

# Génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques adsorbés à la surface d'un aérosol urbano-industriel (PM<sub>2,5</sub>)

## *In vitro* evaluation of the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons-coated onto airborne PM<sub>2.5</sub>

Sylvain BILLET\*, Imane ABBAS\*, Jérémie LE GOFF\*\*, Anthony VERDIN\*,  
Véronique ANDRE\*\*, Fabrice CAZIER\*\*\*, François SICHEL\*\*, Pirouz SHIRALI\*\*\*\*, Guillaume GARÇON\*

### Résumé

Les Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) représentent une famille de composés chimiques dont un certain nombre de membres sont reconnus quant à leur cancérogénicité. Or, au sein des mélanges très complexes et très hétérogènes de composés chimiques inorganiques et organiques que constituent les aérosols atmosphériques d'origine anthropogénique, leur présence est très souvent détectée. Toutefois, le pouvoir génotoxique de tels aérosols n'a été que rarement étudié. Un aérosol anthropogénique (PM<sub>2,5</sub>) a été prélevé à Dunkerque, sous l'influence du complexe industrialo-portuaire, et la détermination de ses caractéristiques physiques et chimiques nous a notamment permis de détecter des doses relativement faibles de différents HAP, adsorbés à la surface de sa fraction particulaire. L'objectif de ce travail a consisté à déterminer l'activation métabolique (i.e. expression génique et activité enzymatique du cytochrome P450 1A1 ; *CYP1A1*) et le potentiel génotoxique (i.e. formation d'adduits à l'ADN) de ces HAP adsorbés dans un modèle de cellules épithéliales pulmonaires humaines en culture. La lignée de cellules A549 a été choisie de par ses caractéristiques physiologiques et ses capacités à métaboliser les HAP. En tant que composés génotoxiques indirects, les HAP requièrent une activation métabolique pour exercer leur toxicité au travers de leurs interactions avec des cibles moléculaires et cellulaires. L'exposition des cellules A549 pendant 24, 48 et 72 h à des concentrations croissantes de l'aérosol collecté (Concentrations létales à 10 % et 50 % ; CL<sub>10</sub> = 23,72 µg/mL soit 6,33 µg/cm<sup>2</sup> et CL<sub>50</sub> = 118,60 µg/mL soit 31,63 µg/cm<sup>2</sup>) a provoqué une induction génique du *cytochrome P450 1A1* et une augmentation de l'activité éthoxyrésorufine O-dééthylase (EROD) de cette même protéine. Les métabolites issus de l'activation métabolique des HAP, de par leurs natures électrophiles, sont susceptibles d'interagir avec les macromolécules cellulaires nucléophiles, telles que l'ADN et, par conséquent, de former des adduits, produits d'addition pouvant engendrer des mutations géniques et par conséquent entraîner la cellule sur la voie de la cancérogenèse. L'utilisation de la technique du post-marquage au <sup>32</sup>P nous a permis d'observer la formation d'adduits à l'ADN dans les cellules A549 exposées pendant 72 h à l'aérosol collecté à sa CL<sub>50</sub>. Toutefois, la trop faible intensité de ces adduits n'a pu permettre la quantification des teneurs relatives en adduits de HAP à l'ADN. Les résultats de ce travail ont montré que les

\* LCE EA2598 – Toxicologie industrielle et environnementale – Université du Littoral – Côte d'Opale – Maison de la recherche en environnement industriel de Dunkerque 2 – 189A, avenue Maurice Schumann – 59140 Dunkerque – France.

\*\* UPRES-EA 1772 – Groupe régional d'études sur le cancer – Université de Caen Basse-Normandie et Centre régional de lutte contre le cancer François Baclesse – Avenue du Général Harris – BP 5026 – 14076 Caen Cedex 05 – France.

\*\*\* Centre commun de mesures – Université du Littoral – Côte d'Opale – Maison de la recherche en environnement industriel de Dunkerque 1 – 145, avenue Maurice Schumann – 59140 Dunkerque – France.

\*\*\*\* [Pirouz.Shirali@univ-littoral.fr](mailto:Pirouz.Shirali@univ-littoral.fr)

faibles concentrations de HAP adsorbés à la surface de la fraction particulaire des aérosols anthropogéniques étaient capables d'induire les mécanismes d'activation métabolique des cellules cibles. L'altération du patrimoine génétique de ces dernières par la formation d'adduits à l'ADN, suggérée qualitativement, n'a pu être mise en évidence de manière quantitative. Les mécanismes d'action toxiques décrits dans cette étude *in vitro* pourraient toutefois contribuer à expliquer la toxicité de tels aérosols anthropogéniques pour l'appareil pulmonaire humain.

### Mots clés

Cellules A549. Pollution atmosphérique. PM<sub>2,5</sub>. Hydrocarbures aromatiques polycycliques. Cytochrome P450 1A1. Post-marquage au <sup>32</sup>P. Adduit à l'ADN.

### Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) represent a family of chemical compounds including a number of members recognized for their carcinogenicity. Their presence is often detected in mixtures very complex and heterogeneous, such as Particulate Matter (PM). However, the genotoxicity of such aerosols has been rarely studied. To improve the knowledge of the underlying mechanisms of action involved in air pollution Particulate Matter (PM)-induced toxicity in human lungs, a PM sampling was realized in Dunkerque. We were interested in the metabolic activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH)-coated onto air pollution PM, and, thereafter, the formation of PAH-DNA adducts in a human lung epithelial cell model (A549 cell line). Cells were exposed to Dunkerque city's PM<sub>2,5</sub> at their Lethal Concentrations at 10% and 50% (i.e. LC<sub>10</sub> = 23.72 µg/mL or 6.33 µg/cm<sup>2</sup>, and LC<sub>50</sub> = 118.60 µg/mL or 31.63 µg/cm<sup>2</sup>), and the study of Cytochrome P450 (CYP) 1A1 gene expression (i.e. RT-PCR) and protein activity (i.e. EROD activity), and the formation of PAH-DNA adducts (i.e. <sup>32</sup>P-post-labelling), were investigated after 24, 48 and 72 h. Negative (i.e. TiO<sub>2</sub> or desorbed PM, dPM; EqLC<sub>10</sub> = 19.42 µg/mL or 5.18 µg/cm<sup>2</sup>, and EqLC<sub>50</sub> = 97.13 µg/mL or 25.90 µg/cm<sup>2</sup>), and positive (i.e. benzo(a)pyrene; 1 µM) controls were included in the experimental design. Statistically significant increases of CYP1A1 gene expression and protein activity were observed in A549 cells, 24, 48 and 72 h after their exposure to dPM, suggesting thereby that the employed outgassing method was not efficient enough to remove total PAH. Both the CYP1A1 gene expression and EROD activity were highly induced 24, 48 and 72 h after cell exposure to PM. However, only very low levels of PAH-DNA adducts, also not reliably quantifiable, were reported 72 h after cell exposure to dPM, and, particularly, PM. The relatively low levels of PAH-coated onto Dunkerque City's PM<sub>2,5</sub> could notably contribute to explain the borderline detection of PAH-DNA adducts in dPM and/or PM-exposed A549 cells. We concluded that remaining very low doses of PAH in dPM or relatively low doses of PAH-coated onto PM were involved in enzymatic induction, a key feature in PAH-toxicity, but failed to show a quantitative genotoxicity in the human lung epithelial cell model we used.

### Keywords

A549 cells. Air pollution. PM<sub>2,5</sub>. Polycyclic aromatic hydrocarbons. Cytochrome P450 1A1. <sup>32</sup>P-postlabelling. DNA adduct.

