	11.71
8	1.45	9.76
Total	14.86	100.08

Synthesis of standards and analysis by HPLC-UV and UHPLC-MS/MS

Adducts identification required synthesis of standards. The synthesis of 2'-dG adducts was performed by the use of 55 μmol of BPO with 40 μmol of 2'-dG in DMSO at room temperature during 72h. In the same way, adducts were synthesized in water thanks to 10 μL of a solution of BPO (55 μmol in DMSO) and 7.5 μmol of 2'-dG. These syntheses were analyzed by UHPLC-IMS/HRMS/MS (conditions are described in section 2). The obtained mass spectra were presented in figure 2.

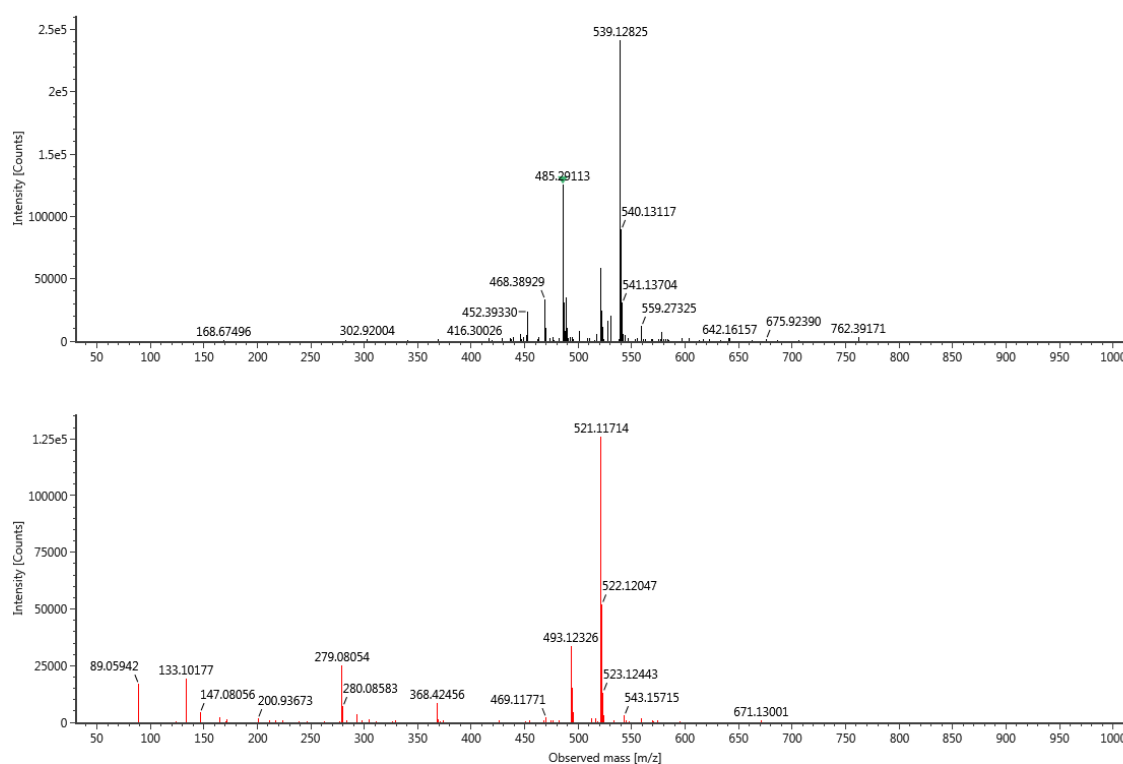


Figure 2. UHPLC-IMS/HRMS/MS spectra of BPO-dG adducts synthesized in DMSO.

In DMSO, one DNA adduct has been identified. By the use of HRMS, the exact mass of sodium adduct was obtained and correspond to m/z 542.1429. After comparison with the theoretical mass of this adduct, an error of -1.1 mDa was obtained, allowing validation of the corresponding chemical formula: $\text{C}_{29}\text{H}_{21}\text{N}_5\text{O}_5$.

4. Discussion

Many studies deal with occurrence of BPO in the different compartment of the environment (Clergé *et al.* 2019). This chronic exposure results in the appearance of toxicity for living organisms. Although DNA adducts are considered as one of the earliest steps in carcinogenesis,

few studies worked on DNA adduct formation with oxy-PAHs. Recent studies demonstrated the formation of adducts with *ortho*-quinones such as benzo[*a*]pyrene-7,8-dione and 1,2-naphthoquinone (McCoull *et al.* 1999; Saeed *et al.* 2007; Matsui *et al.* 2019). No study worked on DNA adducts formation with ketones. In order to study DNA adducts formation, calf thymus DNA was exposed to BPO during 72 hours. After DNA hydrolysis (described in section 2), samples were analyzed by ³²P-postlabelling method. A comparison with the RAL of the reference, BaP (14.87.10⁻⁸ for 88.57.10⁻⁸) observed in figure 1, demonstrated the formation of a high amounts of DNA adducts with different structures. In order to obtain a structural characterization, analytical standards were first synthesized in DMSO followed by a synthesis in water. Different structures were proposed in link with those already published (figure 3). Two were proposed by direct reaction of BPO on N² and N7 of 2'-dG. The last structure was proposed as a 2'-deoxyxanthosine (2'-dX) adduct. Previous studies have demonstrated that 2'-dG could spontaneously be deaminated to form 2'-dX which possess similar reactive sites than 2'-dG (Uddin *et al.* 2011).

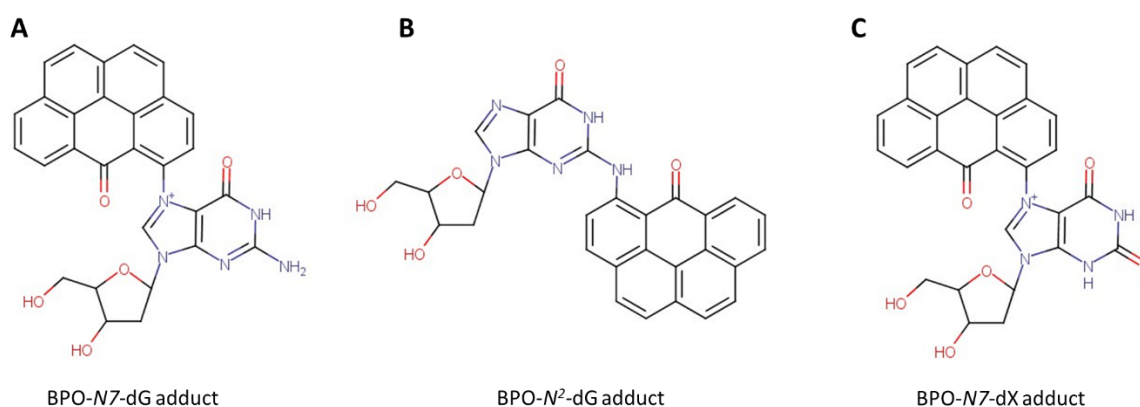


Figure 3. Structure proposal for BPO adducts.

The use of HRMS device allowed elucidation of adduct structure by the obtaining of an exact mass. In DMSO, one sodium adduct ($[M+Na^+]$) has been identified with a mass of m/z 542.1429 (table 2). The small observed error associated to the exact experimental mass could allow to validate the structure associated to the form B of figure 3. To confirm this structure, analysis of the “cross collision section” (CCS) was realized (table 2). The CCS is specific of one compound. It represents physicochemical properties of the molecule and give information on mass and structure (Joshi *et al.* 2018). Moreover, CCS values reliable and consistent, regardless of matrix or concentration. Similarly to exact mass, the small error observed between theoretical

(determined by the use of “MetCCS Predictor Result” website) and experimental CCS allow to validate the structure B (figure 3).

Table 2. Exact masse and cross collision section obtained for [M+Na⁺] adduct in HRMS.

		Exact mass (m/z)	Error (mDa)	CCS (Å ²)	Error (Å ²)
m/z 542	Theoretical	542.1440	-1.1	223.70	-0.03
	Experimental	542.1429		223.67	

5. Conclusion

In this study, characterization of BPO DNA adducts was realized for the first time. The use of HRMS allow to validate the formation of adduct on N² position of BPO by 1,4-Michael addition. This structure was similar to those published concerning other oxy-PAHs and metabolites of PAHs (McCoull *et al.* 1999; Saeed *et al.* 2007; Matsui *et al.* 2019). In association with other addition products, these adducts could be used as biomarkers of exposure to BPO in environmental and toxicological studies.

Acknowledgment

Authors would like to thank Dr. Carla Delépée for her profound insight into the linguistic part of present work and instructive discussion concerning the factual content. Adeline Clergé is grateful to the French Ministry of Education and Research for her Ph.D. fellowship.

References

- Abdel-Shafy, H. I., and M. S. M. Mansour. 2016. “A Review on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Source, Environmental Impact, Effect on Human Health and Remediation.” *Egyptian Journal of Petroleum* 25 (1): 107–23. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>.
- Andersson, J. T., and C. Achten. 2015. “Time to Say Goodbye to the 16 EPA PAHs? Toward an Up-to-Date Use of PACs for Environmental Purposes.” *Polycyclic Aromatic Compounds* 35 (2–4): 330–54. <https://doi.org/10.1080/10406638.2014.991042>.
- Arlt, V. M. 2005. “3-Nitrobenzanthrone, a Potential Human Cancer Hazard in Diesel Exhaust and Urban Air Pollution: A Review of the Evidence.” *Mutagenesis* 20 (6): 399–410. <https://doi.org/10.1093/mutage/gei057>.

- Balu, N., W. T. Padgett, G. B. Nelson, G. R. Lambert, J. A. Ross, and S. Nesnow. 2006. "Benzo[a]pyrene-7,8-Quinone-3'-mononucleotide Adduct Standards for ³²P Postlabeling Analyses: Detection of Benzo[a]pyrene-7,8-Quinone-Calf Thymus DNA Adducts." *Analytical Biochemistry* 355 (2): 213–23. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.05.023>.
- Bandowe, B. A. M., M. Bigalke, L. Boamah, E. Nyarko, F. K. Saalia, and W. Wilcke. 2014. "Polycyclic Aromatic Compounds (PAHs and Oxygenated PAHs) and Trace Metals in Fish Species from Ghana (West Africa): Bioaccumulation and Health Risk Assessment." *Environment International* 65 (April): 135–46. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.12.018>.
- Benford, D., M. Dinovi, and R. W. Setzer. 2010. "Application of the Margin-of-Exposure (MoE) Approach to Substances in Food That Are Genotoxic and Carcinogenic E.g.: Benzo[a]pyrene and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 48 Suppl 1 (January): S42-48. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.039>.
- Boobis, A. R., G. P. Daston, R. J. Preston, and S. S. Olin. 2009. "Application of Key Events Analysis to Chemical Carcinogens and Noncarcinogens." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49 (8): 690–707. <https://doi.org/10.1080/10408390903098673>.
- Clergé, A., J. Le Goff, C. Lopez, J. Ledauphin, and R. Delépée. 2019. "Oxy-PAHs: Occurrence in the Environment and Potential Genotoxic/Mutagenic Risk Assessment for Human Health." *Critical Reviews in Toxicology* 49 (September). <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408444.2019.1605333>.
- Durant, J. L., W. F. Busby, A. L. Lafleur, B. W. Penman, and C. L. Crespi. 1996. "Human Cell Mutagenicity of Oxygenated, Nitrated and Unsubstituted Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Associated with Urban Aerosols." *Mutation Research/Genetic Toxicology* 371 (3): 123–57. [https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(96\)90103-2](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(96)90103-2).
- Genies, C., A. Maître, E. Lefèbvre, A. Jullien, M. Chopard-Lallier, and T. Douki. 2013. "The Extreme Variety of Genotoxic Response to Benzo[a]pyrene in Three Different Human Cell Lines from Three Different Organs." *PLoS ONE* 8 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078356>.
- Grifoll, M., A. M. Solanas, and J. M. Bayona. 1992. "Bioassay-Directed Chemical Characterization of Genotoxic Agents in the Dissolved and Particulate Water Phases of the Besos and Llobregat Rivers (Barcelona, Spain)." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 23 (1): 19–25. <https://doi.org/10.1007/BF00225991>.

Gupta, R. C., M. V. Reddy, and K. Randerath. 1982. "32P-Postlabeling Analysis of Non-Radioactive Aromatic Carcinogen--DNA Adducts." *Carcinogenesis* 3 (9): 1081–92. <https://doi.org/10.1093/carcin/3.9.1081>.

Huang, B., M. Liu, X. Bi, C. Chaemfa, Z. Ren, X. Wang, G. Sheng, and J. Fu. 2014. "Phase Distribution, Sources and Risk Assessment of PAHs, NPAHs and OPAHs in a Rural Site of Pearl River Delta Region, China." *Atmospheric Pollution Research* 5 (2): 210–18. <https://doi.org/10.5094/APR.2014.026>.

Huang, M., I. A. Blair, and T. M. Penning. 2013. "Identification of Stable Benzo[a]pyrene-7,8-Dione-DNA Adducts in Human Lung Cells." *Chemical Research in Toxicology* 26 (5): 685–92. <https://doi.org/10.1021/tx300476m>.

Huang, M., X. Liu, S. S. Basu, L. Zhang, M. E. Kushman, R. G. Harvey, I. A. Blair, and T. M. Penning. 2012. "Metabolism and Distribution of Benzo[a]pyrene-7,8-Dione (B[a]P-7,8-Dione) in Human Lung Cells by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry: Detection of an Adenine B[a]P-7,8-Dione Adduct." *Chemical Research in Toxicology* 25 (5): 993–1003. <https://doi.org/10.1021/tx200463s>.

IARC. 2010. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans: Painting, Firefighting, and Shiftwork. Vol. 98. International Agency for Research on Cancer.

Joshi, R., A. Sharma, K. Thakur, D. Kumar, and G. Nadda. 2018. "Metabolite Analysis and Nucleoside Determination Using Reproducible UHPLC-Q-ToF-IMS in *Ophiocordyceps Sinensis*." *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 41 (15–16): 927–36. <https://doi.org/10.1080/10826076.2018.1541804>.

Kurihara, R., F. Shiraishi, N. Tanaka, and S. Hashimoto. 2005. "Presence and Estrogenicity of Anthracene Derivatives in Coastal Japanese Waters." *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (8): 1984–93. <https://doi.org/10.1897/04-310R.1>.

Larsson, M., J. Hagberg, J. P. Giesy, and M. Engwall. 2014. "Time-Dependent Relative Potency Factors for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Derivatives in the H4IIE-Luc Bioassay." *Environmental Toxicology and Chemistry* 33 (4): 943–53. <https://doi.org/10.1002/etc.2517>.

Layshock, J. A., G. Wilson, and K. A. Anderson. 2010. "Ketone and Quinone-Substituted Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mussel Tissue, Sediment, Urban Dust, and Diesel Particulate Matrices." *Environmental Toxicology and Chemistry* 29 (11): 2450–60. <https://doi.org/10.1002/etc.301>.

Le Goff, J., J. Gallois, L. Pelhuet, M. H. Devier, H. Budzinski, D. Pottier, V. André, and J. Cachot. 2006. "DNA Adduct Measurements in Zebra Mussels, *Dreissena Polymorpha*, Pallas. Potential Use for Genotoxicant Biomonitoring of Fresh Water Ecosystems." *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 79 (1): 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.05.002>.

Matsui, T., N. Yamada, H. Kuno, and R. A. Kanaly. 2019. "Formation of Bulky DNA Adducts by Non-Enzymatic Production of 1,2-Naphthoquinone-Epoxyde from 1,2-Naphthoquinone under Physiological Conditions." *Chemical Research in Toxicology*, August. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00088>.

Mattsson, A., S. Lundstedt, and U. Stenius. 2009. "Exposure of HepG2 Cells to Low Levels of PAH-Containing Extracts from Contaminated Soils Results in Unpredictable Genotoxic Stress Responses." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 50 (4): 337–48. <https://doi.org/10.1002/em.20486>.

McCoull, K. D., D. Rindgen, I. A. Blair, and T. M. Penning. 1999. "Synthesis and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon O-Quinone Depurinating N7-Guanine Adducts." *Chemical Research in Toxicology* 12 (3): 237–46. <https://doi.org/10.1021/tx980182z>.

Miller-Schulze, J. P., M. Paulsen, T. Kameda, A. Toriba, K. Hayakawa, B. Cassidy, L. Naeher, M. A. Villalobos, and C. D. Simpson. 2016. "Nitro-PAH Exposures of Occupationally-Exposed Traffic Workers and Associated Urinary 1-Nitropyrene Metabolite Concentrations." *Journal of Environmental Sciences* 49 (November): 213–21. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.06.007>.

Misaki, K., H. Kawami, T. Tanaka, H. Handa, M. Nakamura, S. Matsui, and T. Matsuda. 2007b. "Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Activity of Polycyclic Aromatic Ketones and Polycyclic Aromatic Quinones." *Environmental Toxicology and Chemistry* 26 (7): 1370–79. <https://doi.org/10.1897/06-465R.1>.

Misaki, K., S. Matsui, and T. Matsuda. 2007a. "Metabolic Enzyme Induction by HepG2 Cells Exposed to Oxygenated and Nonoxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." *Chemical Research in Toxicology* 20 (2): 277–83. <https://doi.org/10.1021/tx060197u>.

Misaki, K., T. Takamura-Enya, H. Ogawa, K. Takamori, and M. Yanagida. 2016. "Tumour-Promoting Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Oxygenated or Nitrated Derivatives." *Mutagenesis* 31 (2): 205–13. <https://doi.org/10.1093/mutage/gev076>.

Moller, M., I. Hagen, and T. Ramdahl. 1985. "Mutagenicity of Polycyclic Aromatic Compounds (PAC) Identified in Source Emissions and Ambient Air." *Mutation Research* 157 (August): 149–56. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(85\)90110-7](https://doi.org/10.1016/0165-1218(85)90110-7).

Nocun, M. S., and M. M. Schantz. 2013. "Determination of Selected Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Oxy-PAHs) in Diesel and Air Particulate Matter Standard Reference Materials (SRMs)." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (16): 5583–93. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6957-3>.

Saeed, M., S. Higginbotham, E. Rogan, and E. Cavalieri. 2007. "Formation of Depurinating N3adenine and N7guanine Adducts after Reaction of 1,2-Naphthoquinone or Enzyme-Activated 1,2-

Dihydroxynaphthalene with DNA. Implications for the Mechanism of Tumor Initiation by Naphthalene.” *Chemico-Biological Interactions* 165 (3): 175–88. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.12.007>.

Sen, S., P. Bhojnagarwala, L. Francey, D. Lu, T. M. Penning, and J. Field. 2012. “p53 Mutagenesis by Benzo[a]pyrene Derived Radical Cations.” *Chemical Research in Toxicology* 25 (10): 2117–26. <https://doi.org/10.1021/tx300201p>.

Tomaz, S., P. Shahpoury, J.-L. Jaffrezo, G. Lammel, E. Perraudin, E. Villenave, and A. Albinet. 2016. “One-Year Study of Polycyclic Aromatic Compounds at an Urban Site in Grenoble (France): Seasonal Variations, Gas/Particle Partitioning and Cancer Risk Estimation.” *The Science of the Total Environment* 565 (September): 1071–83. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.137>.

Uddin, K. M., M. H. Almatarneh, D. M. Shaw, and R. A. Poirier. 2011. “Mechanistic Study of the Deamination Reaction of Guanine: A Computational Study.” *The Journal of Physical Chemistry A* 115 (10): 2065–76. <https://doi.org/10.1021/jp1120806>.

Umbuzeiro, G. A., A. Franco, M. H. Martins, F. Kummrow, L. Carvalho, H. H. Schmeiser, J. Leykauf, M. Stiborova, and L. D. Claxton. 2008. “Mutagenicity and DNA Adduct Formation of PAH, Nitro-PAH, and Oxy-PAH Fractions of Atmospheric Particulate Matter from São Paulo, Brazil.” *Mutation Research* 652 (1): 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.12.007>.

Wei, C., Y. Han, B. A. M. Bandowe, J. Cao, R.-J. Huang, H. Ni, J. Tian, and W. Wilcke. 2015. “Occurrence, Gas/Particle Partitioning and Carcinogenic Risk of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Oxygen and Nitrogen Containing Derivatives in Xi’an, Central China.” *The Science of the Total Environment* 505 (February): 814–22. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.054>.

Wei, S., B. Huang, M. Liu, X. Bi, Z. Ren, G. Sheng, and J. Fu. 2012. “Characterization of PM_{2.5}-Bound Nitrated and Oxygenated PAHs in Two Industrial Sites of South China.” *Atmospheric Research* 109–110 (June): 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2012.01.009>.

Wincent, E., F. L. Bihanic, and K. Dreij. 2016. “Induction and Inhibition of Human Cytochrome P4501 by Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.” *Toxicology Research* 5 (3): 788–99. <https://doi.org/10.1039/C6TX00004E>.

Wingfors, H., L. Hägglund, and R. Magnusson. 2011. “Characterization of the Size-Distribution of Aerosols and Particle-Bound Content of Oxygenated PAHs, PAHs, and N-Alkanes in Urban Environments in Afghanistan.” *Atmospheric Environment* 45 (26): 4360–69. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2011.05.049>.

Yao, C., W. G. Foster, J. C. Sadeu, S. Siddique, J. Zhu, and Y. L. Feng. 2016. “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, September. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.122>.

III.3.2. Bilan sur la synthèse des adduits à la 6H-benzo[cd]pyrene-6-one

Notre étude démontre pour la première fois la formation d’adduits entre l’ADN et la 6H-benzo[cd]pyrene-6-one. Ces adduits ont tout d’abord été détectés en post-marquage au phosphore 32. Après comparaison avec le BaP, les spots obtenus démontrent la formation d’une quantité significative d’adduits de structures inconnues.

De manière à obtenir une identification structurale de ces adduits, des standards ont été synthétisés par réaction avec la 2'-deoxyguanosine et une méthode analytique a été développée en spectrométrie de masse haute résolution. L’obtention d’une masse précise et d’un CCS a permis d’identifier des adduits situés en N^2 de la 2'-deoxyguanosine.

Ces résultats préliminaires nous permettent de montrer l’interaction de notre composé avec les bases de l’ADN. Dans le but de les utiliser en tant que biomarqueurs d’exposition et d’effets précoces, il nous faudra évaluer la stabilité de ces adduits dans le temps.

III.4. Adduits à l’ADN sur cellules BEAS-2B

Dans la continuité des travaux précédents, des cellules BEAS-2B ont été exposées aux trois oxy-HAP. Le but de cette étude est donc d’évaluer la formation des adduits aux oxy-HAP dans ces cellules. Comme décrit dans le chapitre 1, les cellules possèdent différents types de mécanismes de réparation en lien avec la diversité des dommages à l’ADN. Cette analyse permettra aussi d’évaluer l’influence des mécanismes de réparation en lien avec la formation des adduit à l’ADN. Les concentrations d’expositions (tableau 4) ont été sélectionnées en fonction des résultats obtenus durant les tests de cytotoxicité (IC_{80} et IC_{50} des graphiques de la publication n°2, partie IV.2. du chapitre 2).

