

Spectre mutationnel de *TP53* en réponse à une exposition *in vitro* à un aérosol atmosphérique particulaire PM_{2,5}

Mutational pattern of *TP53* tumor suppressor gene in human lung cells exposed to air pollution PM_{2.5}

Sylvain BILLET^(1, 2, 3), Guillaume GARÇON^(1,2), Vincent PAGET^(1, 2, 3),
Anthony VERDIN^(1, 2), Véronique ANDRÉ⁽³⁾, Natacha HEUTTE⁽³⁾, Pirouz SHIRALI^(1, 2,*) et François SICHEL⁽³⁾

Résumé

La pollution atmosphérique particulaire fine (PM_{2,5}) constitue un des facteurs d'exposition contribuant à l'induction de certaines pathologies cardiopulmonaires, et notamment les cancers broncho-pulmonaires (CBP). Toutefois, la relation causale n'est pas suffisamment documentée quant aux mécanismes d'action potentiellement impliqués. En raison de son rôle de suppresseur de tumeurs, *TP53* est muté dans la majorité des CBP. L'objectif de cette étude a donc été de rechercher les mutations susceptibles d'altérer la fonctionnalité de ce facteur de transcription dans un modèle de cellules pulmonaires épithéliales humaines (A549) exposées à la fraction fine d'un aérosol atmosphérique particulaire d'origine urbano-industrielle.

Un échantillon particulaire de granulométrie fine a été collecté à Dunkerque par impaction en cascade. Sa caractérisation physico-chimique a révélé la présence de nombreux composés inorganiques et organiques, dont la toxicité intrinsèque est connue. La recherche des mutations altérant la fonctionnalité de la protéine P53 a été effectuée 72 h après l'exposition des cellules A549 à la concentration létale à 50 % (CL₅₀, 118,60 µg/mL = 31,63 µg/cm²) de l'aérosol, à l'aide du *Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast* (FASAY).

Seize mutations altérant la fonctionnalité de P53 ont été détectées suite à l'exposition des cellules A549 à l'aérosol particulaire : huit délétions de un ou deux nucléotides et huit substitutions de nucléotides, principalement des transitions A > G et G > A. Ces mutations sont décrites dans la littérature comme pouvant être causées par des mécanismes endogènes. Cette mutagenèse indirecte est généralement en rapport avec le phénomène du stress oxydant, potentiellement induit par les teneurs de l'échantillon particulaire en métaux/métalloïdes susceptibles de former des Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO), *via* la réaction de Fenton et l'activation métabolique de composés organiques adsorbés à la surface des particules atmosphériques. L'implication du stress oxydant dans l'apparition des mutations de *TP53* a été confortée par la détection d'un adduit oxydatif à l'ADN, la 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG), dans les cellules A549 exposées à l'aérosol particulaire.

Mots-clés

Pneumocytes humains (lignée A549). Pollution atmosphérique particulaire (PM_{2,5}). Mutagenèse. *TP53*. FASAY. Stress oxydant. 8-OHdG.

1. Université Lille Nord de France – Lille – France.

2. Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant – Maison de la Recherche en Environnement Industriel – Université du Littoral Côte d'Opale – Dunkerque – France.

3. GRECAN – Université de Caen Basse-Normandie et Centre Régional de Lutte Contre le Cancer François Baclesse – Caen – France.

* Pirouz.Shirali@univ-littoral.fr

Abstract

Environmental exposure to fine airborne particulate matter (PM_{2.5}) is thought to be responsible for cardiopulmonary diseases, including lung cancer. However, the mechanisms of action potentially involved in PM_{2.5} toxicity are not yet fully described. Mutations in the *TP53* gene are the most common alterations in human solid tumors. *TP53* mutational patterns have sometimes been linked to carcinogen exposure. The purpose of this study was to determine the mutations that alter the functionality of this transcription factor in a model of human epithelial lung cells (A549) exposed to the fine particulate fraction (PM_{2.5}) of an atmospheric aerosol sampled under urban and industrial influences.

PM_{2.5} was collected in Dunkerque City by cascade impaction. Its physicochemical characterization revealed the presence of many inorganic and organic compounds, including some that are known for their toxicity. The search for mutations altering the functionality of the P53 protein was performed 72 h after exposure of A549 cells to PM_{2.5} at its lethal concentration at 50% (LC₅₀, 118.60 µg/mL = 31.63 µg/cm²), using the Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast (FASAY).

Sixteen mutations altering P53 function were detected after A549 cells exposure to the collected PM_{2.5}: eight deletions of one or two nucleotides and eight nucleotide substitutions, mainly transitions A > G and G > A. These mutations are described in the literature as possibly caused by endogenous mechanisms, such as oxidative stress. This kind of alteration can be induced by metal content of the PM_{2.5}, as well as by metabolic activation of the organic compounds coated onto its surface. Involvement of oxidative stress in *TP53* mutations was confirmed by the detection of an oxidative DNA adduct, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), in A549 cells exposed to the collected PM.

Keywords

A549 cells. Air pollution particulate matter. Mutagenesis. TP53. FASAY. Oxidative stress. 8-OHdG.

Introduction

L'impact sanitaire de la pollution atmosphérique, dû en majeure partie aux composés chimiques produits par combustion, reste important de nos jours malgré les faibles concentrations qui prévalent désormais dans l'air ambiant des villes d'Amérique du Nord et d'Europe occidentale [1]. Les données scientifiques actuelles indiquent que la pollution atmosphérique urbaine provoque un très large spectre d'effets sur la santé, allant de l'irritation des yeux à la mort [2]. L'implication de cette pollution dans le développement du cancer du poumon a ainsi été mise en évidence de manière forte lors de nombreuses enquêtes [3-6]. En 2002, au niveau européen, le risque de développer un cancer du poumon à cause de la pollution atmosphérique a été estimé à 10,7 %, ce qui représente plus de 25 000 cas/an, soit environ 1 %, tous cancers confondus [7]. Parallèlement, aux États-Unis, la mortalité par cancer du poumon augmente de 8 % à chaque fois que les teneurs en particules fines s'accroissent de 10 µg/m³ [5]. Ces particules sont des particules solides ou liquides en suspension dans l'air. Toutefois, en dépit de l'intensité des relations de causalité mises en évidence par les épidémiologistes, les données concernant les mécanismes d'action possibles demeurent fragmentaires, d'où un intérêt croissant pour les développer [8]. Il faut toutefois remarquer que pour des raisons d'ordre pratique, seules des études de la fraction particulaire des aérosols atmosphériques sont envisageables lors d'études *in vitro*.

Le cancer est classiquement présenté comme une pathologie liée à l'accumulation de modifications stables et transmissibles du matériel génétique aboutissant à la sélection progressive de cellules insensibles aux contrôles exercés par l'environnement tissulaire et par l'organisme entier [9].

L'étude de la génotoxicité forme le premier rang des recherches d'effets cancérigènes. Lorsqu'une cellule est mise en présence d'un xénobiotique, différents processus de détoxification et de réparation de l'ADN interviennent. Si ces mécanismes de protection sont dépassés, des mutations peuvent apparaître. Une mutation est une modification permanente du nombre ou de la structure du matériel génétique dans un organisme, qui aboutit à une modification des caractéristiques phénotypiques de l'organisme. Les altérations peuvent impliquer un gène unique (*i.e.* mutation génique telle que les mutations ponctuelles), un ensemble de gènes ou un chromosome entier, pouvant entraîner des modifications structurelles ou numériques. En fonction de la spécificité, de la stabilité et de la transmissibilité des mutations au génome des cellules filles, la cellule exposée peut être engagée dans la phase d'initiation tumorale qui précède les phases de promotion, de progression et d'invasion.

Toutes les mutations n'entraînent pas heureusement des effets en termes d'initiation d'un processus de cancérogenèse. Les mutations critiques portent en général sur les gènes impliqués dans l'embryogenèse, la différenciation cellulaire ou la régulation du cycle cellulaire, comme le gène *Tumor Protein 53 (TP53)* de la famille des gènes dits suppresseurs de tumeurs. Le rôle essentiel de sa protéine P53 au cœur des processus de réponse aux dommages de l'ADN (*i.e.* arrêt du cycle cellulaire, réparation des lésions, apoptose) lui confère le titre de « Gardien du génome ». La perte de fonction des gènes *P21* et *TP53* coïncide avec la transformation maligne dans de nombreux processus tumoraux. *TP53* est le gène le plus étudié puisqu'il se retrouve muté dans la majorité des cancers humains.

