



HAL
open science

7-alkylguanines et leurs dérivés fluorescents comme biomarqueurs d'exposition aux agents alkylants

Marie-José Durand-Thouand

► **To cite this version:**

Marie-José Durand-Thouand. 7-alkylguanines et leurs dérivés fluorescents comme biomarqueurs d'exposition aux agents alkylants. Cancer. Université Paul Verlaine - Metz, 1993. Français. NNT : 1993METZ008S . tel-01775436

HAL Id: tel-01775436

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775436v1>

Submitted on 24 Apr 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 18 juin 1993

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

option toxicologie de l'environnement

par

Marie-José DURAND

**7-ALKYLGUANINES ET LEURS DERIVES FLUORESCENTS
COMME BIOMARQUEURS D'EXPOSITION
AUX AGENTS ALKYLANTS**

MEMBRES DU JURY

P. VASSEUR, Professeur (Université de Metz)

H. BARTSCH, Docteur (CIRC - Lyon)

D. SHUKER, Docteur (CIRC - Lyon)

A. NIVELEAU, Directeur de recherche INSERM (Lyon)

J. LA

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



022 420441 1

VB 78536

THESE

Présentée et soutenue publiquement

le 18 juin 1993

Pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

option toxicologie de l'environnement

par

Marie-José DURAND

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19930235
Cote	S/M3 93/8
Loc	Magasin

7-ALKYLGUANINES ET LEURS DERIVES FLUORESCENTS COMME BIOMARQUEURS D'EXPOSITION AUX AGENTS ALKYLANTS

MEMBRES DU JURY

- P. VASSEUR, Professeur (Université de Metz)
- H. BARTSCH, Docteur (CIRC - Lyon)
- D. SHUKER, Docteur (CIRC - Lyon)
- A. NIVELEAU, Directeur de recherche INSERM (Lyon)
- J. LAVAL, Directeur de recherche CNRS (Villejuif)

AVANT-PROPOS

Ce travail a été effectué au Centre International de la Recherche sur le Cancer, dans l'unité des Cancérogènes de l'Environnement dirigée par le Dr Helmut Bartsch. Je le remercie de m'avoir accueillie dans son équipe et d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie sincèrement Paule Vasseur (Pr) de m'avoir introduite au CIRC et d'avoir accepté la présidence du jury.

Je voudrais exprimer ma sincère reconnaissance à David Shuker (Dr) qui a supervisé ces travaux et qui m'a fait bénéficier de sa grande expérience notamment dans le domaine de l'immunochimie.

Je remercie Jacques Laval (Dr) et Alain Niveleau (Dr) d'avoir accordé de leur temps pour être rapporteur et d'avoir accepté de juger cette thèse.

Cette thèse ne serait pas tout à fait ce qu'elle est sans les conseils, les critiques de Christian Malaveille (Dr), je le remercie très sincèrement de m'avoir accordé du temps lors de la rédaction de ce mémoire.

Enfin je voudrais remercier tout ceux qui m'ont apporté leur aide :

- Liliane Garren qui m'a initié à la chromatographie liquide haute performance, pour son aide précieuse lors de la recherche de fuite, et autres problèmes techniques.

- Agnès Hautefeuille pour son aide importante lors de la nitrosation des sucs gastriques et du SOS chromotest

- Alain Schouft pour les analyses CPG-SM des 3-alkyladénines

- Gisèle Brun pour m'avoir gentiment expliqué le fonctionnement des pompes Spectra Physic .

- Brigitte Pignatelli (Dr) pour ses conseils et ses encouragements.

- Sylvie Calmels (Dr) pour la lecture critique de ce document et son amical soutien.

- Daniel Graizeli et Michel Javin pour la reproduction de ce document.

- Jean-Claude Block (Pr) du laboratoire Santé Environnement (Nancy) pour m'avoir permis d'utiliser le matériel informatique de son laboratoire.

- A ma mère.

- A Gérard, pour son aide ,sa patience, sa compréhension

Ce travail a bénéficié du soutien financier du Ministère de la Recherche et de la Technologie (Janvier 1990-Juin 1992) et du Centre International de la Recherche sur le Cancer (Juillet 1992-Mai 1993).