Concentrations (mM)	1,2-NphQ	BAQ	BPO
n°1	10	400	2,5
n°2	25	500	20

Tableau 4. Concentrations d'exposition sur cellules BEAS-2B

III.4.1. Matériel & méthodes

III.4.1.a. Culture cellulaire

Le protocole de culture cellulaire des BEAS-2B est le même que celui décrit dans la publication n°2 (chapitre 2, partie IV.2.). La seule différence repose dans le fait que les cellules ont été développées en flacon T75 (750 000 cellules par boîte). Ces cellules sont ensuite incubées à 37°C en présence de 5% de CO₂ durant 48 heures.

III.4.1.b. Exposition aux oxy-HAP.

Des solutions mères de 1,2-NphQ (10 mM, 3,16 mg dans 2 mL), de BAQ (10 mM, 5,16 mg dans 2 mL) et de BPO (10 mM, 5,09 mg dans 2 mL) sont préparées dans le DMF. La préparation des solutions filles se fait par dilution dans le milieu de culture (LHC-9). Le milieu des boîtes de culture est aspiré puis remplacé par le milieu contenant le traitement. Les boîtes contenant les différents traitements sont ensuite incubées durant 24h.

III.4.1.c. Recueil des cellules - extraction de l'ADN - hydrolyse

Suite aux 24 heures d'exposition, le traitement est stoppé par retrait du milieu contenant les oxy-HAP. Ce dernier est stocké dans un flacon afin de conserver les cellules en suspension. Le tapis cellulaire est rincé à l'aide de PBS puis trypsiné (trypsine 0,05%). L'action de la trypsine est ensuite stoppée par ajout du milieu contenant le traitement et les cellules en suspension. La solution est transférée dans un falcon puis centrifugée durant 5 minutes à 150 rpm. Le surnageant est aspiré (permettant ainsi d'ôter le traitement) puis le culot est lavé avec du PBS. Une nouvelle centrifugation permet d'éliminer le PBS puis d'obtenir un culot sec.

L'ADN des cellules BEAS-2B est ensuite extrait grâce à la méthode phénol-chloroforme-alcool isoamylique (Le Goff *et al.* 2006). Le culot d'ADN est repris dans un mélange d'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA, 1mM) et de Tris HCl (20mM)

auquel est ajouté un volume de dodécylsulfate de sodium (SDS, 10%). Ce mélange est vortexé durant 1 minute afin de remettre l'ADN en suspension. Les RNAses A et T1 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) sont ajoutées à ce mélange puis incubées durant 30 min à 37°C. La protéinase K (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) est ensuite mélangée puis incubée une heure et trente minutes à 37°C. Après incubation, un volume de phénol saturé en eau est ajouté au mélange puis vortexé durant 3 minutes. La solution est ensuite centrifugée durant 5 minutes à 5000 rpm. La phase aqueuse située dans la partie supérieure du tube est délicatement prélevée puis versée dans un tube propre. La phase organique est mélangée à un volume de CIP (correspondant à un mélange phénol – alcool isoamylique – chloroforme), vortexée durant 3 minutes puis à nouveau centrifugée. La phase aqueuse est prélevée puis ajoutée à la première.

Suite à cette extraction, l'ADN doit ensuite être précipité. Un volume de NaCl (5M) puis un volume d'éthanol froid sont ajoutés à la phase aqueuse qui est ensuite agitée par retournements successifs. La solution est centrifugée 13 minutes à 10 000 rpm afin de plaquer l'ADN au fond du tube. Le surnageant est retiré, l'ADN est séché puis un volume minimal d'eau milliQ est ajouté.

La pureté de l'ADN est vérifiée par détermination des valeurs de ratio d'absorbance : $1,8 < A_{260}/A_{280} < 1,95$ et $A_{260}/A_{280} > 2,3$. Enfin, l'ADN est hydrolysé selon le protocole décrit en partie III.1.1. du chapitre 3.

III.4.1.d. Post-marquage au phosphore 32

Le protocole de détection par post-marquage est le même que celui décrit dans les publications n°2, 3 et 4 (chapitre 2, partie IV.).

III.4.2. Résultats & discussion

Après exposition des cellules BEAS-2B, différents autoradiogrammes ont été obtenus (Figure 21). Les résultats sont exprimés en taux relatif d'adduits (RAL, Relative Adducts Levels). Cette analyse consiste à rapporter l'intensité radioactive des spots correspondant aux adduits à l'intensité radioactive produite par une quantité connue de nucléotides marqués. Contrairement aux résultats obtenus sur ADN nu, la 1,2-NphQ

semble ne pas entraîner la formation d'adduits stables détectables en post-marquage. Concernant le BAQ et BPO, une très faible quantité est observée.

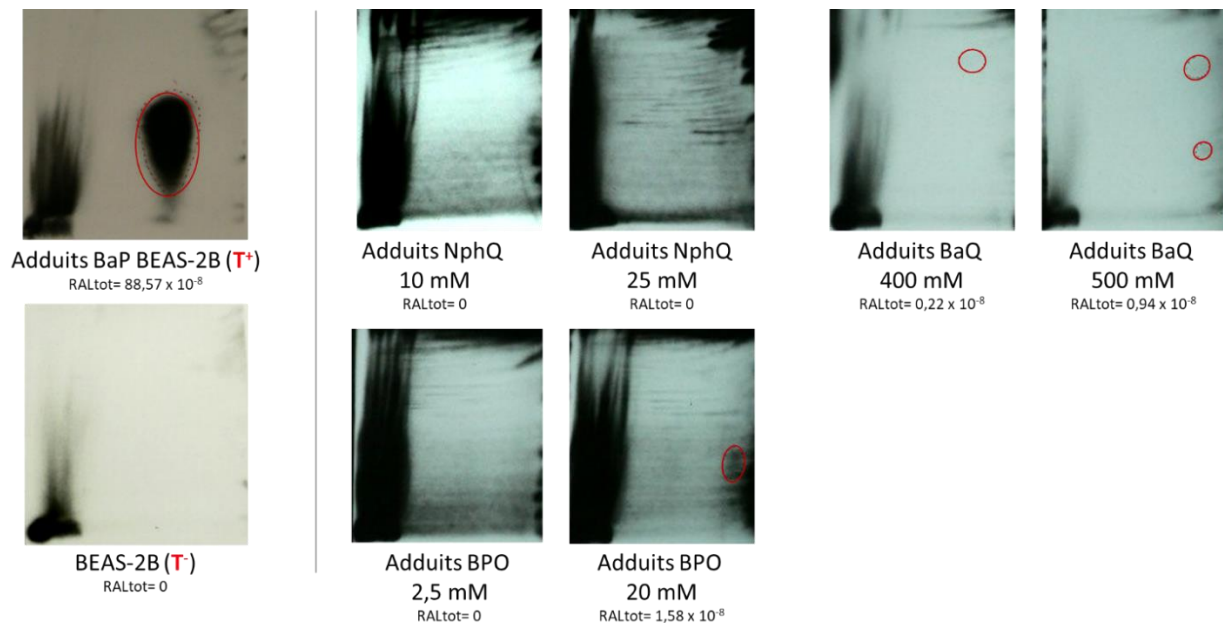


Figure 21. Résultats des analyses en post-marquage après exposition des cellules BEAS-2B aux trois oxy-HAP d'intérêt.

Ces différences peuvent être reliées à l'efficacité des systèmes de réparation des BEAS-2B. Ces systèmes peuvent entraîner l'élimination des adduits à l'ADN par formation d'adduit dépurinés, détectables dans le milieu de culture. Une future analyse en spectrométrie de masse pourrait permettre de valider, ou non, cette hypothèse.

IV. Discussion et conclusion

Le concept du MoA permet d'évaluer le risque cancérigène d'un composé en fonction de son mécanisme d'action. La formation d'adduits à l'ADN a été proposée comme l'un des premiers événements clé de ce concept. L'interaction des oxy-HAP avec les différentes bases de l'ADN entraînerait l'apparition de perturbations biologiques qui pourraient à leur tour résulter en le développement de pathologies (Figure 17). L'identification suivie de la quantification des adduits à l'ADN permettrait d'évaluer la dose biologique efficace ainsi que l'influence des mécanismes de réparation.

Dans ce chapitre, les adduits de trois oxy-HAP ont été étudiés : 1,2-NphQ, BAQ et BPO. Contrairement aux HAP, ces oxy-HAP semblent être des génotoxiques directs et ne requièrent donc aucune activation métabolique préalable. Une première analyse en post-marquage au phosphore 32 a permis de démontrer, par comparaison avec le BaP, la formation significative de plusieurs adduits de structure inconnue sur de l'ADN de thymus de veau. Afin d'obtenir une identification, des standards analytiques ont été synthétisés dans le DMF ou dans le DMSO par réaction directe avec la 2'-deoxyguanosine. Pour la première fois, les structures des différents adduits purinés ont été proposées. Ces adduits semblent se former en position N7 de la 2'-deoxyguanosine ainsi qu'en N7 de la 2'-dX suite à la désamination spontanée de la 2'-dG. ont été détectés par spectrométrie de masse. Ces mêmes adduits ont été retrouvés dans l'eau sur la 2'-deoxyguanosine libre et sur de l'ADN de thymus de veau. Contrairement au BAQ et au BPO, la 1,2-NphQ a démontré un effet solvant. L'adduit issu de la désamination de la 2'-dG s'est avéré être majoritaire dans le DMF puis minoritaire dans l'eau. De plus, l'influence de la température de réaction a été étudiée et a montré une accélération de la formation des adduits dépurinés au préjudice de la forme purinée. Ces résultats démontrent l'instabilité de la liaison osidique à l'origine des processus de réparation des adduits à l'ADN. Enfin, une exposition sur cellules BEAS-2B a permis à nouveau de démontrer la formation d'adduits en post-marquage, mais cette fois ci avec une intensité beaucoup plus faible voire même inexistante pour la 1,2-NphQ. Plusieurs hypothèses permettraient d'expliquer ce phénomène :

- Difficulté à entrer dans le noyau
- Réaction avec les protéines du cytoplasme
- Intervention des mécanismes de réparation tels que les BER ou les NER permettant d'éliminer les adduits sous forme dépurinée (Madureira *et al.* 2014)

Ce chapitre nous a donc permis de montrer la formation d'adduits stables et instables sur la 2'-dG et la 2'-dX. Ces mêmes adduits ont ensuite été détectés après exposition sur cellules BEAS-2B. Ces données montrent que ces adduits pourraient être utilisés en tant que biomarqueurs potentiels d'exposition aux oxy-HAP. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que ces biomarqueurs puissent aussi représenter l'exposition aux HAP. Une fois absorbés, la métabolisation des HAP va entraîner la formation de

métabolites tels que les quinones pouvant à leur tour réagir avec l'ADN et entraîner la formation des même adduits que ceux obtenus après réactions directe avec les oxy-HAP. Ils seraient donc considérés comme non spécifiques.

Afin de réaliser des études en population sur un nombre élevé d'échantillon, il devient important d'optimiser une des étapes de la préparation de l'échantillon : l'hydrolyse de l'ADN. Au cours de l'hydrolyse, plusieurs enzymes coûteuses sont utilisées au cours de plusieurs étapes, rendant ainsi le processus chronophage. Une solution possible serait l'immobilisation sur nanobilles magnétiques. L'utilisation de ces nanobilles magnétiques présenterait différents avantages :

- Par le biais d'un aimant, les nanobilles pourraient être récupérées à la fin de l'hydrolyse. Aucune étape de rinçage de l'ADN hydrolysé ne serait nécessaire.
- Les enzymes immobilisées pourraient être réutilisées à plusieurs reprises sans diminution considérable de l'activité enzymatique ce qui permettrait de réduire le temps et le coût de l'analyse associé à la préparation d'échantillon.

Pour ce faire, des nanobilles de type « core-shell » ont été synthétisées au laboratoire selon des protocoles publiés auparavant (Lu, Salabas, and Schüth 2007; Čampelj, Makovec, and Drogenik 2009; Salwiński *et al.* 2014; Rakhshae and Noorani 2017). Ces particules sont constituées d'un noyau magnétique à base d'oxyde de fer (magnétite, Fe_3O_4) entouré d'une couche de silice. L'utilisation du (3-aminopropyl)triéthoxysilane associée au glutaraldéhyde permet une augmentation de la capacité de greffage des nanobilles. Suite à cette synthèse, une caractérisation par microscopie électronique à balayage a permis de montrer la formation de nanobilles de taille variable (Figure 22). Cette synthèse nécessite encore des optimisations afin d'obtenir des lots de nanobilles homogènes. Par la suite, deux enzymes ont été immobilisées afin de réaliser une preuve de concept : la phosphatase alcaline et la tyrosinase. Ces enzymes ont été comparées à une protéine, l'albumine de sérum bovin (BSA), prise comme référence.

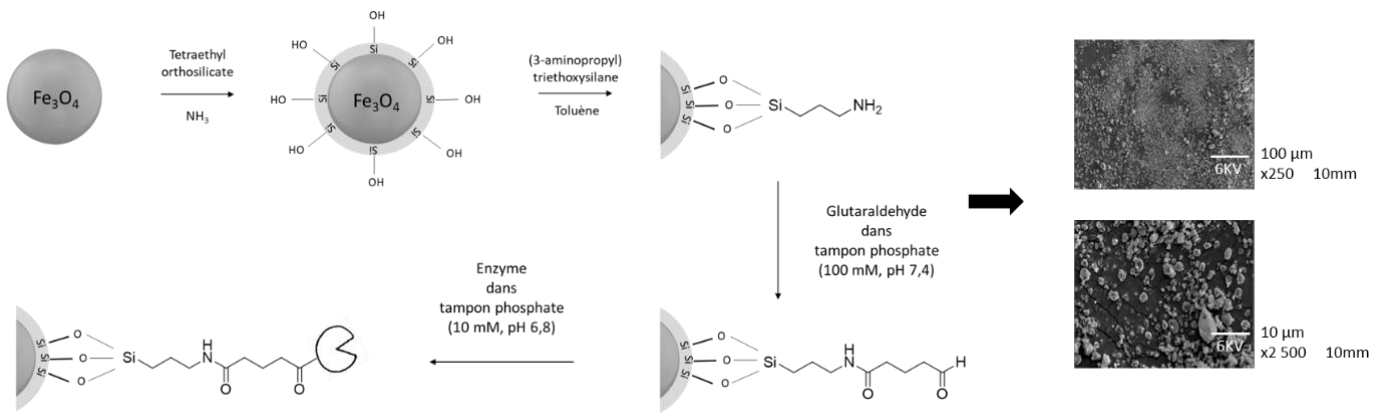


Figure 22. Synthèse des nanobilles magnétiques et caractérisation par microscopie électronique à balayage.

Les premiers résultats mettent en avant une immobilisation élevée, répétable et stable dans le temps lorsqu'elle est comparée à l'enzyme libre (parties A et B de la Figure 23). De plus, le graphique C de la Figure 23 démontre que les enzymes peuvent être utilisées jusqu'à trois fois tout en conservant au moins 50% de leur activité enzymatique. Ces premiers résultats sont prometteurs pour une future immobilisation des enzymes impliquées dans le processus d'hydrolyse de l'ADN et devront être complétés par la suite.

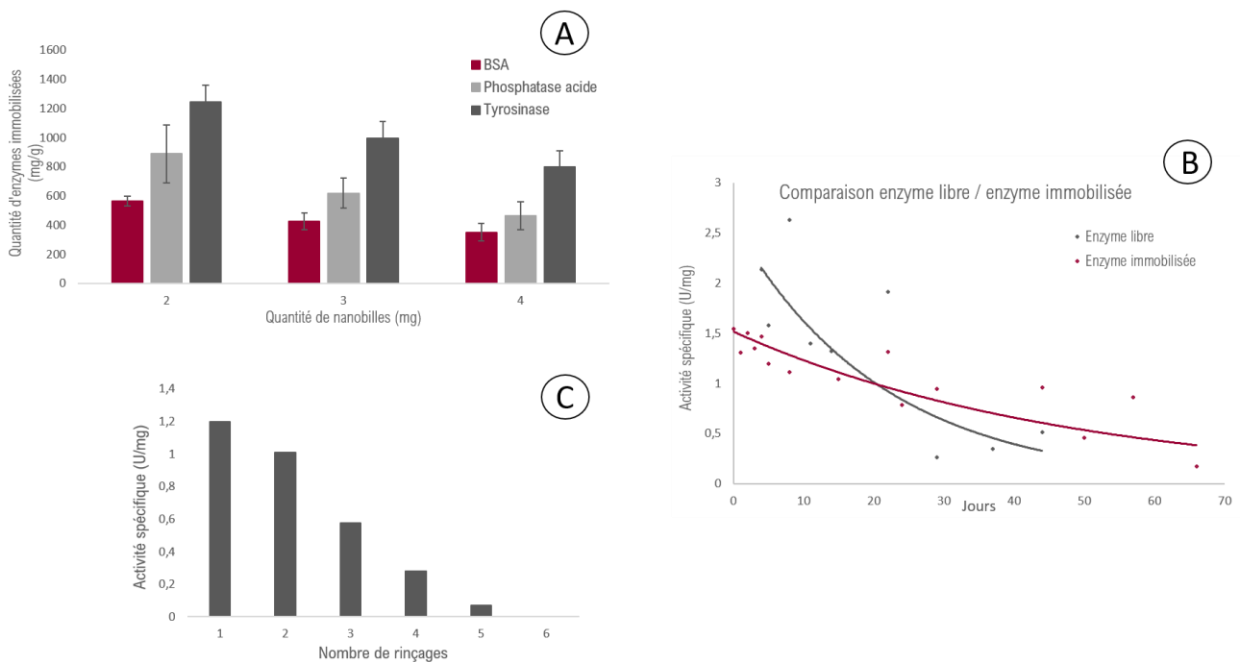


Figure 23. Résultats de l'immobilisation des enzymes sur nanobilles magnétiques. **A)** histogramme représentatif de la quantité d'enzyme/protéine par milligramme de nanobilles **B)** Comparaison de la conservation de l'activité enzymatique de l'enzyme immobilisée par rapport à l'enzyme libre dans le temps **C)** Conservation de l'activité de l'enzyme libre en fonction du nombre de passages.

Discussion générale

Discussion générale

Au cours des dernières décennies, le développement industriel associé à d'autres facteurs tels que la généralisation des véhicules personnels a engendré l'apparition d'une pollution chimique complexe présente dans les eaux, les sols et l'air (Holgate *et al.* 1999). Parmi les polluants recensés, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) constituent une large famille très répandue dans les différents compartiments de l'environnement, représentant une préoccupation majeure en terme de santé humaine et environnementale. Suite à la remise en question de la liste des seize HAP prioritaires, supposée représenter l'ensemble des HAP quant à leur toxicité pour l'homme, des composés tels que les oxy-HAP ont intégré un nombre croissant d'études. Ainsi, lorsque ces dérivés substitués des HAP sont recherchés dans l'environnement, ils sont détectés à des concentrations voisines de celles des HAP et, par la même occasion, bien supérieures à celles des nitro-HAP, autre classe de HAP substitués dont l'intérêt en toxicologie environnementale est apparu plus précocement. Une exposition chronique à ces polluants pourrait entraîner le développement de pathologies résultant d'un ensemble de mécanismes biologiques complexes (Boobis *et al.* 2009). Le Dr Kurt Straif, responsable de la section des monographies du CIRC, a souligné que « l'air que nous respirons est pollué par un mélange de substances cancérigènes » (communiqué de presse n°221, CIRC, 17 octobre 2013). Nous savons maintenant que la pollution de l'air extérieur est l'une des premières causes environnementales de décès par cancer. La caractérisation et la mesure précise de l'exposition des populations aux contaminants de l'environnement est donc un point crucial dans l'évaluation du risque de survenue de différentes pathologies telles que certains cancers par exemple. Jusqu'à ce jour, peu de données concernant le risque cancérigène des oxy-HAP étaient disponibles dans la littérature. L'une des méthodes d'évaluation de ce risque consiste en une meilleure compréhension des mécanismes d'actions biologiques (depuis le niveau cellulaire jusqu'à l'échelle de l'organisme entier), au travers du concept MoA (Figure 7).

Au cours de mon travail de thèse, 7 oxy-HAP considérés comme prioritaires ont été sélectionnés selon des critères de présence dans l'environnement et de possible

toxicité pour l'homme. Ces oxy-HAP prioritaires possèdent une diversité de structures chimiques représentative d'un large panel d'oxy-HAP, en particulier des quinones et des cétones α,β -insaturées. De ce travail résulte une analyse méthodique de l'ensemble de la littérature dans ce domaine, faisant l'objet d'une revue scientifique (Clergé *et al.* 2019). Comme indiqué précédemment, l'une des méthodes pertinentes permettant l'évaluation du risque d'altération de la santé chez l'homme consiste à étudier les perturbations biologiques liées à l'exposition à ces composés. L'approche *in vitro*, sur des modèles cellulaires pertinents, peut donc apporter des informations précieuses à ce sujet.

Avant toute étude des mécanismes d'action *in vitro* associés à cette famille chimique, il s'est avéré nécessaire d'évaluer la cytotoxicité résultant de l'exposition aux oxy-HAP sur des cellules épithéliales bronchiques humaines dites BEAS-2B. Le choix de cette lignée cellulaire repose sur le fait qu'elle concerne l'un des premiers tissus impacté par l'exposition aérienne aux oxy-HAP. Ce modèle cellulaire permet de représenter au mieux les interactions probables entre l'épithélium pulmonaire et les oxy-HAP. Les premiers résultats obtenus par utilisation du test MTS mettent en avant la toxicité de ces composés malgré les petits artefacts générés par le test en lui-même (Wang, Henning, and Heber 2010), confirmant certaines données de la littérature. Une étude en cytométrie en flux suivi d'un test d'évaluation de la mort cellulaire (test CellTox™ Green) a permis de montrer que l'exposition au **BAQ** et au **BPO** entraînait un ralentissement plus ou moins important du cycle cellulaire en phase G0-G1 associé à l'apparition d'une mort cellulaire dose-dépendante. Une quantification cinétique des caspases-3/7 nous permettra ensuite de démontrer que cette mort cellulaire correspond à de l'apoptose. Concernant les cinq autres oxy-HAP, après comparaison avec le témoin, de simples ralentissements dans le cycle ont été observés associés à un ralentissement de la croissance (observé par la mesure de la confluence). Ces composés se sont donc avérés être cytotoxiques selon des mécanismes d'action différents pouvant passer par la génération de ROS (espèces réactives de l'oxygène) durant leur métabolisation et/ou la production d'adduits à l'ADN et aux protéines par addition de Michael.

Selon le concept du MoA, l'interaction des composés toxiques avec l'ADN peut résulter en l'apparition de dommages à l'ADN pouvant conduire en la formation de mutations délétères dans certains gènes critiques dont le dysfonctionnement est à

l'origine du processus de transformation cellulaire (Figure 7). L'utilisation du test d'Ames a permis de démontrer que les composés d'une même famille pouvaient posséder des mécanismes d'action mutagènes différents :

- **BAQ** et **9,10-AQ** : activité mutagène en l'absence d'activation métabolique. Cette activité peut être dû à l'activité redox associée aux composés carbonylés (entraînant la formation de dommages oxydatifs, Patrinely, Clifford, and Ioannides, 1996) ou à la formation d'adduits stables avec l'ADN conduisant à l'apparition de mutations.

