

Cinétiques de formation et de réparation des adduits de l'ADN du benzo[a]pyrène

Caroline MARIE, PhD

Stagiaire postdoctorale de la chaire d'analyse et de gestion des risques toxicologiques
Université de Montréal



Laboratoires



Environnement et prédiction de la santé des populations

Laboratoire TIMC-UMR 5525

Université Joseph Fourier-Grenoble

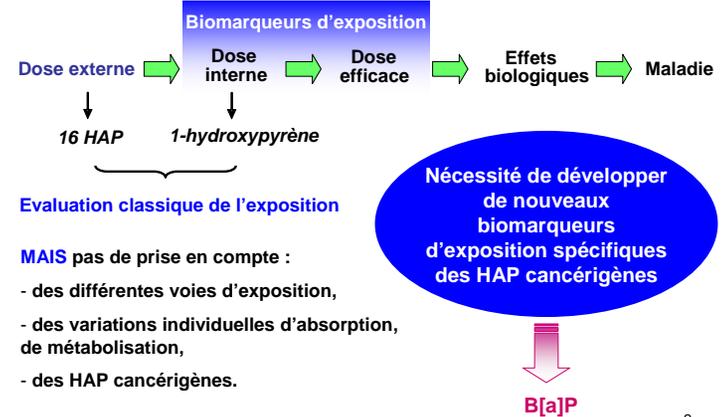
Laboratoire des Lésions des Acides Nucléiques

CEA/Grenoble/DRFMC-SCIB UMR-E3
CEA-UJF

Thèse cofinancée par l'ADEME et le CEA

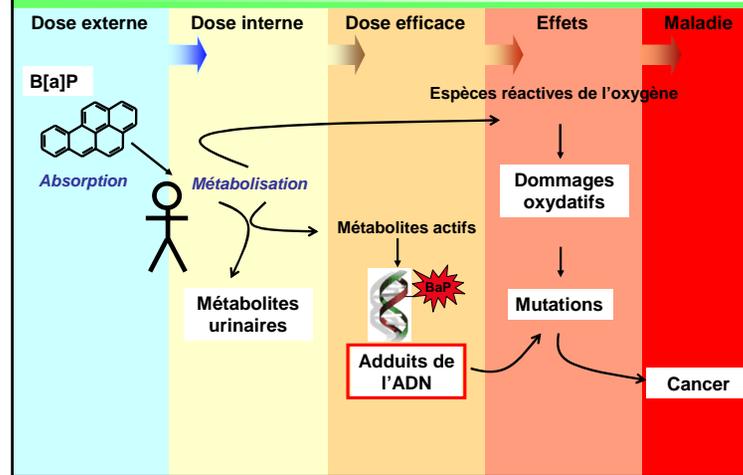


Surveillance biologique de l'exposition aux HAP



2

Mécanisme d'action toxique du B[a]P



Objectifs

Biomarqueur d'exposition :

- détectable
- formation dose-dépendante
- persistant.

Déterminer les adduits majoritaires du B[a]P, et étudier leurs cinétiques de formation et de réparation.

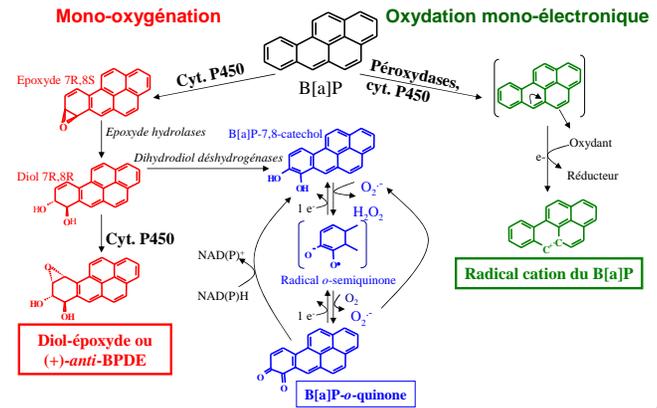
- 1 – Identifier les adduits potentiels.
- 2 – Mettre au point une méthode de dosage spécifique de ces adduits.
- 3 – Etudes cellulaires dans des modèles appropriés.