La recherche d'un effet cancérigène nécessite une période de latence longue qui s'écoule entre le

début de l'exposition et les premières manifestations de la maladie. Des tests de mutagenèse, et en particulier le test d'Ames, ont été initialement développés afin de combler le besoin de disposer de méthodes donnant des résultats plus rapides. Afin de raffiner la méthode, de nombreux autres essais de génotoxicité ont ensuite été développés notamment sur des cultures de cellules humaines.

Parmi ces derniers, le test FASAY (*Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast*), mis au point en 1993, se propose d'identifier les mutations du gène *TP53*, susceptibles d'entraîner une altération de la fonctionnalité de la protéine P53 [10]. Ce test est apparu comme particulièrement novateur, car il permet de caractériser uniquement les mutations délétères. L'originalité de cette approche tient au fait que la mutagenèse est étudiée directement sur un gène clé de la cancérogenèse humaine et qu'une comparaison directe des spectres obtenus est possible avec les spectres mutationnels des tumeurs humaines, recensés par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC). Le test FASAY permet de s'affranchir de la double co-transformation, car il repose sur l'analyse de la fonctionnalité de la protéine P53 sur des allèles séparés. Cette méthode fait appel à deux principes qui sont, d'une part, l'incorporation de l'ADNc de *TP53* dans un vecteur par recombinaison homologue chez la levure, et les propriétés de facteur de transcription de P53, d'autre part.

Dans l'objectif d'évaluer l'action génotoxique des aérosols atmosphériques particulaires, un échantillon de granulométrie fine (PM_{2,5}) a été collecté à Dunkerque, agglomération industrielle du Nord de la France. L'effort de recherche s'est porté sur les capacités de l'échantillon collecté à induire une réponse cytotoxique, des altérations oxydatives, des phénomènes inflammatoires, ainsi que des mécanismes pro-apoptotiques ou génotoxiques dans des modèles de culture *in vitro* [11-14]. Dans le cadre du présent travail, nous nous sommes intéressés à l'impact toxique *in vitro* de l'aérosol atmosphérique particulaire sur une lignée de pneumocytes de type II qui dérivent d'un carcinome humain (A549). Suite à la mise en évidence d'atteintes liées à la cytotoxicité globale de l'échantillon et en s'appuyant sur la relation dose-réponse ainsi déterminée, une altération cellulaire de type oxydatif a été recherchée : l'hydroxylation de la désoxyGuanosine composant l'ADN. Les atteintes à l'ADN sont susceptibles d'entraîner la création de mutations critiques altérant la fonctionnalité des protéines codées par les gènes atteints. Lorsque le gène *TP53* est muté, notamment au niveau du domaine de fixation à l'ADN, la protéine P53 peut être absente ou inactivée, ce qui peut aboutir à la présence de mutations, d'aneuploïdie, ou de défauts de mitose entraînant sa mort. Le gène *TP53* est muté dans la plupart des cancers humains. Afin de déterminer le profil mutationnel de l'échantillon particulaire atmosphérique urbano-industriel collecté, le test fonctionnel FASAY a été mis en œuvre.

Matériels et méthodes

Matériels chimiques

Les réactifs de culture cellulaire proviennent d'InVitrogen (Cergy-Pontoise, France). Le dioxyde de Titane (IV) en poudre (anatase ; pureté : 99 % ; Ø : 0,2 µm) est fourni par Acros Organics (Noisy-le-Grand, France). Les amorces pour l'amplification en chaîne par polymérase (*Polymerase Chain Reaction* ; PCR) ont été synthétisées par Proligo France SAS (Paris, France). Les autres réactifs nécessaires pour la transcription inverse (*Reverse Transcription* ; RT) et la PCR sont fournis par Roche Diagnostics (Meylan, France). La nucléase P1 et la phosphatase alcaline sont fournies par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

Particules atmosphériques : collecte, caractérisation physico-chimique

Collecte [15]

Les PM ont été collectées à Dunkerque (51° 04' N ; 2° 38' 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. La récupération des particules par grattage des plaques d'impaction séchées a été effectuée deux fois par mois avant conservation des particules à - 20 °C, afin d'éviter la dégradation des constituants particulaires.

Caractérisation physique [14]

La distribution granulométrique de l'échantillon particulaire collecté a été déterminée par analyse en microscopie électronique à balayage puis confirmée par granulométrie laser.

Caractérisation chimique [14]

La fraction inorganique de l'échantillon a été quantifiée par spectrométrie d'émission atomique couplée à un plasma inductif (*Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry*, ICP-AES). Les particules ont été minéralisées par digestion acide (mélange de trois acides de qualité Suprapur® Merck, HNO₃, HClO₄ et HF). Après évaporation des acides, le résidu est repris dans un volume d'eau ultrapure puis acidifiée en vue du dosage des éléments Al, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Pb, Ti, Sr et Zn par ICP-AES (spectromètre d'émission Varian Liberty II). La fraction ionique a été étudiée par chromatographie ionique et spectrophotométrie visible. Les ions étant fortement solubles dans l'eau, ils sont extraits par de l'eau ultrapure et au moyen d'ultrasons. Le lixiviat est filtré avant l'analyse par chromatographie ionique (Dionex DX 500) ou spectrophotométrie visible (Unicam helios).

La fraction organique a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse. Les analyses ont été effectuées à l'aide de l'appareil Varian Saturn 4D, équipé

d'une colonne « 60 m J&W DB1 MS column ». L'extraction de la fraction organique fortement adsorbée au noyau inorganique particulaire s'est révélée être une phase critique. En effet, la détection en GC-MS nécessite l'injection instantanée de la totalité de la fraction organique dans la colonne, pour des raisons liées au temps de rétention propre à chaque composé organique étudié. Plusieurs techniques d'extraction, distinctes mais complémentaires de manière à pallier leurs déficiences respectives, ont dû être appliquées :

- L'extraction traditionnellement utilisée s'effectue à l'aide du dichlorométhane par la technique du Soxhlet car elle préserve l'intégrité de la matière organique. Il s'agit d'une extraction solide-liquide, reposant sur le principe de la percolation d'un solvant à travers un échantillon solide contenu dans une cartouche poreuse, mais le reflux maintenu lors de l'extraction entraîne la perte des composés organiques les plus légers. L'éluat recueilli puis concentré a été injecté dans la colonne de la GC-MS.

- Une nouvelle méthode de désorption thermique a été mise en œuvre, afin de pallier les limites de la technique d'extraction précédente. Elle consiste en la désorption de l'échantillon à 300 °C avec mise en place d'un piège froid (*cold trap*) à -150 °C. Les composés organiques désorbés dans le four sont ainsi condensés dans le piège refroidi par une circulation d'azote quasi liquide. Un flash thermique permet ensuite leur injection instantanée en GC-MS. Cette technique permet la quantification de la fraction organique légère. Cependant, la température de désorption maximale de l'appareil s'est révélée être le facteur limitant l'analyse des composés organiques de volatilité intermédiaire. Les particules précédemment chauffées à 300 °C ont donc subi une nouvelle désorption à 500 °C avec mise en œuvre d'un piège froid « éthanol-azote liquide » à -114 °C afin de compléter les mesures quantitatives obtenues à 300 °C. L'échantillon de PM_{2.5} atmosphérique est déposé dans le tube du four du Chrompack® obtenu par de la laine de silice préalablement chauffée à 400 °C afin d'en éliminer les impuretés. Neuf désorptions successives du même échantillon, effectuées durant une période de huit jours, ont permis de détecter la majeure partie des composés organiques légers et semi-lourds adsorbés à la surface des particules.