- **1,2-NphQ**, **BPO** et **BANTone** : activité mutagène en présence et en absence d'activation métabolique. Une activité mutagène observée à des concentrations d'exposition plus élevées en présence d'activation métabolique pourrait être liée à la présence de glutathion réduit et de glutathion-S-transférase dans le mélange composant l'activateur métabolique (Summer, Göggelmann, and Greim 1980). La conjugaison au glutathion réduit participant aux processus de détoxification des cellules, il pourrait donc être nécessaire d'avoir une plus forte concentration en agent toxique pour obtenir une mutagénicité équivalente à celle observée sans S9.

- **NCQ** et **B[b]FO** : activité mutagène uniquement en présence d'une activation métabolique, suggérant que ces oxy-HAP ne sont pas les composés finaux à l'origine du caractère mutagène observé.

Ces résultats sont en accord avec la nécessité de se préoccuper des conséquences liées à l'exposition chronique aux oxy-HAP. Le caractère cytotoxique et mutagène semble être la conséquence biologique des lésions à l'ADN telles que les adduits (Figure 17). Différentes études ont montré la relation entre la formation d'adduits, la survenue de mutations et le développement de cancers (Miller 1951; Brookes and Lawley 1964; Nesnow *et al.* 1995). Afin d'explorer cette possible relation cause-effet, il devient donc nécessaire de pouvoir détecter, caractériser et quantifier ces adduits à l'ADN. Au cours de ce travail, les adduits de trois oxy-HAP ont été étudiés. Une première analyse en post-marquage au phosphore 32 a permis de démontrer que l'exposition d'un ADN de thymus de veau aux différents oxy-HAP entraînait la formation d'une quantité significative d'adduits à l'ADN (publication n°3, 4 et 5). Afin d'élucider la structure de ces adduits, des standards analytiques ont été synthétisés dans le DMF puis dans l'eau sur l'une des bases la plus réactive de l'ADN, la 2'-dG. Différents adduits purinés et dépurinés ont été obtenus

puis caractérisés pour la première fois par spectrométrie de masse, par réaction directe avec la 2'-dG ou après désamination de la 2'-dG en 2'-dX. Au final, ces adduits pourraient être utilisés comme biomarqueurs concernant :

- L'évaluation de l'exposition des populations aux différents oxy-HAP
- Les cinétiques de formation et d'élimination des adduits à l'ADN.

Associée aux résultats obtenus concernant les tests de cytotoxicité et de mutagénicité, la synthèse de ces adduits à l'ADN nous permet d'obtenir des informations pertinentes sur le mécanisme d'action de trois de nos sept oxy-HAP d'intérêt. Ainsi, l'exposition des BEAS-2B à la **1,2-NphQ** a entraîné l'apparition d'une cytotoxicité. Cette exposition n'entraîne pas de mort cellulaire mais résulte plutôt en un ralentissement dans la croissance cellulaire potentiellement attribuable à l'existence de dommages à l'ADN et à la nécessité pour la cellule de les réparer. D'un point de vue génotoxique, la formation d'adduits a été observée sur de l'ADN de thymus de veau selon différentes conditions réactionnelles. Il est tout à fait envisageable que de tels adduits puissent être associés à l'activité mutagène observée sur les souches de *Salmonella Typhimurium*. Toutefois, lorsque cette exposition est réalisée sur des cellules BEAS-2B, les adduits à l'ADN ne sont alors plus détectés en post-marquage. Tous ces résultats nous permettent de formuler l'hypothèse d'une possible réparation des dommages causés par l'exposition à la 1,2-NphQ résultant ainsi en un très faible niveau d'adduits dans les cellules eucaryotes ou d'une possible réactivité avec les protéines du cytoplasme. Plusieurs études ont démontré la réparation rapide des adduits au BaP et au BPDE sur des cellules de hamsters et de souris (cellules CHO et BALB/c, Nakayama, Yuspa, and Poirier 1984; MacLeod *et al.* 1991). Concernant le **BAQ** et le **BPO**, un comportement similaire a été obtenu. L'exposition à ces oxy-HAP entraîne l'apparition d'une cytotoxicité associée à une activité mutagène et à une mort cellulaire par apoptose. Comme la 1,2-NphQ, des adduits ont été obtenus sur la 2'-dG et sur l'ADN de thymus de veau. Mais, contrairement à la 1,2-NphQ, lorsque les adduits sont étudiés en post-marquage sur les cellules BEAS-2B, un niveau résiduel d'adduits est observé. De plus, la quantité de cellules viables récupérée à la fin de l'analyse est plus faible que celle du témoin. Ces résultats démontrent une possible association entre les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN et l'élimination des dommages persistants par apoptose.

Tous ces résultats démontrent donc que le mode d'action d'un oxy-HAP en particulier ne peut pas être généralisé à l'ensemble de la famille chimique. Chaque oxy-HAP sélectionné a démontré avoir un mode d'action particulier en lien avec ses paramètres physico-chimiques tels que sa structure, son poids moléculaire, sa solubilité. La sélection des 7 oxy-HAP considérés comme prioritaires a permis d'étudier des composés de structures chimiques diverses (*ortho*-quinones, *para*-quinones et cétones) et de regrouper des données préliminaires représentatives du possible mode d'action de ces composés.

Dans la perspective d'une utilisation de ces adduits dans les études de biomonitoring à haut débit, les différentes étapes d'extraction, d'hydrolyse, de purification et d'analyse doivent en particulier être optimisées. La dernière partie de cette thèse a porté sur une étude de faisabilité d'automatisation de l'étape d'hydrolyse de l'ADN qui représente un processus particulièrement chronophage et coûteux. Les premiers résultats sont prometteurs et ont montré que l'utilisation de nanobilles magnétiques pouvait permettre une automatisation du processus d'hydrolyse par :

- une immobilisation élevée des enzymes
- une réutilisation possible associée à une conservation de l'activité dans le temps.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

L'étude de l'étiologie des cancers est complexe. Différents facteurs de risque, tels que les caractéristiques innées ou acquises viennent moduler la susceptibilité de chaque individu face à une exposition potentiellement cancérigène. L'un des points essentiels reste toutefois l'évaluation précise de l'exposition. Le développement du concept de l'exposome permettrait donc d'évaluer l'impact de l'exposition aux différents polluants au cours d'une vie. Notre étude a porté sur les oxy-HAP, composés peu étudiés malgré leur présence dans les différents compartiments de l'environnement et leur potentielle toxicité au regard de HAP dont ils sont issus. Les différents travaux décrits dans cette thèse ont permis de démontrer que l'omission des oxy-HAP dans les études portant sur les impacts toxiques pour l'homme et l'environnement (génétoxicité, mutagénicité) entraînait une importante sous-estimation de la toxicité globale des HAP et de leurs dérivés. Afin d'évaluer l'impact de ces composés sur la santé des populations, 7 oxy-HAP représentatifs ont été sélectionnés dans le chapitre 1, le but étant d'obtenir dans la suite du travail des informations concernant leur mécanisme d'action génotoxique et mutagène.

De par l'utilisation de tests de cytotoxicité et de mutagénicité, le chapitre 2 nous a permis de démontrer la problématique que représente cette classe par approche *in vitro*. Ces sept oxy-HAP se sont avérés être cytotoxiques par blocage du cycle cellulaire et/ou par induction de la mort cellulaire. De plus, leur activité mutagène, en présence ou en absence d'activation métabolique, démontre la préoccupation que représente ces composés en lien avec un pouvoir cancérigène potentiel. Ces effets toxiques peuvent être liés à la formation de dommages tels que les adduits à l'ADN. Le chapitre 3 nous a permis de montrer la formation d'adduits originaux de structures différentes. Les adduits du BAQ et du BPO n'avaient encore jamais été décrits. Quelques études portaient sur les adduits de la 1,2-NphQ. Cependant, les structures proposées différaient de celles détectées au cours de notre étude. De plus, l'obtention de différentes structures en fonction du solvant de synthèse a permis de souligner le fait que, contrairement à ce que l'on pensait, l'eau ne semble pas être toujours le solvant de synthèse le plus pertinent.

Tous ces résultats démontrent bien que les oxy-HAP représentent un risque important de santé publique et qu'ils méritent d'être intégrés dans de nombreuses études, notamment en cancérologie chez animal ou au sein d'études épidémiologiques. Afin de relier les effets cellulaires observés dans nos études de génotoxicité, d'autres marqueurs seront prochainement étudiés :

- La phosphorylation des histones H2AX afin d'observer d'éventuelle cassures de l'ADN, un autre type de lésions susceptible d'être associé au stress oxydant et la production de ROS.
- L'activation du gène p53, gène suppresseur de tumeur dont l'expression est associée notamment aux processus de réparation de l'ADN et aux arrêts dans le cycle.
- L'évaluation du stress oxydant associé à l'exposition directe aux oxy-HAP (voie Nrf2).

Concernant les adduits à l'ADN, leur formation devra être étudiée sur les quatre autres oxy-HAP considérés comme prioritaires associé au développement d'une méthode de quantification. Les adduits ayant été synthétisés uniquement sur la plus réactive des bases de l'ADN, la 2'-dG, il faudra ensuite synthétiser ces différents adduits sur les autres bases de l'ADN afin d'obtenir une représentation complète de la génotoxicité de ces composés.

En lien avec les adduits à l'ADN, les adduits aux protéines pourraient être étudiés en tant que biomarqueurs d'expositions pertinents. Ces adduits sont représentatifs de l'absorption et de la distribution des composés toxiques. Leur stabilité sur plusieurs dizaines de jours permettrait d'obtenir une estimation quantitative de l'exposition.

Références

Références

- Abdel-Shafy, H. I., and M. S. M. Mansour. 2016. "A Review on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Source, Environmental Impact, Effect on Human Health and Remediation." *Egyptian Journal of Petroleum* 25 (1): 107–23. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011>.
- Albinet, A., E. Leoz-Garziandia, H. Budzinski, and E. Viilenave. 2007. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), Nitrated PAHs and Oxygenated PAHs in Ambient Air of the Marseilles Area (South of France): Concentrations and Sources." *The Science of the Total Environment* 384 (1–3): 280–92. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.04.028>.
- Allen, J. O., N. M. Dookeran, K. Taghizadeh, A. L. Lafleur, K. A. Smith, and A. F. Sarofim. 1997. "Measurement of Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Associated with a Size-Segregated Urban Aerosol." *Environmental Science & Technology* 31 (7): 2064–70. <https://doi.org/10.1021/es960894g>.
- Alnemri, E. S. 1997. "Mammalian Cell Death Proteases: A Family of Highly Conserved Aspartate Specific Cysteine Proteases." *Journal of Cellular Biochemistry* 64 (1): 33–42.
- Alnemri, E. S., D. J. Livingston, D. W. Nicholson, G. Salvesen, N. A. Thornberry, W. W. Wong, and J. Yuan. 1996. "Human ICE/CED-3 Protease Nomenclature." *Cell* 87 (2): 171.
- Ames, B. N., W. E. Durston, E. Yamasaki, and F. D. Lee. 1973. "Carcinogens Are Mutagens: A Simple Test System Combining Liver Homogenates for Activation and Bacteria for Detection." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70 (8): 2281–85. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.8.2281>.
- Ames, B. N., J. Mccann, and E. Yamasaki. 1975. "Methods for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test." *Mutation Research* 31 (6): 347–64. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90046-1](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90046-1).
- Ames, B.N. 1979. *Identifying Environmental Chemicals Causing Mutations and Cancer*. Vol. 204. <https://doi.org/10.1126/science.373122>.
- Anderson, M. W. 1987. *Carcinogen-DNA Adducts as a Measure of Biological Dose for Risk Analysis of Carcinogenic Data*. Pp. 221-228 in National Research Council, *Pharmacokinetics in Risk Assessment. Drinking Water and Health*. Vol. 8. National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK218075/>.
- Andersson, J. T., and C. Achten. 2015. "Time to Say Goodbye to the 16 EPA PAHs? Toward an Up-to-Date Use of PACs for Environmental Purposes." *Polycyclic Aromatic Compounds* 35 (2–4): 330–54. <https://doi.org/10.1080/10406638.2014.991042>.
- Andryšák, Z., J. Vondráček, M. Machala, P. Krcmár, L. Svihálková-Sindlerová, A. Kranz, C. Weiss, D. Faust, A. Kozubík, and C. Dietrich. 2007. "The Aryl Hydrocarbon Receptor-Dependent Deregulation of Cell Cycle Control Induced by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Rat Liver Epithelial Cells." *Mutation Research* 615 (1–2): 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2006.10.004>.

- ANSES. 2013. "Valeur toxicologique de référence par inhalation pour le naphthalène - Avis de l'Anses. Rapport d'expertise collective." Édition scientifique. <https://www.anses.fr/fr/system/files/CHIM2009sa0345Ra.pdf>.
- Arlt, V. M. 2005. "3-Nitrobenzanthrone, a Potential Human Cancer Hazard in Diesel Exhaust and Urban Air Pollution: A Review of the Evidence." *Mutagenesis* 20 (6): 399–410. <https://doi.org/10.1093/mutage/gei057>.
- Artymovich, K., and D. M. Appledorn. 2015. "A Multiplexed Method for Kinetic Measurements of Apoptosis and Proliferation Using Live-Content Imaging." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1219: 35–42. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1661-0_4.
- Assink, J. W., and W. J. van den Brink. 2012. *Contaminated Soil: First International TNO Conference on Contaminated Soil 11–15 November, 1985, Utrecht, The Netherlands*. Springer Science & Business Media.
- ATSDR. 2005. "Agency for Toxic Substances and Disease Registry - Toxicological Profile for Naphthalene, 1-Methylnaphthalene, and 2-Methylnaphthalene." *U.S. Department Of Health And Human Services Public Health Service.*, August, 1–291.
- Audebert, M., A. Riu, C. Jacques, A. Hillenweck, E. L. Jamin, D. Zalko, and J. -P. Cravedi. 2010. "Use of the γ H2AX Assay for Assessing the Genotoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Human Cell Lines." *Toxicology Letters* 199 (2): 182–92. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.08.022>.
- Autrup, H. 2000. "Genetic Polymorphisms in Human Xenobiotica Metabolizing Enzymes as Susceptibility Factors in Toxic Response." *Mutation Research* 464 (1): 65–76.
- Baek, S. O., R. A. Field, M. E. Goldstone, P. W. Kirk, J. N. Lester, and R. Perry. 1991. "A Review of Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Sources, Fate and Behavior." *Water, Air, and Soil Pollution* 60 (3): 279–300. <https://doi.org/10.1007/BF00282628>.
- Bailey, L. A., M. A. Nascarella, L. E. Kerper, and L. R. Rhomberg. 2016. "Hypothesis-Based Weight-of-Evidence Evaluation and Risk Assessment for Naphthalene Carcinogenesis." *Critical Reviews in Toxicology* 46 (1): 1–42. <https://doi.org/10.3109/10408444.2015.1061477>.
- Baird, W. M., L. A. Hooven, and B. Mahadevan. 2005. "Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-DNA Adducts and Mechanism of Action." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 45 (2–3): 106–14. <https://doi.org/10.1002/em.20095>.
- Bakke, J., C. Struble, J. A. Gustafsson, and B. Gustafsson. 1985. "Catabolism of Premercapturic Acid Pathway Metabolites of Naphthalene to Naphthols and Methylthio-Containing Metabolites in Rats." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (3): 668–71.
- Balu, N., W. T. Padgett, G. R. Lambert, A. E. Swank, A. M. Richard, and S. Nesnow. 2004. "Identification and Characterization of Novel Stable Deoxyguanosine and Deoxyadenosine Adducts of Benzo[a]pyrene-7,8-Quinone from Reactions at Physiological pH." *Chemical Research in Toxicology* 17 (6): 827–38. <https://doi.org/10.1021/tx034207s>.
- Balu, N., W. T. Padgett, G. B. Nelson, G. R. Lambert, J. A. Ross, and S. Nesnow. 2006. "Benzo[a]pyrene-7,8-Quinone-3'-mononucleotide Adduct Standards for 32P Postlabeling Analyses: Detection of Benzo[a]pyrene-7,8-Quinone-Calf Thymus DNA Adducts." *Analytical Biochemistry* 355 (2): 213–23. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.05.023>.

- Bandowe, B. A. M., M. Bigalke, L. Boamah, E. Nyarko, F. K. Saalia, and W. Wilcke. 2014. "Polycyclic Aromatic Compounds (PAHs and Oxygenated PAHs) and Trace Metals in Fish Species from Ghana (West Africa): Bioaccumulation and Health Risk Assessment." *Environment International* 65 (April): 135–46. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.12.018>.
- Bandowe, B. A. M., and M. A. Nkansah. 2016. "Occurrence, Distribution and Health Risk from Polycyclic Aromatic Compounds (PAHs, Oxygenated-PAHs and Azaarenes) in Street Dust from a Major West African Metropolis." *The Science of the Total Environment* 553 (May): 439–49. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.142>.
- Barron, M. G., and E. Holder. 2003. "Are Exposure and Ecological Risks of PAHs Underestimated at Petroleum Contaminated Sites?" *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* 9 (6): 1533–45. <https://doi.org/10.1080/10807030390251029>.
- Bartsch, H. 1996. "DNA Adducts in Human Carcinogenesis: Etiological Relevance and Structure-Activity Relationship." *Mutation Research* 340 (2–3): 67–79.
- Beach, A. C., and R. C. Gupta. 1992. "Human Biomonitoring and the ³²P-Postlabeling Assay." *Carcinogenesis* 13 (7): 1053–74. <https://doi.org/10.1093/carcin/13.7.1053>.
- Bekki, K., H. Takigami, G. Suzuki, N. Tang, and K. Hayakawa. 2009. "Evaluation of Toxic Activities of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Derivatives Using in Vitro Bioassays." *Journal of Health Science* 55 (4): 601–10. <https://doi.org/10.1248/jhs.55.601>.
- Benford, D., M. Dinovi, and R. W. Setzer. 2010. "Application of the Margin-of-Exposure (MoE) Approach to Substances in Food That Are Genotoxic and Carcinogenic E.g.: Benzo[a]pyrene and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 48 Suppl 1 (January): S42–48. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.09.039>.
- Benoit, F. M., G. L. LeBel, and D. T. Williams. 1979. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Levels in Eastern Ontario Drinking Waters, 1978." *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 23 (1): 774–78. <https://doi.org/10.1007/BF01770040>.
- Berg, K., L. Zhai, M. Chen, A. Kharazmi, and T. C. Owen. 1994. "The Use of a Water-Soluble Formazan Complex to Quantitate the Cell Number and Mitochondrial Function of Leishmania Major Promastigotes." *Parasitology Research* 80 (3): 235–39.
- Bessho, T., K. Tano, H. Kasai, E. Ohtsuka, and S. Nishimura. 1993. "Evidence for Two DNA Repair Enzymes for 8-Hydroxyguanine (7,8-Dihydro-8-Oxoguanine) in Human Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 268 (26): 19416–21.
- Signal, K. L., S. Langridge, and J. L. Zhou. 2008. "Release of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Carbon Monoxide and Particulate Matter from Biomass Combustion in a Wood-Fired Boiler under Varying Boiler Conditions." *Atmospheric Environment* 42 (39): 8863–71. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.09.013>.
- Boer, J. de, and J. H. J. Hoeijmakers. 2000. "Nucleotide Excision Repair and Human Syndromes." *Carcinogenesis* 21 (3): 453–60. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.453>.
- Boesl, U. 2017. "Time-of-Flight Mass Spectrometry: Introduction to the Basics." *Mass Spectrometry Reviews* 36 (1): 86–109. <https://doi.org/10.1002/mas.21520>.

- Boffetta, P., N. Jourenkova, and P. Gustavsson. 1997. "Cancer Risk from Occupational and Environmental Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." *Cancer Causes & Control: CCC* 8 (3): 444–72.
- Bolton, J. L., M. A. Trush, T. M. Penning, G. Dryhurst, and T. J. Monks. 2000. "Role of Quinones in Toxicology." *Chemical Research in Toxicology* 13 (3): 135–60. <https://doi.org/10.1021/tx9902082>.
- Bolton, Judy L., Michael A. Trush, Trevor M. Penning, Glenn Dryhurst, and Terrence J. Monks. 2000. "Role of Quinones in Toxicology." *Chemical Research in Toxicology* 13 (3): 135–60. <https://doi.org/10.1021/tx9902082>.
- Boobis, A. R., S. M. Cohen, V. Dellarco, D. McGregor, M. E. B. Meek, C. Vickers, D. Willcocks, and W. Farland. 2006. "IPCS Framework for Analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans." *Critical Reviews in Toxicology* 36 (10): 781–92. <https://doi.org/10.1080/10408440600977677>.
- Boobis, A. R., G. P. Daston, R. J. Preston, and S. S. Olin. 2009. "Application of Key Events Analysis to Chemical Carcinogens and Noncarcinogens." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49 (8): 690–707. <https://doi.org/10.1080/10408390903098673>.
- Borska, L., C. Andrys, J. Krejsek, V. Palicka, M. Chmelarova, K. Hamakova, J. Kremlacek, and Z. Fiala. 2014. "Oxidative Damage to Nucleic Acids and Benzo(a)pyrene-7,8-Diol-9,10-Epoxide-DNA Adducts and Chromosomal Aberration in Children with Psoriasis Repeatedly Exposed to Crude Coal Tar Ointment and UV Radiation." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014: 302528. <https://doi.org/10.1155/2014/302528>.
- Brandt, H. C. A., and W. P. Watson. 2003. "Monitoring Human Occupational and Environmental Exposures to Polycyclic Aromatic Compounds." *The Annals of Occupational Hygiene* 47 (5): 349–78. <https://doi.org/10.1093/annhyg/meg052>.
- Briske-Anderson, M. J., J. W. Finley, and S. M. Newman. 1997. "The Influence of Culture Time and Passage Number on the Morphological and Physiological Development of Caco-2 Cells." *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 214 (3): 248–57. <https://doi.org/10.3181/00379727-214-44093>.
- Brookes, P., and P. D. Lawley. 1964. "Evidence for the Binding of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons to the Nucleic Acids of Mouse Skin : Relation between Carcinogenic Power of Hydrocarbons and Their Binding to Deoxyribonucleic Acid." *Nature* 202 (4934): 781. <https://doi.org/10.1038/202781a0>.
- Brooks, L R, T J Hughes, L D Claxton, B Austern, R Brenner, and F Kremer. 1998. "Bioassay-Directed Fractionation and Chemical Identification of Mutagens in Bioremediated Soils." *Environmental Health Perspectives* 106 (Suppl 6): 1435–40.
- Bruins, A. P., T. R. Covey, and J. D. Henion. 1987. "Ion Spray Interface for Combined Liquid Chromatography/Atmospheric Pressure Ionization Mass Spectrometry." *Analytical Chemistry* 59 (22): 2642–46. <https://doi.org/10.1021/ac00149a003>.
- Buchholz, B. A., S. A. Carratt, E. A. Kuhn, N. M. Collette, X. Ding, and L. V. Winkle. 2019. "Naphthalene DNA Adduct Formation and Tolerance in the Lung." *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 438 (January): 119–23. <https://doi.org/10.1016/j.nimb.2018.07.004>.
- Burchiel, S. W., D. A. Davis, S. D. Ray, and S. L. Barton. 1993. "DMBA Induces Programmed Cell Death (Apoptosis) in the A20.1 Murine B Cell Lymphoma."

- Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology* 21 (1): 120–24.
- Buterin, T., M. T. Hess, N. Luneva, N. E. Geacintov, S. Amin, H. Kroth, A. Seidel, and H. Naegeli. 2000. “Unrepaired Fjord Region Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-DNA Adducts in Ras Codon 61 Mutational Hot Spots.” *Cancer Research* 60 (7): 1849–56.
- Caino, M. C., J. L. Oliva, H. Jiang, T. M. Penning, and M. G. Kazanietz. 2007. “Benzo[a]pyrene-7,8-Dihydrodiol Promotes Checkpoint Activation and G2/M Arrest in Human Bronchoalveolar Carcinoma H358 Cells.” *Molecular Pharmacology* 71 (3): 744–50. <https://doi.org/10.1124/mol.106.032078>.
- Čampelj, S., D. Makovec, and M. Drofenik. 2009. “Functionalization of Magnetic Nanoparticles with 3-Aminopropyl Silane.” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Proceedings of the Seventh International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, 321 (10): 1346–50. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2009.02.036>.
- Cancer environnement. 2018. “Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP).” Cancer Environnement. December 12, 2018. <https://www.cancer-environnement.fr/235-Hydrocarbures-aromatiques-polycycliques-HAP.ce.aspx>.
- Carratt, S. A., N. Kovalchuk, X. Ding, and L. S. Van Winkle. 2019a. “Metabolism and Lung Toxicity of Inhaled Naphthalene: Effects of Postnatal Age and Sex.” *Toxicological Sciences*. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz100>.
- Carvalho, H., R. M. A. da Costa, V. Chiganças, R. Weinlich, G. Brumatti, G. P. Amarante-Mendes, A. Sarasin, and C. F. M. Menck. 2003. “Effect of Cell Confluence on Ultraviolet Light Apoptotic Responses in DNA Repair Deficient Cells.” *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, The Fourth International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations, 544 (2): 159–66. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2003.06.004>.
- Caulfield, J. L., J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum. 1998. “Nitric Oxide-Induced Deamination of Cytosine and Guanine in Deoxynucleosides and Oligonucleotides.” *Journal of Biological Chemistry* 273 (21): 12689–95. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.21.12689>.
- “CellTox™ Green Cytotoxicity Assay | Cell Death Assay | Cytotoxicity.” n.d. Accessed July 5, 2019. <https://france.promega.com/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/celltox-green-cytotoxicity-assay/>.
- Celotti, L., P. Ferraro, D. Furlan, N. Zanesi, and S. Pavanello. 1993. “DNA Repair in Human Lymphocytes Treated in Vitro with (±)-Anti- and (±)-Syn-Benzol[a]pyrene Dioloxide.” *Mutation Research/DNA Repair* 294 (2): 117–26. [https://doi.org/10.1016/0921-8777\(93\)90020-H](https://doi.org/10.1016/0921-8777(93)90020-H).
- Cerniglia, C. E. 1992. “Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.” *Biodegradation* 3 (2–3): 351–68. <https://doi.org/10.1007/BF00129093>.
- Chen, S., N. Nguyen, K. Tamura, M. Karin, and R. H. Tukey. 2003. “The Role of the Ah Receptor and p38 in Benzo[a]pyrene-7,8-Dihydrodiol and Benzo[a]pyrene-7,8-Dihydrodiol-9,10-Epoxy-Induced Apoptosis.” *The Journal of Biological Chemistry* 278 (21): 19526–33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300780200>.
- Chesis, P. L., D. E. Levin, M. T. Smith, L. Ernster, and B. N. Ames. 1984. “Mutagenicity of Quinones: Pathways of Metabolic Activation and Detoxification.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81 (6): 1696–1700. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.6.1696>.

- Chiapperino, D., M. Cai, J. M. Sayer, H. Yagi, H. Kroth, C. Masutani, F. Hanaoka, D. M. Jerina, and A. M. Cheh. 2005. "Error-Prone Translesion Synthesis by Human DNA Polymerase Eta on DNA-Containing Deoxyadenosine Adducts of 7,8-Dihydroxy-9,10-Epoxy-7,8,9,10-Tetrahydrobenzo[a]pyrene." *The Journal of Biological Chemistry* 280 (48): 39684–92. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508008200>.
- Claxton, L. D., J. Allen, A. Auletta, K. Mortelmans, E. Nestmann, and E. Zeiger. 1987. "Guide for the Salmonella Typhimurium/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity." *Mutation Research/Genetic Toxicology* 189 (2): 83–91. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(87\)90014-0](https://doi.org/10.1016/0165-1218(87)90014-0).
- Cleaver, J. E. 2005. "Cancer in Xeroderma Pigmentosum and Related Disorders of DNA Repair." *Nature Reviews. Cancer* 5 (7): 564–73. <https://doi.org/10.1038/nrc1652>.
- Clergé, A., J. Le Goff, C. Lopez, J. Ledauphin, and R. Delépée. 2019. "Oxy-PAHs: Occurrence in the Environment and Potential Genotoxic/Mutagenic Risk Assessment for Human Health." *Critical Reviews in Toxicology* 49 (September). <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408444.2019.1605333>.
- Collins, A. R. 2004. "The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations." *Molecular Biotechnology* 26 (3): 249–61. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>.
- Colom-Díaz, J. M., M. U. Alzueta, U. Fernandes, and M. Costa. 2017. "Emissions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons during Biomass Combustion in a Drop Tube Furnace." *Fuel* 207 (November): 790–800. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.06.084>.
- Cooke, M. S., M. D. Evans, R. Dove, R. Rozalski, D. Gackowski, A. Siomek, J. Lunec, and R. Olinski. 2005. "DNA Repair Is Responsible for the Presence of Oxidatively Damaged DNA Lesions in Urine." *Mutation Research* 574 (1–2): 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.01.022>.
- Cotelle, S., and J. F. Féraud. 1999. "Comet assay in genetic ecotoxicology: A review." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34 (4): 246–55. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1999\)34:4<246::AID-EM4>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1999)34:4<246::AID-EM4>3.0.CO;2-V).
- Cryns, V., and J. Yuan. 1998. "Proteases to Die for." *Genes & Development* 12 (11): 1551–70. <https://doi.org/10.1101/gad.12.11.1551>.
- Dasgupta, S., A. Cao, B. Mauer, B. Yan, S. Uno, and A. McElroy. 2014. "Genotoxicity of Oxy-PAHs to Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*) Embryos Assessed Using the Comet Assay." *Environmental Science and Pollution Research* 21 (24): 13867–76. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2586-4>.
- De Boeck, M., and M. Kirsch-Volders. 1997. "Nereis Virens (Annelida: Polychaeta) Is Not an Adequate Sentinel Species to Assess the Genotoxic Risk (Comet Assay) of PAH Exposure to the Environment." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 30 (1): 82–90.
- De Martinis, B. S., R. A. Okamoto, N. Y. Kado, L. A. Gundel, and L. R. F. Carvalho. 2002. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in a Bioassay-Fractionated Extract of PM10 Collected in São Paulo, Brazil." *Atmospheric Environment* 36 (2): 307–14. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(01\)00334-X](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(01)00334-X).
- Deiry, W. S. el-, J. W. Harper, P. M. O'Connor, V. E. Velculescu, C. E. Canman, J. Jackman, J. A. Pietsenpol, M. Burrell, D. E. Hill, and Y. Wang. 1994. "WAF1/CIP1 Is Induced in p53-Mediated G1 Arrest and Apoptosis." *Cancer Research* 54 (5): 1169–74.

- Delft, J. H. M. van, M.-J. S. T. Steenwinkel, J. G. van Asten, N. de Vogel, T. C. D. M. Bruijntjes-Rozier, T. Schouten, P. Cramers, et al. 2001. "Biological Monitoring the Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons of Coke Oven Workers in Relation to Smoking and Genetic Polymorphisms for GSTM1 and GSTT1." *The Annals of Occupational Hygiene* 45 (5): 395–408. [https://doi.org/10.1016/S0003-4878\(00\)00065-X](https://doi.org/10.1016/S0003-4878(00)00065-X).
- Dementeva, N., D. Kokova, A. Ponamoreva, N. Cherdyntseva, and J. Kzhyshkowska. 2016. "Application of UPLC-ESI-Q-TOF Analysis for Screening of the Carcinogen-Modified DNA-Adducts in the Circulation DNA of Patients with Lung Cancer." *AIP Conference Proceedings* 1772 (1): 050005. <https://doi.org/10.1063/1.4964575>.
- Denissenko, M. F., A. Pao, M. Tang, and G. P. Pfeifer. 1996. "Preferential Formation of Benzo[a]pyrene Adducts at Lung Cancer Mutational Hotspots in P53." *Science (New York, N.Y.)* 274 (5286): 430–32.
- Dhawan, A., M. Bajpayee, and D. Parmar. 2009. "Comet Assay: A Reliable Tool for the Assessment of DNA Damage in Different Models." *Cell Biology and Toxicology* 25 (1): 5–32. <https://doi.org/10.1007/s10565-008-9072-z>.
- Dinkova-Kostova, A. T., and P. Talalay. 2000. "Persuasive Evidence That Quinone Reductase Type 1 (DT Diaphorase) Protects Cells against the Toxicity of Electrophiles and Reactive Forms of Oxygen." *Free Radical Biology & Medicine* 29 (3–4): 231–40. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(00\)00300-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(00)00300-2).
- Doherty, M. A., R. Makowski, G. G. Gibson, and G. M. Cohen. 1985. "Cytochrome P-450 Dependent Metabolic Activation of 1-Naphthol to Naphthoquinones and Covalent Binding Species." *Biochemical Pharmacology* 34 (13): 2261–67.
- Du, H. J., N. Tang, B. C. Liu, B. R. You, F. H. Shen, M. Ye, A. Gao, and C. S. Huang. 2006. "Benzo[a]pyrene-Induced Cell Cycle Progression Is through ERKs/Cyclin D1 Pathway and Requires the Activation of JNKs and p38 Mapk in Human Diploid Lung Fibroblasts." *Molecular and Cellular Biochemistry* 287 (1–2): 79–89. <https://doi.org/10.1007/s11010-005-9073-7>.
- Durant, J. L., W. F. Busby, A. L. Lafleur, B. W. Penman, and C. L. Crespi. 1996. "Human Cell Mutagenicity of Oxygenated, Nitrated and Unsubstituted Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Associated with Urban Aerosols." *Mutation Research/Genetic Toxicology* 371 (3): 123–57. [https://doi.org/10.1016/S0165-1218\(96\)90103-2](https://doi.org/10.1016/S0165-1218(96)90103-2).
- Dyroff, M. C., F. C. Richardson, J. A. Popp, M. A. Bedell, and J. A. Swenberg. 1986. "Correlation of O4-Ethyldeoxythymidine Accumulation, Hepatic Initiation and Hepatocellular Carcinoma Induction in Rats Continuously Administered Diethylnitrosamine." *Carcinogenesis* 7 (2): 241–46. <https://doi.org/10.1093/carcin/7.2.241>.
- ECACC. 2017. "ECACC: European Collection of Authenticated Cell Cultures. General Cell Collection: BEAS-2B." Public Health England. 2017. https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=95102433&collection=ecacc_gc#medImg, consulté le 11 juillet 2019.
- Eder, E., S. Scheckenbach, C. Deininger, and C. Huffman. 1993. "The Possible Role of α,β -Unsaturated Carbonyl Compounds in Mutagenesis and Carcinogenesis." *Toxicology Letters* 67 (1): 87–103. [https://doi.org/10.1016/0378-4274\(93\)90048-3](https://doi.org/10.1016/0378-4274(93)90048-3).
- Egeghy, P. P., L. Hauf-Cabalo, R. Gibson, and S. M. Rappaport. 2003. "Benzene and Naphthalene in Air and Breath as Indicators of Exposure to Jet Fuel." *Occupational*

- and Environmental Medicine* 60 (12): 969–76.
<https://doi.org/10.1136/oem.60.12.969>.
- Enari, M., H. Sakahira, H. Yokoyama, K. Okawa, A. Iwamatsu, and S. Nagata. 1998. “A Caspase-Activated DNase That Degrades DNA during Apoptosis, and Its Inhibitor ICAD.” *Nature* 391 (6662): 43–50. <https://doi.org/10.1038/34112>.
- Eriksson, M., G. Dalhammar, and A. K. Borg-Karlson. 2000. “Biological Degradation of Selected Hydrocarbons in an Old PAH/Creosote Contaminated Soil from a Gas Work Site.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 53 (5): 619–26.
- Ewa, B., and M.-Š. Danuta. 2017. “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and PAH-Related DNA Adducts.” *Journal of Applied Genetics* 58 (3): 321–30. <https://doi.org/10.1007/s13353-016-0380-3>.
- Farmer, P. B. 2004. “DNA and Protein Adducts as Markers of Genotoxicity.” *Toxicology Letters* 149 (1–3): 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.12.015>.
- Farmer, P. B., and D. E. G. Shuker. 1999. “What Is the Significance of Increases in Background Levels of Carcinogen-Derived Protein and DNA Adducts? Some Considerations for Incremental Risk Assessment.” *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 424 (1): 275–86. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(99\)00025-1](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(99)00025-1).
- Farmer, P. B., and R. Singh. 2008. “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.” *Mutation Research* 659 (1–2): 68–76. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.006>.
- Fenech, M. 2000. “The in Vitro Micronucleus Technique.” *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 455 (1): 81–95. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(00\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(00)00065-8).
- Fenn, J. B., M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, and C. M. Whitehouse. 1989. “Electrospray Ionization for Mass Spectrometry of Large Biomolecules.” *Science (New York, N.Y.)* 246 (4926): 64–71. <https://doi.org/10.1126/science.2675315>.
- Fernandez-Capetillo, O., A. Lee, M. Nussenzweig, and A. Nussenzweig. 2004. “H2AX: The Histone Guardian of the Genome.” *DNA Repair* 3 (8–9): 959–67. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.024>.
- Finlayson-Pitts, B., and J.N. Pitts. 2000. “Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Derivatives: Atmospheric Chemistry and Toxicological Implications.” *Chemistry of the Upper and Lower Atmosphere*, January, 436–546.
- Flowers, L., S. T. Ohnishi, and T. M. Penning. 1997. “DNA Strand Scission by Polycyclic Aromatic Hydrocarbon O-Quinones: Role of Reactive Oxygen Species, Cu(II)/Cu(I) Redox Cycling, and O-Semiquinone Anion Radicals,.” *Biochemistry* 36 (28): 8640–48. <https://doi.org/10.1021/bi970367p>.
- Flowers-Geary, L., R. G. Harvey, and T. M. Penning. 1993. “Cytotoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon O-Quinones in Rat and Human Hepatoma Cells.” *Chemical Research in Toxicology* 6 (3): 252–60. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(95\)03660-1](https://doi.org/10.1016/0009-2797(95)03660-1).
- Flückiger-Isler, S., M. Baumeister, K. Braun, V. Gervais, N. Hasler-Nguyen, R. Reimann, J. Van Gompel, H.-G. Wunderlich, and G. Engelhardt. 2004. “Assessment of the Performance of the Ames II Assay: A Collaborative Study with 19 Coded Compounds.” *Mutation Research* 558 (1–2): 181–97. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.12.001>.

- Fortini, P., E. Parlanti, O. M. Sidorkina, J. Laval, and E. Dogliotti. 1999. "The Type of DNA Glycosylase Determines the Base Excision Repair Pathway in Mammalian Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (21): 15230–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.21.15230>.
- Frenzilli, G., M. Nigro, and B. P. Lyons. 2009. "The Comet Assay for the Evaluation of Genotoxic Impact in Aquatic Environments." *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, Celebrating the 20th Anniversary of the Invention of the Comet Assay, 681 (1): 80–92. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2008.03.001>.
- Frosina, G., P. Fortini, O. Rossi, F. Carrozzino, G. Raspaglio, L. S. Cox, D. P. Lane, A. Abbondandolo, and E. Dogliotti. 1996. "Two Pathways for Base Excision Repair in Mammalian Cells." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (16): 9573–78. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.16.9573>.
- Fujiki, H. 2014. "Gist of Dr. Katsusaburo Yamagiwa's Papers Entitled 'Experimental Study on the Pathogenesis of Epithelial Tumors' (I to VI Reports)." *Cancer Science* 105 (2): 143–49. <https://doi.org/10.1111/cas.12333>.
- Fujiwara, F., M. Guiñez, S. Cerutti, and P. Smichowski. 2014. "UHPLC-(+)APCI-MS/MS Determination of Oxygenated and Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Airborne Particulate Matter and Tree Barks Collected in Buenos Aires City." *Microchemical Journal* 116 (September): 118–24. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2014.04.004>.
- Gabelica, V., and E. Marklund. 2018. "Fundamentals of Ion Mobility Spectrometry." *Current Opinion in Chemical Biology, Omics*, 42 (February): 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.10.022>.
- Gao, H., F. Guo, F. Feng, J. Yin, M. Song, and H. Wang. 2009. "Improved Preparation and Identification of Aristolochic Acid-DNA Adducts by Solid-Phase Extraction with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry." *Journal of Environmental Sciences (China)* 21 (12): 1769–76. [https://doi.org/10.1016/s1001-0742\(08\)62486-9](https://doi.org/10.1016/s1001-0742(08)62486-9).
- Gao, J., and S. W. Burchiel. 2014. "Genotoxic Mechanisms of PAH-Induced Immunotoxicity." *Molecular Immunotoxicology*, July, 245–62. <https://doi.org/10.1002/9783527676965.ch12>.
- Garden, J. L., K. A. Wilson, and S. D. Wetmore. 2019. "Effects of Formaldehyde on DNA." *URSCA Proceedings* 4 (March). <https://journals.macewan.ca/ursca/article/view/1564>.
- Genies, C., A. Maître, E. Lefèbvre, A. Jullien, M. Chopard-Lallier, and T. Douki. 2013. "The Extreme Variety of Genotoxic Response to Benzo[a]pyrene in Three Different Human Cell Lines from Three Different Organs." *PLoS ONE* 8 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078356>.
- Gentil, A., J. B. Cabral-Neto, R. Mariage-Samson, A. Margot, J. L. Imbach, B. Rayner, and A. Sarasin. 1992. "Mutagenicity of a Unique Apurinic/Apyrimidinic Site in Mammalian Cells." *Journal of Molecular Biology* 227 (4): 981–84.
- Gibson, T. L., V. B. Smart, and L. L. Smith. 1978. "Non-Enzymic Activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons as Mutagens." *Mutation Research* 49 (2): 153–61.
- Goate, A., M. -C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, et al. 1991. "Segregation of a Missense Mutation in the Amyloid Precursor Protein Gene with Familial Alzheimer's Disease." *Nature* 349 (6311): 704–6. <https://doi.org/10.1038/349704a0>.

- Godschalk, R. W., L. M. Maas, J. C. Kleinjans, and F. J. Van Schooten. 1998. "Influences of DNA Isolation and RNA Contamination on Carcinogen-DNA Adduct Analysis by 32P-Postlabeling." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 32 (4): 344–50.
- Gorelick, N. J. 1993. "Application of HPLC in the 32P-Postlabeling Assay." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 288 (1): 5–18. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(93\)90203-R](https://doi.org/10.1016/0027-5107(93)90203-R).
- Grant, T. W., M. D. Doherty, D. Odowole, K. D. Sales, and G. M. Cohen. 1986. "Semiquinone Anion Radicals Formed by the Reaction of Quinones with Glutathione or Amino Acids." *FEBS Letters* 201 (2): 296–300. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)80627-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)80627-5).
- Griego, F. Y., K. T. Bogen, P. S. Price, and D. L. Weed. 2008. "Exposure, Epidemiology and Human Cancer Incidence of Naphthalene." *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP* 51 (2 Suppl): S22-26. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2008.02.003>.
- Grifoll, M., A. M. Solanas, and J. M. Bayona. 1992. "Bioassay-Directed Chemical Characterization of Genotoxic Agents in the Dissolved and Particulate Water Phases of the Besos and Llobregat Rivers (Barcelona, Spain)." *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 23 (1): 19–25. <https://doi.org/10.1007/BF00225991>.
- Grova, N., E. M. Hardy, F. Faÿs, R. C. Duca, and Brice M. R. Appenzeller. 2018. "Hair Analysis for the Biomonitoring of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure: Comparison with Urinary Metabolites and DNA Adducts in a Rat Model." *Archives of Toxicology* 92 (10): 3061–75. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2298-5>.
- Grunwald, D., J. -F. Mayol, and X. Ronot. 2010. *Cycle Cellulaire et Cytométrie En Flux*. Tec&Doc.
- Guo, N., D. Faller, and C. Vaziri. 2002. "Carcinogen-Induced S-Phase Arrest Is Chk1 Mediated and Caffeine Sensitive." *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research* 13 (March): 77–86.
- Gupta, R. C. 1985. "Enhanced Sensitivity of 32P-Postlabeling Analysis of Aromatic carcinogen:DNA Adducts." *Cancer Research* 45 (11 Pt 2): 5656–62.
- Gupta, R. C., M. V. Reddy, and K. Randerath. 1982. "32P-Postlabeling Analysis of Non-Radioactive Aromatic Carcinogen--DNA Adducts." *Carcinogenesis* 3 (9): 1081–92. <https://doi.org/10.1093/carcin/3.9.1081>.
- Hakim, I. A., R. B. Harris, S. Brown, H.-H. S. Chow, S. Wiseman, S. Agarwal, and W. Talbot. 2003. "Effect of Increased Tea Consumption on Oxidative DNA Damage among Smokers: A Randomized Controlled Study." *The Journal of Nutrition* 133 (10): 3303S–3309S. <https://doi.org/10.1093/jn/133.10.3303S>.
- Hakura, A., H. Mochida, Y. Tsutsui, and K. Yamatsu. 1995. "Mutagenicity of Benzoquinones for Ames Salmonella Tester Strains." *Mutation Research* 347 (1): 37–43. [https://doi.org/10.1016/0165-7992\(95\)90031-4](https://doi.org/10.1016/0165-7992(95)90031-4).
- Harper, B. L., V. M. S. Ramanujam, M. M. Gad-El-Karim, and M. S. Legator. 1984. "The Influence of Simple Aromatics on Benzene Clastogenicity." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 128 (2): 105–14. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(84\)90097-6](https://doi.org/10.1016/0027-5107(84)90097-6).
- Harri, M., P. Svoboda, T. Mori, P. Mutanen, H. Kasai, and K. Savela. 2005. "Analysis of 8-Hydroxydeoxyguanosine among Workers Exposed to Diesel Particulate Exhaust:

- Comparison with Urinary Metabolites and PAH Air Monitoring.” *Free Radical Research* 39 (9): 963–72. <https://doi.org/10.1080/10715760500190115>.
- Harris, K. A., M. B. Yunker, N. Dangerfield, and P. S. Ross. 2011. “Sediment-Associated Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons in Coastal British Columbia, Canada: Concentrations, Composition, and Associated Risks to Protected Sea Otters.” *Environmental Pollution, Nitrogen Deposition, Critical Loads and Biodiversity*, 159 (10): 2665–74. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.05.033>.
- Harrison, R. M., M. S. Alam, J. Dang, I. M. Ismail, J. Basahi, M. A. Alghamdi, I. A. Hassan, and M. Khoder. 2016. “Relationship of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Oxy(quinone) and Nitro Derivatives during Air Mass Transport.” *Science of The Total Environment* 572 (December): 1175–83. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.030>.
- Hartwell, L. H., and M. B. Kastan. 1994. “Cell Cycle Control and Cancer.” *Science* 266 (5192): 1821–28. <https://doi.org/10.1126/science.7997877>.
- Heijink, A. M., M. Krajewska, and M. A. T. M. van Vugt. 2013. “The DNA Damage Response during Mitosis.” *Mutation Research* 750 (1–2): 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2013.07.003>.
- Henderson, R. F., W. E. Bechtold, J. A. Bond, and J. D. Sun. 1989. “The Use of Biological Markers in Toxicology.” *Critical Reviews in Toxicology* 20 (2): 65–82. <https://doi.org/10.3109/10408448909017904>.
- Henkler, F., K. Stolpmann, and A. Luch. 2012. “Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Bulky DNA Adducts and Cellular Responses.” *Experientia Supplementum (2012)* 101: 107–31. https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_5.
- Högberg, J., I. Silins, and U. Stenius. 2009. “Chemical Induced Alterations in p53 Signaling.” *EXS* 99: 181–208.
- Holgate, S. T., J. M. Samet, H. S. Koren, and R. L. Maynard. 1999. *Air Pollution and Health*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-352335-8.X5074-1>.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein, and C. C. Harris. 1991. “p53 Mutations in Human Cancers.” *Science (New York, N.Y.)* 253 (5015): 49–53. <https://doi.org/10.1126/science.1905840>.
- Hsu, I. C., M. C. Poirier, S. H. Yuspa, D. Grunberger, I. B. Weinstein, R. H. Yolken, and C. C. Harris. 1981. “Measurement of Benzo(a)pyrene-DNA Adducts by Enzyme Immunoassays and Radioimmunoassay.” *Cancer Research* 41 (3): 1091–95.
- Hu, C. -W., M. -T. Wu, M. -R. Chao, C. -H. Pan, C. -J. Wang, J. A. Swenberg, and K. -Y. Wu. 2004. “Comparison of Analyses of Urinary 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine by Isotope-Dilution Liquid Chromatography with Electrospray Tandem Mass Spectrometry and by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.” *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM* 18 (4): 505–10. <https://doi.org/10.1002/rcm.1367>.
- Huang, B., M. Liu, X. Bi, C. Chaemfa, Z. Ren, X. Wang, G. Sheng, and J. Fu. 2014. “Phase Distribution, Sources and Risk Assessment of PAHs, NPAHs and OPAHs in a Rural Site of Pearl River Delta Region, China.” *Atmospheric Pollution Research* 5 (2): 210–18. <https://doi.org/10.5094/APR.2014.026>.
- Huang, M., I. A. Blair, and T. M. Penning. 2013. “Identification of Stable Benzo[a]pyrene-7,8-Dione-DNA Adducts in Human Lung Cells.” *Chemical Research in Toxicology* 26 (5): 685–92. <https://doi.org/10.1021/tx300476m>.