4

1 - Identification des adduits potentiels

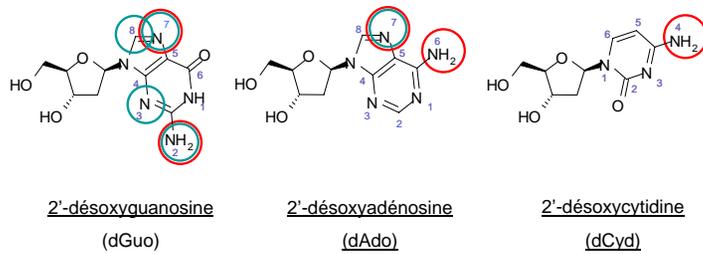
5

1 - Voies métaboliques de bioactivation du B[a]P



6

1 - Sites nucléophiles de l'ADN



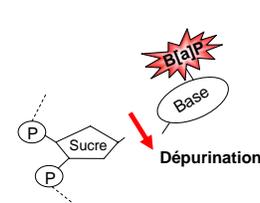
○ BPDE

○ Radical cation

7

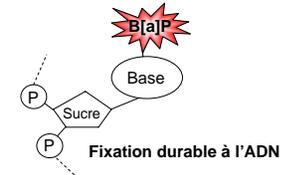
1 - Deux types d'adduits

ADDUITS DEPURINANTS



- Exposition à court terme.
- Dans l'urine.
- Dans l'ADN?

ADDUITS STABLES



- Exposition à long terme.
- Pris en charge par les mécanismes de réparation de l'ADN.
- Dans l'urine?

8

1 – Adduits potentiels

Adduits stables et dépurinants du BPDE et du radical cation du B[a]P

9

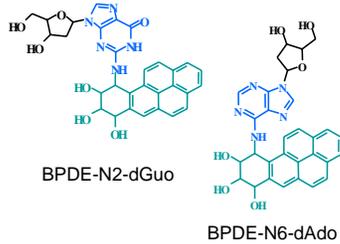
2 - Mise au point d'une méthode de dosage spécifique

10

2 - Synthèse des adduits

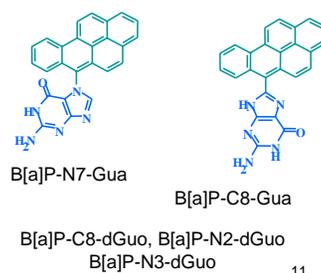
Adduits du BPDE

- Action de (±)-*anti*-BPDE sur de l'ADN isolé.
- Obtention de **deux adduits stables**.



Adduits du radical cation

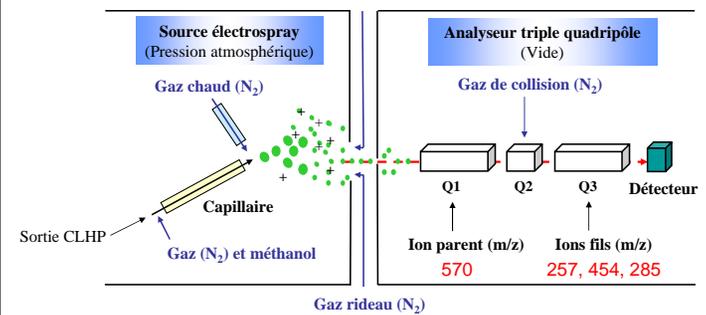
- Synthèse électrochimique sur la dGuo.
- Obtention de **trois adduits stables** et **deux adduits dépurinants** :



11

2 - La CLHP-SM/SM

La chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse en mode tandem

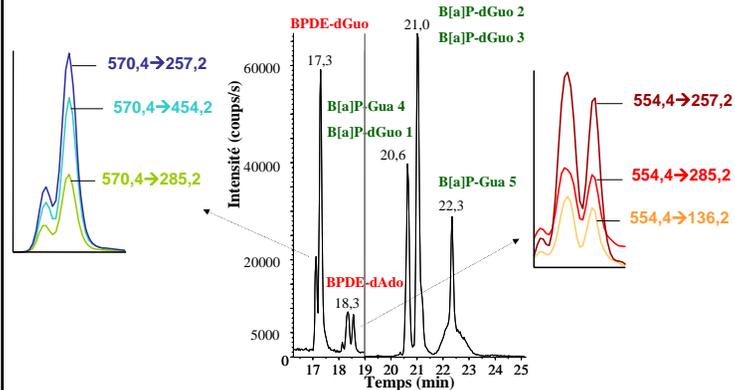


Détection spécifique et sensible (~ 1 adduit/10⁸ nucléosides normaux pour 100 µg d'ADN)