- Les composés organiques polychlorés ont été quantifiés par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à haute résolution (HRGC/HRMS) en accord avec les méthodes 1613 et 1668 proposées par l'US-EPA. Après extraction au toluène, les PolyChloroDibenzo-p-Dioxines et -Furanes (PCDD-F) et les PolyChloroBiphényles (PCB) ont été purifiés par chromatographie liquide, puis injectés en HRGC/HRMS. La GC (HP6890, Agilent Technologies, Massy, France) est équipée d'un injecteur *split/splitless* et d'une colonne capillaire « 60 m J&W PB 5 MS ». Le MS est un spectromètre de masse à haute résolution de géométrie EB (*Mass Spectrometry Instruments*, Manchester, Royaume-Uni) (résolution : 10 000 ; température de la source : 250 °C ; tension d'élec-

trons : 30 eV ; courant de la chambre d'ionisation : 300 µA). Cette technique a également permis la mise en évidence de furanes (PCDF).

Désorption thermique des particules atmosphériques [15]

La désorption consiste en l'élimination de 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 °C ; P = 10-7 Pa). Des Analyses Thermiques Différentielles et Analyses Thermo-Gravimétriques (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 m²/g) a confirmé la disponibilité de la surface particulaire pour la fixation de composés organiques. L'utilisation de concentrations équivalentes (CL Eq ou LC Eq), intégrant la perte de la fraction organique adsorbée, a permis d'exposer les cellules A549 aux mêmes teneurs en composés inorganiques.

Matériel biologique

L'homme respire en moyenne 15 m³ d'air par jour, et la zone d'échange gazeux de l'appareil respiratoire représente une superficie pouvant atteindre 100 m². Le poumon constitue ainsi l'interface la plus importante entre le milieu extérieur et l'organisme, ce qui, par son rôle dans l'oxygénation des différents tissus, lui confère un intérêt particulier en toxicologie. Il est une cible privilégiée pour les différents agents toxiques et polluants susceptibles de se trouver dans l'air que nous respirons. Notre choix s'est ainsi orienté vers un modèle de pneumocytes de type II d'origine tumorale : la lignée de cellules A549 (numéro ATCC : CCL-185). Les pneumocytes de type II ont pour fonction principale la sécrétion du surfactant pulmonaire par les corps lamellaires. Toutefois, grâce au surdéveloppement de leurs réticulums endoplasmiques et appareils de Golgi, ces cellules sont dotées de capacités métaboliques substantielles. Les cellules A549 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.

Culture des cellules A549

Les cellules A549 ont étéensemencées dans des flacons de culture stériles de 75 cm² (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) et 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 effectuées sous conditions contrôlées (T = 37 °C ; CO₂ = 5 % et humidité = 100 %). Des passages successifs ont permis d'obtenir, à partir d'une même ampoule de cellules mères, un nombre suffisant de cellules en phase exponentielle de croissance afin d'appliquer le protocole d'exposition.

Traitement des cellules et prélèvement

Afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules (> 6.10⁶ cellules/flacon) après 72 h d'exposition, les flacons ont étéensemencés avec 0,75.10⁶ cellules/flacon. Après adhésion des cellules, les milieux ont été renouvelés pour n'exposer que des cellules vivantes aux Particules (PM) en suspension dans le milieu de culture à leur Concentration Létale (CL) à 10 % (i.e. CL₁₀ = 23,72 µg PM/mL ou 6,33 µg PM/cm²) ou à 50 % (i.e. CL₅₀ = 118,60 µg PM/mL ou 31,63 µg PM/cm²) pendant 24, 48 ou 72 h, sans renouvellement du milieu de culture. Ces concentrations létales ont été déterminées lors d'une étude précédente [14]. Les cellules non exposées ont servi de témoins, alors que les cellules exposées au TiO₂ et aux Particules désorbées (dPM) à des concentrations équivalentes à la CL₁₀ et à la CL₅₀ 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 constitué des témoins particuliers (i.e. Eq CL₁₀ = 19,42 µg/mL ; ou 5,18 µg/cm² ; Eq CL₅₀ = 97,13 µg/mL ; ou 25,90 µg/cm²). Dès la fin du temps d'incubation, les cellules ont été prélevées, lavées, puis des aliquotes de culots cellulaires ont été rapidement congelés dans l'azote liquide et conservés à -80 °C jusqu'à l'extraction de l'ADN ou des ARN.

Spectre mutationnel de TP53 (FASAY)

TP53 est l'un des gènes les plus fréquemment mutés dans le cancer chez l'Homme. De par l'importance de la fonction de suppresseur de tumeurs que possède la protéine P53 correspondante, dans l'inhibition des processus de cancérogenèse, l'étude de ses altérations lors de l'exposition à un xénobiotique revêt, alors, un intérêt extrêmement fort quant à la compréhension des mécanismes physiopathologiques de l'initiation tumorale.

Vérification du statut de TP53 dans la lignée A549

Dans le cadre de la recherche de mutations du gène TP53 altérant la fonctionnalité de la protéine au sein de la lignée A549 de pneumocytes humains de type II exposée à un aérosol particulaire urbano-industriel, il est indispensable de définir au préalable le statut de ce gène dans cette lignée cellulaire. Il est absolument primordial que le gène codant pour cette protéine soit exempt de toute mutation au sein de la lignée cellulaire avant exposition. Pour cela, le

séquençage direct des exons 5 à 9 qui présentent un fort taux de mutations recensées dans les cancers a été effectué après amplification par PCR *touchdown* et marquage à l'aide d'un thermocycleur Eppendorf et du kit réactionnel « Big Dye Terminator », avant analyse par un séquenceur 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems). La réaction de séquençage se décompose en trois étapes : (i) le marquage aléatoire par incorporation de terminateurs marqués, (ii) la purification des produits synthétisés, et (iii) l'électrophorèse capillaire des fragments obtenus. L'alignement à l'aide du logiciel « Blast 2 Sequences » (Basic Local Alignment Search Tool ; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi> ; NCBI) a permis de vérifier l'homologie des séquences ainsi déterminées avec la séquence sauvage de TP53. Cette étude n'ayant mis en évidence qu'un polymorphisme (SNP) au niveau du nucléotide 59 de l'intron 7 (G > T), mais aucune mutation sur les exons 5 à 9 du gène TP53, il a été possible d'étudier la génotoxicité vis-à-vis de TP53 des échantillons particuliers atmosphériques urbano-industriels collectés à Dunkerque sur la lignée A549 de pneumocytes humains de type II.

Spectre mutationnel de TP53 par le test FASAY

Après exposition durant 72 h des cellules A549 aux particules totales à leur CL₅₀, aux particules thermodésorbées à leur concentration équivalente à la CL₅₀, les ARN totaux ont été extraits à partir des culots secs, à l'aide du « RNeasy Mini Kit » (Qiagen) (figure 1, adaptée de Flaman *et al.* [16]). Les ADNc obtenus par *Reverse Transcription* (RT) ont été amplifiés spécifiquement par *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Les séquences des amorces utilisées sont : P3 5'-ATT-TGA-TGC-TGT-CCC-CGG-ACG-ATA-TTG-AA(S)C-3' et P4 5'-ACC-CTT-TTT-GGA-CTT-CAG-GTG-GCT-GGA-GT(S)G-3', où (S) représente la position d'un groupement phosphorothioate. Le fragment amplifié se situe entre les codons 42 et 374, ce qui correspond à une séquence nucléotidique de 998 paires de bases. Les ADNc néosynthétisés de TP53 ont été insérés par recombinaison homologue dans le vecteur d'expression pSS16 extemporanément digéré. Ces plasmides ont permis ensuite la transformation des levures yIG397. Lorsque la protéine P53 est fonctionnelle, elle se fixe sur les *Ribosomal Gene Clusters* (RGC) intégrés au niveau de la séquence promotrice du gène ADE2. Elle rend ainsi possible la transcription de ce gène, entraînant la pousse de colonies blanches (figure 1a). En revanche, si la protéine P53 n'est plus fonctionnelle, la transcription du gène ADE2 n'est plus possible, entraînant la croissance de colonies rouges (figure 1b). Cette coloration rouge provient de l'accumulation d'un pré-curseur de l'adénine au sein des colonies.