## 1. Introduction

De nombreuses études ont montré les effets défavorables de la pollution de l'air sur la santé. L'exposition à long terme aux particules atmosphériques, et plus particulièrement aux particules fines, diminue de manière significative l'espérance de vie [1-3]. Ces particules (i.e. *Particulate Matter* 2,5 ; PM<sub>2,5</sub>) sont caractérisées par un diamètre aérodynamique inférieur à 2,5 µm, ce qui leur permet une pénétration plus profonde dans les poumons jusque la région alvéolaire, et exacerbe leur toxicité intrinsèque. Or, au sein des mélanges très complexes et hétérogènes de composés chimiques inorganiques et organiques que constituent les aérosols atmosphériques d'origine anthropogénique, la présence d'Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) cancérigènes est très souvent détectée [4]. Pourtant, le pouvoir génotoxique de tels aérosols n'a été que rarement étudié. En 2005, dans le monde, le cancer du poumon a entraîné la mort de 1,3 million de personnes, dont 5 % sont attribués à la pollution atmosphérique [2, 5, 6]. Ainsi, une augmentation de la moyenne annuelle de concentrations des PM<sub>2,5</sub> de 10 µg/m<sup>3</sup> provoquerait un accroissement de 13 % de la mortalité par cancer du poumon [1].

Même si le niveau d'exposition aux HAP par la voie respiratoire apparaît relativement faible par rapport aux autres voies d'exposition que sont l'alimentation ou le tabagisme, il est important de prendre en compte la forte prolongation de la demi-vie des HAP atmosphériques une fois adsorbés à la surface des PM<sub>2,5</sub> [7]. Ces composés organiques, ainsi absorbés par l'organisme, se retrouvent biodisponibles au sein du tissu pulmonaire, puis dans tout l'organisme, où ils pourront être métabolisés en composés plus hydrosolubles pour faciliter leur excrétion grâce à l'action conjuguée de deux classes d'enzymes. Toutefois, au niveau pulmonaire, l'activation métabolique des HAP par les cytochromes P450 (CYP), et plus particulièrement par le CYP1A1 induit la formation d'intermédiaires réactifs possédant des effets néfastes sur la santé [2]. Certains métabolites pourront ainsi interagir avec l'ADN des cellules cibles, et former des adduits, entraînant de ce fait une possible mutation, voire une initiation tumorale [2]. L'expression génique du CYP1A1 est modulée en accord avec l'activation d'un facteur de transcription spécifique : l'*Aryl hydrocarbon Receptor* (AhR) [2, 8].

L'activité mutagène de la pollution atmosphérique est particulièrement bien décrite au niveau bactérien

par l'utilisation de tests *in vitro* qui ont mis en évidence l'importance du rôle des HAP adsorbés dans cette mutagénicité [9, 10]. Toutefois, d'autres facteurs, souvent négligés, comme les dimensions des particules, les interactions entre les différents composants chimiques et les réactions secondaires dans l'atmosphère, sont connus pour affecter la génotoxicité des aérosols atmosphériques [11-14]. En effet, les niveaux d'adduits de HAP à l'ADN retrouvés chez des travailleurs exposés au trafic suivent des tendances saisonnières et ont tendance à varier en fonction de la saison d'échantillonnage [3, 15]. La photodégradation et la transformation chimique des HAP dans l'atmosphère pendant la saison chaude risquent d'induire la formation de produits hautement réactifs, tels que le Benzo[*a*]pyrène (B[*a*]P) et les B[*a*]P-7,8-Dihydrodiol-9,10-époxyde (BPDE) quinones, capables de générer des adduits à l'ADN [15, 16]. De plus, les polymorphismes génétiques modulent chez l'homme la formation d'adduits de HAP à l'ADN [17].

Dans le cadre de la surveillance d'une exposition aux HAP, les marqueurs biologiques les plus recherchés sont, tout d'abord, leurs métabolites (par exemple, le 1-hydroxypyrene), mais aussi la formation d'adduits à l'ADN et aux protéines. Lors d'une étude de cancérogénicité, l'étude des adduits à l'ADN est particulièrement pertinente, car ceux-ci font partie intégrante des mécanismes connus au sein d'un processus tumoral [18-22]. En revanche, les adduits aux protéines, n'étant pas corrélés lors de faibles concentrations d'exposition aux HAP, n'apparaissent pas comme des marqueurs intéressants pour évaluer l'exposition environnementale [11, 23, 24]. La méthode de post-marquage au  $^{32}\text{P}$  apparaît comme étant le marqueur biologique de choix pour la surveillance de l'exposition aux HAP, aussi bien dans le cas d'une exposition professionnelle que pour les expositions environnementales [25]. De ce fait, un groupe de travail a mis au point des protocoles, des normes et des méthodes d'assurance qualité pour la mise en œuvre de cette technique qui requiert l'utilisation d'une source radioactive [22, 26].

Pour améliorer la connaissance des mécanismes d'action sous-jacents à la cytotoxicité de la pollution atmosphérique induite dans les poumons humains, tout en mettant en exergue le rôle crucial de la fraction organique adsorbée à la surface des particules, un échantillonnage de particules atmosphériques a été réalisé à Dunkerque, une ville côtière du nord de la France, caractérisée non seulement par la proximité de nombreuses activités industrielles, mais aussi par un conséquent trafic de véhicules à moteur. Ces particules ont été caractérisées d'un point de vue physique et chimique et l'induction des enzymes intervenant dans l'activation métabolique des Composés organiques volatils (COV) et des HAP adsorbés a été étudiée en utilisant une lignée de cellules épithéliales pulmonaires humaines (A549) [4]. Dans ce travail, nous avons porté notre attention sur la capacité des PM collectées à induire l'expression du gène du *CYP1A1* et l'activité de sa protéine, puis la formation d'adduits de HAP à l'ADN dans les cellules A549.

Afin de mieux cerner le rôle particulier des HAP adsorbés à la surface des particules collectées, des particules de  $\text{TiO}_2$ , d'une part, et des particules ayant subi une désorption thermique, d'autre part, ont été utilisées en tant que témoins négatifs lors de cette étude, puisque ces particules ne renferment pas de fraction organique.

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Matériels chimiques

Les réactifs de culture cellulaire proviennent d'*InVitrogen* (Cergy-Pontoise, France). Le dioxyde de Titane (IV) en poudre (anatase ; pureté : 99 % ; diamètre :  $0,2\ \mu\text{m}$ ) sont fournis par *Acros Organics* (Noisy-le-Grand, France). La protéinase K, les ribonucléases A et T1, la nucléase de *micrococcus*, les 2'-désoxyadénosine-3'-monophosphate (dAp), la nucléase P1, l'urée, l'acide formique, l'hydroxyde de lithium, le kit « bicinchoninic acid », ainsi que tous les réactifs pour le dosage de l'activité EROD ont été fournis par Sigma-Aldrich (St-Quentin Fallavier, France). Le tampon de lyse RIPA provient de *Santa Cruz Biotechnology, Inc.* (Heidelberg, Allemagne). Les amorces pour l'amplification en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction* ; PCR) ont été synthétisées par Proligo France SAS (Paris, France), et tous les autres réactifs nécessaires pour la transcription inverse (*Reverse Transcription* ; RT) et la PCR ont été fournis par Roche Diagnostics (Meylan, France). La source radioactive d'ATP enrichie en [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ( $3\ 000\ \text{Ci/mmol}$ ) a été fournie par *GE Healthcare Europe GmbH* (Orsay, France). La T4 polynucleotide kinase a été fournie par Q Biogen (*MP Biomedicals*, Ilkirch, France) ; la phosphodiesterase de type II a été extraite d'une rate de veau par Calbiochem (VWR International France, Fontenay-sous-Bois, France). Les plaques de chromatographie en PolyÉthylèneimine (PEI)-cellulose F sont fabriquées par Merck (VWR International France, Fontenay-sous-Bois, France).