ABREVIATIONS

- 3-EtAd : 3-éthyladénine
- 3-HEtAd : 3-hydroxyéthyladénine
- 3-MeAd : 3-méthyladénine
- 7-alkylGua : 7-alkylguanine
- 7-CEtGua : 7-carboxyéthylguanine
- 7-CMeGua : 7-carboxyméthylguanine
- 7-DHPGua : 7-(2,3-dihydroxypropyl)guanine
- 7-EtGua : : 7-éthylguanine
- 7-HEtGua : 7-hydroxyéthylguanine
- 7-MeGua : 7-méthylguanine
- AP : Site apurique ou apyrimidique
- BSA : sérum-albumine bovine
- CLHP : Chromatographie liquide à haute performance.
- CNO : Composés-N-nitrosés.
- CPG-SM: Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.
- DES : Diéthylsulfate
- DMCS : Diméthylchlorosilane
- DMSO : Diméthylsulfoxyde
- ELISA : Dosage enzymoimmunologique en phase solide (enzyme-linked immunosorbent assay)
- ENU : Ethylnitrosourée
- HFBA : Acide heptafluorobutyrique
- Ig G: Immunoglobuline G
- mBSA : sérum-albumine bovine méthylée
- MMS : Méthylmethanesulfonate
- MNU : Méthylnitrosourée
- Nor-G-OH : 7(2-[(2-hydroxyéthyl)amino]éthyl)guanine
- Q⁶-MedG : 7-méthyldésoxyguanosine

O⁶-MeGua : O⁶-Méthylguanine

Oval : Ovalbumine

PBS : solution saline tamponnée par le phosphate (phosphate buffered saline)

PhMal : Phénylmalondialdéhyde

PhMal-7-alkylGua : 7-alkylguanines dérivées par la phénylmalondialdéhyde

Pro : Protéine

RIA : Dosage radioimmunologique (radioimmunoassay)

RMN : Résonance magnétique nucléaire.

S_N1 : substitution nucléophile d'ordre 1

S_N2 : substitution nucléophile d'ordre 2

THF : Tétrahydrofurane

TRIS : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane

USERIA : Dosage enzymoimmunologique en phase solide ultrasensible (ultra sensitive enzymatic radioimmunoassay)

SOMMAIRE

CHAPITRE 1 : BIBLIOGRAPHIE

1) Importance du cancer dans les causes de décès	2
2) Le cancer de l'estomac.	3
2.1) Incidence et répartition géographique	3
2.2) Etiologie du cancer de l'estomac	4
2.2.1) Caractéristiques histopathologiques du cancer de l'estomac	4
• Cancer de type diffus	4
• Cancer de type intestinal	5
2.2.2) Facteurs intervenants dans les différentes étapes du cancer de l'estomac de type intestinale	5
• Rôle du régime alimentaire	5
• Rôle des bactéries : hypothèse de la formation des composés N-nitrosés (CNO)	7
• Rôle des micro nutriments	7
• Maladies prédisposantes	8
3.) Caractéristiques de la cancérogenèse chimique	8
3.1) Caractères électrophiles des cancérogènes chimiques	8
3.2) Principales étapes de la cancérogenèse chimique	9
3.2.1) L'initiation	9
3.2.2) La promotion	9
3.2.3) La progression	11
4) Formation des adduits et leurs conséquences biologiques	12
4.1) Réactivité et cible moléculaire des cancérogènes chimiques	12
4.1.1) Formation des adduits	12
4.1.2) Mécanisme de formation des adduits à l'ADN par les agents alkylants	13
4.1.3) Importance des différentes lésions à l'ADN	16
4.4) Réparation de l'ADN	16
4.4.1) Réparation par transfert du groupe alkyl.	17
4.4.2) Réparation par excision de bases	17
4.4.3) Réparation des résidus Fapy	17
4.5) Conséquences biologiques de la formation des adduits	18
4.6) Les sites apuriques	20

4.6.1) Formation et structure des sites apuriques	20
4.6.2) Réparation et pouvoir mutagène des sites AP	22
a) Réparation des sites AP	22
b) Mutagénicité des sites AP	24
4.6.3) Mise en évidence des sites AP	25
a) Détection des sites AP par la méthoxyamine	25
b) Détection des sites AP par la 9-aminoellipticine (9-AE)	26
c) Détection des sites AP par post-marquage ³² P	26
d) Détection des sites AP par ELISA	27
e) Détection des sites AP par enzymo-immunologie après réaction avec une hydrazine biotinylée	27
5) Evaluation du taux d'adduction de l'ADN	28
5.1) Méthodes immunochimiques	28
5.1.1) Obtention des anticorps	28
5.1.2) Applications	29
a) Détection et quantification des adduits	29
b) Purification des adduits	29
5.2) Le postmarquage au ³² P	30
5.3) Postmarquage fluorescent	30
5.3.1) Détection des adduits à l'ADN (<i>in situ</i>) suite à une exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques	30
5.3.2) Détection des nucléosides-5'-monophosphates par marquage à l'aide du Dansyl-chloride	31
5.3.3) Modification des alkylguanines par les malondialdéhydes substituées	31
5.4) Méthodes chromatographiques	32
6) Intérêt du dosage des adduits	32
6.1) Notion de doses biologiques effectives	32
6.2) Notion d'épidémiologie moléculaire	33
6.3) Applications : mesure d'expositions	33
6.3.1) Contamination alimentaire par des cancérogènes	34
6.3.2) Contamination alimentaire par des précurseurs cancérogènes	36