Après dénombrement complet des levures blanches et rouges, ces dernières ont été récupérées et mises en culture séparément, afin de disposer de matériel suffisant pour en extraire les ADNc de TP53. Après la lyse de la paroi des levures à l'aide de Zymolyase, l'extraction des inserts d'ADN intégrés aux plasmides

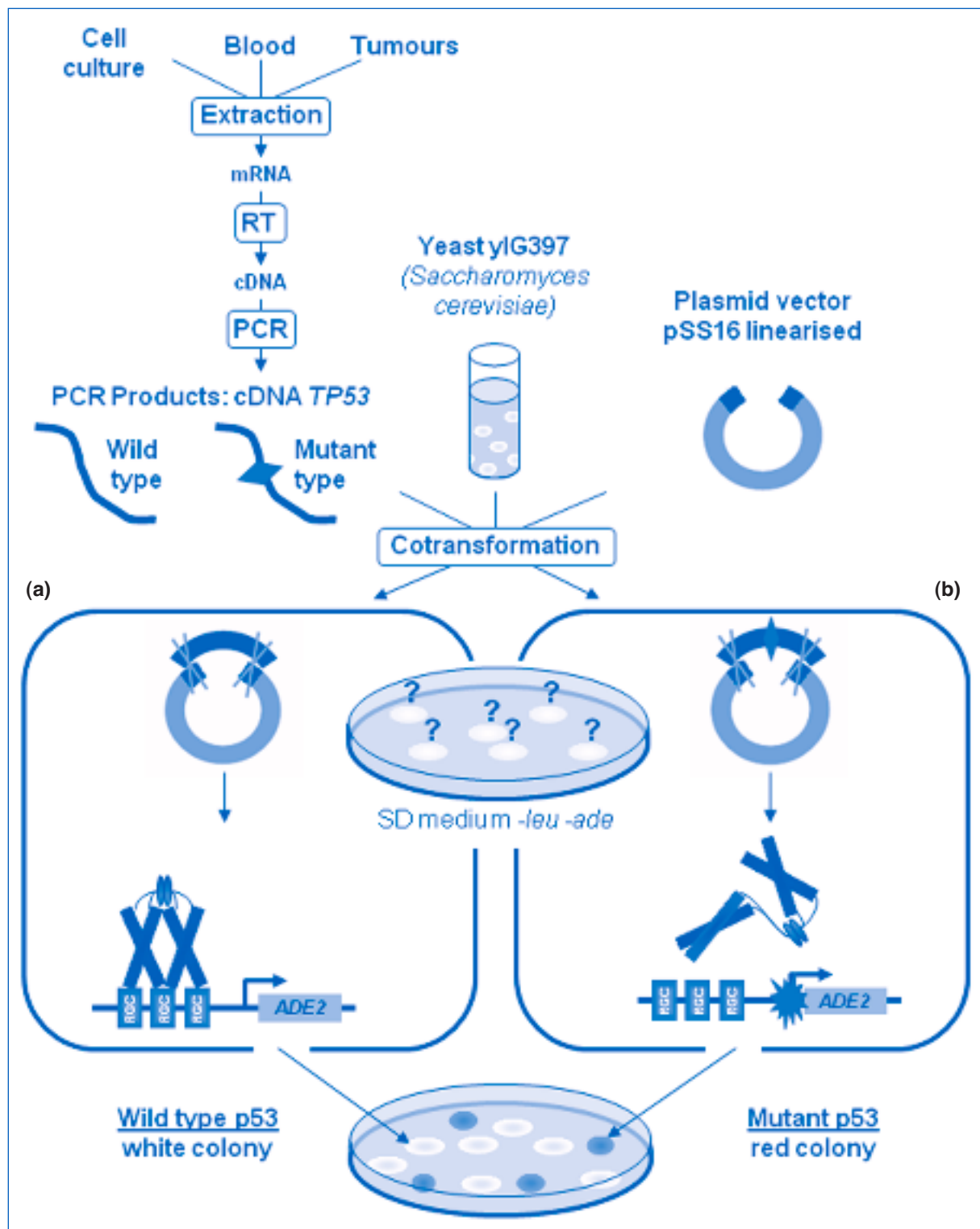


Figure 1.
Principe du test FASAY avec *ADE2* comme gène rapporteur.
FASAY principle FASAY with *ADE2* as reporter gene.

s'est effectuée à l'aide du kit « *Pure Link Quick Plasmid Miniprep Kit* » (Invitrogen). Avant de procéder au séquençage, l'ADNc a été amplifié par PCR en utilisant les amorces P5 : 5'-TCT-GTG-ACT-TGC-ACG-TAC-TCC-3' et P6 : 5'-CCA-ACA-ACA-CCA-GCT-CCT-CT-3'. L'utilisation du kit « *Dye Terminator Cycle Sequencing with Start Kit* » (Beckman Coulter) a permis de séquencer chaque échantillon dans les sens 5'-3' et 3'-5', en fonction de l'amorce utilisée (*i.e.* P5 ou P6). Les échantillons marqués ont ensuite été purifiés par précipitation « éthanol-acétate de sodium » avant remise en suspension et analyse par le séquenceur multicapillaire CEQ 8000 Beckman Coulter de l'Unité Génétique et Reproduction du Centre Hospitalier Régional Clémenceau de Caen.

La séquence d'ADN issue de chaque échantillon a été alignée avec la séquence sauvage de *TP53* à l'aide du logiciel « Blast 2 Sequences » afin de déterminer le pourcentage de similitude et de souligner la présence de mutations [17,18]. Les mutations confirmées par séquençages sens et anti-sens ont ensuite été mises en relation avec la base de données du CIRC (IARC *TP53* database – version R14, novembre 2009 – <http://www-p53.iarc.fr/P53main.html>), qui recense les mutations de *TP53* ayant fait l'objet de publications, soit plus de 25 000 mutations (24 810 mutations somatiques et 399 mutations germinales) [19].

Atteinte oxydative de l'ADN : dosage de l'adduit d'oxydation 8-OHdG

Certains composés de la fraction inorganique des particules collectées, tels que le fer, constituent des inducteurs puissants de la production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO), à l'origine d'altérations oxydatives cellulaires dont l'hydroxylation de la déoxyGuanosine composant l'ADN. Suite à l'exposition et au prélèvement des cellules A549, l'ADN a été extrait à l'aide du kit « *Generation Capture Plate Kit* » (Qiagen) selon les recommandations du fabricant, puis dosé par spectrophotométrie. Des aliquotes de 10 µg d'ADN ont été dénaturés à 100 °C. La solution de nucléase P1 a été ajoutée aux échantillons incubés à 37 °C pendant la nuit. Les nucléotides ont ensuite été déphosphorylés (phosphatase alcaline) à 37 °C. Le dosage des adduits d'oxydation repose sur l'utilisation du kit « 8-OHdG ELISA kit » (Gentaur, Bruxelles, Belgique) [20] et d'un lecteur de microplaques MRX (Logiciel : Revelation v3.2 ; Dynex Technologies, Issy-les-Moulineaux, France). Cette mesure quantitative consiste en un dosage immunoenzymatique (*Enzyme Linked Sorbent Assay*, ELISA) compétitif. Le taux d'adduits 8-OHdG détecté représente une variable aléatoire quantitative pour laquelle les valeurs de chaque groupe (contrôles particuliers et concentrations croissantes de l'aérosol) ont été comparées à celles du groupe témoin grâce au test non paramétrique U de Mann-Whitney. Le risque d'erreur de première espèce (α) consenti est de 0,05. Le traitement des données est réalisé avec le logiciel d'analyses statistiques SPSS (v.12.0.1 pour Windows, nov. 2003 ; SPSS France).

Résultats

Caractéristiques physiques de l'échantillon particulaire collecté

L'échantillon présente une granulométrie comprise entre 0,33 µm et 5,0 µm, avec un pic à 0,45 µm. Il est majoritairement composé de PM_{2,5} (92,15 %) et peut se décomposer en cinq classes granulométriques : 0,33-0,5 µm (33,63 %), 0,5-1,0 µm (30,61 %), 1,0-1,5 µm (14,33 %), 1,5-2,0 µm (8,69 %) et 2,0-2.5 µm (4,89 %). La surface spécifique de l'échantillon collecté, mesurée par porosimétrie à azote, est de 1 m²/g.