- Huang, M., X. Liu, S. S. Basu, L. Zhang, M. E. Kushman, R. G. Harvey, I. A. Blair, and T. M. Penning. 2012. "Metabolism and Distribution of Benzo[a]pyrene-7,8-Dione (B[a]P-7,8-Dione) in Human Lung Cells by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry: Detection of an Adenine B[a]P-7,8-Dione Adduct." *Chemical Research in Toxicology* 25 (5): 993–1003. <https://doi.org/10.1021/tx200463s>.
- Husgafvel-Pursiainen, K., P. Hackman, M. Ridanpää, S. Anttila, A. Karjalainen, T. Partanen, O. Taikina-Aho, L. Heikkilä, and H. Vainio. 1993. "K-Ras Mutations in Human Adenocarcinoma of the Lung: Association with Smoking and Occupational Exposure to Asbestos." *International Journal of Cancer* 53 (2): 250–56.
- IARC. 1983. "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Polynuclear Aromatic Compounds, Part 1, Chemical, Environmental and Experimental Data, Volume 32." <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono32.pdf>.
- IARC. 1987. "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Human - Overall Evaluation of Carcinogenicity: An Updating of IARC Monographs." 1–42. <https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/Suppl7.pdf>.
- IARC. 2002. "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene." 82 (February).
- IARC. 2010. *IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans: Painting, Firefighting, and Shiftwork*. Vol. 98. International Agency for Research on Cancer.
- INSERM. 2000. "Enzymes Du Métabolisme Des Cancérogènes Chimiques et Polymorphismes Génétiques de Ces Enzymes Dans Les Populations." In *Susceptibilités Génétiques et Expositions Professionnelles*. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale.
- INSERM. 2005. *Cancer: Approche méthodologique du lien avec l'environnement*. Les éditions Inserm. <http://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/129>.
- INSERM. 2008. *Cancer et environnement*. Les éditions Inserm. <http://www.ipubli.inserm.fr/handle/10608/102>.
- Inserm-CepiDc. 2019. "Causes de Décès Selon Le Sexe Données Annuelles de 1990 À 2016." August 14, 2019. <https://www.insee.fr/fr/statistiques/2385258>.
- Institut National du Cancer. 2017. "Evolution de L'incidence et de La Mortalité Nationales de L'ensemble Des Cancers Entre 1980 et 2012." April 2017. <https://lesdonnees.e-cancer.fr/Themes/epidemiologie/Incidence-mortalite-nationale/Incidence-et-mortalite-nationales-des-cancers>.
- Jarrige, F. 2011. "L'histoire des pollutions. Politique et démesure à l'ère industrielle." *Revue des livres*, no. 2: 5–10.
- Jeffrey Lewis, R. 2012. "Naphthalene Animal Carcinogenicity and Human Relevancy: Overview of Industries with Naphthalene-Containing Streams." *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP* 62 (1): 131–37. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.12.004>.
- Jelinsky, S. A., T. Liu, N. E. Geacintov, and E. L. Loechler. 1995. "The Major, N2-Gua Adduct of the (+)-Anti-Benzo[a]pyrene Diol Epoxide Is Capable of Inducing G.fwdarw.A and G.fwdarw.C, in Addition to G.fwdarw.T, Mutations | Biochemistry." *Biochemistry* 34 (41): 13545–53. <https://doi.org/10.1021/bi00041a034>.
- Jernström, B., and A. Gräslund. 1994. "Covalent Binding of Benzo[a]pyrene 7,8-Dihydrodiol 9,10-Epoxides to DNA: Molecular Structures, Induced Mutations and

- Biological Consequences.” *Biophysical Chemistry* 49 (3): 185–99. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(93\)E0087-L](https://doi.org/10.1016/0301-4622(93)E0087-L).
- Jia, C., and S. Batterman. 2010. “A Critical Review of Naphthalene Sources and Exposures Relevant to Indoor and Outdoor Air.” *International Journal of Environmental Research and Public Health* 7 (7): 2903–39. <https://doi.org/10.3390/ijerph7072903>.
- Jia, X.-W., B. -C. Liu, X. -L. Shi, A. Gao, B. -R. You, M. Ye, F. -H. Shen, and H. J. Du. 2005. “[Inhibition of the Pathway of Benzo (a) Pyrene-Induced Cell Cycle Changes by All-Trans Retinoic Acid in Lung Fibroblast].” *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi = Zhonghua Laodong Weisheng Zhiyebing Zazhi = Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases* 23 (November): 329–32.
- Joshi, R., A. Sharma, K. Thakur, D. Kumar, and G. Nadda. 2018. “Metabolite Analysis and Nucleoside Determination Using Reproducible UHPLC-Q-ToF-IMS in *Ophiocordyceps Sinensis*.” *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 41 (15–16): 927–36. <https://doi.org/10.1080/10826076.2018.1541804>.
- Kafle, A., J. Klaene, A. B. Hall, J. Glick, S. L. Coy, and P. Vouros. 2013. “A Differential Mobility Spectrometry/Mass Spectrometry Platform for the Rapid Detection and Quantitation of DNA Adduct dG-ABP.” *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM* 27 (13): 1473–80. <https://doi.org/10.1002/rcm.6591>.
- Kamber, M., S. Flückiger-Isler, G. Engelhardt, R. Jaekch, and E. Zeiger. 2009. “Comparison of the Ames II and Traditional Ames Test Responses with Respect to Mutagenicity, Strain Specificities, Need for Metabolism and Correlation with Rodent Carcinogenicity.” *Mutagenesis* 24 (4): 359–66. <https://doi.org/10.1093/mutage/geb017>.
- Kamiya, H., M. Suzuki, Y. Komatsu, H. Miura, K. Kikuchi, T. Sakaguchi, N. Murata, C. Masutani, F. Hanaoka, and E. Ohtsuka. 1992. “An Abasic Site Analogue Activates a c-Ha- Ras Gene by a Point Mutation at Modified and Adjacent Positions.” *Nucleic Acids Research* 20 (17): 4409–15. <https://doi.org/10.1093/nar/20.17.4409>.
- Keith, G., and G. Dirheimer. 1995. “Postlabeling: A Sensitive Method for Studying DNA Adducts and Their Role in Carcinogenesis.” *Current Opinion in Biotechnology* 6 (1): 3–11.
- Keith, L. H. 2015. “The Source of U.S. EPA’s Sixteen PAH Priority Pollutants.” *Polycyclic Aromatic Compounds* 35 (2–4): 147–60. <https://doi.org/10.1080/10406638.2014.892886>.
- Keith, L. H., and D. B. Walters. 1991. *National Toxicology Program’s Chemical Solubility Compendium*. CRC Press.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. “Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics.” *British Journal of Cancer* 26 (4): 239–57. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>.
- Keyte, I. J., A. Albinet, and R. M. Harrison. 2016. “On-Road Traffic Emissions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Oxy- and Nitro- Derivative Compounds Measured in Road Tunnel Environments.” *Science of The Total Environment* 566–567 (October): 1131–42. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.152>.
- Khan, Q. A., and L. M. Anderson. 2001. “Hydrocarbon Carcinogens Evade Cellular Defense Mechanism of G1 Arrest in Nontransformed and Malignant Lung Cell Lines.” *Toxicology and Applied Pharmacology* 173 (2): 105–13. <https://doi.org/10.1006/taap.2001.9172>.

- Khan, Q. A., K. H. Vousden, and A. Dipple. 1999. "Lack of p53-Mediated G1 Arrest in Response to an Environmental Carcinogen." *Oncology* 57 (3): 258–64. <https://doi.org/10.1159/000012040>.
- Kienzler, A., X. Tronchère, A. Devaux, and S. Bony. 2012. "Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 Fish Cell Lines for Genotoxicity Testing of Environmental Pollutants by Means of a Fpg-Modified Comet Assay." *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 26 (3): 500–510. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.01.001>.
- Kim, B. S., and B. H. Margolin. 1999. "Statistical Methods for the Ames Salmonella Assay: A Review." *Mutation Research* 436 (1): 113–22.
- Kim, S. J., C. -B. Ko, C. Park, B. -R. Kim, T. -H. Sung, D. -H. Koh, N. -S. Kim, K. -J. Oh, S. -Y. Chung, and R. Park. 2005. "p38 MAP Kinase Regulates Benzo(a)pyrene-Induced Apoptosis through the Regulation of p53 Activation." *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444 (2): 121–29. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.10.009>.
- Ko, C. -B., S. -J. Kim, C. Park, B. -R. Kim, C. -H. Shin, S. Choi, S. -Y. Chung, et al. 2004. "Benzo(a)pyrene-Induced Apoptotic Death of Mouse Hepatoma Hepa1c1c7 Cells via Activation of Intrinsic Caspase Cascade and Mitochondrial Dysfunction." *Toxicology* 199 (1): 35–46. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.01.039>.
- Koc, H., and J. A. Swenberg. 2002. "Applications of Mass Spectrometry for Quantitation of DNA Adducts." *Journal of Chromatography B, Analytical Chemistry in Occupational and Environmental Medicine*, 778 (1): 323–43. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(02\)00135-6](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(02)00135-6).
- Kochany, J., and R. J. Maguire. 1994. "Abiotic Transformations of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons and Polynuclear Aromatic Nitrogen Heterocycles in Aquatic Environments." *Science of The Total Environment* 144 (1): 17–31. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(94\)90424-3](https://doi.org/10.1016/0048-9697(94)90424-3).
- Kopp, B., L. Khoury, and Marc Audebert. 2019. "Validation of the γ H2AX Biomarker for Genotoxicity Assessment: A Review." *Archives of Toxicology* 93 (8): 2103–14. <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02511-9>.
- Kurihara, R., F. Shiraishi, N. Tanaka, and S. Hashimoto. 2005. "Presence and Estrogenicity of Anthracene Derivatives in Coastal Japanese Waters." *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 (8): 1984–93. <https://doi.org/10.1897/04-310R.1>.
- Lakhani, S. A., A. Masud, K. Kuida, G. A. Porter, C. J. Booth, W. Z. Mehal, I. Inayat, and R. A. Flavell. 2006. "Caspases 3 and 7: Key Mediators of Mitochondrial Events of Apoptosis." *Science (New York, N.Y.)* 311 (5762): 847–51. <https://doi.org/10.1126/science.1115035>.
- Lamkanfi, M., and T. -D. Kanneganti. 2010. "Caspase-7: A Protease Involved in Apoptosis and Inflammation." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 42 (1): 21–24. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.09.013>.
- Landkocz, Y., F. Ledoux, V. André, F. Cazier, P. Genevray, D. Dewaele, P. J. Martin, et al. 2017. "Fine and Ultrafine Atmospheric Particulate Matter at a Multi-Influenced Urban Site: Physicochemical Characterization, Mutagenicity and Cytotoxicity." *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 221 (February): 130–40. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.054>.
- Langan, L. M., S. Arossa, S. F. Owen, and A. N. Jha. 2018. "Assessing the Impact of Benzo[a]pyrene with the in Vitro Fish Gut Model: An Integrated Approach for Eco-

- Genotoxicological Studies." *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 826 (February): 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2017.12.009>.
- Large, A. T., J. P. Shaw, L. D. Peters, A. D. McIntosh, L. Webster, A. Mally, and J. K. Chipman. 2002. "Different Levels of Mussel (*Mytilus Edulis*) DNA Strand Breaks Following Chronic Field and Acute Laboratory Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." *Marine Environmental Research* 54 (3–5): 493–97.
- Larsson, M., J. Hagberg, J. P. Giesy, and M. Engwall. 2014. "Time-Dependent Relative Potency Factors for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Derivatives in the H4IIE-Luc Bioassay." *Environmental Toxicology and Chemistry* 33 (4): 943–53. <https://doi.org/10.1002/etc.2517>.
- Lawrence, C. W., A. Borden, S. K. Banerjee, and J. E. LeClerc. 1990. "Mutation Frequency and Spectrum Resulting from a Single Abasic Site in a Single-Stranded Vector." *Nucleic Acids Research* 18 (8): 2153–57. <https://doi.org/10.1093/nar/18.8.2153>.
- Laws, G. M., S. P. Adams, W. W. Nichols, and J. R. Selden. 1994. "Detection of DNA Adducts by ³²P-Postlabeling and Multifraction Contact-Transfer Thin-Layer Chromatography." *Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology* 23 (2): 308–12.
- Layshock, J. A., G. Wilson, and K. A. Anderson. 2010. "Ketone and Quinone-Substituted Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mussel Tissue, Sediment, Urban Dust, and Diesel Particulate Matrices." *Environmental Toxicology and Chemistry* 29 (11): 2450–60. <https://doi.org/10.1002/etc.301>.
- "Le cancer en chiffres | Fondation ARC pour la recherche sur le cancer." n.d. Accessed October 28, 2019. <https://www.fondation-arc.org/le-cancer-en-chiffres>.
- Le Goff, J., J. Gallois, L. Pelhuet, M. H. Devier, H. Budzinski, D. Pottier, V. André, and J. Cachot. 2006. "DNA Adduct Measurements in Zebra Mussels, *Dreissena Polymorpha*, Pallas. Potential Use for Genotoxicant Biomonitoring of Fresh Water Ecosystems." *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 79 (1): 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.05.002>.
- Lechner, J. F., A. Haugen, I. A. McClendon, and E. W. Pettis. 1982. "Clonal Growth of Normal Adult Human Bronchial Epithelial Cells in a Serum-Free Medium." *In Vitro* 18 (7): 633–42.
- Lee, B. -D., M. Iso, and M. Hosomi. 2001. "Prediction of Fenton Oxidation Positions in Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Frontier Electron Density." *Chemosphere* 42 (4): 431–35. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00061-8](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00061-8).
- Lei, W., R. Yu, S. Mandlekar, and A.-N. T. Kong. 1998. "Induction of Apoptosis and Activation of Interleukin 1 β -Converting Enzyme/Ced-3 Protease (Caspase-3) and c-Jun NH₂-Terminal Kinase 1 by Benzo(a)pyrene." *Cancer Research* 58 (10): 2102–6.
- Lemieux, C. L., I. B. Lambert, S. Lundstedt, M. Tysklind, and P. A. White. 2008. "Mutagenic Hazards of Complex Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Mixtures in Contaminated Soil." *Environmental Toxicology and Chemistry* 27 (4): 978–90. <https://doi.org/10.1897/07-157.1>.
- Leonard, J. R., B. J. Klocke, C. D'sa, R. A. Flavell, and K. A. Roth. 2002. "Strain-Dependent Neurodevelopmental Abnormalities in Caspase-3-Deficient Mice." *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 61 (8): 673–77. <https://doi.org/10.1093/jnen/61.8.673>.

- Leroyer, A., F. Jeandel, A. Maitre, M. Howsam, D. Deplanque, M. Mazzuca, and C. Nisse. 2010. "1-Hydroxypyrene and 3-Hydroxybenzo[a]pyrene as Biomarkers of Exposure to PAH in Various Environmental Exposure Situations." *Science of The Total Environment* 408 (5): 1166–73. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.10.073>.
- Li, G., S. Wu, J. Zeng, L. Wang, and W. Yu. 2016. "Effect of Frying and Aluminium on the Levels and Migration of Parent and Oxygenated PAHs in a Popular Chinese Fried Bread Youtiao." *Food Chemistry* 209 (October): 123–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.036>.
- Li, J., H. Dong, D. Zhang, B. Han, C. Zhu, S. Liu, X. Liu, Q. Ma, and X. Li. 2015. "Sources and Ecological Risk Assessment of PAHs in Surface Sediments from Bohai Sea and Northern Part of the Yellow Sea, China." *Marine Pollution Bulletin* 96 (1): 485–90. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.05.002>.
- Lieberman, D. F., R. Fink, F. L. Schäfer, R. Mulcahy, and A. A. Stark. 1982. "Mutagenicity of Anthraquinone and Hydroxylated Anthraquinones in the Ames/Salmonella Microsome System." *Applied and Environmental Microbiology* 43 (6): 1354–59.
- Lin, L., L. Dong, X. Meng, Q. Li, Z. Huang, C. Li, R. Li, W. Yang, and J. Crittenden. 2018. "Distribution and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Phthalic Acid Esters in Water and Surface Sediment from the Three Gorges Reservoir." *Journal of Environmental Sciences* 69 (July): 271–80. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.11.004>.
- Lindahl, T., and B. Nyberg. 1974. "Heat-Induced Deamination of Cytosine Residues in Deoxyribonucleic Acid." *Biochemistry* 13 (16): 3405–10. <https://doi.org/10.1021/bi00713a035>.
- Liu, S., and Y. Wang. 2015. "Mass Spectrometry for the Assessment of the Occurrence and Biological Consequences of DNA Adducts." *Chemical Society Reviews* 44 (21): 7829–54. <https://doi.org/10.1039/c5cs00316d>.
- Liu, X., H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang. 1997. "DFF, a Heterodimeric Protein That Functions Downstream of Caspase-3 to Trigger DNA Fragmentation during Apoptosis." *Cell* 89 (2): 175–84.
- Loeb, L. A., and B. D. Preston. 1986. "Mutagenesis by Apurinic/Apyrimidinic Sites." *Annual Review of Genetics* 20: 201–30. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.20.120186.001221>.
- Loechler, E. L. 1995. "How Are Potent Bulky Carcinogens Able to Induce Such a Diverse Array of Mutations?" *Molecular Carcinogenesis* 13 (4): 213–19.
- Loomis, D., Y. Grosse, B. Lauby-Secretan, F. El Ghissassi, V. Bouvard, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, et al. 2013. "The Carcinogenicity of Outdoor Air Pollution." *The Lancet. Oncology* 14 (13): 1262–63.
- Lu, A. H., E. L. Salabas, and F. Schüth. 2007. "Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application." *Angewandte Chemie International Edition* 46 (8): 1222–44. <https://doi.org/10.1002/anie.200602866>.
- Lundstedt, S., P. Haglund, and L. Öberg. 2003. "Degradation and Formation of Polycyclic Aromatic Compounds during Bioslurry Treatment of an Aged Gasworks Soil." *Environmental Toxicology and Chemistry* 22 (7): 1413–20.
- Lundstedt, S., P. Haglund, and L. Öberg. 2006. "Simultaneous Extraction and Fractionation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Oxygenated Derivatives in Soil Using Selective Pressurized Liquid Extraction." *Analytical Chemistry* 78 (9): 2993–3000. <https://doi.org/10.1021/ac052178f>.