### 2.2. Particules atmosphériques : collecte, caractéristiques physico-chimiques et désorption

#### 2.2.1. Collecte

Les PM ont été collectées à Dunkerque ( $51^\circ\ 04'\ \text{N}$  ;  $2^\circ\ 38'\ \text{E}$ ), une ville industrialo-portuaire du nord de la France. Le prélèvement a été effectué en continu pendant neuf mois, à l'aide d'un impacteur en cascade à grand volume de prélèvement [27].

#### 2.2.2. Caractéristiques physiques

La distribution granulométrique de l'échantillon particulière collecté a été étudiée par analyse en microscopie électronique à balayage. L'échantillon est majoritairement composé de  $\text{PM}_{2,5}$  (92,15 %) (Figure 1). La surface spécifique de l'échantillon collecté, déterminée par la méthode de Brunauer, Emmett et Teller (BET), est de  $1\ \text{m}^2/\text{g}$ .

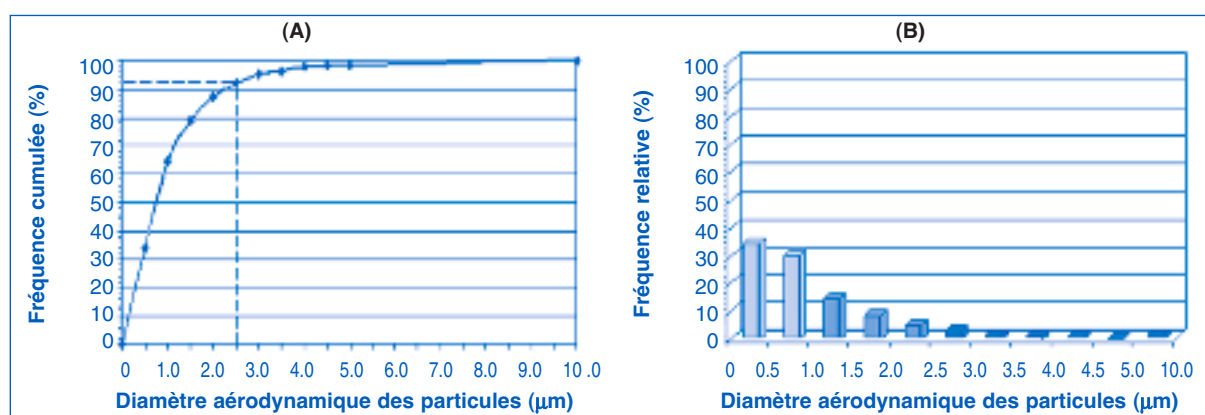


Figure 1.

Distribution granulométrique, exprimée en fréquences cumulées (A) et en fréquences relatives (B), de l'échantillon particulaire collecté à Dunkerque à l'aide d'un impacteur en cascade.

Size distribution of the particle matter (PM) collected in Dunkerque, a French seaside city located on the southern coast of the North-Sea, using high volume cascade impactor, is depicted as cumulative frequency (A) and relative frequency (B). PM size distribution has been determined using scanning electron microscopy.

### 2.2.3. Caractéristiques chimiques (Tableau 1)

L'analyse en spectrométrie d'émission atomique à source plasma a montré la présence de nombreux éléments inorganiques au sein de l'échantillon, dont certains reflètent plutôt l'origine naturelle des particules (Ca, Mg, Na, Ti, Sr, etc.) alors que d'autres montrent son origine anthropique (Al, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn, etc.). L'analyse des composés organiques en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été effectuée suite à deux méthodes d'extraction complémentaires : la désorption thermique à 500 °C, et l'extraction par solvant avec soxhlet. De nombreux HAP ont pu être détectés, et parmi eux, onze des seize composés classés comme prioritaires par l'agence américaine de protection de l'environnement (US-EPA).

### 2.2.4. Désorption thermique couplée à un vide progressif

La désorption consiste à éliminer la phase organique que renferment les particules atmosphériques sans affecter leur structure fine inorganique. À cette fin, la technique choisie est la désorption thermique couplée à un vide progressif ( $T = 400\text{ °C}$  ;  $P = 10^{-7}\text{ Pa}$ ). Des analyses thermiques différentielles et analyses thermogravimétriques (ATD-ATG), ont montré l'efficacité relative de cette désorption, qui n'aurait toutefois pas réussi à désorber l'intégralité des composés organiques les plus lourds. La détermination de la surface spécifique de l'échantillon désorbé ( $50\text{ m}^2/\text{g}$ ) a confirmé la disponibilité de la surface particulaire pour la fixation de composés organiques [4, 27].

Tableau 1.

Composition des phases inorganique et organique lourde de l'aérosol ( $\text{PM}_{2,5}$ ) collecté à Dunkerque.

Inorganic and organic compounds detected in collected particle matter ( $\text{PM}_{2,5}$ ) by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES) or gas chromatography coupled mass spectrometry (GC-MS).

Composés inorganiques	Masse (en %)	Composés organiques	Concentration (en ppm)
Fe	7,84	Naphtalène	38,1
Al	5,83	Méthylnaphtalène	141,9
Ca	4,95	Diméthylnaphtalène	90,2
Na	1,88	Anthracène	47,1
K	0,97	Phénanthrène	28,3
Mg	0,81	Dibutylphtalate	110,1
Pb	0,80	Fluoranthène	4,7
Ti	0,51	Benzo(b+k)fluoranthène	6,6
Mn	0,352	Benzo(a)pyrène	7,9
Zn	0,184	Bis(Ethyl.Hexyl)phtalate	41,4
Ba	0,064	Acénaphthène	11,1
Cu	0,037	Fluorène	6,3
Cr	0,032	Pyrène	4,7
V	0,03	Benzo(a)anthracène ou Chrysène	4,9
Ni	0,029		
Sr	0,022		
Li	0,011		
Mo	0,004		

### 2.3. Matériel biologique

Le système respiratoire étant la cible privilégiée des particules atmosphériques, notre choix s'est orienté vers un modèle de pneumocytes alvéolaires de type II d'origine tumorale : la lignée de cellules A549 (numéro ATCC : CCL-185). Ces cellules ont la propriété de se multiplier et d'être maintenues en survie grâce à un repiquage hebdomadaire. Leur temps de doublement théorique est de 24 h.

### 2.4. Culture des cellules A549

Les cellules A549 ont étéensemencées dans des flacons de culture stériles de 75 cm<sup>2</sup> (Corning; Thermo Fisher Scientific, Courtabœuf, France) contenant du Milieu essentiel minimum (MEM) avec des sels de Earle et sans L-glutamine. Ce dernier a été supplémenté à 1 % (v/v) avec une solution de L-glutamine (200 mM), avec une solution d'antibiotiques (pénicilline ; 10 000 U/ml – streptomycine ; 10 000 µg/ml), et à 5 % (v/v) avec du sérum de veau fœtal. Les cultures de cellules ont été placées dans un incubateur (T = 37 °C ; CO<sub>2</sub> = 5 % et humidité = 100 %). Des passages successifs nous ont permis d'obtenir, à partir d'une même ampoule de cellules mères, un nombre suffisant de cellules en phase exponentielle de croissance pour pouvoir appliquer notre protocole d'exposition.