Caractéristiques chimiques

Les éléments majeurs de la fraction inorganique des particules atmosphériques collectées sont les suivants : Fe (7,84 %), Al (5,83 %), Ca (4,95 %), Na (1,88 %), K (0,97 %), Mg (0,81 %), Pb (0,80 %) et Ti (0,51 %). Les ions détectés sont les suivants : SO₄²⁻ (8,12 %), NO₃⁻ (5,15 %), Cl⁻ (1,8 %) et NH₄⁺ (0,68 %). La fraction organique est particulièrement riche et dierse. Elle comporte de nombreux HAP et, parmi eux, onze des seize composés classés comme prioritaires par l'agence américaine de protection de l'environnement (US-EPA) : Naphtalène (38,1 ppm), Méthylnaphtalène (141,9 ppm), Diméthylnaphtalène (90,2 ppm), Anthracène (47,1 ppm), Phénanthrène (28,3 ppm), Fluoranthène (4,7 ppm), Acénaphthène (11,1 ppm), Fluorène (6,3 ppm), Pyrène (4,7 ppm) et Benzo[*a*]anthracène ou Chrysène (4,9 ppm). Les composés organiques légers et semi-lourds adsorbés à la surface des particules étaient les suivants : Benzène (106,5 ppm), Toluène (42,2 ppm), Nonène (9,3 ppm), Xylène (65,4 ppm), Styène (13,5 ppm), 1-Ethényltriméthylbenzène (15,4 ppm), Décane (64,9 ppm), Diéthylbenzène (170,3 ppm), Limonène epoxyde (20,5 ppm), Tétraméthylbenzène (89,5 ppm), Heptadécane (15,1 ppm), Dibutylphtalate (110,1 ppm), Eicosane (1,4 ppm), Hénicosane (5,2 ppm), Docosane (17,4 ppm), Tricosane (8,7 ppm), Tétracosane (39,7 ppm), Pentacosane (12,2 ppm) et Bis(éthyl,hexyl)phtalate (41,4 ppm). Des composés organiques polychlorés (PolyChloroDibenzo-*p*-Dioxines et -Furanes, PCDD-F, et PolyChloroBiphényles, PCB) ont pu être détectés, notamment : 1,2,3,7,8-PentaCDD (115,28 pg/g PM, soit 57,64 pg I-TEQ/g PM), HxCDD (902,33 pg/g PM, soit 90,2 pg I-TEQ/g PM), HpCDD (2 645 pg/g PM, soit 26,45 pg I-TEQ/g PM), OCDD (10'918 pg/g PM, soit 10,92 pg I-TEQ/g PM). En regard de la durée et des conditions de prélèvement de l'aérosol, des teneurs atmosphériques particulières en dioxines liées à la fraction particulaire étudiée ont été estimées à 0,1 pg/m³, alors que celles des furanes seraient de 0,05 pg/m³. Parmi les PCB détectés, on notera la présence de congénères de type dioxine en quantités significatives (37'757 pg/g PM).

Spectre mutationnel de *TP53* (FASAY)

L'application du test FASAY a permis de mettre en évidence des mutations affectant le gène *TP53* dans

tous les échantillons étudiés, y compris les cellules A549 non exposées, malgré l'absence de détection de mutations touchant les exons 5 à 9, lors de l'étude préliminaire.

Mutations de TP53 affectant les cellules non exposées

Quatre mutations ont ainsi été identifiées dans les cellules A549 non exposées (tableau 1). Parmi celles-ci, une insertion de trois nucléotides, qui correspond à la répétition du codon 261 situé sur les exons 7 et 8 (Ex 7/8), a pu être détectée trois fois (43 %). Cette insertion n'est pas spécifique car il semblerait que sa localisation au niveau d'un site d'épissage expliquerait sa présence dans les spectres mutationnels obtenus, à l'aide du FASAY, pour d'autres composés [21-23].

Le taux de mutations identifiées, à l'exception de l'insertion précédemment explicitée, par rapport aux échantillons extraits ayant intégré le gène *TP53* est

de 8,89 %. Puisque ces mutations ponctuelles ont également été retrouvées au sein de cellules exposées, il ne peut s'agir de mutations spontanées dont la survenue serait aléatoire. Ces clones correspondraient, par conséquent, à des mutants préexistants au sein de la lignée cellulaire étudiée, non détectés lors du séquençage réalisé au préalable.

Spectre mutationnel des particules désorbées (dPM)

L'exposition à la fraction désorbée à 400 °C sous pression réduite de l'échantillon particulaire atmosphérique collecté à Dunkerque a provoqué, dans les cellules A549, la formation de 23 mutants, dont 5 concernent des mutations précédemment décrites dans les Témoins, parmi lesquelles 1 insertion Ex 7/8. Le spectre mutationnel obtenu est nettement dominé par les transitions G > A (44 %) identiquement réparties entre les Guanines situées au niveau des sites CpG et les autres (tableau 2).

Tableau 1.
Mutations de *TP53* identifiées par la technique du FASAY dans une lignée cellulaire de pneumocytes humains d'origine tumorale (A549) non exposés.
Summary of TP53 mutations found using FASAY in unexposed-A549 cells.

N°	Exon	Codon	Nucléotide	Nucléotide muté	Acide aminé muté	Nature de la mutation
1-2	5	157	470	GTC → GCC	Val → Ala	Faux-sens
3	6	195	584	ATC → ACC	Ile → Thr	Faux-sens
4	7	245	734	GGC → GAC	Gly → Asp	Faux-sens
5-7	7/8	261-262	781	AGT → AGT AGT		Frameshift

Tableau 2.
Spectre mutationnel de *TP53* des particules désorbées (dPM) établi dans une lignée cellulaire de pneumocytes humains d'origine tumorale (A549) par la technique du FASAY.
Summary of TP53 mutations found using FASAY in desorbed PM (dPM) exposed-A549 cells.

N°	Exon	Codon	Nucléotide	Nucléotide muté	Acide aminé muté	Nature de la mutation
1	6	195	584	ATC → ACC	Ile → Thr	Faux-sens
2-4	7	245	734	GGC → GAC	Gly → Asp	Faux-sens
5	7/8	262-263	781	AGT → AGT AGT		Frameshift
6-9	5	150-151	450-451	ACA CCC CC → ACC CCC		Frameshift
10-11	5	151	451	CCC → TCC	Pro → Ser	Faux-sens
12	5	152	455	CCG CCC → CGC CCG		Frameshift
13	5	175	524	CGC → CAC	Arg → His	Faux-sens
14	5	181	542	CGC → CAC	Arg → His	Faux-sens
15	7	238	713	TGT → TAT	Cys → Tyr	Faux-sens
16	7	244	731	GGC → GAC	Gly → Asp	Faux-sens
17	8	277	830	TGT → TAT	Cys → Tyr	Faux-sens
18	8	280	839	AGA → ACA	Arg → Thr	Faux-sens
19	8	281	842	GAC → GGC	Asp → Gly	Faux-sens
20	8	282-283	846-847	CGG CGC AC → CGG CAC		Frameshift
21	8	283	848	CGC → CAC	Arg → His	Faux-sens
22	8	298	892	GAG → TAG	Glu → STOP	Faux-sens
23	8	300	898	CCC CCA G → CCC CAG		Frameshift

Les délétions constituent le deuxième type de mutation le plus fréquent (38 %) et concernent presque exclusivement les nucléotides Guanines et Cytosines. La transition A > G et les transversions G > C et G > T ne correspondent qu'à une seule mutation identifiée. La mutation G > T (n° 22) altère la structure primaire de la protéine au niveau d'un acide glutamique modifié en codon STOP. La transversion A > C n'est, quant à elle, pas retrouvée dans le spectre mutationnel de *TP53* des particules désorbées. Le taux de mutations identifiées, à l'exception de l'insertion au niveau des exons 7 et 8, par rapport aux échantillons extraits ayant intégré le gène *TP53* est de 30,14 % ; 24,66 % lorsque les deux autres mutations retrouvées dans les Témoins (n° 1-4) ne sont plus prises en compte.