12

2 - Dosage spécifique et sensible

Optimisation des conditions chromatographiques pour détecter les sept adduits en une injection :



Chromatogramme obtenu pour l'injection de 500 fmoles de chaque adduit

13

3 - Etudes cellulaires

14

3 - Choix des modèles cellulaires

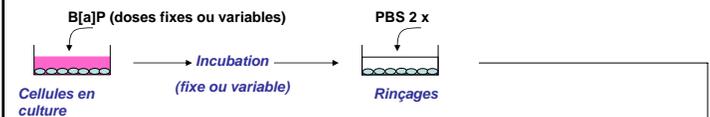
➤ HaCat : lignée de kératinocytes humains.

➤ HepG2 : lignée d'hépatocytes humains.

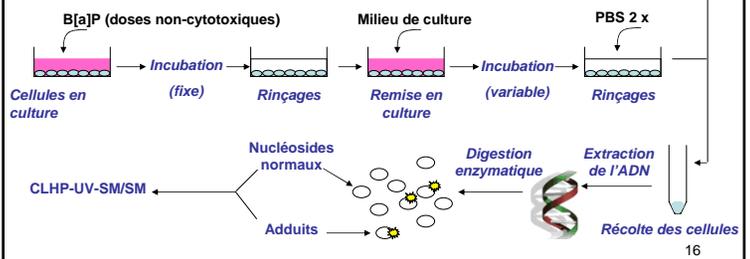
15

3 - Protocole

Cinétique de formation des adduits et étude de la relation dose-réponse :

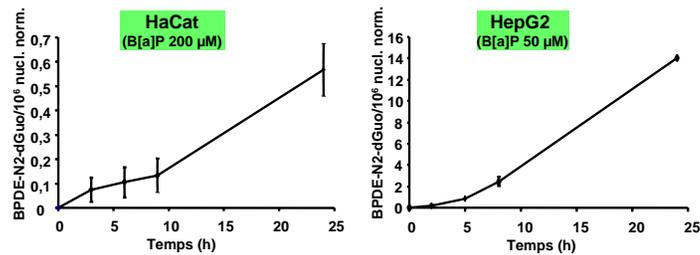


Cinétique de réparation des adduits :



16

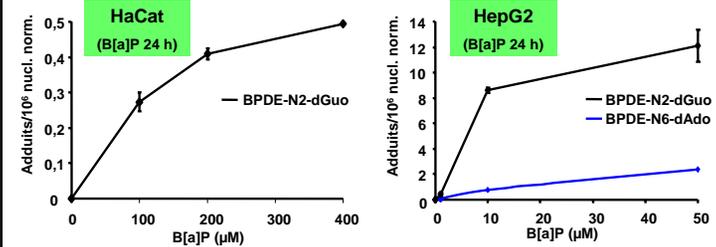
3 - Cinétique de formation des adduits en présence de B[a]P



- Cinétique de formation lente : liée à la métabolisation du B[a]P.
- Cinétique exponentielle : induction des cyt. P450 par le B[a]P (*Misaki et al. 2007*)
- Adduit BPDE-N2-dGuo majoritaire.
- Différence de niveaux d'adduits formés entre les deux lignées.

17

3 - Relation dose-réponse en présence de B[a]P



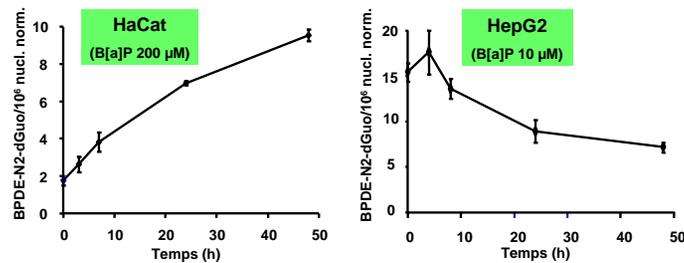
- Adduits du BPDE majoritaires (adduits radical cation < 5 adduits/10⁸ nucl. norm.)
- La formation de BPDE-N2-dGuo est deux ordres de grandeur plus importante dans les cellules HepG2 que dans les cellules HaCat.