### 2.5. Traitement des cellules et prélèvement

Pour réaliser une cinétique (24, 48 et 72 h) tout en ayant un nombre suffisant de cellules (> 6.10<sup>6</sup> cellules/flacon) à chacun des temps d'incubation, l'ensemencement a été adapté. En effet, compte tenu du temps de doublement théorique des cellules A549 (24 h), les trois séries de flacons ont été respectivementensemencées avec 3.10<sup>6</sup>, 1,5.10<sup>6</sup> et 0,75.10<sup>6</sup> cellules/flacon. Après adhésion des cellules, les milieux ont été renouvelés pour n'exposer que des cellules vivantes aux Particules totales (Pt) à leur Concentration létale (CL) à 10 % (i.e. CL<sub>10</sub> = 23,72 µg PM/mL ou 6,33 µg PM/cm<sup>2</sup>) ou à 50 % (i.e. CL<sub>50</sub> = 118,60 µg PM/mL ou 31,63 µg PM/cm<sup>2</sup>) pendant 24, 48 ou 72 h, sans renouvellement du milieu de culture. Les cellules non exposées servent de témoins, alors que les cellules exposées au TiO<sub>2</sub> et aux Particules désorbées (Pd) à des concentrations équivalentes à la CL<sub>10</sub> et à la CL<sub>50</sub> de la fraction inorganique des particules totales, c'est-à-dire intégrant la perte de masse liée à la désorption effective de la fraction organique, ont servi de témoins négatifs (i.e. Eq CL<sub>10</sub> = 19,42 µg/mL ; ou 5,18 µg/cm<sup>2</sup> ; Eq CL<sub>50</sub> = 97,13 µg/mL ; ou 25,90 µg/cm<sup>2</sup>). Enfin, l'exposition de flacons de culture au B[a]P (1 µM) a constitué un contrôle positif d'induction de la voie d'activation métabolique des HAP. Dès la fin du temps d'incubation, les cellules ont été prélevées, lavées deux fois dans 5 ml de tampon phosphate (0,01 M ; pH 7,2), puis des aliquots des culots cellulaires ont été rapidement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80 °C jusqu'à l'extraction des ARN ou à la préparation des microsomes.

### 2.6. Expression génique du CYP1A1

Les ARN totaux ont été extraits à partir des culots cellulaires à l'aide du kit *RNeasy Mini Kit* (Qiagen ; Courtabœuf, France), avant de procéder à la transcription inverse (RT) selon des conditions déjà publiées [28]. L'amplification en chaîne par polymérase (PCR) des ADN complémentaires suit le protocole décrit par Iwanari *et al.* (amorces : S : 5'-TCT TTC TCT TCC TGG CTA TC-3' ; AS : 5'-CTG TCT CTT CCC TTC ACT CT-3') [29].

### 2.7. Activité catalytique du CYP1A1

#### 2.7.1. Préparation des microsomes

Les microsomes ont été extraits selon la méthode de Guengerich [30]. Les cellules (6.10<sup>6</sup> cellules) ont tout d'abord été lysées par 500 µL de tampon RIPA, puis centrifugées à 20 000 g pendant 10 min à 4 °C. Les surnageants ont ensuite été centrifugés à 110 000 g pendant 1 h à 4 °C, pour obtenir la fraction microsomale, remise en suspension dans du tampon phosphate (100 mM ; pH 7,4 ; EDTA, 1 mM) puis rapidement congelée dans de l'azote liquide et conservée à -80 °C. La concentration en protéines microsomales a été mesurée par l'utilisation de l'acide bicinchoninique [31].

#### 2.7.2. Mesure de l'activité EROD

La méthode précédemment décrite par Donato *et al.* a été utilisée [32]. La fraction microsomale a été incubée (~100 µg de protéines) pendant 15 min à 37 °C en présence de tampon phosphate (100 mM ; pH 7,4) avec système de régénération de NADPH (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM NADP<sup>+</sup>, 10 mM glucose-6-phosphate, et 0,3 U/mL glucose-6-phosphate deshydrogénase), ainsi que 10 µM d'éthoxyrésorufine qui est le substrat enzymatique. Après arrêt de la réaction par ajout de méthanol, la résorufine formée a été quantifiée par fluorimétrie (longueurs d'onde : excitation : 544 nm ; émission : 590 nm) à l'aide d'un lecteur de microplaques (logiciel : Ascent v2.6 ; matériel : Fluoroskan Ascent).

### 2.8. Post-marquage au <sup>32</sup>P des adduits de HAP à l'ADN

#### 2.8.1. Extraction de l'ADN génomique

Après élimination des ARN et des protéines par un traitement enzymatique aux RNAses A et T1, et à la protéinase K, l'ADN génomique a été extrait des cellules exposées pendant 72 h en utilisant le kit « *Genomic DNA from Tissue Kit* » (Macherey-Nagel Eurl, Hoerd, France).

#### 2.8.2. Post-marquage au <sup>32</sup>P

Selon un protocole défini par Randerath et Reddy [33, 34], 5 µg d'ADN ont été digérés par la nucléase du *micrococcus* et par la phosphodiesterase pendant 3 h 30. L'enrichissement en adduits a été effectué par la nucléase P1 pendant 30 min à 37 °C. Les adduits

encombrants ont ensuite été marqués pendant 30 min à 37 °C par la T4 polynucléotide kinase en présence de 30 µCi de <sup>32</sup>P-γATP. La chromatographie 2D sur couche mince sur plaques de PEI-cellulose (12 cm × 12 cm) a permis la séparation des adduits marqués. Pour ce faire, quatre solvants de migrations ont successivement été utilisés : (i) Phosphate de sodium (1 M ; pH 6,8 ; 12 h) ; (ii) Formate de lithium (3 M), Urée (7 M ; pH 3,5) ; (iii) Chlorure de lithium (0,7 M), Tris-HCl (0,45 M), Urée (7,7 M ; pH 8,0) ; et (iv) Phosphate de sodium (1,7 M ; pH 5,0 ; 12 h). Les autoradiogrammes étaient des films Kodak XOMat exposés en cassette aux plaques de chromatographie pendant 72 h à - 80 °C. Chaque condition d'exposition a au moins été étudiée en triplicat. Un contrôle positif (ADN de thymus de veau exposé au BPDE), ainsi qu'un témoin négatif sans ADN ont été étudiés. La quantification relative a été permise par la migration d'échantillons de teneur connue en dAp. Les spots d'adduits à l'ADN ont été découpés puis la radioactivité a été comptée par scintillation en mode Cerenkov [34].

## 2.9. Analyses statistiques

L'attribution des traitements a été réalisée avec une table de permutations au hasard à neuf éléments et les échantillons ont été analysés en aveugle. Les

résultats ont été décrits par leurs moyennes et leurs écarts types. Les valeurs des variables aléatoires de chaque groupe (contrôles négatifs, contrôles positifs, exposition aux particules atmosphériques) ont été comparées à celles du groupe témoin grâce au test non paramétrique U de Mann-Whitney. Par ailleurs, des corrélations ont été réalisées entre les paramètres d'étude de l'activation métabolique (Test non paramétrique de Spearman). Le risque d'erreur de première espèce ( $\alpha$ ) consenti était de 0,05. Le traitement des données a été réalisé avec le logiciel d'analyses statistiques SPSS 12.0 for Windows, Version 12.0.1 Nov 2003 (SPSS France).

## 3. Résultats

### 3.1. Effets des PM sur l'expression génique et l'activité catalytique du CYP1A1

L'induction statistiquement significative de la transcription du gène du CYP1A1 a été observée chez les cellules A549, 24, 48 et 72 h après leur exposition aux particules désorbées (Pd) que ce soit à leur concentration Eq CL<sub>10</sub> ( $p < 0,05$ ) ou à leur Eq CL<sub>50</sub> ( $p < 0,01$ ), aux particules totales (Pt) à leur CL<sub>10</sub> ( $p < 0,01$ ) comme à leur CL<sub>50</sub> ( $p < 0,01$ ), ainsi qu'au B[a]P ( $p < 0,01$ ), par rapport aux cellules témoins (Tableau 2). En revanche, l'exposition des cellules

Tableau 2.