Spectre mutationnel de TP53 de l'échantillon particulaire atmosphérique collecté à Dunkerque

L'exposition à l'aérosol atmosphérique particulaire (PM_{2,5}) collecté à Dunkerque a entraîné, dans la lignée cellulaire de pneumocytes humains d'origine tumorale (A549), la formation de 25 mutants, dont huit concernent des mutations précédemment décrites dans les Témoins, parmi lesquelles six insertions Ex 7/8. Le spectre mutationnel obtenu fait apparaître quatre délétions correspondant à la moitié en fré-

quence des mutations constatées (tableau 3). Les transitions A > G et G > A constituent également un type de mutation important avec une fréquence de 19 % chacune. Les transversions A > T et G > T ne sont représentées que dans un échantillon chacun (6 %). Le taux de mutations identifiées, à l'exception de l'insertion au niveau des exons 7 et 8, par rapport aux échantillons extraits ayant intégré le gène *TP53* est de 18,95 % ; 16,84 % lorsque les deux autres mutations (nos 1-2) retrouvées dans les Témoins ne sont plus prises en compte.

Atteinte oxydative de l'ADN

Seule l'exposition à la concentration CL₁₀ Eq de TiO₂ n'a pas entraîné d'augmentation significative de la formation d'adduits 8-OHdG dans l'ADN des pneumocytes par rapport aux cellules témoins. Ainsi, la formation d'adduits 8-OHdG est significativement augmentée lors de l'exposition cellulaire pendant 72 h à la concentration la plus forte de TiO₂ et aux deux concentrations testées de l'aérosol atmosphérique particulaire natif ou désorbé. Une augmentation dose-dépendante de la teneur en adduits hydroxylés a été constatée lors de l'exposition aux échantillons particulaires (figure 2).

Tableau 3.
Spectre mutationnel de *TP53* des particules atmosphériques
établi dans une lignée cellulaire de pneumocytes humains d'origine tumorale (A549) par la technique du FASAY.
Summary of TP53 mutations found using FASAY in PM exposed-A549 cells.

N°	Exon	Codon	Nucléotide	Nucléotide muté	Acide aminé muté	Nature de la mutation
1	5	157	470	GTC → GCC	Val → Ala	Faux-sens
2	6	195	584	ATC → ACC	Ile → Thr	Faux-sens
3-8	7/8	262-263	781	AGT → AGT AGT		Frameshift
9	5	135	403	TGC CAA C → GCC AAC		Frameshift
10	5	143	427	GTG → ATG	Val → Met	Faux-sens
11	5	145	434	CTG → CCG	Leu → Pro	Faux-sens
12	5	150	448-449	ACA CCC CC → ACC CCC		Frameshift
13	5	151	451	CCC → TCC	Pro → Ser	Faux-sens
14	5	164	492	AAG → AAT	Lys → Asn	Faux-sens
15	5	168	503	CAC → CGC	His → Arg	Faux-sens
16	5	178	532	CAC CAT G → ACC ATG		Frameshift
17	5	180	539	GAG → GTG	Glu → Val	Faux-sens
18-23	6	206	617	TTTGAT G → TTG ATG		Frameshift
24	6	220	658	TAT → CAT	Tyr → His	Faux-sens
25	7	238	713	TGT → TAT	Cys → Tyr	Faux-sens

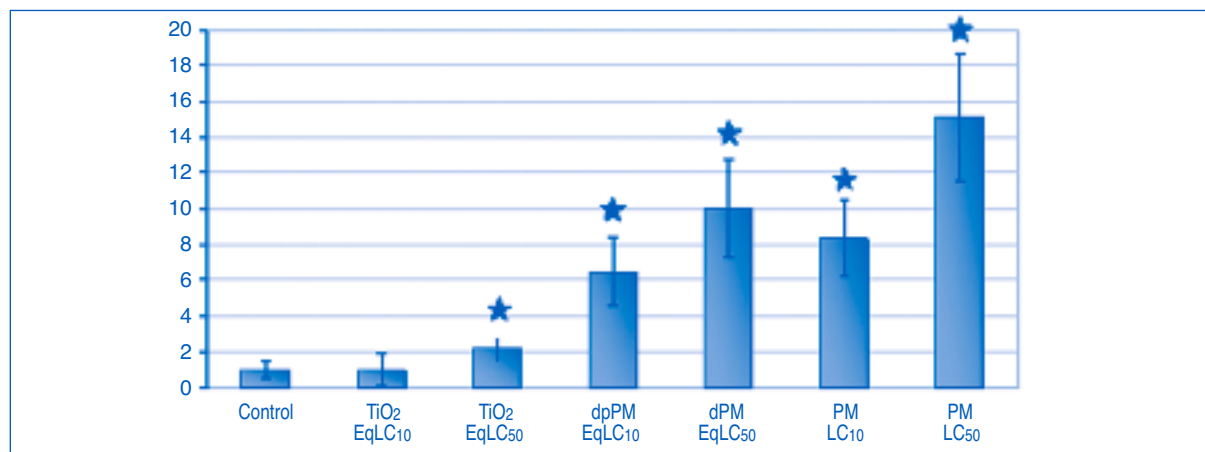


Figure 2.

Atteinte oxydative de l'ADN des pneumocytes A549 exposés à la fraction particulaire d'un aérosol atmosphérique collecté à Dunkerque.

Concentration en adduit oxydatif à l'ADN 8-hydroxy-2'-désoxyguanosine (8-OHdG) normalisée par rapport aux cellules témoins dans des cellules A549 incubées durant 72 h en présence de dioxyde de titane (TiO₂), de particules désorbées (dPM), de l'échantillon particulaire atmosphérique collecté (PM). Les moyennes et écarts types ont été calculés grâce à huit réplicats pour les cellules non exposées (Control) et quatre réplicats pour les autres expositions (concentrations létales à 10 % : LC₁₀ = 23,72 µg/mL = 6,33 µg/cm² et à 50 % : LC₅₀ = 118,6 µg/mL = 31,63 µg/cm²) (* = p < 0,05 ; vs Témoins ; Test non paramétrique U de Mann-Whitney).

Oxidative damage in particulates-exposed cells

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) DNA adduct concentration in A549 cells exposed during 72 h. Titanium oxide (TiO₂) served as particulate controls, whereas desorbed PM (dPM) represented the inorganic core of PM collected in Dunkerque City. A549 cells were also exposed to collected PM (PM). Means and standard deviations were determined using eight replicates for the unexposed cells (Control) and four replicates for the other expositions (lethal concentrations 10 % : LC₁₀ = 23.72 µg/mL = 6.33 µg/cm² and 50 % : LC₅₀ = 118.6 µg/mL = 31.63 µg/cm²) (* = p < 0.05 ; vs Control ; Non parametric Mann-Whitney U-test).

Discussion

Les concentrations atmosphériques particulaires ont pu être corrélées à une augmentation des taux de mortalité journaliers et annuels, ainsi qu'à la survenue de cancers du poumon [5, 24-26]. À l'heure actuelle, de par la difficulté de l'interprétation des résultats des études épidémiologiques, notamment en l'absence de caractérisation physico-chimique des aérosols, les mécanismes physiopathologiques sous-jacents responsables de leurs effets délétères demeurent encore peu connus. Or, de cette connaissance dépend l'instauration de mesures de prévention destinées à assurer une meilleure maîtrise du risque sanitaire environnemental que constitue la pollution atmosphérique.

Notre travail s'inscrit dans un vaste projet de recherche dédié à la détermination des mécanismes d'action sous-jacents impliqués dans la toxicité pulmonaire des aérosols anthropogéniques atmosphériques. Un échantillon particulaire de granulométrie fine (92,15 % de PM_{2,5}) a été collecté à Dunkerque, en milieu urbain sous l'influence du complexe industriel. L'analyse chimique de l'échantillon particulaire atmosphérique prélevé révèle la

présence de divers éléments inorganiques, parmi lesquels certains reflètent plutôt l'origine naturelle de l'aérosol (*e.g.* Al, Ca, Mg, Na, Ti, Sr) alors que d'autres corroborent son anthropogénicité (*e.g.* Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn). La faible dimension de ces particules leur confère une plus grande surface spécifique, ce qui exacerbe leur réactivité et accroît fortement leur capacité d'adsorption d'autres composés, notamment des COV (*e.g.* les BTEX), des HAP (*e.g.* Naphtalène, Anthracène, B[a]P, Fluoranthène) et des composés organiques polychlorés, tels que les dioxines. Cette composition confirme l'origine mixte industrielle et routière de l'échantillon collecté et s'accorde avec la présence de nombreuses sources d'émissions anthropiques à proximité du site de prélèvement.