- Lundstedt, S., P. A. White, C. L. Lemieux, K. D. Lynes, I. B. Lambert, L. Oberg, P. Haglund, and M. Tysklind. 2007. "Sources, Fate, and Toxic Hazards of Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) at PAH-Contaminated Sites." *Ambio* 36 (6): 475–85.
- Machala, M., M. Ciganek, L. Bláha, K. Minksová, and J. Vondráck. 2001. "Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated and Estrogenic Activities of Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Azaarenes Originally Identified in Extracts of River Sediments." *Environmental Toxicology and Chemistry* 20 (12): 2736–43.
- MacLeod, M. C., A. Daylong, G. Adair, and R. M. Humphrey. 1991. "Differences in the Rate of DNA Adduct Removal and the Efficiency of Mutagenesis for Two Benzo[a]pyrene Diol Epoxides in CHO Cells." *Mutation Research/Genetic Toxicology* 261 (4): 267–79. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(91\)90042-K](https://doi.org/10.1016/0165-1218(91)90042-K).
- Madureira, D. J., F. T. Weiss, P. Van Midwoud, D. E. Helbling, S. J. Sturla, and K. Schirmer. 2014. "Systems Toxicology Approach to Understand the Kinetics of Benzo(a)pyrene Uptake, Biotransformation, and DNA Adduct Formation in a Liver Cell Model." *Chemical Research in Toxicology* 27 (3): 443–53. <https://doi.org/10.1021/tx400446q>.
- Malich, G., B. Markovic, and C. Winder. 1997. "The Sensitivity and Specificity of the MTS Tetrazolium Assay for Detecting the in Vitro Cytotoxicity of 20 Chemicals Using Human Cell Lines." *Toxicology* 124 (3): 179–92. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(97\)00151-0](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(97)00151-0).
- Mallakin, A., B. J. McConkey, G. Miao, B. McKibben, V. Snieckus, D. G. Dixon, and B. M. Greenberg. 1999. "Impacts of Structural Photomodification on the Toxicity of Environmental Contaminants: Anthracene Photooxidation Products." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 43 (2): 204–12. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1764>.
- Mancini, R., G. Romano, A. Sgambato, G. Flamini, M. R. Giovagnoli, A. Boninsegna, C. Carraro, A. Vecchione, and A. Cittadini. 1999. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-DNA Adducts in Cervical Smears of Smokers and Nonsmokers." *Gynecologic Oncology* 75 (1): 68–71. <https://doi.org/10.1006/gyno.1999.5525>.
- Manso, J. A., I. F. C. Camacho, E. Calle, and J. Casado. 2011. "Alkylating Potential of A, β -Unsaturated Compounds." *Organic & Biomolecular Chemistry* 9 (18): 6226–33. <https://doi.org/10.1039/c1ob05298e>.
- Margolin, B. H., N. Kaplan, and E. Zeiger. 1981. "Statistical Analysis of the Ames Salmonella/Microsome Test." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (6): 3779–83.
- Mastrangelo, G., E. Fadda, and V. Marzia. 1996. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Cancer in Man." *Environmental Health Perspectives* 104 (11): 1166–70. <https://doi.org/10.1289/ehp.961041166>.
- Mather, B. D., K. Viswanathan, K. M. Miller, and T. E. Long. 2006. "Michael Addition Reactions in Macromolecular Design for Emerging Technologies." *Progress in Polymer Science* 31 (5): 487–531. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.03.001>.
- Matsui, T., N. Yamada, H. Kuno, and R. A. Kanaly. 2019. "Formation of Bulky DNA Adducts by Non-Enzymatic Production of 1,2-Naphthoquinone-Epoxyde from 1,2-Naphthoquinone under Physiological Conditions." *Chemical Research in Toxicology*, August. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00088>.

- Mattsson, Å., B. Jernström, I. A. Cotgreave, and E. Bajak. 2009. "H2AX Phosphorylation in A549 Cells Induced by the Bulky and Stable DNA Adducts of Benzo[a]pyrene and Dibenzo[a,l]pyrene Diol Epoxides." *Chemico-Biological Interactions* 177 (1): 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2008.09.015>.
- Mattsson, A., S. Lundstedt, and U. Stenius. 2009. "Exposure of HepG2 Cells to Low Levels of PAH-Containing Extracts from Contaminated Soils Results in Unpredictable Genotoxic Stress Responses." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 50 (4): 337–48. <https://doi.org/10.1002/em.20486>.
- McCarrick, S., V. Cunha, O. Zapletal, J. Vondráček, and K. Dreij. 2019. "In Vitro and in Vivo Genotoxicity of Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." *Environmental Pollution* 246 (March): 678–87. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.092>.
- McCoull, K. D., D. Rindgen, I. A. Blair, and T. M. Penning. 1999. "Synthesis and Characterization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon O-Quinone Depurinating N7-Guanine Adducts." *Chemical Research in Toxicology* 12 (3): 237–46. <https://doi.org/10.1021/tx980182z>.
- Meek, M. E. B. 2008. "Recent Developments in Frameworks to Consider Human Relevance of Hypothesized Modes of Action for Tumours in Animals." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49 (2): 110–16. <https://doi.org/10.1002/em.20369>.
- Mellon, I., V. A. Bohr, C. A. Smith, and P. C. Hanawalt. 1986. "Preferential DNA Repair of an Active Gene in Human Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (23): 8878–82. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.23.8878>.
- Meyer, S., S. Cartellieri, and H. Steinhart. 1999. "Simultaneous Determination of PAHs, Hetero-PAHs (N, S, O), and Their Degradation Products in Creosote-Contaminated Soils. Method Development, Validation, and Application to Hazardous Waste Sites." *Analytical Chemistry* 71 (18): 4023–29. <https://doi.org/10.1021/ac990136j>.
- Meyer, S., and H. Steinhart. 2001. "Fate of PAHs and Hetero-PAHs during Biodegradation in a Model Soil/Compost-System: Formation of Extractable Metabolites." *Water, Air, and Soil Pollution* 132 (3–4): 215–31. <https://doi.org/10.1023/A:1013252021388>.
- Miller, E. C. 1951. "Studies on the Formation of Protein-Bound Derivatives of 3,4-Benzopyrene in the Epidermal Fraction of Mouse Skin." *Cancer Research* 11 (2): 100–108.
- Miller, E. C., and J. A. Miller. 1981. "Mechanisms of Chemical Carcinogenesis." *Cancer* 47 (5 Suppl): 1055–64.
- Miller-Schulze, J. P., M. Paulsen, T. Kameda, A. Toriba, K. Hayakawa, B. Cassidy, L. Naeher, M. A. Villalobos, and C. D. Simpson. 2016. "Nitro-PAH Exposures of Occupationally-Exposed Traffic Workers and Associated Urinary 1-Nitropyrene Metabolite Concentrations." *Journal of Environmental Sciences* 49 (November): 213–21. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.06.007>.
- Misaki, K., H. Kawami, T. Tanaka, H. Handa, M. Nakamura, S. Matsui, and T. Matsuda. 2007b. "Aryl Hydrocarbon Receptor Ligand Activity of Polycyclic Aromatic Ketones and Polycyclic Aromatic Quinones." *Environmental Toxicology and Chemistry* 26 (7): 1370–79. <https://doi.org/10.1897/06-465R.1>.

- Misaki, K., S. Matsui, and T. Matsuda. 2007a. "Metabolic Enzyme Induction by HepG2 Cells Exposed to Oxygenated and Nonoxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." *Chemical Research in Toxicology* 20 (2): 277–83. <https://doi.org/10.1021/tx060197u>.
- Misaki, K., T. Takamura-Enya, H. Ogawa, K. Takamori, and M. Yanagida. 2016. "Tumour-Promoting Activity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Oxygenated or Nitrated Derivatives." *Mutagenesis* 31 (2): 205–13. <https://doi.org/10.1093/mutage/gev076>.
- Mitamura, S., H. Ikawa, N. Mizuno, Y. Kaziro, and H. Itoh. 1998. "Cytosolic Nuclease Activated by Caspase-3 and Inhibited by DFF-45." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 243 (2): 480–84. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.8122>.
- Moller, M., I. Hagen, and T. Ramdahl. 1985. "Mutagenicity of Polycyclic Aromatic Compounds (PAC) Identified in Source Emissions and Ambient Air." *Mutation Research* 157 (August): 149–56. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(85\)90110-7](https://doi.org/10.1016/0165-1218(85)90110-7).
- Monks, T. J., R. P. Hanzlik, G. M. Cohen, D. Ross, and D. G. Graham. 1992. "Quinone Chemistry and Toxicity." *Toxicology and Applied Pharmacology* 112 (1): 2–16. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(92\)90273-U](https://doi.org/10.1016/0041-008X(92)90273-U).
- Mortelmans, K., and E. Zeiger. 2000. "The Ames Salmonella/Microsome Mutagenicity Assay." *Mutation Research* 455 (1–2): 29–60.
- Motykiewicz, G., E. Małusecka, E. Grzybowska, M. Chorazy, Y. J. Zhang, F. P. Perera, and R. M. Santella. 1995. "Immunohistochemical Quantitation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-DNA Adducts in Human Lymphocytes." *Cancer Research* 55 (7): 1417–22.
- Motykiewicz, G., J. Michalska, J. Pendzich, E. Małusecka, M. Strózyk, E. Kalinowska, D. Butkiewicz, et al. 1998. "A Molecular Epidemiology Study in Women from Upper Silesia, Poland." *Toxicology Letters* 96–97 (August): 195–202. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(98\)00072-1](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(98)00072-1).
- Nakayama, J., S. H. Yuspa, and M. C. Poirier. 1984. "Benzo(a)pyrene-DNA Adduct Formation and Removal in Mouse Epidermis in Vivo and in Vitro: Relationship of DNA Binding to Initiation of Skin Carcinogenesis." *Cancer Research* 44 (9): 4087–95.
- National Research Council (US) Committee on Chemical Environmental. 1983. *The Mutagenicity of Carcinogenic Compounds*. National Academies Press (US). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK217789/>.
- National Toxicology Program. 1992. "Toxicology and Carcinogenesis Studies of Naphthalene (CAS No. 91-20-3) in B6C3F1 Mice (Inhalation Studies)." *National Toxicology Program Technical Report Series* 410 (April): 1–172.
- National Toxicology Program. 2000. "Toxicology and Carcinogenesis Studies of Naphthalene (Cas No. 91-20-3) in F344/N Rats (Inhalation Studies)." *National Toxicology Program Technical Report Series*, no. 500 (December): 1–173.
- Nesnow, S., G. Nelson, W. T. Padgett, M. H. George, T. Moore, L. C. King, L. D. Adams, and J. A. Ross. 2010. "Lack of Contribution of Covalent Benzo[a]pyrene-7,8-Quinone-DNA Adducts in Benzo[a]pyrene-Induced Mouse Lung Tumorigenesis." *Chemico-Biological Interactions* 186 (2): 157–65. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2010.03.037>.
- Nesnow, S., J. A. Ross, G. D. Stoner, and M. J. Mass. 1995. "Mechanistic Linkage between DNA Adducts, Mutations in Oncogenes and Tumorigenesis of

- Carcinogenic Environmental Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Strain A/J Mice." *Toxicology* 105 (2–3): 403–13. [https://doi.org/10.1016/0300-483x\(95\)03238-b](https://doi.org/10.1016/0300-483x(95)03238-b).
- Neumann, H. G. 1980. "Dose-Response Relationship in the Primary Lesion of Strong Electrophilic Carcinogens." *Archives of Toxicology. Supplement. = Archiv Fur Toxikologie. Supplement 3*: 69–77.
- Nigro, J. M., S. J. Baker, A. C. Preisinger, J. M. Jessup, R. Hostetter, K. Cleary, S. H. Bigner, N. Davidson, S. Baylin, and P. Devilee. 1989. "Mutations in the p53 Gene Occur in Diverse Human Tumour Types." *Nature* 342 (6250): 705–8. <https://doi.org/10.1038/342705a0>.
- NIST. 2006. "Certificate of Analysis SRM 1650b. Diesel Particulate Matter. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg."
- Nocun, M. S., and M. M. Schantz. 2013. "Determination of Selected Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Oxy-PAHs) in Diesel and Air Particulate Matter Standard Reference Materials (SRMs)." *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405 (16): 5583–93. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-6957-3>.
- NTP. 2000. "Toxicology and Carcinogenesis Studies of Naphthalene (Cas No. 91-20-3) in F344/N Rats (Inhalation Studies)." *National Toxicology Program Technical Report Series*, no. 500 (December): 1–173.
- OCDE. 1997. "Essai N° 471: Essai de Mutation Réverse Sur Des Bactéries, Lignes Directrices de l'OCDE Pour Les Essais de Produits Chimiques." *Éditions OCDE, Paris* Section 4. <https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264071254-fr>.
- Oguri, T., S. V. Singh, K. Nemoto, and J. S. Lazo. 2003. "The Carcinogen (7R,8S)-Dihydroxy-(9S,10R)-Epoxy-7,8,9,10-Tetrahydrobenzo[a]pyrene Induces Cdc25B Expression in Human Bronchial and Lung Cancer Cells." *Cancer Research* 63 (4): 771–75.
- Ohnishi, S., Y. Hiraku, K. Hasegawa, K. Hirakawa, S. Oikawa, M. Murata, and S. Kawanishi. 2018. "Mechanism of Oxidative DNA Damage Induced by Metabolites of Carcinogenic Naphthalene." *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 827 (March): 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.01.005>.
- Oliveira Galvão, M. F. de, N. de Oliveira Alves, P. A. Ferreira, S. Caumo, P. de Castro Vasconcellos, P. Artaxo, S. de Souza Hacon, D. A. Roubicek, and S. R. Batistuzzo de Medeiros. 2018. "Biomass Burning Particles in the Brazilian Amazon Region: Mutagenic Effects of Nitro and Oxy-PAHs and Assessment of Health Risks." *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 233 (February): 960–70. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.068>.
- Onat, B., H. Bakal, H. Arioglu, A. Bozdogan, E. Kafkas, and A. EL Sabagh. 2017. "Comparison of Volatile Composition of Raw and Roasted Halisbey Peanut Variety Using HS-SPME GC/MS Techniques." *Fresenius Environmental Bulletin* 26 (June): 5198–5204.
- Osterman-Golkar, S., L. Ehrenberg, D. Segerbäck, and I. Hällström. 1976. "Evaluation of Genetic Risks of Alkylating Agents. II. Haemoglobin as a Dose Monitor." *Mutation Research* 34 (1): 1–10.
- Ovrevik, J., V. M. Arlt, E. Oya, E. Nagy, S. Mollerup, D. H. Phillips, M. Låg, and J. A. Holme. 2010. "Differential Effects of Nitro-PAHs and Amino-PAHs on Cytokine and Chemokine Responses in Human Bronchial Epithelial BEAS-2B Cells." *Toxicology*

- and *Applied Pharmacology* 242 (3): 270–80.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.10.017>.
- Page, T. J., S. O'Brien, C. R. Jefcoate, and C. J. Czuprynski. 2002. "7,12-Dimethylbenz[a]anthracene Induces Apoptosis in Murine Pre-B Cells through a Caspase-8-Dependent Pathway." *Molecular Pharmacology* 62 (2): 313–19.
<https://doi.org/10.1124/mol.62.2.313>.
- Pálková, L., J. Vondráček, L. Trilecová, M. Ciganek, K. Pěňčíková, J. Neča, A. Milcová, J. Topinka, and M. Machala. 2015. "The Aryl Hydrocarbon Receptor-Mediated and Genotoxic Effects of Fractionated Extract of Standard Reference Diesel Exhaust Particle Material in Pulmonary, Liver and Prostate Cells." *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 29 (3): 438–48.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.12.002>.
- Pannetier, P., L. Fuster, C. Clérandeau, C. Lacroix, P. -Y. Gourves, J. Cachot, and B. Morin. 2018. "Usefulness of RTL-W1 and OLCAB-e3 Fish Cell Lines and Multiple Endpoint Measurements for Toxicity Evaluation of Unknown or Complex Mixture of Chemicals." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 150 (April): 40–48.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.027>.
- Park, B. K., M. Pirmohamed, and N. R. Kitteringham. 1995. "The Role of Cytochrome P450 Enzymes in Hepatic and Extrahepatic Human Drug Toxicity." *Pharmacology & Therapeutics* 68 (3): 385–424.
- Park, D. -H., J. W. Shin, S. -K. Park, J. -N. Seo, L. Li, J. -J. Jang, and M. -J. Lee. 2009. "Diethylnitrosamine (DEN) Induces Irreversible Hepatocellular Carcinogenesis through Overexpression of G1/S-Phase Regulatory Proteins in Rat." *Toxicology Letters* 191 (2–3): 321–26. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.09.016>.
- Park, J. -H., S. Gopishetty, L. M. Szewczuk, A. B. Troxel, R. G. Harvey, and T. M. Penning. 2005. "Formation of 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-deoxyguanosine (8-Oxo-dGuo) by PAH O-Quinones: Involvement of Reactive Oxygen Species and copper(II)/copper(I) Redox Cycling." *Chemical Research in Toxicology* 18 (6): 1026–37.
<https://doi.org/10.1021/tx050001a>.
- Patrinely, A., M. N. Clifford, and C. Ioannides. 1996. "Contribution of Phenols, Quinones and Reactive Oxygen Species to the Mutagenicity of White Grape Juice in the Ames Test." *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 34 (9): 869–72.
[https://doi.org/10.1016/s0278-6915\(96\)00048-8](https://doi.org/10.1016/s0278-6915(96)00048-8).
- Peakall, D. B., and C. H. Walker. 1994. "The Role of Biomarkers in Environmental Assessment (3). Vertebrates." *Ecotoxicology* 3 (3): 173–79.
<https://doi.org/10.1007/BF00117082>.
- Pellegrin, V. 1983. "Molecular Formulas of Organic Compounds: The Nitrogen Rule and Degree of Unsaturation." *Journal of Chemical Education* 60 (8): 626–33.
- Penning, T. M. 2017. "Genotoxicity of Ortho-Quinones: Reactive Oxygen Species versus Covalent Modification." *Toxicology Research* 6 (6): 740–54.
<https://doi.org/10.1039/c7tx00223h>.
- Pentland, A. P., J. George, C. Moran, and P. Needleman. 1987. "Cellular Confluence Determines Injury-Induced Prostaglandin E2 Synthesis by Human Keratinocyte Cultures." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 919 (1): 71–78. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(87\)90219-0](https://doi.org/10.1016/0005-2760(87)90219-0).
- Pereira, M. A., and L. W. Chang. 1981. "Binding of Chemical Carcinogens and Mutagens to Rat Hemoglobin." *Chemico-Biological Interactions* 33 (2–3): 301–5.

- Perera, F. P., and I. B. Weinstein. 2000. "Molecular Epidemiology: Recent Advances and Future Directions." *Carcinogenesis* 21 (3): 517–24. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.517>.
- Perera, F. P., and R. M. Whyatt. 1994. "Biomarkers and Molecular Epidemiology in Mutation/Cancer Research." *Mutation Research* 313 (2–3): 117–29.
- Persoons, R., J. Richard, C. Herve, S. Montlevier, M. Marques, and A. Maitre. 2018. "Biomonitoring of Styrene Occupational Exposures: Biomarkers and Determinants." *Toxicology Letters*, Biomonitoring for chemical risk assessment and control, 298 (December): 99–105. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.06.1211>.
- Pfau, W., U. Brockstedt, K. D. Söhren, and H. Marquardt. 1994. "32P-Post-Labeling Analysis of DNA Adducts Formed by Food-Derived Heterocyclic Amines: Evidence for Incomplete Hydrolysis and a Procedure for Adduct Pattern Simplification." *Carcinogenesis* 15 (5): 877–82. <https://doi.org/10.1093/carcin/15.5.877>.
- Piccirillo, V. J., M. G. Bird, R. J. Lewis, and W. J. Bover. 2012. "Preliminary Evaluation of the Human Relevance of Respiratory Tumors Observed in Rodents Exposed to Naphthalene." *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP* 62 (3): 433–40. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.01.008>.
- Pinho, B., C. Sousa, J. Oliveira, P. Valentão, and P. Andrade. 2012. "Naphthoquinones' Biological Activities and Toxicological Effects." *Bioactive Compounds: Types, Biological Activities and Health Effects*, March, 181–218.
- Plošnik, A., M. Vračko, and M. Sollner Dolenc. 2016. "Mutagenic and Carcinogenic Structural Alerts and Their Mechanisms of Action." *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju* 67 (3): 169–82. <https://doi.org/10.1515/aiht-2016-67-2801>.
- Pohl, A., M. Kostecki, I. Jureczko, M. Czaplicka, and B. Łozowski. 2018. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water and Bottom Sediments of a Shallow, Lowland Dammed Reservoir (on the Example of the Reservoir Blachownia, South Poland)." *Archives of Environmental Protection* 44 (January): 10–23. <https://doi.org/10.24425/118177>.
- Poirier, M. C., J. R. Stanley, J. B. Beckwith, I. B. Weinstein, and S. H. Yuspa. 1982. "Indirect Immunofluorescent Localization of Benzo[a]pyrene Adducted to Nucleic Acids in Cultured Mouse Keratinocyte Nuclei." *Carcinogenesis* 3 (3): 345–48. <https://doi.org/10.1093/carcin/3.3.345>.
- Poirier, M. C., and A. Weston. 1996. "Human DNA Adduct Measurements: State of the Art." *Environmental Health Perspectives* 104 (Suppl 5): 883–93.
- Pott, P. 1775. *Chirurgical Observations: Relative to the Cataract, the Polypus of the Nose, the Cancer of the Scrotum, the Different Kinds of Ruptures, and the Mortification of the Toes and Feet*. London: Printed by T.J. Carnegy, for L. Hawes, W. Clarke, and R. Collins. <http://galenet.galegroup.com/servlet/ECCO?c=1&stp=Author&ste=11&af=BN&ae=T007127&tiPG=1&dd=0&dc=flc&docNum=CW107455718&vrsn=1.0&srchtp=a&d4=0.33&n=10&SU=0LRM&locID=ureginalib>.
- Pradel, W., R. Mai, T. Gedrange, and G. Lauer. 2008. "Cell Passage and Composition of Culture Medium Effects Proliferation and Differentiation of Human Osteoblast-like Cells from Facial Bone." *Journal of Physiology and Pharmacology: An Official Journal of the Polish Physiological Society* 59 (Suppl): 47–58.
- Pretera, T., Y. Zhang, S. R. Spencer, C. A. Wilczak, and P. Talalay. 1993. "The Electrophile Counterattack Response: Protection against Neoplasia and Toxicity."

- Advances in Enzyme Regulation* 33: 281–96. [https://doi.org/10.1016/0065-2571\(93\)90024-8](https://doi.org/10.1016/0065-2571(93)90024-8).
- Price, P. S., and M. A. Jayjock. 2008. “Available Data on Naphthalene Exposures: Strengths and Limitations.” *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Supplement: Naphthalene State of the Science Symposium, 51 (2, Supplement): 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2007.10.010>.
- Puisieux, A., S. Lim, J. Groopman, and M. Ozturk. 1991. “Selective Targeting of p53 Gene Mutational Hotspots in Human Cancers by Etiologically Defined Carcinogens.” *Cancer Research* 51 (22): 6185–89.
- “Qualité de L’air Extérieur - Anses.” n.d. Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de L’alimentation, de L’environnement et Du Travail. Accessed October 28, 2019. <https://www.anses.fr/fr/content/qualit%C3%A9-de-l%E2%80%99air-ext%C3%A9rieur>.
- Quan, T., and J. C. States. 1996. “Preferential DNA Damage in the p53 Gene by Benzo[a]pyrene Metabolites in Cytochrome P4501A1-Expressing Xeroderma Pigmentosum Group A Cells.” *Molecular Carcinogenesis* 16 (1): 32–43. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2744\(199605\)16:1<32::AID-MC5>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2744(199605)16:1<32::AID-MC5>3.0.CO;2-Q).
- Rai, Y., R. Pathak, N. Kumari, D. K. Sah, S. Pandey, N. Kalra, R. Soni, B. S. Dwarakanath, and A. N. Bhatt. 2018. “Mitochondrial Biogenesis and Metabolic Hyperactivation Limits the Application of MTT Assay in the Estimation of Radiation Induced Growth Inhibition.” *Scientific Reports* 8 (1): 1531. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19930-w>.
- Rakhshae, R., and Y. Noorani. 2017. “Comparing Three Methods of Simultaneous Synthesis and Stabilization of Fe₃O₄ Nanoparticles: Changing Physicochemical Properties of Products to Improve Kinetic and Thermodynamic of Dye Adsorption.” *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 422 (January): 128–40. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.08.078>.
- Ramdahl, T. 1983. “Polycyclic Aromatic Ketones in Environmental Samples.” *Environmental Science & Technology* 17 (11): 666–70. <https://doi.org/10.1021/es00117a008>.
- Randall, K. L., D. Argoti, J. D. Paonessa, Y. Ding, Z. Oaks, Y. Zhang, and P. Vouros. 2010. “An Improved Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Method for the Quantification of 4-Aminobiphenyl DNA Adducts in Urinary Bladder Cells and Tissues.” *Journal of Chromatography. A* 1217 (25): 4135–43. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.006>.
- Randerath, K., M. V. Reddy, and R. C. Gupta. 1981. “³²P-Labeling Test for DNA Damage.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (10): 6126–29. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.10.6126>.
- Ravanat, J. L., R. J. Turesky, E. Gremaud, L. J. Trudel, and R. H. Stadler. 1995. “Determination of 8-Oxoguanine in DNA by Gas Chromatography--Mass Spectrometry and HPLC--Electrochemical Detection: Overestimation of the Background Level of the Oxidized Base by the Gas Chromatography--Mass Spectrometry Assay.” *Chemical Research in Toxicology* 8 (8): 1039–45.
- Ravindra, K., R. Sokhi, and R. Van Grieken. 2008. “Atmospheric Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Source Attribution, Emission Factors and Regulation.” *Atmospheric Environment* 42 (13): 2895–2921. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.12.010>.