CHAPITRE 2 : OBJECTIFS

1)	Bases scientifiques du projet	38
2)	Approche expérimentale	39

CHAPITRE 3 :

ANALYSE DES 7-ALKYLGUANINES PAR SPECTROFLUORIMETRIE APRES PURIFICATION IMMUNOCHIMIQUE

1)	Chromatographie d'immunoaffinité	42
1.1)	Introduction	42
1.2)	Matériel et méthodes	42
1.2.1)	Synthèse des antigènes d'immunisation et d'enrobage	42
1.2.2)	Immunisation des lapins	43
1.2.3)	Réactivités croisées de l'antisérum	44
1.2.4)	Préparation de la fraction IgG de l'antisérum	45
1.2.5)	Préparation des colonnes d'immunoaffinité	45
1.2.6)	Synthèse de la [¹⁴ C] 7-éthylguanine	46
1.2.7)	Utilisation des colonnes d'immunoaffinité	47
1.2.8)	Conditions de séparation CLHP des différentes bases	47
1.3)	Protocole expérimental	47
1.4)	Résultats	48
1.4.1)	Synthèse des antigènes d'immunisation et d'enrobage	48
1.4.2)	Caractéristiques de l'antisérum	49
1.4.3)	Fonctionnement et détermination de la capacité des colonnes d'immunoaffinité	51
2)	Applications : intérêt de l'utilisation des colonnes d'immunoaffinité	54
2.1)	Ethylation de l'ADN de thymus de veau par le diéthylsulfate (DES) et l'éthylnitrosourée (ENU)	54
2.1.1)	Matériel et méthodes	54
2.1.2)	Résultats	55
2.2)	Analyse de l'ADN de thymus de veau incubé avec des sucs gastriques	57
2.2.1)	Matériel et méthode	57
a)	Nitrosation	57

b) Incubation avec l'ADN de thymus de veau.	57
c) SOS Chromotest	57
d) Condition de séparation CLHP des purines	58
e) Analyse CPG-SM des 3-alkyladénines	58
2.2.2) Protocole expérimental	61
a) Incubation de l'ADN dans un suc gastrique acide contenant un agent alkylant	61
b) Recherche des agents alkylants dans les sucs gastriques de Colombiens	61
2.2.3) Résultats	62
a) Incubation de l'ADN dans un suc gastrique acide supplémenté en agent alkylant	62
b) Recherche des agents alkylants dans les sucs gastriques de Colombiens	63
3) Discussion	67

CHAPITRE 4 :

DERIVATION DES 7-ALKYLGUANINES PAR LA PHENYLMALONDIALDEHYDE

1) Introduction	70
2) Synthèse et caractérisation chimique des dérivés fluorescents des 7-alkylguanines	70
2.1) Matériel et méthodes	70
2.1.1) 7-alkylguanines	70
2.1.2) Synthèse de la phénylmalondialdéhyde	71
2.1.3) Synthèse des dérivés fluorescents 7-alkylguanine : méthode générale	71
2.1.4) Dérivation de faible quantité de 7-alkylguanines (2 à 50 pmoles)	72
2.1.5) Caractéristiques chimiques des PhMal-7-alkylguanine et conditions d'analyse en CLHP	72
2.2) Protocole	73

3) Résultats	73
3.1) Synthèse des dérivés fluorescents des 7-alkylguanines	73
3.2) Confirmation de la structure chimique et de la pureté des produits synthétisés	74
3.2.1) Spectre de masse	74
3.2.2) Spectre ultraviolet (UV) et spectres de fluorescence	75
3.2.3) Spectre de résonance magnétique nucléaire (RMN) de l'hydrogène	77
3.3) Profil d'éluion des PhMal-7-alkylguanines	78
3.4) Dérivation de faible quantité de 7-alkylguanines : courbes de standardisation	79
4) Purification des dérivés fluorescents sur colonnes d'immunoaffinité	80
4.1) Matériel et méthode	80
4.1.1) Synthèse des antigènes d'immunisation et d'enrobage	80
4.1.2) Immunisation des lapins	81
4.1.3) Réactivité croisée de l'antisérum	81
4.1.4) Préparation de la fraction IgG de l'antisérum et des colonnes d'immunoaffinité	81
4.1.5) Synthèse du standard interne : PhMal-[¹⁴ C]-7-CEtGua	81
a) Synthèse de la [¹⁴ C]-7-CEtGuanine à partir de la [U ¹⁴ C] Guanosine	81
b) Synthèse de la PhMal [¹⁴ C]-7-CEtGuanine	82
4.1.6) Fonctionnement des colonnes d'immunoaffinité	82
4.2) Résultats	82
4.2.1) Synthèse des antigènes d'immunisation et d'enrobage	82
4.2.2) Caractéristiques de l'antisérum	83
4.2.3) Fonctionnement et détermination de la capacité des colonnes d'immunoaffinité	84
a) Vérification de la pureté du standard radioactif PhMal[¹⁴ C] 7-CE-Gua	84
b) Fonctionnement des colonnes d'immunoaffinité	86
4.2.4) Spécificité de l'antisérum du second lapin	87
5) Discussion	88