Expression génique du CYP1A1 et activité EROD dans des cellules A549 exposées durant 24, 48, ou 72 h. Les cellules non exposées correspondent aux témoins (T). Les cellules A549 exposées au TiO<sub>2</sub> ou aux Particules désorbées (Pd) aux concentrations équivalentes aux concentrations létales à 10 % (i.e. Eq CL<sub>10</sub> = 19,42 µg/mL ou 5,18 µg/cm<sup>2</sup>) et 50 % (i.e. Eq CL<sub>50</sub> = 97,13 µg/mL ou 25,90 µg/cm<sup>2</sup>), qui intègrent la perte de masse consécutive à la désorption de la fraction organique, ont été utilisés en tant que témoins négatifs. Par contre, les cellules A549 exposées au B[a]P correspondaient à des témoins positifs de l'activation métabolique des HAP. Les cellules A549 ont été exposées aux Particules totales (Pt) à leur concentration létale à 10 % (i.e. CL<sub>10</sub> = 23,72 µg PM/mL ou 6,33 µg PM/cm<sup>2</sup>) et 50 % (i.e. CL<sub>50</sub> = 118,60 µg PM/ml ou 31,63 µg PM/cm<sup>2</sup>). Les résultats sont décrits par leur moyenne ± écart-type. Les variations statistiques des résultats des cellules exposées par rapport aux témoins sont calculées par le test U de Mann-Whitney (NS : Non Significatif ; \* :  $p < 0,05$  ; et \*\* :  $p < 0,01$ ).

Gene expression and catalytic activity of cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) in A549 cells 24, 48 or 72 h after their exposure. Non-exposed A549 cells served as Controls (T), and A549 cells exposed to TiO<sub>2</sub> or desorbed Particulate Matter (dPM) at concentrations equivalent to their Lethal Concentrations at 10 % (i.e. Eq LC<sub>10</sub> = 19.42 µg PM/mL or 5.18 µg PM/cm<sup>2</sup>) and 50 % (i.e. Eq LC<sub>50</sub> = 97.13 µg PM/mL or 25.90 µg PM/cm<sup>2</sup>), integrating weight losses due to the organic desorption, were used as negative controls. In contrast, A549 cells exposed to Benzo(a)Pyrene (B[a]P) served as positive controls for the induction of the gene expression of CYP1A1. A549 cells were exposed to Particulate Matter (PM) at their Lethal Concentrations at 10 % (i.e. LC<sub>10</sub> = 23.72 µg PM/mL or 6.33 µg PM/cm<sup>2</sup>) or 50 % (i.e. LC<sub>50</sub> = 118.60 µg PM/ml or 31.63 µg PM/cm<sup>2</sup>). Gene expression of CYP1A1 has been reported by their fold-induction to the control values. Results are described by their mean ± standard deviation of 8 replicates for controls, and 4 replicates for negative controls, PM exposures, and positive controls. (Mann-Whitney U-test; versus controls; NS: Not Significant; \*:  $p < 0.05$ ; and \*\*:  $p < 0.01$ ).

		Exposition							B[a]P 1 µM
		T	TiO <sub>2</sub> Eq CL <sub>10</sub>	TiO <sub>2</sub> Eq CL <sub>50</sub>	Pd Eq CL <sub>10</sub>	Pd Eq CL <sub>50</sub>	Pt CL <sub>10</sub>	Pt CL <sub>50</sub>	
Expression génique	24 h	1 ± 0,340	0,922NS ± 0,350	1,205NS ± 0,502	1,620* ± 0,342	2,159** ± 0,671	2,889** ± 0,309	3,382** ± 1,054	3,235** ± 0,849
	48 h	1 ± 0,231	0,894NS ± 0,264	0,824NS ± 0,053	1,342** ± 0,254	1,683** ± 0,406	2,341** ± 0,203	2,669** ± 0,679	2,165** ± 0,334
	72 h	1 ± 0,269	0,869NS ± 0,232	1,018NS ± 0,278	1,578* ± 0,541	1,916** ± 0,545	2,419** ± 0,719	2,893** ± 1,020	2,65** ± 0,251
Activité EROD	24 h	195 ± 16	177NS ± 9	192NS ± 9	20 166* ± 949	20 493* ± 3 336	25 455* ± 2 248	49 420* ± 2 453	16 337* ± 988
	48 h	115 ± 53	136NS ± 19	649NS ± 21	19 271* ± 3 233	29 186* ± 4 909	23 331* ± 7 023	31 817* ± 7 528	42 960* ± 3 938
	72 h	124 ± 50	90NS ± 22	240NS ± 32	13 306* ± 2 978	14 480* ± 1 243	13 689* ± 3 721	31 347* ± 3 255	35 727* ± 505

A549 au TiO<sub>2</sub> n'a entraîné aucune variation significative de l'expression génique du *CYP1A1*. L'activité catalytique du *CYP1A1* a été significativement augmentée par l'exposition des cellules A549 durant 24, 48, ou 72 h aux Pt aux deux concentrations testées, par rapport aux témoins ( $p < 0,05$ ) (Tableau 2). De même, les Pd comme le B[a]P ont provoqué un accroissement significatif de l'activité EROD, pour les trois temps étudiés, par rapport aux témoins ( $p < 0,05$ ). Par contre, aucune modulation significative de l'activité EROD n'a pu être mise en évidence après exposition des cellules A549 au TiO<sub>2</sub> pendant 24, 48, ou 72 h. L'expression génique et l'activité catalytique du *CYP1A1* montrent une corrélation significative (Rho de Spearman = 0,722,  $p < 0,001$ ).

### 3.2. Effets des PM sur la formation d'adduits encombrants à l'ADN

Le post-marquage au <sup>32</sup>P a mis en évidence la présence de trois zones de spots d'adduits encombrants à l'ADN sur les autoradiogrammes des cellules A549 après leur exposition 72 h aux Pd à leur Eq CL<sub>50</sub>, aux Pt à leur CL<sub>50</sub>, ainsi qu'au B[a]P (les zones ont été respectivement numérotées I, II, et III). Tout d'abord, le spot I, apparaissant quelle que soit l'exposition, y compris chez les témoins, a été considéré comme un artefact engendré par la technique de marquage et non par la présence d'adduits à l'ADN. En revanche, un spot d'adduit commun (II) a été observé chez les cellules exposées 72 h en présence de Pd, de Pt, ou de B[a]P. Toutefois, la relativement faible intensité de ce spot par rapport aux bruits de fond environnant ne permet pas sa quantification de manière correcte. Enfin, l'exposition des cellules A549 pendant 72 h au B[a]P a entraîné la formation de trois spots distincts d'adduits à l'ADN d'intensité relativement forte (III), pour lesquels la quantification a été possible : le niveau relatif d'adduits étant de  $89,52 \times 10^{-8} \pm 24,06 \times 10^{-8}$  adduit/nucléotide.

## 4. Discussion

L'exposition à la pollution atmosphérique est impliquée dans le développement du cancer du poumon [1, 2, 5, 6, 35]. Pourtant, les mécanismes sous-jacents à la cancérogénicité des particules atmosphériques ne sont pas encore complètement connus. Néanmoins, la présence de composés aromatiques cancérogènes adsorbés à leur surface suggère leur probable implication dans la cytotoxicité pulmonaire de telles expositions [4]. C'est pourquoi la capacité d'induction de l'activation métabolique de ces HAP par les PM a été recherchée, ainsi que la formation d'adduits encombrants à l'ADN dans un modèle *in vitro*.