L'effort de recherche s'est ensuite porté sur l'impact *in vitro* de l'échantillon collecté sur une lignée cellulaire de pneumocytes humains. Ont ainsi pu être étudiés la capacité de l'échantillon particulaire atmosphérique à induire une réponse cytotoxique, ainsi que les conséquences génotoxiques d'une telle exposition. Les atteintes à l'ADN sont susceptibles d'entraîner la création de mutations critiques altérant la fonctionnalité des protéines codées par les gènes

atteints. Le gène suppresseur de tumeurs *TP53*, impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire, est ainsi retrouvé muté dans plus de la moitié des cas de cancers humains. Le test fonctionnel FASAY, qui est le seul test de mutagenèse ciblant un gène clé de la cancérogenèse sur des cellules humaines, a permis d'établir le profil mutationnel de ce gène induit par l'exposition aux particules atmosphériques collectées sous influence urbano-industrielle, mais aussi à un échantillon désorbé de ces particules, afin de tester l'hypothèse, sous-tendue par les études épidémiologiques, du rôle de la protéine P53 dans les phénomènes de cancérogenèse induits par l'exposition à la pollution atmosphérique particulaire. Une autre grande force de ce test fonctionnel est de ne sélectionner que des mutations entraînant une perte de fonctionnalité de la protéine P53, tout en ciblant la partie centrale du gène, qui porte plus de 90 % des mutations retrouvées sur *TP53* chez l'Homme. Enfin, ce test présente une très haute sensibilité (1 copie mutée parmi 10 000).

La mise en œuvre du test FASAY se heurte toutefois à plusieurs limites non négligeables, telles que la relative lourdeur expérimentale générée par les différentes étapes nécessaires à sa réalisation. Le recours au processus de recombinaison homologue peut générer un fort taux de mutants spontanés, et donc de nombreux faux positifs qu'il faut ensuite écarter [27].

Tout d'abord, l'application du test FASAY sur le modèle A549 a confirmé l'instabilité génétique généralement constatée dans les lignées cellulaires, *a fortiori* dans celles dérivant de tumeurs puisque trois mutations faux-sens ont été séquencées dans les pneumocytes non exposés et correspondraient à des mutants préexistants au sein de la lignée cellulaire étudiée. Ces données ne mettent toutefois pas en doute les résultats obtenus en regard des différentes expositions. Bien au contraire, la détection de ces mutants valide notre choix de technique d'étude, qui se révèle bien plus sensible que la méthode de séquençage direct.

Malgré l'existence de nombreuses études ayant porté sur la génotoxicité de l'air, aucune n'a cherché à établir le spectre mutationnel de *TP53* dans des cellules humaines [28, 29]. Ce travail apparaît donc comme particulièrement novateur. Les spectres des échantillons particuliers atmosphériques natifs ou désorbés peuvent être explicités simultanément pour plus de clarté, en raison de la forte homologie qui les caractérise. La première propriété commune est la forte proportion de délétions qui varie entre 38 et 50 %. Cette fréquence de délétions s'expliquerait par l'origine tumorale de notre modèle cellulaire. La deuxième caractéristique commune est l'importance des transitions (38-50 %). Concernant les particules désorbées, les transitions $G > A$ constituent le type prédominant et la moitié de ces mutations affectent des sites CpG, exempts de toute transition lors de l'exposition à l'échantillon particulaire atmosphérique natif. La localisation préférentielle des transitions

$G > A$ au niveau des sites CpG est une caractéristique propre des tumeurs sans étiologie clairement associée à l'exposition à un composé génotoxique, telles que les cancers pulmonaires chez les non-fumeurs, les cancers du colon ou le syndrome de Li-Fraumeni [30-32]. Cette transition représente aussi la mutation spontanée la plus fréquemment détectée dans certains modèles *in vitro* tels que le test HPRT sur cellules ovariennes de hamster chinois (CHO-HPRT) [33]. La transition $G > A$ au niveau d'un site CpG a habituellement pour origine des mécanismes endogènes et peut caractériser un effet mutagène indirect. La survenue de mutation spontanée est alors favorisée par des mécanismes physiopathologiques, telle que le stress oxydant. Les particules désorbées, et donc également celles collectées, renferment pléthore de métaux parmi lesquels nombreux sont ceux impliqués dans la survenue d'atteintes oxydatives (e.g. Fe, Cr et Ni). Le caractère pro-oxydant des échantillons particuliers, corrélé à la fréquence de ce type de transition, se retrouve avec une plus forte intensité au niveau des particules désorbées. Ce paramètre peut être expliqué par l'élimination au cours de la désorption thermique des composés organiques adsorbés à la surface de l'échantillon particulaire atmosphérique, ce qui rendrait la fraction inorganique plus accessible, et donc plus facilement biodisponible au sein des cellules exposées.

L'échantillon particulaire atmosphérique collecté provoque la transition opposée $A > G$ avec une intensité plus forte que l'échantillon désorbé. La prédominance des transitions a été également constatée lors de l'exposition aux échappements de moteurs diesel du gène *Lacl* chez des rats transgéniques ($G > A$: 19 % ; $A > G$: 18 %) [34]. Toutefois, la protéine p53 de rat ne forme pas de mutations en cas d'exposition aux particules diesel. Lors de la comparaison des spectres mutationnels obtenus après exposition des cellules A549 aux échantillons particuliers, la différence résultante correspond essentiellement aux transitions $A > G$ qui trouvent probablement leur source dans les spectres des composés organiques ayant été désorbés. En effet, le spectre mutationnel de chacun des chefs de files des deux grandes classes de composés organiques (*i.e.* le benzène pour les COV et le B[a]P pour les HAP) a été déterminé à l'aide du test FASAY. Ces spectres comportent environ 20 % de transition $A > G$, tout comme l'échantillon particulaire collecté dans le cadre de ce projet [35]. Par ailleurs, la faible fréquence des transversions $G > T$ (6 %) confirme le rôle mineur des adduits encombrants à l'ADN, ce que suggérait l'absence d'adduits quantifiables sur les autoradiographies obtenues après exposition de cellules à l'échantillon particulaire collecté ou aux particules désorbées, lors d'une étude antérieure [36].

D'autre part, le test FASAY offre l'opportunité unique de permettre la comparaison directe des spectres mutationnels obtenus *in vitro* à ceux des tumeurs humaines, dans l'optique d'apporter des arguments de plausibilité biologique à la recherche des facteurs étiologiques des cancers.

L'un des points forts du test FASAY est la possible confrontation du spectre mutationnel obtenu avec la base de données du CIRC. Bien qu'un seul des points chauds de mutation des tumeurs pulmonaires, le codon 175, n'ait été retrouvé muté après exposition à l'échantillon particulaire atmosphérique, il est important de noter que la majorité des mutations identifiées à l'aide du FASAY (56 %) ont été précédemment décrites dans des biopsies de cancers bronchiques. Cette conclusion est cohérente avec la proportion relativement forte de transitions G > A décrites pour cette localisation tumorale.

Au vu des principales conclusions tirées de l'application du test FASAY à l'étude de l'impact de la pollution atmosphérique particulaire, il est apparu nécessaire de confirmer l'implication de mécanismes physiopathologiques endogènes, tels que le stress oxydant, dans le processus génotoxique de notre échantillon. Le biomarqueur classique d'interaction des espèces pro-oxydantes avec l'ADN a été dosé après 72 h d'exposition. La formation de l'adduit 8-OHdG est fortement et significativement induite lors de l'exposition des pneumocytes A549 à l'échantillon particulaire désorbé ou natif.