CHAPITRE 5:
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1) Synthèse des résultats	92
2) Perspectives	92
2.1) Dérivation des 7-alkylguanines par la phénylmalondialdéhyde	92
2.2) Applications	93
2.3) Quantification du nombre de sites apuriques (AP)	94
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	95
ANNEXES	106

Chapitre 1
BIBLIOGRAPHIE

1) Importance du cancer dans les causes de décès

L'Organisation Mondiale de la Santé estime qu'environ un décès sur cinq dans les pays occidentaux peut être attribué à un cancer (IARC 1990). Au niveau mondial le cancer est la troisième cause de décès loin derrière les maladies infectieuses et les maladies de l'appareil circulatoire (Tableau 1).

Tableau 1: Distribution mondiale des causes annuelles de décès (autour des années 1980)
(IARC 1990)

Régions	Décès (toutes causes) x1000	Infections et maladies parasitaires (%)	Maladies du système circulatoire (%)	Neo-plasme (%)	Conditions périnatales (%)	Accident et empoisonnement (%)	Causes inconnues (%)
Dans le monde	50911	33,1	26,2	8,4	6,4	5,3	20,7
Afrique	8562	48,7	12,3	3,1	8,7	3,8	23,4
Amérique latine	3197	31	24,7	9	8,3	8,3	20,7
Amérique du Nord	2081	3,6	54,5	21,5	1,2	8,4	10,8
Est de l'Asie	8842	23	33,7	10,6	4,3	7,2	21,3
Sud de l'Asie	20315	43,8	15,6	4,3	8,4	4,3	23,6
Europe*	7713	8,6	53,8	18,1	1,8	5,8	12,0
Océanie	201	17,7	42,2	16	3,2	6,7	14,1
Pays développés	10652	7,6	53,6	19,2	1,6	6,4	11,7
Pays en voie de développement	40259	39,9	19	5,5	7,7	4,9	23,1

* Y compris l'URSS

Dans les pays développés les décès par cancer sont plus importants (19,2%) que dans les pays en voie de développement (5,5%). Cette différence étant due au fait que pour les populations des pays développés les maladies infectieuses sont en recul et espérance de vie est supérieure à celle des populations des pays en voie de développement. En effet une relation entre l'âge d'un individu et la probabilité de développer un cancer a été observé par Doll (1968). L'analyse de Cairns (1978) sur la relation âge/incidence du cancer démontre que les facteurs exogènes doivent jouer un rôle important dans la cancérogenèse. Selon Doll et Peto (1981) 60 à 80% des cancers seraient dus à des facteurs exogènes (facteurs environnementaux et socio-économiques). De ce fait, la grande majorité des cancers serait potentiellement évitable en mettant en place des mesures de prévention.

En réalité les seuls facteurs chimiques environnementaux ne permettent pas d'expliquer le processus du cancer. La cancérogenèse est un phénomène multifactoriel à plusieurs étapes, le développement d'une tumeur résulte d'interactions complexes entre plusieurs facteurs tant environnementaux (exogènes) qu'endogènes (génétiques, hormonaux) (Peto, 1977).

L'importance des facteurs environnementaux a été montrée par des études épidémiologiques. Ainsi on a pu mettre en évidence une relation entre facteurs étiologiques (fumée de cigarette, alcool, alimentation, virus, produits chimiques) et le développement de certains cancers. Par exemple l'usage abusif du tabac serait à lui seul responsable de 30% des cancers dans les pays développés (Cairns, 1989). De même la contamination de l'alimentation par les aflatoxines et l'infection chronique par le virus de l'hépatite B sont impliquées dans la cancérisation du foie en Afrique et en Asie (article de synthèse, Weinstein, 1988). L'exposition professionnelle à des substances comme le chlorure de vinyle, le benzène, l'aniline, est associée à la survenue de cancer. Les données d'études épidémiologiques, d'essais de cancérogenèse chimique (chez les rongeurs), d'épreuves de génotoxicité *in vivo* et *in vitro* ont permis d'identifier comme cancérogène pour l'homme une cinquantaine de produits chimiques (Bartsch & Tomatis, 1983; Vainio *et al*, 1985).