- Raychoudhury, S. S., and D. Kubinski. 2003. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Induced Cytotoxicity in Cultured Rat Sertoli Cells Involves Differential Apoptotic Response." *Environmental Health Perspectives* 111 (1): 33–38. <https://doi.org/10.1289/ehp.5458>.
- Reddel, R. R., Y. Ke, B. I. Gerwin, M. G. McMenamin, J. F. Lechner, R. T. Su, D. E. Brash, J. B. Park, J. S. Rhim, and C. C. Harris. 1988. "Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells by Infection with SV40 or Adenovirus-12 SV40 Hybrid Virus, or Transfection via Strontium Phosphate Coprecipitation with a Plasmid Containing SV40 Early Region Genes." *Cancer Research* 48 (7): 1904–9.
- Reddy, M. V., and K. Randerath. 1986. "Nuclease P1-Mediated Enhancement of Sensitivity of ³²P-Postlabeling Test for Structurally Diverse DNA Adducts." *Carcinogenesis* 7 (9): 1543–51.
- Reed, M., M. Monske, F. Lauer, S. Meserole, J. Born, and S. Burchiel. 2003. "Benzo[a]pyrene Diones Are Produced by Photochemical and Enzymatic Oxidation and Induce Concentration-Dependent Decreases in the Proliferative State of Human Pulmonary Epithelial Cells." *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 66 (13): 1189–1205. <https://doi.org/10.1080/15287390306409>.
- Rehwagen, M., A. Müller, L. Massolo, O. Herbarth, and A. Ronco. 2005. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Associated with Particles in Ambient Air from Urban and Industrial Areas." *Science of The Total Environment* 348 (1): 199–210. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.12.050>.
- Reisen, F., and J. Arey. 2005. "Atmospheric Reactions Influence Seasonal PAH and Nitro-PAH Concentrations in the Los Angeles Basin." *Environmental Science & Technology* 39 (1): 64–73. <https://doi.org/10.1021/es035454l>.
- Ringuet, J., A. Albinet, E. Leoz-Garziandia, H. Budzinski, and E. Villenave. 2012. "Diurnal/Nocturnal Concentrations and Sources of Particulate-Bound PAHs, OPAHs and NPAHs at Traffic and Suburban Sites in the Region of Paris (France)." *Science of The Total Environment* 437 (October): 297–305. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.07.072>.
- Robertson, J. D., and S. Orrenius. 2000. "Molecular Mechanisms of Apoptosis Induced by Cytotoxic Chemicals." *Critical Reviews in Toxicology* 30 (5): 609–27. <https://doi.org/10.1080/10408440008951122>.
- Rodriguez, H., and E. L. Loechler. 1993a. "Mutagenesis by the (+)-Anti-Diol Epoxide of Benzo[a]pyrene: What Controls Mutagenic Specificity?" *Biochemistry* 32 (7): 1759–69. <https://doi.org/10.1021/bi00058a009>.
- Rodriguez, H., and E. L. Loechler. 1993b. "Mutational Specificity of the (+)-Anti-Diol Epoxide of Benzo[a]pyrene in a supF Gene of an Escherichia Coli Plasmid: DNA Sequence Context Influences Hotspots, Mutagenic Specificity and the Extent of SOS Enhancement of Mutagenesis." *Carcinogenesis* 14 (3): 373–83. <https://doi.org/10.1093/carcin/14.3.373>.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova, and W. M. Bonner. 1998. "DNA Double-Stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (10): 5858–68. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>.
- Romano, G., A. Sgambato, A. Boninsegna, G. Flamini, G. Curigliano, Q. Yang, V. La Gioia, et al. 1999. "Evaluation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-DNA Adducts in Exfoliated Oral Cells by an Immunohistochemical Assay." *Cancer Epidemiology*,

Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology 8 (1): 91–96.

- Romert, L., L. Dock, D. Jenssen, and B. Jernström. 1989. "Effects of Glutathione Transferase Activity on Benzo[a]pyrene 7,8-Dihydrodiol Metabolism and Mutagenesis Studied in a Mammalian Cell Co-Cultivation Assay." *Carcinogenesis* 10 (9): 1701–7. <https://doi.org/10.1093/carcin/10.9.1701>.
- Ross, D., H. Thor, S. Orrenius, and P. Moldeus. 1985. "Interaction of Menadione (2-Methyl-1,4-Naphthoquinone) with Glutathione." *Chemico-Biological Interactions* 55 (January): 177–84. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(85\)80126-5](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(85)80126-5).
- Ross, J. A., and S. Nesnow. 1999. "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Correlations between DNA Adducts and Ras Oncogene Mutations." *Mutation Research* 424 (1–2): 155–66. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(99\)00016-0](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(99)00016-0).
- Roth, W., and J. C. Reed. 2002. "Apoptosis and Cancer: When BAX Is TRAILing Away." *Nature Medicine* 8 (3): 216–18. <https://doi.org/10.1038/nm0302-216>.
- Ryu, H. -Y., J. K. Emberley, J. J. Schlezinger, L. L. Allan, S. Na, and D. H. Sherr. 2005. "Environmental Chemical-Induced Bone Marrow B Cell Apoptosis: Death Receptor-Independent Activation of a Caspase-3 to Caspase-8 Pathway." *Molecular Pharmacology* 68 (4): 1087–96. <https://doi.org/10.1124/mol.105.014712>.
- Saeed, M., S. Higginbotham, E. Rogan, and E. Cavalieri. 2007. "Formation of Depurinating N3adenine and N7guanine Adducts after Reaction of 1,2-Naphthoquinone or Enzyme-Activated 1,2-Dihydroxynaphthalene with DNA. Implications for the Mechanism of Tumor Initiation by Naphthalene." *Chemico-Biological Interactions* 165 (3): 175–88. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.12.007>.
- Saha, M., O. Minnetian, D. Fisher, E. Rogers, R. Annan, G. Kresbach, P. Vouros, and R. Giese. 1988. "Pentafluorobenzoylation of Alkyl and Related DNA Base Adducts Facilitates Their Determination by Electrophore Detection." *IARC Scientific Publications*, no. 89: 356–60.
- Sakai, M., D. Yoshida, and S. Mizusaki. 1985. "Mutagenicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Quinones on Salmonella Typhimurium TA97." *Mutation Research* 156 (1–2): 61–67.
- Salas, V. M., and S. W. Burchiel. 1998. "Apoptosis in Daudi Human B Cells in Response to Benzo[a]pyrene and Benzo[a]pyrene-7,8-Dihydrodiol." *Toxicology and Applied Pharmacology* 151 (2): 367–76. <https://doi.org/10.1006/taap.1998.8455>.
- Salwiński, A., D. Da Silva, R. Delépée, and B. Maunit. 2014. "Enzyme-Coupled Nanoparticles-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry for Searching for Low-Mass Inhibitors of Enzymes in Complex Mixtures." *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 25 (4): 538–47. <https://doi.org/10.1007/s13361-014-0826-y>.
- Samali, A., B. Zhivotovsky, D. Jones, S. Nagata, and S. Orrenius. 1999. "Apoptosis: Cell Death Defined by Caspase Activation." *Cell Death and Differentiation* 6 (6): 495–96. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400520>.
- Santella, R. M. 1999. "Immunological Methods for Detection of Carcinogen-DNA Damage in Humans." *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 8 (9): 733–39.

- Santella, R. M., L. L. Hsieh, C. D. Lin, S. Viet, and I. B. Weinstein. 1985. "Quantitation of Exposure to Benzo[a]pyrene with Monoclonal Antibodies." *Environmental Health Perspectives* 62 (October): 95–99. <https://doi.org/10.1289/ehp.856295>.
- Sasaki, Y. F., K. Sekihashi, F. Izumiyama, E. Nishidate, A. Saga, K. Ishida, and S. Tsuda. 2000. "The Comet Assay with Multiple Mouse Organs: Comparison of Comet Assay Results and Carcinogenicity with 208 Chemicals Selected from the IARC Monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database." *Critical Reviews in Toxicology* 30 (6): 629–799. <https://doi.org/10.1080/10408440008951123>.
- Schmied-Tobies, M. I. H., H. Paschke, and T. Reemtsma. 2016. "Combined Chemoassay and Mass Spectrometric Approach to Study the Reactive Potential of Electrophiles towards Deoxynucleosides as Model for DNA." *Chemosphere* 151 (May): 263–70. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.052>.
- Schooten, F. J. van, M. J. Hillebrand, E. Scherer, L. den Engelse, and E. Kriek. 1991. "Immunocytochemical Visualization of DNA Adducts in Mouse Tissues and Human White Blood Cells Following Treatment with Benzo[a]pyrene or Its Diol Epoxide. A Quantitative Approach." *Carcinogenesis* 12 (3): 427–33. <https://doi.org/10.1093/carcin/12.3.427>.
- Sega, G. A., and J. G. Owens. 1978. "Ethylation of DNA and Protamine by Ethyl Methanesulfonate in the Germ Cells of Male Mice and the Relevancy of These Molecular Targets to the Induction of Dominant Lethals." *Mutation Research* 52 (1): 87–106.
- Sega, G. A., and J. G. Owens. 1983. "Methylation of DNA and Protamine by Methyl Methanesulfonate in the Germ Cells of Male Mice." *Mutation Research* 111 (2): 227–44.
- Sega, G. A., and J. G. Owens. 1987. "Binding of Ethylene Oxide in Spermiogenic Germ Cell Stages of the Mouse after Low-Level Inhalation Exposure." *Environmental and Molecular Mutagenesis* 10 (2): 119–27.
- Sen, S., P. Bhojnagarwala, L. Francey, D. Lu, T. M. Penning, and J. Field. 2012. "p53 Mutagenesis by Benzo[a]pyrene Derived Radical Cations." *Chemical Research in Toxicology* 25 (10): 2117–26. <https://doi.org/10.1021/tx300201p>.
- Shapiro, R., and S. H. Pohl. 1968. "The Reaction of Ribonucleosides with Nitrous Acid. Side Products and Kinetics." *Biochemistry* 7 (1): 448–55. <https://doi.org/10.1021/bi00841a057>.
- Shimohara, C., T. Sawai, and T. Yagi. 2008. "Polyaromatic Hydrocarbons Cause Histone H2AX Phosphorylation in the S-Phase of the Cell Cycle." *Genes and Environment* 30 (3): 92–99. <https://doi.org/10.3123/jemsge.30.92>.
- Shukla, R., N. E. Geacintov, and E. L. Loechler. 1999. "The Major, N2-dG Adduct of (+)-Anti-B[a]PDE Induces G→A Mutations in a 5'-AGA-3' Sequence Context." *Carcinogenesis* 20 (2): 261–68. <https://doi.org/10.1093/carcin/20.2.261>.
- Singh, R., and P. B. Farmer. 2006. "Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry: The Future of DNA Adduct Detection." *Carcinogenesis* 27 (2): 178–96. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgi260>.
- Slee, E. A., C. Adrain, and S. J. Martin. 2001. "Executioner Caspase-3, -6, and -7 Perform Distinct, Non-Redundant Roles during the Demolition Phase of Apoptosis." *Journal of Biological Chemistry* 276 (10): 7320–26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008363200>.
- Solhaug, A., S. Øvrebø, S. Møllerup, M. Låg, P. E. Schwarze, S. Nesnow, and J. A. Holme. 2005. "Role of Cell Signaling in B[a]P-Induced Apoptosis: Characterization of

- Unspecific Effects of Cell Signaling Inhibitors and Apoptotic Effects of B[a]P Metabolites.” *Chemico-Biological Interactions* 151 (2): 101–19. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2004.12.002>.
- Solhaug, A., M. Refsnes, and J. A. Holme. 2004. “Role of Cell Signalling Involved in Induction of Apoptosis by Benzo[a]pyrene and Cyclopenta[c,d]pyrene in Hepa1c1c7 Cells.” *Journal of Cellular Biochemistry* 93 (6): 1143–54. <https://doi.org/10.1002/jcb.20251>.
- Sotomayor, R. E., M. Washington, L. Nguyen, R. Nyang’anyi, D. M. Hinton, and M. Chou. 2003. “Effects of Intermittent Exposure to Aflatoxin B1 on DNA and RNA Adduct Formation in Rat Liver: Dose-Response and Temporal Patterns.” *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 73 (2): 329–38. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg076>.
- Stakėnienė, R., K. Jokšas, A. Galkus, and E. Raudonytė-Svirbutavičienė. 2019. “Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Sediments from the Curonian Lagoon and the Nemunas River Delta (Lithuania, Baltic Sea): Distribution, Origin, and Suggestions for the Monitoring Program.” *Environmental Monitoring and Assessment* 191 (4): 212. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7367-6>.
- Stein, S., Y. Lao, I. -Y. Yang, S. S. Hecht, and M. Moriya. 2006. “Genotoxicity of Acetaldehyde- and Crotonaldehyde-Induced 1,N2-Propanodeoxyguanosine DNA Adducts in Human Cells.” *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 608 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.01.009>.
- Straif, K., R. Baan, Y. Grosse, B. Secretan, F. E. Ghissassi, and V. Cogliano. 2005. “Carcinogenicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.” *The Lancet Oncology* 6 (12): 931–32. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)70458-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)70458-7).
- Straif, K., A. Cohen, and J. Samet. 2013. *IARC Scientific Publication. Air Pollution and Cancer*. 161. <http://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/larc-Scientific-Publications/Air-Pollution-And-Cancer-2013>.
- Suess, M. J. 1976. “The Environmental Load and Cycle of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.” *Science of The Total Environment* 6 (3): 239–50. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(76\)90033-4](https://doi.org/10.1016/0048-9697(76)90033-4).
- Summer, K. H., W. Göggelmann, and H. Greim. 1980. “Glutathione and Glutathione S-Transferases in the Salmonella Mammalian-Microsome Mutagenicity Test.” *Mutation Research* 70 (3): 269–78.
- Szyfter, K., K. Hemminki, W. Szyfter, Z. Szmeja, J. Banaszewski, and K. Yang. 1994. “Aromatic DNA Adducts in Larynx Biopsies and Leukocytes.” *Carcinogenesis* 15 (10): 2195–99. <https://doi.org/10.1093/carcin/15.10.2195>.
- Taioli, E., R. J. Sram, B. Binkova, I. Kalina, T. A. Popov, S. Garte, and P. B. Farmer. 2007. “Biomarkers of Exposure to Carcinogenic PAHs and Their Relationship with Environmental Factors.” *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, Effects of PAHs in environmental pollution on exogenous and endogenous DNA damage, 620 (1): 16–21. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.02.018>.
- Takahashi, N., J. Schreiber, V. Fischer, and R. P. Mason. 1987. “Formation of Glutathione-Conjugated Semiquinones by the Reaction of Quinones with Glutathione: An ESR Study.” *Archives of Biochemistry and Biophysics* 252 (1): 41–48. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(87\)90006-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(87)90006-3).

- Tanaka, H., H. Arakawa, T. Yamaguchi, K. Shiraishi, S. Fukuda, K. Matsui, Y. Takei, and Y. Nakamura. 2000. "A Ribonucleotide Reductase Gene Involved in a p53-Dependent Cell-Cycle Checkpoint for DNA Damage." *Nature* 404 (6773): 42–49. <https://doi.org/10.1038/35003506>.
- Tang, D., and V. J. Kidd. 1998. "Cleavage of DFF-45/ICAD by Multiple Caspases Is Essential for Its Function during Apoptosis." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (44): 28549–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.44.28549>.
- Teixeira, J. P., J. Gaspar, G. Martinho, S. Silva, S. Rodrigues, O. Mayan, E. Martin, P. B. Farmer, and J. Rueff. 2002. "Aromatic DNA Adduct Levels in Coke Oven Workers: Correlation with Polymorphisms in Genes GSTP1, GSTM1, GSTT1 and CYP1A1." *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 517 (1): 147–55. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00063-3](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00063-3).
- Thornberry, N. A., and Y. Lazebnik. 1998. "Caspases: Enemies within." *Science (New York, N.Y.)* 281 (5381): 1312–16. <https://doi.org/10.1126/science.281.5381.1312>.
- Tingle, M. D., M. Pirmohamed, E. Templeton, A. S. Wilson, S. Madden, N. R. Kitteringham, and B. K. Park. 1993. "An Investigation of the Formation of Cytotoxic, Genotoxic, Protein-Reactive and Stable Metabolites from Naphthalene by Human Liver Microsomes." *Biochemical Pharmacology* 46 (9): 1529–38. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(93\)90319-r](https://doi.org/10.1016/0006-2952(93)90319-r).
- Tolba, R., T. Kraus, C. Liedtke, M. Schwarz, and R. Weiskirchen. 2015. "Diethylnitrosamine (DEN)-Induced Carcinogenic Liver Injury in Mice." *Laboratory Animals* 49 (1 Suppl): 59–69. <https://doi.org/10.1177/0023677215570086>.
- Tomaz, S., P. Shahpoury, J.-L. Jaffrezou, G. Lammel, E. Perraudin, E. Villenave, and A. Albinet. 2016. "One-Year Study of Polycyclic Aromatic Compounds at an Urban Site in Grenoble (France): Seasonal Variations, Gas/Particle Partitioning and Cancer Risk Estimation." *The Science of the Total Environment* 565 (September): 1071–83. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.137>.
- Topinka, J., S. Marvanová, J. Vondráček, O. Sevastyanova, Z. Nováková, P. Krčmář, K. Pěňčíková, and M. Machala. 2008. "DNA Adducts Formation and Induction of Apoptosis in Rat Liver Epithelial 'stem-Like' Cells Exposed to Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 638 (1): 122–32. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.09.004>.
- Topinka, J., A. Milcova, H. Libalova, Z. Novakova, P. Rossner, I. Balascak, and R. J. Sram. 2009. "Biomarkers of Exposure to Tobacco Smoke and Environmental Pollutants in Mothers and Their Transplacental Transfer to the Foetus. Part I: Bulky DNA Adducts." *Mutation Research* 669 (1–2): 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2009.04.011>.
- Törnqvist, M., C. Fred, J. Haglund, H. Helleberg, B. Paulsson, and P. Rydberg. 2002. "Protein Adducts: Quantitative and Qualitative Aspects of Their Formation, Analysis and Applications." *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 778 (1–2): 279–308.
- Tretyakova, N., M. Goggin, and G. Janis. 2012. "Quantitation of DNA Adducts by Stable Isotope Dilution Mass Spectrometry." *Chemical Research in Toxicology* 25 (10): 2007–35. <https://doi.org/10.1021/tx3002548>.

- Tretyakova, N., P. W. Villalta, and S. Kotapati. 2013. "Mass Spectrometry of Structurally Modified DNA." *Chemical Reviews* 113 (4): 2395–2436. <https://doi.org/10.1021/cr300391r>.
- Turesky, R. J., and P. Vouros. 2004. "Formation and Analysis of Heterocyclic Aromatic Amine-DNA Adducts in Vitro and in Vivo." *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 802 (1): 155–66. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.10.053>.
- Uddin, K. M., M. H. Almatarneh, D. M. Shaw, and R. A. Poirier. 2011. "Mechanistic Study of the Deamination Reaction of Guanine: A Computational Study." *The Journal of Physical Chemistry A* 115 (10): 2065–76. <https://doi.org/10.1021/jp1120806>.
- Umbuzeiro, G. A., A. Franco, M. H. Martins, F. Kummrow, L. Carvalho, H. H. Schmeiser, J. Leykauf, M. Stiborova, and L. D. Claxton. 2008. "Mutagenicity and DNA Adduct Formation of PAH, Nitro-PAH, and Oxy-PAH Fractions of Atmospheric Particulate Matter from São Paulo, Brazil." *Mutation Research* 652 (1): 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.12.007>.
- US EPA. 1998. "Toxicological Review of Naphthalene - In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS)."
- US EPA. 2002. "U.S. Environmental Protection Agency. Third External Review Draft of Air Quality Criteria for Particulate Matter, Vol. 1. Research Triangle Park, NC: Office of Research and Development, EPA 600/P-99/002aC."
- Van Schooten, F. J., E. Kriek, M. J. Steenwinkel, H. P. Noteborn, M. J. Hillebrand, and F. E. Van Leeuwen. 1987. "The Binding Efficiency of Polyclonal and Monoclonal Antibodies to DNA Modified with Benzo[a]pyrene Diol Epoxide Is Dependent on the Level of Modification. Implications for Quantitation of Benzo[a]pyrene-DNA Adducts in Vivo." *Carcinogenesis* 8 (9): 1263–69. <https://doi.org/10.1093/carcin/8.9.1263>.
- Venkatachalam, S., M. F. Denissenko, N. Alvi, and A. A. Wani. 1994. "Rapid Activation of Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemic Cells by (±)-Anti-Benzo[a]pyrene Diol Epoxide-Induced DNA Damage." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 197 (January): 722–29. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1993.2539>.
- Vongchampa, V., M. Dong, L. Gingipalli, and P. Dedon. 2003. "Stability of 2'-deoxyxanthosine in DNA." *Nucleic Acids Research* 31 (3): 1045–51. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg177>.
- Vries, A. de, M. E. Dollé, J. L. Broekhof, J. J. Muller, E. D. Kroese, C. F. van Kreijl, P. J. Capel, J. Vijg, and H. van Steeg. 1997. "Induction of DNA Adducts and Mutations in Spleen, Liver and Lung of XPA-Deficient/lacZ Transgenic Mice after Oral Treatment with Benzo[a]pyrene: Correlation with Tumour Development." *Carcinogenesis* 18 (12): 2327–32. <https://doi.org/10.1093/carcin/18.12.2327>.
- Waidyanatha, S., M. A. Troester, A. B. Lindstrom, and S. M. Rappaport. 2002. "Measurement of Hemoglobin and Albumin Adducts of Naphthalene-1,2-Oxide, 1,2-Naphthoquinone and 1,4-Naphthoquinone after Administration of Naphthalene to F344 Rats." *Chemico-Biological Interactions* 141 (3): 189–210. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(02\)00048-0](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(02)00048-0).
- Walsh, J. G., S. P. Cullen, C. Sheridan, A. U. Lüthi, C. Gerner, and S. J. Martin. 2008. "Executioner Caspase-3 and Caspase-7 Are Functionally Distinct Proteases." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (35): 12815–19. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707715105>.