→ différence de métabolisation du B[a]P dans les deux types cellulaires?

- Activité enzymatique des cyt. P450 1A1 et 1A2 (*Ledirac et al. 1997*).
- Niveaux d'expression du récepteur AhR (*Swanson 2004*).

18

3 - Réparation des adduits en présence de B[a]P



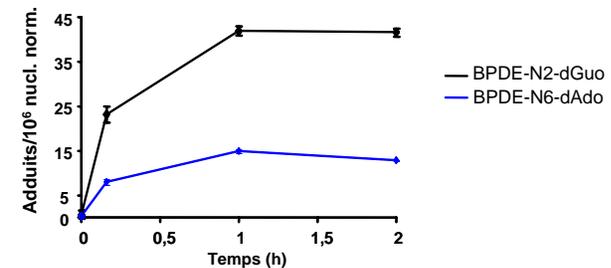
Cinétique d'élimination différente liée à la différence de métabolisation du B[a]P dans les deux types cellulaires.

→ Hypothèse : tout le B[a]P pénètre dans les cellules lors du traitement et est ensuite métabolisé progressivement (*Binkova et al. 2004*).

19

3 - Etude des adduits du BPDE

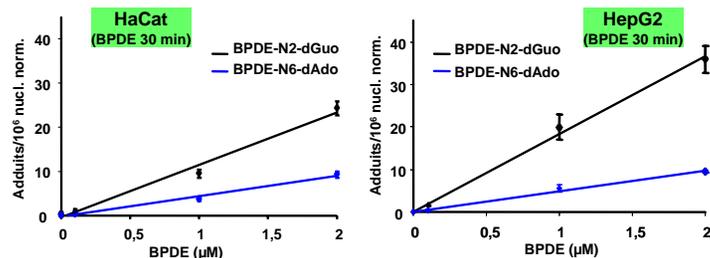
- Cinétique de formation des adduits du BPDE dans les cellules HepG2 en présence de (±)-anti-BPDE :



Cinétique de formation rapide : maximum atteint moins d'une heure après le traitement.

20

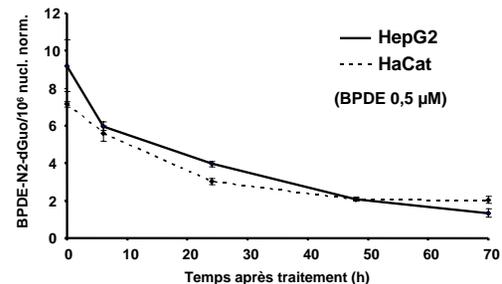
3 - Formation des adduits en présence de BPDE



- Formation linéaire dose-dépendante.
- Adduit BPDE-N2-dGuo majoritaire.
- Formation similaire dans les deux lignées.

21

3 - Réparation des adduits du BPDE



- Réparation similaire dans les deux lignées : à 48 h ~ 25% des adduits persistent.
- Cinétique monophasique : mono exponentielle ($R^2 = 0,997$).

→ Confirmation de la différence de métabolisation du B[a]P dans les deux types cellulaires.

22

Conclusions

Dans les cellules étudiées :

- L'adduit majoritaire est l'adduit **BPDE-N2-dGuo** :
 - sa formation est dose-dépendante
 - sa cinétique de réparation est lente
 - biomarqueur potentiel de l'exposition au BaP.
- **Aucun adduit de la voie du radical cation** n'est détecté dans l'ADN des cellules (< 5 adduits/10⁸ nucléosides normaux, < 0,5% des adduits du BPDE)
 - adduits dépurinants?
- **Différence de métabolisation** importante mise en évidence entre les types cellulaires :
 - cinétiques de formation variables
 - qu'en est-il des cellules prélevées chez l'homme?
 - à l'échelle de l'organisme?

23

Perspectives

- Rechercher l'adduit BPDE-dGuo chez des sujets exposés aux HAP.
- Poursuivre les études cellulaires.
- Etudier les cinétiques de formation et de réparation à l'échelle de l'organisme entier (modèle animal).

24