2) Le cancer de l'estomac.

Bien que l'incidence du cancer de l'estomac ait diminué progressivement en occident, ce cancer est numériquement très important dans les pays en voie de développement. Aussi est-il justifié d'en connaître les principaux facteurs de risque dans le but de proposer des mesures de prévention.

2.1) Incidence et répartition géographique

Le cancer de l'estomac est le plus fréquent des cancers digestifs. Dans les pays développés il est au quatrième rang des cancers enregistrés alors qu'il est au deuxième rang pour les pays en voie de développement (10,5% de tous les cancers enregistrés ; IARC 1990 ; Figure 1).

La répartition géographique de ce cancer montre qu'il est particulièrement élevé dans certaines régions : le Japon, une partie de l'Amérique Latine (Colombie en particulier), la Chine, l'Est de l'Europe. Cette distribution ne s'explique pas par des différences d'ordre ethnique. En effet, il a été montré que pour les japonais ayant immigrés aux États-Unis, le risque du cancer de l'estomac reste encore élevé, alors que les générations suivantes nées aux États-Unis présentent un risque nettement plus bas (5 fois moins). Des études indiquent que certains facteurs de cancérisation de l'estomac exercent leur effet dès les deux premières décades de la vie. De plus, ces facteurs seraient de nature environnemental (article de synthèse, Mirvish, 1983).

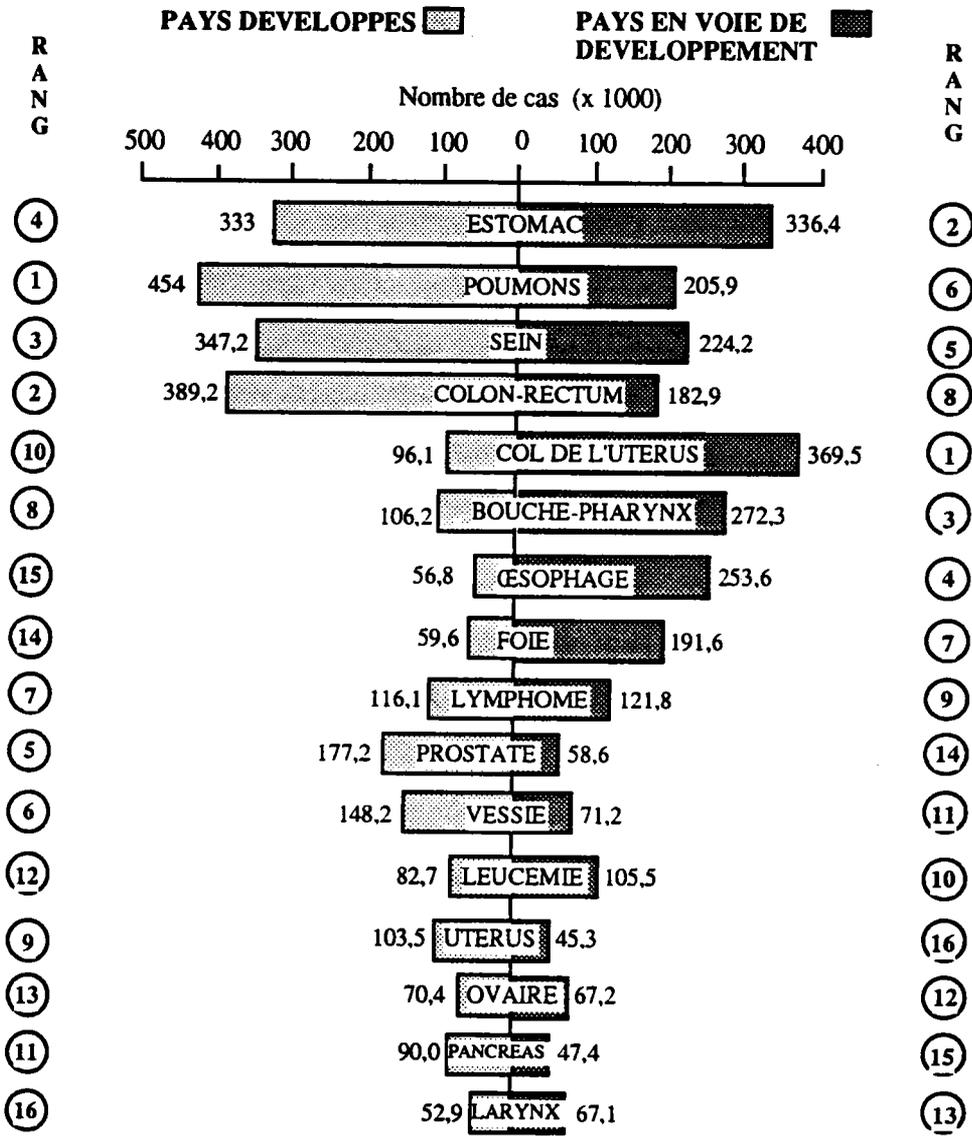


Figure 1: Cancer affectant 16 parties anatomiques par ordre d'importance dans les pays développés et en voie de développement (IARC 1990).