- Wang, J. J., W. D. Marshall, D. G. Frazer, B. Law, and D. M. Lewis. 2003. "Characterization of DNA Adducts from Lung Tissue of Asphalt Fume-Exposed Mice by Nanoflow Liquid Chromatography Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry." *Analytical Biochemistry* 322 (1): 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2003.07.001>.
- Wang, M., C. Wang, X. Hu, H. Zhang, S. He, and S. Lv. 2015. "Distributions and Sources of Petroleum, Aliphatic Hydrocarbons and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Surface Sediments from Bohai Bay and Its Adjacent River, China." *Marine Pollution Bulletin* 90 (1–2): 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.11.017>.
- Wang, P., S. M. Henning, and David Heber. 2010. "Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols." *PLoS One* 5 (4): e10202. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010202>.
- Wang, S., M. Miura, Y. K. Jung, H. Zhu, E. Li, and J. Yuan. 1998. "Murine Caspase-11, an ICE-Interacting Protease, Is Essential for the Activation of ICE." *Cell* 92 (4): 501–9.
- Wang, S., Y. Sheng, M. Feng, J. Leszczynski, L. Wang, H. Tachikawa, and H. Yu. 2007. "Light-Induced Cytotoxicity of 16 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on the US EPA Priority Pollutant List in Human Skin HaCaT Keratinocytes: Relationship between Phototoxicity and Excited State Properties." *Environmental Toxicology* 22 (3): 318–27. <https://doi.org/10.1002/tox.20241>.
- Watson, W. P. 1987. "Post-Radiolabelling for Detecting DNA Damage." *Mutagenesis* 2 (5): 319–31. <https://doi.org/10.1093/mutage/2.5.319>.
- Wei, C., Y. Han, B. A. M. Bandowe, J. Cao, R.-J. Huang, H. Ni, J. Tian, and W. Wilcke. 2015. "Occurrence, Gas/Particle Partitioning and Carcinogenic Risk of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Oxygen and Nitrogen Containing Derivatives in Xi'an, Central China." *The Science of the Total Environment* 505 (February): 814–22. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.10.054>.
- Wei, S., B. Huang, M. Liu, X. Bi, Z. Ren, G. Sheng, and J. Fu. 2012. "Characterization of PM_{2.5}-Bound Nitrated and Oxygenated PAHs in Two Industrial Sites of South China." *Atmospheric Research* 109–110 (June): 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2012.01.009>.
- Weimann, A., D. Belling, and H. E. Poulsen. 2002. "Quantification of 8-Oxo-Guanine and Guanine as the Nucleobase, Nucleoside and Deoxynucleoside Forms in Human Urine by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry." *Nucleic Acids Research* 30 (2): E7. <https://doi.org/10.1093/nar/30.2.e7>.
- Weinert, T. A., and L. H. Hartwell. 1988. "The RAD9 Gene Controls the Cell Cycle Response to DNA Damage in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Science* 241 (4863): 317–22. <https://doi.org/10.1126/science.3291120>.
- Wichmann, H.-E. 2007. "Diesel Exhaust Particles." *Inhalation Toxicology* 19 Suppl 1: 241–44. <https://doi.org/10.1080/08958370701498075>.
- Wild, C. P. 2012. "The Exposome: From Concept to Utility." *International Journal of Epidemiology* 41 (1): 24–32. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr236>.
- Wild, C. P., and P. Pisani. 1997. "Carcinogen-DNA and Carcinogen-Protein Adducts in Molecular Epidemiology." *IARC Scientific Publications*, no. 142: 143–58.
- Williams, D. T., E. R. Nestmann, G. L. LeBel, F. M. Benoit, R. Otson, and E. G. H. Lee. 1982. "Determination of Mutagenic Potential and Organic Contaminants of Great

- Lakes Drinking Water.” *Chemosphere* 11 (3): 263–76. [https://doi.org/10.1016/0045-6535\(82\)90150-3](https://doi.org/10.1016/0045-6535(82)90150-3).
- Wilson, A. S., C. D. Davis, D. P. Williams, A. R. Buckpitt, M. Pirmohamed, and B. K. Park. 1996. “Characterisation of the Toxic Metabolite(s) of Naphthalene.” *Toxicology* 114 (3): 233–42.
- Wilson, S. E., G. Talaska, R. S. Kahn, B. Schumann, J. Khoury, A. C. Leonard, and B. P. Lanphear. 2011. “White Blood Cell DNA Adducts in a Cohort of Asthmatic Children Exposed to Environmental Tobacco Smoke.” *International Archives of Occupational and Environmental Health* 84 (1): 19–27. <https://doi.org/10.1007/s00420-010-0529-z>.
- Wincent, E., F. L. Bihanic, and K. Dreij. 2016. “Induction and Inhibition of Human Cytochrome P4501 by Oxygenated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons.” *Toxicology Research* 5 (3): 788–99. <https://doi.org/10.1039/C6TX00004E>.
- Wingfors, H., L. Hägglund, and R. Magnusson. 2011. “Characterization of the Size-Distribution of Aerosols and Particle-Bound Content of Oxygenated PAHs, PAHs, and N-Alkanes in Urban Environments in Afghanistan.” *Atmospheric Environment* 45 (26): 4360–69. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2011.05.049>.
- Wischmann, H., and H. Steinhart. 1997. “The Formation of PAH Oxidation Products in Soils and Soil/Compost Mixtures.” *Chemosphere* 35 (8): 1681–98. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(97\)00249-X](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(97)00249-X).
- Wogan, G. N. 1988. “Detection of DNA Damage in Studies on Cancer Etiology and Prevention. Pp. 32-54 in Methods for Detecting DNA Damaging Agents in Humans: Applications in Cancer Epidemiology and Prevention.” *H. Bartsch, K. Hemminki, and I. K. O’Neill, Eds.*, no. IARC Scientific Publications No. 89.
- Wolf, S. M., and P. Vouros. 1994. “Application of Capillary Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometric Methods to the Rapid Screening of Adducts Formed by the Reaction of N-Acetoxy-N-Acetyl-2-Aminofluorene with Calf Thymus DNA.” *Chemical Research in Toxicology* 7 (1): 82–88.
- Wolterbeek, A. P., R. Roggeband, R. A. Baan, V. J. Feron, and A. A. Rutten. 1995. “Relation between Benzo[a]pyrene-DNA Adducts, Cell Proliferation and p53 Expression in Tracheal Epithelium of Hamsters Fed a High Beta-Carotene Diet.” *Carcinogenesis* 16 (7): 1617–22. <https://doi.org/10.1093/carcin/16.7.1617>.
- Yalcin, H. C., S. F. Perry, and S. N. Ghadiali. 2007. “Influence of Airway Diameter and Cell Confluence on Epithelial Cell Injury in an in Vitro Model of Airway Reopening.” *Journal of Applied Physiology* 103 (5): 1796–1807. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00164.2007>.
- Yang, J., S. Balbo, P. W. Villalta, and S. S. Hecht. 2019. “Analysis of Acrolein-Derived 1,N2-Propanodeoxyguanosine Adducts in Human Lung DNA from Smokers and Nonsmokers.” *Chemical Research in Toxicology* 32 (2): 318–25. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.8b00326>.
- Yang, L. L., V. M. Maher, and J. J. McCormick. 1982. “Relationship between Excision Repair and the Cytotoxic and Mutagenic Effect of the ‘anti’ 7,8-Diol-9,10-Epoxyde of Benzo[a]pyrene in Human Cells.” *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 94 (2): 435–47. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(82\)90306-2](https://doi.org/10.1016/0027-5107(82)90306-2).
- Yang Y., W. J. Griffiths, T. Midtvedt, J. Sjövall, J. Rafter, and J. -Å. Gustafsson. 1999. “Characterization of Conjugated Metabolites of Benzo[a]pyrene in Germ-Free Rat Urine by Liquid Chromatography/Electrospray Tandem Mass Spectrometry.”

- Chemical Research in Toxicology* 12 (12): 1182–89.
<https://doi.org/10.1021/tx990101e>.
- Yao, C., W. G. Foster, J. C. Sadeu, S. Siddique, J. Zhu, and Y. L. Feng. 2016. "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*, September. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.122>.
- Yoshii, S., M. Tanaka, Y. Otsuki, T. Fujiyama, H. Kataoka, H. Arai, H. Hanai, and H. Sugimura. 2001. "Involvement of Alpha-PAK-Interacting Exchange Factor in the PAK1-c-Jun NH(2)-Terminal Kinase 1 Activation and Apoptosis Induced by Benzo[a]pyrene." *Molecular and Cellular Biology* 21 (20): 6796–6807. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.20.6796-6807.2001>.
- Yu, F., K. Ye, Y. Hu, J. Li, Y. An, and D. Qu. 2019. "Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Derived from Vehicle Exhaust Gas Induces Premature Senescence in Mouse Lung Fibroblast Cells." *Molecular Medicine Reports* 19 (5): 4326–34. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10086>.
- Yu, W., R. Liu, F. Xu, C. Men, and Z. Shen. 2016. "Identifications and Seasonal Variations of Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the Yangtze River Estuary, China." *Marine Pollution Bulletin* 104 (1–2): 347–54. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.036>.
- Yun, B. H., J. Guo, M. Bellamri, and R. J. Turesky. 2018. "DNA Adducts: Formation, Biological Effects, and New Biospecimens for Mass Spectrometric Measurements in Humans." *Mass Spectrometry Reviews* 0 (0): 1–28. <https://doi.org/10.1002/mas.21570>.
- Zenzen, M. T., L. A. Puy, R. Bielecki, and T. E. Reed. 1999. "Detection of Benzo[a]pyrene Diol Epoxide-DNA Adducts in Embryos from Smoking Couples: Evidence for Transmission by Spermatozoa." *Molecular Human Reproduction* 5 (2): 125–31. <https://doi.org/10.1093/molehr/5.2.125>.
- Zhao, F., and W. T. Klimecki. 2015. "Culture Conditions Profoundly Impact Phenotype in BEAS-2B, a Human Pulmonary Epithelial Model." *Journal of Applied Toxicology: JAT* 35 (8): 945–51. <https://doi.org/10.1002/jat.3094>.
- Zhao, M., W. Wang, Y. Liu, L. Dong, L. Jiao, L. Hu, and D. Fan. 2016. "Distribution and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Surface Sediments from the Bering Sea and Western Arctic Ocean." *Marine Pollution Bulletin* 104 (1–2): 379–85. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.01.016>.
- Zhao, X., S. Wu, G. Gong, G. Li, and L. Zhuang. 2017. "TBHQ and Peanut Skin Inhibit Accumulation of PAHs and Oxygenated PAHs in Peanuts during Frying." *Food Control* 75 (May): 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.029>.
- Zhou, B. B., and S. J. Elledge. 2000. "The DNA Damage Response: Putting Checkpoints in Perspective." *Nature* 408 (6811): 433–39. <https://doi.org/10.1038/35044005>.

ANNEXES

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Publication internationales acceptées dans une revue à comité de lecture

1. **Oxy-PAHs: occurrence in the environment and potential genotoxic/mutagenic risk assessment for human health.**

Adeline Clergé, Jérémie Le Goff, Claire Lopez, Jérôme Ledauphin, Raphaël Delépée

Critical Review in Toxicology (septembre 2019) – doi: 10.1080/10408444.2019.1605333

Publication internationales en cours de soumission dans une revue à comité de lecture

1. **Synthesis, purification, and characterization of stable deoxyguanosine adducts of 1,2-naphthoquinone, an oxydated metabolite of naphthalene.**

Adeline Clergé, Jérémie Le Goff, Claire Lopez-Piffet, Stéphanie Lagadu, Isabelle Vaudorne, Victor Babin, Thomas Cailly, Raphaël Delépée

Talanta

2. **Synthesis, purification, and characterization of stable deoxyguanosine adducts of 7,12-benzo[*a*]anthracenquinone.**

Adeline Clergé, Jérémie Le Goff, Claire Lopez-Piffet, Stéphanie Lagadu, Isabelle Vaudorne, Raphaël Delépée

Analytica Chimica Acta

3. **Synthesis, purification, and characterization of stable deoxyguanosine adducts of 6*H*-benzo[*cd*]pyren-6-one.**

Adeline Clergé, Jérémie Le Goff, Claire Lopez-Piffet, Stéphanie Lagadu, Isabelle Vaudorne, Raphaël Delépée

Analytica Chimica Acta

4. Evaluation of cytotoxicity and mutagenicity of 7 oxy-PAHs.

Adeline Clergé, Jérémie Le Goff, Emilie Brotin, Edwige Abeilard, Marilyne Guillamin, Isabelle Vaudorne, Christophe Denoyelle, Raphaël Delépée

Toxicological Sciences

COMMUNICATION PAR VOIE ORALE

Congrès internationaux :

1. Synthesis and characterization by UHPLC-MS/MS of DNA adducts from 4 oxy-PAHs for the evaluation of their genotoxicity.

Adeline Clergé, Jérémie Le Goff, Isabelle Vaudorne, Stéphanie Lagadu, Raphaël Delépée.

HPLC 2019, Milan, Italie - 16 au 20 juin 2019.

Congrès nationaux :

1. Stratégie pour le criblage de l'exposition humaine à des composés génotoxiques.

Adeline Clergé, Jérémie Le Goff, Isabelle Vaudorne, Stéphanie Lagadu, Raphaël Delépée.

Club Chromatographie Val-de-Seine, Deauville – 04 juin 2019.

2. Evaluation de la génotoxicité du naphtalène par la formation d'adduits entre la 1,2-naphthoquinone et l'ADN.

Adeline Clergé, Jérémie Le Goff, Raphaël Delépée.

Colloque SFTG-SPTC, Paris – 01 et 02 octobre 2018.

3. Caractérisation par UHPLC-MS/MS des profils d'adduits à l'ADN pour l'évaluation de la génotoxicité des polluants aériens.

Adeline Clergé, Jérémie Le Goff, Isabelle Vaudorne, Stéphanie Lagadu, Raphaël Delépée.

Club Chromatographie Val-de-Seine, Caen – 23 novembre 2017.

4. Cytotoxicité et génotoxicité des oxy-HAP pour les cellules pulmonaires humaines BEAS-2B.

Adeline Clergé, Jérémie Le Goff, Raphaël Delépée.

Journées scientifiques du Club Jeunes de l'AFSEP, Montpellier - 13 et 14 novembre 2017.

COMMUNICATION PAR VOIE AFFICHÉE

Congrès internationaux :

1. New MS methods for identification of PAH DNA adducts: UPLC-IMS-QToFMS.

Carey E Donald, Sonnich Meier, Daniela Pampanin, Bjørn Einar Grøsvik, Kåre B. Jørgensen, Marc Berntssen, Sylvain Merel, Jérémie Le Goff, Adeline Clergé, Raphaël Delépée

International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds (ISPAC), Örebro, Suède – 9 au 12 septembre 2019

2. Study of the genotoxicity of 7 oxy-PAHs : focus on DNA adducts.

Adeline Clergé, Jérémie Le Goff, Emilie Brotin, Isabelle Vaudorne, Stéphanie Lagadu, Raphaël Delépée.

European Environmental Mutagen and Genomics Society (EEMGS), Rennes – 19 au 23 mai 2019.

Poster Award Winner.

3. Synthesis, characterization and quantification by UHPLC-MS/MS of DNA adducts from 5 oxy-PAHs for the evaluation of their genotoxicity.

Adeline Clergé, Jérémie Le Goff, Emilie Brotin, Isabelle Vaudorne, Stéphanie Lagadu, Raphaël Delépée.

ISC2018, Cannes-Mandelieu, 23 au 27 septembre 2018.

Final round of the best poster competition.

Congrès nationaux :

1. *Flashposter* - Synthèse et caractérisation par UHPLC-MS/MS d'adduits entre l'ADN et 7 oxy-HAP pour l'évaluation de leur génotoxicité.

Adeline Clergé, Jérémie Le Goff, Isabelle Vaudorne, Stéphanie Lagadu, Raphaël Delépée.

SEP19, Paris – 25 au 28 mars 2019

2. Evaluation of genotoxicity and mutagenicity of 1,2-naphthoquinone.

Adeline Clergé, Jérémie Le Goff, Isabelle Vaudorne, Stéphanie Lagadu, Raphaël Delépée.

Journée Normande de Recherche Biomédicale (JNRb), Rouen – 20 septembre 2018.

3. Evidence of genotoxic properties of oxy-PAHs and aldehydes using DNA adducts as a contribution to cancer etiology comprehension in exposome context.

Adeline Clergé and Hélène Alamil, Mathilde Lechevrel, Jérémie Le Goff, Zeina Dagher, Raphaël Delépée.

Journée Normande de Recherche Biomédicale (JNRb), Caen – 14 novembre 2017.

4. Nouvelle stratégie concernant l'hydrolyse de l'ADN pour l'analyse des adduits dans le contexte de l'exposome.

Adeline Clergé, Jérémie Le Goff, Raphaël Delépée.

SEP17, Paris – 28 au 30 mars 2017.

5. Characterization by UHPLC-MS/MS of DNA adducts profile for the evaluation of the genotoxicity of human air pollutants thanks to a metabolomics approach.

Adeline Clergé, Jérémie Le Goff, Raphaël Delépée.

Journées de l'EdNBISE, Le Havre – 16 et 17 mars 2017.

ACTIVITÉ EN MATIÈRE D'ENSEIGNEMENT

Avenant au contrat doctoral (2018-2019) : co-encadrement des séances de travaux pratiques des sciences analytiques A en DFGSP2 (UE Sciences analytiques et physico-chimiques, 60h eq. TD) avec le Pr. Raphaël Delépée et de développement galénique et analytique en DFASP1 (UE Recherche, développement et enregistrement du médicament/ démarche qualité, 4h eq. TD) avec le Pr. Raphaël Delépée à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Caen Normandie.

Avenant au contrat doctoral (2017-2018) : co-encadrement des séances de travaux pratiques des sciences analytiques A en DFGSP2 (UE Sciences analytiques et physico-chimiques, 36h eq. TD) avec le Pr. Raphaël Delépée et de toxicologie clinique en DFASP1 (UE Cancérologie et médicaments anticancéreux A, 30h eq. TD) avec le Pr. François Sichel à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Caen Normandie.

ENCADREMENT DE STAGIAIRES

1. Co-encadrement d'un stagiaire d'initiation à la recherche en deuxième année des études pharmaceutiques (DFGSP2) en 2017 (1 mois, Tess Legoupil) avec le Pr. Raphaël Delépée.
2. Co-encadrement d'une lycéenne de 1^{ère} S. (2 semaines, Héloïse Delépée) avec le Pr. Raphaël Delépée dans le cadre d'un stage de découverte d'un laboratoire de recherche.
3. Co-encadrement de deux étudiantes en BTS Bioanalyses et Contrôles en 2018 et en 2019 (1 mois, Nolwenn Blot-Barzic et Athénaïs Cahoreau) avec le Pr. Raphaël Delépée.

FORMATIONS

Formations doctorales :

- Anglais écrit CM (8h)
- Anglais écrit TD (24h)
- Anglais intensif (15h)
- International communication in English (ICE, 8h)
- Intégrité scientifique (4h)
- Développer une stratégie de présence numérique sur internet (4h)
- Formations suivies à l'ESPE dans le cadre de la Mission (27h)

Autres formations :

- Biostatistiques : logiciel R (15h)
- Radioprotections (2h)
- Sauveteur secouriste du travail (14h)

VULGARISATION SCIENTIFIQUE

Découverte des laboratoires de recherche dans le cadre de la Fête de la Science

Fête de la Science, IUT de Caen - 6 au 14 octobre 2018

HAP oxydés : étude des effets génotoxiques in-vitro et caractérisation des adduits à l'ADN par spectrométrie de masse

Les adduits à l'ADN sont considérés comme des biomarqueurs de génotoxicité particulièrement pertinents, puisqu'ils sont représentatifs de la structure du composé génotoxique. Nos recherches se sont axées sur les études de génotoxicité incluant l'altération de l'ADN en relation avec le risque de cancer, en se focalisant sur les dérivés des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Des études de toxicité ont démontré que les HAP oxygénés (oxy-HAP) et les HAP nitrés (nitro-HAP) étaient responsables d'une grande partie de la toxicité totale des HAP. Ce travail s'est donc axé sur les oxy-HAP car, bien que ces composés soient omniprésents dans l'environnement, ils restent encore largement sous-étudiés en termes de toxicité. Une liste de 7 oxy-HAP, considérés comme prioritaires, a été sélectionnée sur des critères de présence dans l'environnement et de possible toxicité pour l'homme.

Afin d'évaluer le potentiel mutagène et génotoxique de ces oxy-HAP prioritaires, de la 2'-désoxyguanosine (2'-dG), de l'ADN du thymus de veau et des cellules épithéliales bronchiques humaines immortalisées (BEAS-2B) ont été exposées à ces molécules. Des adduits ont été détectés en post-marquage au phosphore 32 puis ont été identifiés et caractérisés en spectrométrie de masse. Ces résultats prouvent, pour la première fois, l'interaction spontanée et directe entre l'ADN et nos 7 oxy-PAH. En outre, plusieurs tests de cytotoxicité et de mutagenicité ont été réalisés : le test MTS, le test CellTox™ Green et le test d'Ames. Cette étude a permis de démontrer les propriétés cytotoxiques et mutagènes de ces oxy-PAH.

Mots clés : adduits à l'ADN, toxicologie analytique, génotoxicité, mutagenicité, spectrométrie de masse.

Oxidized PAHs: in-vitro genotoxic effects study and characterization of DNA adducts by mass spectrometry

DNA adducts are considered as particularly relevant biomarkers of genotoxicity because they are specific of the structure of the genotoxic compound. Our research is focused on genotoxicity studies which encompass alteration of DNA in connection with cancer risk focusing on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) derivatives. Studies about toxicity have demonstrated that oxygenated-PAHs (oxy-PAHs) and nitrated-PAHs (nitro-PAHs) were responsible of a large part of the total PAHs toxicity. This work focuses on oxy-PAHs because, although they are ubiquitous compounds in the environment, they still remain largely under studied in terms of toxicity. A set of 7 priority oxy-PAHs, was selected based on criteria of occurrence in the environment and possible toxicity for humans.

In order to assess the mutagenic and genotoxic potential of the selected oxy-PAHs, 2'-deoxyguanosine (2'-dG), calf thymus DNA, and immortalized human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) were exposed to these molecules. Adducts were detected in post-labelling with phosphorus 32 and were identified and characterized by mass spectrometry. These results prove for the first time, the spontaneous and direct interaction between DNA and at least 3 of our 7 oxy-PAHs. In addition, several cytotoxicity and mutagenicity assays were carried out: MTS assay, CellTox™ Green assay, and Ames assay. This study demonstrated the cytotoxic and mutagenic properties of these oxy-PAHs.

Keywords: DNA adducts, analytical toxicology, genotoxicity, mutagenicity, mass spectrometry.