La caractérisation physico-chimique de la fraction particulaire de l'aérosol a mis en évidence la présence de HAP cancérogènes adsorbés à la surface inorganique [4]. La détection de ces composés organiques s'explique par la localisation de plusieurs sources anthropogéniques importantes à proximité du site de prélèvement. En complément d'un trafic routier important, la zone industrielle de Dunkerque comporte notamment des activités de sidérurgie et de métallurgie, et des raffineries de pétrole, ce qui entraîne une exposition complexe et hétérogène de composés inorganiques et organiques, et rend dédaléenne l'attribution des toxicités respectives de chaque fraction (inorganique vs organique, notamment).

Il est particulièrement important de noter que l'adsorption des HAP à la surface des particules inorganiques leur permet d'allonger considérablement leur demi-vie atmosphérique [7]. En effet, des particules carbonées en suspension jouent le rôle de noyaux de condensation pour les HAP, ce qui accroît leur stabilité en empêchant leur dégradation photo-oxydative. En outre, cette fonction de support physique des PM pourrait améliorer à la fois la pénétration et la rétention de ces composés organiques dans les poumons, accroissant ainsi leur toxicité [4].

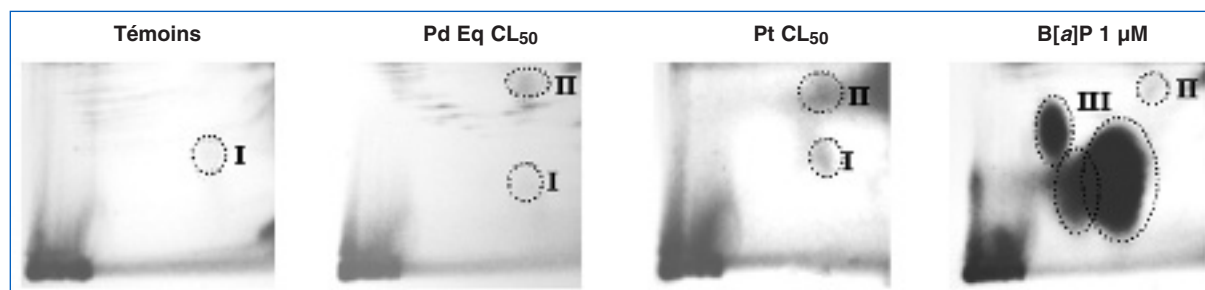


Figure 2.

Autoradiographies obtenues par post-marquage au <sup>32</sup>P. La Figure 2 présente les profils obtenus par post-marquage au <sup>32</sup>P des adduits à l'ADN dans des cellules A549 exposées durant 72 h. Les cellules non exposées correspondent aux témoins. Les cellules A549 exposées aux Particules désorbées (Pd) à la concentration équivalente à la concentration létale à 50 % (i.e. Eq CL<sub>50</sub> = 97,13 µg PM/mL ou 25,90 µg PM/cm<sup>2</sup>), qui intègre la perte de masse consécutive à la désorption de la fraction organique, ont été utilisées en tant que témoin négatif. Par contre, les cellules A549 exposées au Benzo[*a*]Pyrène (B[a]P) correspondaient à des témoins positifs de l'activation métabolique des HAP. Les cellules A549 ont été exposées aux Particules totales (Pt) à leur concentration létale à 50 % (i.e. CL<sub>50</sub> = 118,60 µg PM/ml ou 31,63 µg PM/cm<sup>2</sup>).

**Effects of PM on DNA Adduct Formation.** PAH-DNA Adduct Patterns obtained by <sup>32</sup>P-post-labeling method of non-exposed A549 cells (Témoins), or after 72 h of A549 cells exposure to desorbed particles (Pd Eq CL<sub>50</sub> = 97.13 µg/mL), to Dunkerque's collected PM<sub>2.5</sub> (Pt Eq CL<sub>50</sub> = 118.60 µg/mL), or to B[a]P (1 µM).

L'exposition puis l'absorption des HAP au sein des tissus cibles de l'organisme entraînent l'activation de leurs voies de métabolisation. Nous avons ainsi montré que les HAP adsorbés à la surface des PM<sub>2,5</sub> collectés à Dunkerque induisaient à la fois l'expression génique du *CYP1A1*, mais aussi son activité catalytique ; ces deux paramètres étant statistiquement corrélés. Ces résultats impliquent que les HAP présents à des doses relativement faibles (i.e. entre 4,7 µg/g PM pour le fluoranthène et le pyrène à 141,9 µg/g PM pour le méthylanthralène) ont été en mesure d'activer les AhR, induisant ainsi les voies d'activation métabolique des HAP, à la fois au sein des cellules A549, mais aussi lors de l'exposition de macrophages alvéolaires en culture primaire [2, 8] (cf. Saint-Georges *et al.*, dans ce numéro). Par ailleurs, les résultats d'induction du *CYP1A1* dans les cellules A549 exposées aux Pd montrent que la méthode de dégazage employée n'était pas suffisamment efficace pour éliminer l'intégralité des HAP, ce qui n'a toutefois pu être vérifié par analyse chimique. Les *CYP* étant généralement plus inductibles que les enzymes de la phase II de métabolisation des HAP, il s'avère que cette production de métabolites chimiquement réactifs pouvant réagir avec l'ADN des cellules cibles et former des adduits à l'ADN, peut donner lieu à des mutations et entraîner une initiation tumorale.

De nombreux marqueurs biologiques d'exposition aux HAP peuvent être utilisés. Parmi ceux-ci, il est apparu particulièrement pertinent de s'intéresser à la formation des adduits des HAP sur l'ADN, car ceux-ci représentent une part significative dans les mécanismes sous-jacents à l'initiation tumorale dans le développement d'un cancer [18-22]. De ce fait, ils représentent la conséquence intégrée de l'exposition, l'absorption, la distribution, l'activation métabolique, et des interactions avec l'ADN, ainsi que la cinétique de réparation de l'ADN [36]. Les adduits encombrants à l'ADN pourraient prédire le cancer du poumon dans le cadre d'un suivi de plusieurs années [37-39].

La méthode de post-marquage au <sup>32</sup>P des adduits encombrants est considérée comme la méthode optimale dans l'optique d'une surveillance de l'exposition environnementale aux HAP [25, 40]. Cette technique permet une détection globale des adduits encombrants, mais ne permet pas de les caractériser chimiquement. Compte tenu de la grande sensibilité de la méthode (entre 1 adduit par 10<sup>8</sup> nucléotides et 1 adduit pour 10<sup>11</sup> nucléotides), le post-marquage au <sup>32</sup>P semble être suffisamment sensible pour une application à des populations humaines exposées à la pollution atmosphérique particulaire. En conséquence, il a été largement utilisé pour détecter les adduits encombrants cancérigènes à l'ADN dans des études d'épidémiologie moléculaire [41, 42].