2.2) Etiologie du cancer de l'estomac

2.2.1) Caractéristiques histopathologiques du cancer de l'estomac

Le cancer de l'estomac est classé en deux principaux types histologiques : diffus et intestinal. Ces deux types de cancer sont dus à des facteurs de risque différents.

- Cancer de type diffus

Les fréquences de ce type de cancer de l'estomac sont similaires dans toutes les régions du monde. De plus, il affecte essentiellement des individus jeunes. Les tumeurs sont mal définies et s'étendent rapidement à la muqueuse. Il semble plutôt gouverné par des facteurs génétiques que par des facteurs environnementaux.

- Cancer de type intestinal

La fréquence de ce type de cancer dépend des époques et des lieux géographiques. Cette catégorie semble surtout liée à des facteurs environnementaux (Muñoz et Asvall, 1971). Ces tumeurs sont bien définies histologiquement. Elles sont précédées par diverses lésions pathologiques. Ainsi, la gastrite et la métaplasie intestinale constituent des lésions précancéreuses.

Ces observations ont conduit Correa (1975, 1988) à proposer un modèle de cancérisation de l'estomac (de type intestinal) en se fondant sur des données épidémiologiques et anatomopathologiques. Les différentes étapes du processus cancéreux sont schématisées sur la figure 2.

La première étape est constituée par une perte de l'acidité de l'estomac et le développement d'une atrophie. Cette achlorhydrie favorise le développement d'une population bactérienne. Les catabolites bactériens seraient partiellement responsables d'une gastrite atrophique pouvant évoluer vers la métaplasie intestinale, puis vers une dysplasie épithéliale et finalement cancéreuse.

2.2.2) Facteurs intervenants dans les différentes étapes du cancer de l'estomac de type intestinale

- Rôle du régime alimentaire.

La consommation d'aliments très salés est liée à un risque accru de cancer de l'estomac chez les japonais et les colombiens (Correa, 1983). La forte quantité de sel pourrait endommager la muqueuse stomacale entraînant une atrophie de la muqueuse (Figure 2).

La malnutrition endémique dans certaines régions du globe est corrélée avec une forte incidence d'atrophie gastrique. L'expérimentation animale montre qu'une achlorhydrie gastrique peut être obtenue chez les jeunes animaux mal nourris (Mirvish, 1983). Cette achlorhydrie permettrait l'installation d'une population bactérienne.

Des précurseurs de cancérogènes peuvent être présents dans l'alimentation. Ainsi, après nitrosation *in vitro*, des composés nitrosés potentiellement cancérogènes ont été mis en évidence dans des sauces de poisson provenant de Chine (Mirvish, 1983).