Conclusions et perspectives

Notre projet de recherche avait pour objectif l'étude de la toxicité pulmonaire d'un échantillon particulaire atmosphérique urbano-industriel (PM_{2,5}) collecté à Dunkerque. Nous nous sommes tout d'abord attachés à sa caractérisation physico-chimique. Nous avons ensuite montré l'impact mutagène de cet échantillon à l'aide du test FASAY mettant en avant la formation de mutations altérant la fonctionnalité de la protéine P53, partiellement induites par des mécanismes de stress oxydant.

Une des réflexions actuelles porte sur le modèle d'étude de la toxicité de l'échantillon particulaire. En effet, si les résultats obtenus dans le présent travail mené dans une lignée de pneumocytes humains d'origine tumorale sont riches d'enseignement, il nous semble aujourd'hui pertinent de complexifier ce modèle, notamment *via* des stratégies de co-cultures constituées de cellules bronchiques ou de pneumocytes, d'une part, et de cellules macrophagiques issues de lavages bronchiolo-alvéolaires réalisés chez des patients sains, d'autre part.

Remerciements

La présente étude 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). L'unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant bénéficie également de financements octroyés par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail (AFSSET ; Convention n° EST- 2007-48) et le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche (Convention n° 16848-2005).

La mise en œuvre du test FASAY a été permise par la fourniture des souches bactériennes et fongiques par MM. le Pr. J.-M. Flaman (INSERM U614, université de Rouen, France) et J. Cachot (LEMA, université du Havre, France). Les auteurs remercient également M. le Pr. K. Meflah, directeur du Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse, ainsi que Mme G. Abéguillé et M. Duval pour l'assistance technique fournie pour l'utilisation du séquenceur du Centre Hospitalier Régional Clémenceau de Caen.

Références

- [1] Health Effects Institute. Airborne particles and health: HEI epidemiologic evidence. *HEI perspectives*, Cambridge MA, 2001, Report.
- [2] Cohen A.-J., Anderson H.-R., Ostro B. *et al.* Mortality impacts of urban air pollution. In: Comparative quantification of health risks: global and regional burden of disease due to selected major risk factors. M. Ezzati, A.-D. Lopez, A. Rodgers and C.-J.-L. Murray (Eds) World Health Organization, Genève, Suisse 2004 : 1353-1433.
- [3] Cohen A.-J., Ross A.-H., Ostro B. *et al.* The global burden of disease due to outdoor air pollution. *J Toxicol Environ. Health* 2005 ; A 68 : 1301-7.
- [4] Dockery D.-W., Pope C.-A., III Xu X., *et al.* An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl. J Med* 1993 ; 329 : 1753-9.
- [5] Pope C.-A., III, Burnett R.-T., Thun M.-J., *et al.*, Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002 ; 287 : 1132-41.
- [6] Vineis P., Husgafvel-Pursiainen K. Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis* 2005 ; 26 : 1846-55.
- [7] Boffetta P. Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. *Mutat Res* 2006 ; 608 : 157-62.
- [8] Carnelley T., Le X.-C. Correlation between chemical characteristics and biological reactivity of particulate matter in ambient air. Edmonton, Alberta, Canada 2001.
- [9] Sarasin A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 2003 ; 544 : 99-106.
- [10] Ishioka C., Frebourg T., Yan Y.-X. *et al.* Screening patients for heterozygous p53 mutations using a functional assay in yeast. *Nat Genet* 1993 ; 5 : 124-9.
- [11] Dagher Z., Garçon G., Billet S. *et al.* Role of nuclear factor-kappa B activation in the adverse effects induced by air pollution particulate matter (PM_{2.5}) in human epithelial lung cells (L132) in culture. *J Appl Toxicol* 2007 ; 27 : 284-90.
- [12] Abbas I., Saint-Georges F., Billet S. *et al.* Air pollution particulate matter (PM_{2.5})-induced gene expression of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in an *in vitro* coculture lung model. *Toxicol In Vitro* 2009 ; 23 : 37-46.
- [13] Garçon G., Dagher Z., Zerimech F. *et al.* Dunkerque City air pollution particulate matter-induced cytotoxicity, oxidative stress and inflammation in human epithelial lung cells (L132) in culture. *Toxicol In Vitro* 2006 ; 20 : 519-28.
- [14] Billet S., Garçon G., Dagher Z. *et al.* Ambient particulate matter (PM_{2.5}): Physicochemical characterization and metabolic activation of the organic fraction in human lung epithelial cells (A549). *Environ Res* 2007 ; 105 : 212-23.
- [15] 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.
- [16] Flaman J.-M., Frebourg T., Moreau V. *et al.* A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood, and tumors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1995 ; 92 : 3963-7.
- [17] Tatusova T.-A. et Madden T.-L. Blast 2 sequences – a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett* 1999 ; 174 : 247-50.
- [18] Altschul S.-F., Gish W., Miller W. *et al.* Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990 ; 215 : 403-10.
- [19] Petitjean A., Mathe E., Kato S. *et al.* Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 2007 ; 28 : 622-629.
- [20] Toyokuni S., Tanaka T., Hatturi Y. *et al.* Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. *Lab Invest* 1997 ; 76 : 365-74.
- [21] Billet S., Paget V., Garçon G. *et al.* Benzene-induced mutational pattern in the tumour suppressor gene TP53 analysed by use of a functional assay, the functional analysis of separated alleles in yeast, in human lung cells. *Arch Toxicol* 2009.
- [22] Paget V., Lechevrel M., Sichel F. Acetaldehyde-induced mutational pattern in the tumour suppressor gene TP53 analysed by use of a functional assay, the FASAY (Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast). *Mutat. Res* 2008 ; 652 : 12-9.
- [23] Paget V., Sichel F., Garon D., Lechevrel M. Aflatoxin B(1)-induced TP53 mutational pattern in normal human cells using the FASAY (Functional Analysis of Separated Alleles in Yeast). *Mutat Res* 2008.
- [24] Brunekreef B., Holgate S.-T. Air pollution and health. *Lancet* 2002 ; 360 : 1233-42.
- [25] Ostro B. The association of air pollution and mortality: examining the case for inference. *Arch Environ Health* 1993 ; 48 : 336-42.

- [26] Schwartz J., Dockery D.-W., Neas L.-M. Is daily mortality associated specifically with fine particles? *J Air Waste Manag Assoc* 1996 ; 46 : 927-39.
- [27] Prado F., Cortes-Ledesma F., Huertas P., Aguilera A. Mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 2003 ; 42 : 185-98.
- [28] Claxton L.-D., Matthews P.-P., Warren S.-H., The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: Salmonella mutagenicity. *Mutat Res* 2004 ; 567 : 347-99.
- [29] Claxton L.-D., Woodall G.-M. Jr. A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. *Mutat Res* 2007 ; 636 : 36-94.
- [30] Pfeifer G.-P., Denissenko M.-F., Olivier M. *et al.* Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 2002 ; 21 : 7435-51.
- [31] Soussi T. P53 alterations in human cancer: more questions than answers. *Oncogene* 2007 ; 26 : 2145-56.
- [32] Chompret A. The Li-Fraumeni syndrome. *Biochimie* 2002 ; 84 : 75-82.
- [33] Kim H.-J., Kim T.-H., Lee S.-Y. *et al.* DNA sequence analysis of 1-nitropyrene-4,5-oxide and 1-nitropyrene-9,10-oxide induced mutations in the hprt gene of Chinese hamster ovary cells. *Mol Cells* 2005 ; 19 : 114-23.
- [34] Sato H., Sone H., Sagai M. *et al.* Increase in mutation frequency in lung of Big Blue rat by exposure to diesel exhaust. *Carcinogenesis* 2000 ; 21 : 653-61.
- [35] Billet S., Paget V., Garçon G. *et al.* Benzene-induced mutational pattern in the tumour suppressor gene *TP53* analysed by use of a functional assay, the functional analysis of separated alleles in yeast, in human lung cells. *Arch Toxicol* 2009.
- [36] Billet S., Abbas I., Le Goff J. *et al.* Genotoxic potential of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-coated onto airborne Particulate Matter (PM_{2.5}) in human lung epithelial A549 cells. *Cancer Lett* 2008 ; 270 : 144-155.