Cette méthode nous a permis de mettre en évidence dans des cellules A549 après 72 h d'exposition au B[a]P la formation de plusieurs spots d'adduits à l'ADN quantifiables. Ces résultats valident ainsi les conditions expérimentales destinées à détecter les

adduits encombrants de HAP à l'ADN. Un spot d'adduit de HAP à l'ADN a aussi pu être détecté dans des cellules A549 exposées 72 h aux PM<sub>2,5</sub> de Dunkerque. Ce spot est aussi décelé après exposition au B[a]P, ainsi qu'aux Pd, ce qui confirmerait l'insuffisance de la désorption thermique sous vide progressif utilisée. Toutefois, la trop faible intensité de cet adduit n'a pas permis de quantification correcte. La présence de cet adduit après exposition au B[a]P, et en regard des concentrations respectives en B[a]P dans les Pt et les Pd par rapport au témoin positif pose le problème de son identification formelle. En effet, il pourrait s'agir de la migration concomitante de deux adduits à l'ADN différents, les particules présentant plusieurs HAP, autres que le B[a]P, capables de se lier à l'ADN.

Si l'on considère l'ensemble des résultats observés pour les cellules A549 exposées aux Pd et aux Pt, il apparaît une incohérence entre l'induction de l'expression génique et l'activité catalytique du *CYP1A1* d'une part, et le faible niveau de détection des adduits de HAP à l'ADN, d'autre part. Plusieurs hypothèses sont à envisager. Tout d'abord, en accord avec Kriek *et al.*, les adduits à l'ADN du BPDE sont souvent relativement difficiles à détecter [43]. Ils pourraient ainsi être présents, mais à des niveaux inférieurs à la limite de détection. Dans d'autres études d'évaluation de la génotoxicité de mélanges de polluants, les spots d'adduits formés étant trop discrets, seule l'étude de la zone diagonale de radioactivité (DRZ pour *Diagonal Radioactive Zone*) peut être utilisée [13]. Toutefois, l'application de cette méthode d'analyse ne nous a pas fourni de résultats complémentaires. Deuxièmement, malgré la présence de nombreux HAP adsorbés à des doses relativement faibles sur les particules atmosphériques étudiées, la dose totale de HAP et leur nombre pourraient empêcher la formation d'adduits de HAP à l'ADN quantifiables. En effet, la comparaison avec une autre étude recherchant le potentiel génotoxique de particules atmosphériques urbaines nous montre que la plus faible dose d'extrait organique ayant formé des adduits encombrants à l'ADN était significativement plus élevée (entre 100 et 1 000 fois supérieure) que celles utilisées dans ce travail [13]. Troisièmement, le temps d'exposition que nous avons choisi (i.e. 72 h) permettrait peut-être l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN, ce qu'un choix de plus courtes durées d'exposition pourrait minimiser. Quatrièmement, la fraction organique adsorbée sur les PM comprend des concentrations équivalentes de COV et de HAP ; la procédure d'enrichissement en adduits par la nucléase P1 nous a permis de détecter les adduits les plus encombrants comme l'a montré le profil d'adduits retrouvé chez les cellules A549 exposées au B[a]P. Toutefois, l'extraction des adduits par le butanol aurait peut-être permis d'identifier d'autres adduits plus légers [44]. Cinquièmement, les réactions chimiques atmosphériques sont connues pour influencer la génotoxicité des PM. Ainsi, les conditions hivernales accroissent généralement la génotoxicité des particules par rapport aux échantillons collectés l'été [9, 11-14, 38, 45-48]. Cette tendance



générale n'est pas absolue. En effet, chez des travailleurs exposés au trafic routier, les niveaux d'adduits encombrants à l'ADN étaient plus élevés en été qu'en hiver [3, 15, 49]. Notre échantillon de PM<sub>2,5</sub> provenant d'une collecte continue de janvier à septembre, ces variations saisonnières n'ont pu être étudiées, tout comme l'opportunité de révéler un impact génotoxique plus important à l'aide d'un prélèvement limité à une seule saison.

En conclusion, les doses relativement faibles de HAP adsorbés à la surface des PM<sub>2,5</sub>, collectées à Dunkerque, ont induit de manière significative à la fois l'expression génique et l'activité catalytique du *CYP1A1*, mais n'ont pas entraîné la formation quantifiable d'adduits de HAP à l'ADN dans les cellules A549 selon nos conditions expérimentales. Dans l'objectif de mieux assimiler les mécanismes d'action sous-jacents à la toxicité de la pollution atmosphérique, notamment dans l'initiation des processus tumoraux, d'autres expériences de mutagenèse sont à considérer. L'inclusion au protocole d'exposition d'un contrôle B[a]P à sa concentration réelle dans la phase particulaire pourrait permettre de caractériser son effet propre dans la formation d'adduits à l'ADN recherchés par la technique du post-marquage au

<sup>32</sup>P, ou au sein d'une étude de mutagenèse bactérienne, comme le test d'Ames. Par ailleurs, en raison des importantes variations saisonnières qui peuvent survenir dans la génotoxicité des particules atmosphériques collectées, un mode de prélèvement plus court pourrait se révéler pertinent.

## Remerciements

L'étude présentée dans cet article entre dans le cadre de l'Institut de recherches en environnement industriel (IRENI), financé par la Région Nord-Pas-de-Calais, le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche, ainsi que par des fonds européens (FEDER). Le Laboratoire de recherche en toxicologie industrielle et environnementale (LCE-EA2598) bénéficie de financements octroyés par l'Agence française de sécurité sanitaire de l'environnement et du travail (AFSSET ; Convention n° EST-2007-48), le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche (Convention n° 16848-2005), et d'une allocation de recherche de la Région Nord-Pas-de-Calais.

## Références

- [1] Pope CA, III, Burnett RT, Thun MJ *et al.*, Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002 ; 287 : 1132-41.
- [2] Schwartz AG, Prysak GM, Bock CH, Cote ML. The molecular epidemiology of lung cancer. *Carcinogenesis* 2007 ; 28 : 507-18.
- [3] Vineis P, Husgafvel-Pursiainen K. Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis* 2005 ; 26 : 1846-55.
- [4] Billet S, Garçon G, Dagher Z *et al.*, Ambient particulate matter (PM<sub>2.5</sub>): physicochemical characterization and metabolic activation of the organic fraction in human lung epithelial cells (A549). *Environ. Res* 2007 ; 105 : 212-23.
- [5] World Health Organization. The World Health Report – Reducing Risks to Health, Promoting Healthy Life. ISBN-13 9789241562072. 2002.
- [6] Hemminki K, Pershagen G. Cancer risk of air pollution: epidemiological evidence. *Environ. Health Perspect.* 1994 ; 102 Suppl 4 : 187-92.
- [7] Mumtaz MM, George JD, Gold KW, Cibulas W, DeRosa CT. ATSDR evaluation of health effects of chemicals. IV. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): understanding a complex problem. *Toxicol Ind. Health* 1996 ; 12 : 742-971.
- [8] Tompkins LM, Wallace AD. Mechanisms of cytochrome P450 induction. *J Biochem Mol Toxicol* 2007 ; 21 : 176-81.
- [9] Claxton LD, Matthews PP, Warren SH. The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: Salmonella mutagenicity. *Mutat. Res* 2004 ; 567 : 347-99.
- [10] Sorensen M, Autrup H, Hertel O, Wallin H, Knudsen LE, Loft S. Personal exposure to PM<sub>2,5</sub> and biomarkers of DNA damage. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003 ; 12 : 191-6.
- [11] Castano-Vinyals G, D'Errico A, Malats N, Kogevinas M. Biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental air pollution. *Occup. Environ. Med* 2004 ; 61 : e12.
- [12] Binkova B, Vesely D, Vesela D, Jelinek R, Sram RJ. Genotoxicity and embryotoxicity of urban air particulate matter collected during winter and summer period in two different districts of the Czech Republic. *Mutat. Res* 1999 ; 440 : 45-58.