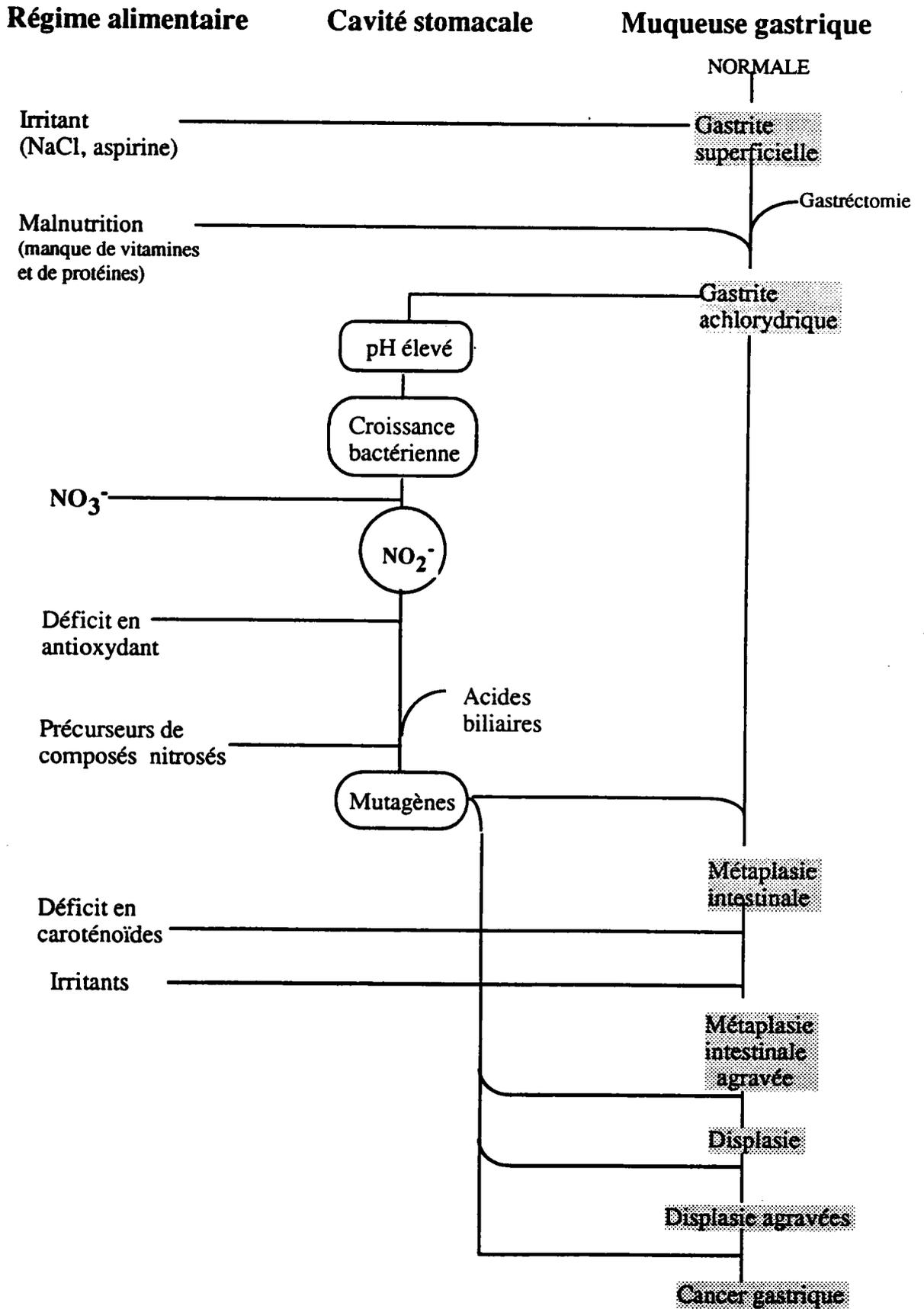


Figure 2 : Modèle de cancérisation de l'estomac avec les principaux facteurs étiologiques (Corréa, 1988)

- Rôle des bactéries : hypothèse de la formation des composés N-nitrosés (CNO) .

Dans l'estomac, les bactéries réduisent les nitrates en nitrites, favorisant ainsi la nitrosation de précurseurs alimentaires (amine, amine aromatique, urée).

La réaction chimique de nitrosation est dépendante du pH; le pH optimum de nitrosation de chaque amine dépend de sa basicité, pour les urées la nitrosation s'effectue à pH très acide (≤ 1). Or dans le cas de gastrite chronique le pH de l'estomac varie entre 3 et 6. Les cellules pariétales qui sécrètent l'acide chlorhydrique sont remplacées par des cellules de type intestinales, cependant ce phénomène ne gagne pas tout la muqueuse. Aussi il a été suggéré que les régions normales adjacentes à la muqueuse atrophique pouvait permettre une nitrosation endogène. Un gradient de pH pourrait s'établir, il permettrait la colonisation bactérienne sur le coté de la muqueuse où le pH est élevé; les nitrites formés par les bactéries réagiraient avec les composés nitrosables en diffusant vers la muqueuse gastrique normale (pH acide) (article de synthèse, Kyrtopoulos, 1989). De plus, une nitrosation d'amine secondaire par catalyse enzymatique peut être effectuée par certaines espèces de bactéries (Suzuki *et al*, 1984 ; Calmels *et al*, 1985 ; 1991).

La nature chimique des composés N-nitrosés (CNO) formés dans l'estomac n'est pas connue, mis à part quelques nitrosamines volatiles dont la concentration est très faible par rapport à l'ensemble des CNO. Ces substances déterminent l'évolution vers la métaplasie intestinale et la dysplasie. Cette dédifférenciation cellulaire serait due à des mutations successives .

Des espèces bactériennes comme *Helicobacter pylori* ainsi que les acides biliaires provoquent une inflammation de la muqueuse, permettant l'établissement de métaplasies intestinales. Cette infiltration bactérienne est accompagnée d'une production locale de cytokines et probablement de formes réduites de l'oxygène pouvant oxyder des composants de la cellule (Sobala *et al*, 1991)

- Rôle des micro nutriments.