- [13] Sevastyanova O, Novakova Z, Hanzalova K, Binkova B, Sram RJ, Topinka J. Temporal variation in the genotoxic potential of urban air particulate matter. *Mutat. Res* 2008 ; 649 : 179-86.
- [14] Topinka J, Schwarz LR, Wiebel FJ, Cerna M, Wolff T. Genotoxicity of urban air pollutants in the Czech Republic. Part II. DNA adduct formation in mammalian cells by extractable organic matter. *Mutat. Res* 2000 ; 469 : 83-93.
- [15] Palli D, Russo A, Masala G *et al.* DNA adduct levels and DNA repair polymorphisms in traffic-exposed workers and a general population sample. *Int J Cancer* 2001 ; 94 : 121-7.
- [16] Lewtas J. Air pollution combustion emissions: Characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutat. Res* 2007 ; 636 : 95-133.
- [17] Kato S, Bowman ED, Harrington AM, Blomeke B, Shields PG. Human lung carcinogen-DNA adduct levels mediated by genetic polymorphisms in vivo. *J Natl. Cancer Inst* 1995 ; 87 : 902-7.
- [18] Lewtas J, Walsh D, Williams R, Dobias L. Air pollution exposure-DNA adduct dosimetry in humans and rodents: evidence for non-linearity at high doses. *Mutat. Res* 1997 ; 378 : 51-63.
- [19] Beland FA, Poirier MC. Significance of DNA adduct studies in animal models for cancer molecular dosimetry and risk assessment. *Environ. Health Perspect.* 1993 ; 99 : 5-10.
- [20] Poirier MC, Weston A, Schoket B *et al.*, Biomonitoring of United States Army soldiers serving in Kuwait in 1991. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998 ; 7 : 545-51.
- [21] Phillips DH. DNA adducts as markers of exposure and risk. *Mutat. Res* 2005 ; 577 : 284-92.
- [22] Poirier MC, Weston A. Human DNA adduct measurements: state of the art. *Environ. Health Perspect.* 1996 ; 104 Suppl 5 : 883-93.
- [23] Autrup H, Daneshvar B, Dragsted LO *et al.*, Biomarkers for exposure to ambient air pollution – comparison of carcinogen-DNA adduct levels with other exposure markers and markers for oxidative stress. *Environ. Health Perspect.* 1999 ; 107 : 233-8.
- [24] Farmer PB, Singh R, Kaur B *et al.* Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage. *Mutat. Res* 2003 ; 544 : 397-402.
- [25] Farmer PB, Shuker DE. What is the significance of increases in background levels of carcinogen-derived protein and DNA adducts? Some considerations for incremental risk assessment. *Mutat. Res* 1999 ; 424 : 275-86.
- [26] Phillips DH, Castegnaro M. Standardization and validation of DNA adduct postlabelling methods: report of interlaboratory trials and production of recommended protocols. *Mutagenesis* 1999 ; 14 : 301-15.
- [27] Billet S, Ledoux F, Dagher Z *et al.* Stability of organic compounds in atmospheric particulate matter and its relation with textural properties. *Chemical Eng. Trans.* 2006 ; 10 : 101-7.
- [28] Garcon G, Gosset P, Zerimech F, Grave-Descampiaux B, Shirali P. Effect of Fe(2)O(3) on the capacity of benzo(a)pyrene to induce polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in the respiratory tract of Sprague-Dawley rats. *Toxicol Lett* 2004 ; 150 : 179-89.
- [29] Iwanari M, Nakajima M, Kizu R, Hayakawa K, Yokoi T. Induction of *CYP1A1*, *CYP1A2*, and *CYP1B1* mRNAs by nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in various human tissue-derived cells: chemical – cytochrome P450 isoform – and cell-specific differences. *Arch Toxicol* 2002 ; 76 : 287-98.
- [30] Guengerich FP. Separation and purification of multiple forms of microsomal cytochrome P-450. Partial characterization of three apparently homogeneous cytochromes P-450 prepared from livers of phenobarbital – and 3-methylcholanthrene-treated rats. *J Biol Chem.* 1978 ; 253 : 7931-9.
- [31] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985 ; 150 : 76-85.
- [32] Donato MT, Castell JV, Gomez-Lechon MJ. Characterization of drug metabolizing activities in pig hepatocytes for use in bioartificial liver devices: comparison with other hepatic cellular models. *J Hepatol.* 1999 ; 31 : 542-9.
- [33] Randerath K, Reddy MV, Gupta RC. <sup>32</sup>P-labeling test for DNA damage. *Proc Natl. Acad. Sci U. S A* 1981 ; 78 : 6126-9.
- [34] Gupta RC, Reddy MV, Randerath K. <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen – DNA adducts. *Carcinogenesis* 1982 ; 3 : 1081-92.
- [35] Abbey DE, Mills PK, Petersen FF, Beeson WL. Long-term ambient concentrations of total suspended particulates and oxidants as related to incidence of chronic disease in California Seventh-Day Adventists. *Environ. Health Perspect.* 1991 ; 94 : 43-50.
- [36] Melnick RL. Carcinogenicity and mechanistic insights on the behavior of epoxides and epoxide-forming chemicals. *Ann N Y. Acad. Sci* 2002 ; 982 : 177-89.
- [37] Bak H, Autrup H, Thomsen BL *et al.* Bulky DNA adducts as risk indicator of lung cancer in a Danish case-cohort study. *Int J Cancer* 2006 ; 118 : 1618-22.

- [38] Peluso M, Srivatanakul P, Munnia A *et al.* DNA adduct formation among workers in a Thai industrial estate and nearby residents. *Sci Total Environ.* 2008 ; 389 : 283-8.
- [39] Tang D, Phillips DH, Stampfer M *et al.* Association between carcinogen-DNA adducts in white blood cells and lung cancer risk in the physicians health study. *Cancer Res* 2001 ; 61 : 6708-12.
- [40] Gabelova A, Valovicova Z, Bacova G *et al.* Sensitivity of different endpoints for in vitro measurement of genotoxicity of extractable organic matter associated with ambient airborne particles (PM<sub>10</sub>). *Mutat. Res* 2007 ; 620 : 103-13.
- [41] Boysen G, Hecht SS. Analysis of DNA and protein adducts of benzo[a]pyrene in human tissues using structure-specific methods. *Mutat. Res* 2003 ; 543 : 17-30.
- [42] Phillips DH. Detection of DNA modifications by the <sup>32</sup>P-postlabelling assay. *Mutat. Res* 1997 ; 378 : 1-12.
- [43] Kriek E, Rojas M, Alexandrov K, Bartsch H. Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in humans: relevance as biomarkers for exposure and cancer risk. *Mutat. Res* 1998 ; 400 : 215-31.
- [44] Bieler CA, Arlt VM, Wiessler M, Schmeiser HH. DNA adduct formation by the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone in V79 cells expressing human cytochrome P450 enzymes. *Cancer Lett* 2003 ; 200 : 9-18.
- [45] Claxton LD, Woodall GM Jr. A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. *Mutat. Res* 2007 ; 636 : 36-94.
- [46] Topinka J, Sevastyanova O, Binkova B *et al.* Biomarkers of air pollution exposure – a study of policemen in Prague. *Mutat. Res* 2007 ; 624 : 9-17.
- [47] Perera F, Brenner D, Jeffrey A *et al.* DNA adducts and related biomarkers in populations exposed to environmental carcinogens. *Environ. Health Perspect.* 1992 ; 98 : 133-7.
- [48] Grzybowska E, Hemminki K, Chorazy M. Seasonal variations in levels of DNA adducts and X-spots in human populations living in different parts of Poland. *Environ. Health Perspect.* 1993 ; 99 : 77-81.
- [49] Sorensen M, Autrup H, Moller P *et al.* Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat. Res* 2003 ; 544 : 255-71.