Dans les expérimentations animales, la formation intragastrique de nitrite et de nitrosamines à partir d'amines secondaires est inhibée en ajoutant de la vitamine C (sous forme ascorbate) dans la nourriture (Mirvish, 1983). De même chez l'homme la nitrosation peut être inhibée par l'acide ascorbique mais également de façon moindre par l' α -tocopherol (vitamine E) (Ohshima & Bartsch, 1981). Il a été récemment montré que les sujets atteints de gastrite chronique ont une concentration en acide ascorbique très faible dans les sucs gastriques, alors qu'elle apparaît normale dans le plasma (Sobala *et al*, 1991). Le taux de caroténoïdes et de tocophérols dans le sang est très bas chez les patients atteint de dysplasie, alors qu'il est normal dans le cas de patients atteint de métaplasies.

Des tannins inhibent également la nitrosation en réagissant avec le nitrite (Mirvish, 1983)

Chez les animaux traités à la N-méthyl N'-nitro-N nitrosoguanidine, l'absorption de caroténoïdes diminue l'incidence des cancers gastriques. Ces composés n'empêchent pas le développement des métaplasies intestinales (Correa, 1988), mais ils interviennent dans les phases plus tardives du processus du cancer gastrique. Ces micro nutriments agiraient comme protecteurs en bloquant le processus de cancérogenèse.

- Maladies prédisposantes

Chez les individus atteints d'anémie pernicieuse, on détecte une achlorhydrie gastrique: des enquêtes épidémiologiques ont mis en évidence une forte corrélation entre cancer de l'estomac et anémie pernicieuse (Caygill *et al*, 1984).

De même le risque de cancer est accru chez les malades qui suite à une gastrectomie partielle ont développé une atrophie de la muqueuse gastrique. Ce risque est augmenté 15 à 20 ans après l'opération chirurgicale (Stahlsberg et Taksdal, 1971) que celle-ci ait été effectuée pour un ulcère gastrique ou duodéal (Ross *et al*, 1982).

Le modèle de Corrêa (1988), définit plusieurs étapes pour la formation du cancer gastrique de type intestinal et précise les différents facteurs favorisant ou ralentissant le processus de cancérogenèse. Cependant, le modèle doit être nuancé du fait d'études récentes montrant l'absence de liaison entre la concentration en CNO dans des sucs gastriques de patients à jeun et les données d'anatomopathologie : les concentrations en CNO de sucs gastriques acides sont semblables à celles de sucs gastriques achlorhydriques (Sobala *et al.*, 1991 ; Pignatelli *et al.*, 1993).

De même, il n'y a aucune preuve permettant d'affirmer qu'une augmentation de la consommation en substances protectrices (vitamine C, Carotène, Vitamine E) réduirait l'incidence du cancer de l'estomac de type intestinal dans les régions à haut risque (Boeing, 1991).

3. Caractéristiques de la cancérogenèse chimique

3.1) Caractères électrophiles des cancérogènes chimiques.

En 1947 Miller et Miller ont mis en évidence que le p-diméthylaminoazo-benzène se fixait par covalence sur les protéines du foie de rat. Brookes et Lawley (1964), furent les premiers à

montrer l'association entre le pouvoir cancérigène de certains hydrocarbures sur la peau de souris et leur taux de fixation sur l'ADN. Ces réactions entraînent des modifications de l'ADN qui peuvent conduire à des mutations. Ces altérations de l'ADN déterminent à terme la transformation de la cellule normale en une cellule cancéreuse.

De nombreux composés de structure chimique très diverses sont capables de former des liaisons covalentes avec l'ADN. De fait, Miller (1970) et Miller et Miller (1977) ont montré que tous ces composés chimiques ont un caractère électrophile.

En effet, les composés cancérigènes sont ou après activation métabolique, des réactifs électrophiles (molécule avec un atome déficient en électrons). Ces molécules peuvent donc se lier de façon covalente à des sites nucléophiles (atomes riches en électrons) de macromolécules cellulaires (protéines, ADN et ARN) pour former des produits d'addition appelés adduits. L'adduction de l'ADN et sa conséquence mutagène correspond à la phase d'initiation de la cancérogenèse chimique.

3.2) Principales étapes de la cancérogenèse chimique

La période qui s'écoule entre l'administration d'un cancérigène et l'apparition d'une tumeur, peut être divisée en trois périodes distinctes : l'initiation, la promotion et la progression. Cette fragmentation dérive de modèles expérimentaux particuliers ; chaque étape peut refléter un ou plusieurs événements au niveau moléculaire (Figure 3)

3.2.1) L'initiation

Sans ou avec le concours d'enzymes (activation métabolique), les composés cancérigènes sont transformés en dérivés électrophiles qui peuvent réagir de façon covalente à l'ADN cellulaire. Les adduits formés peuvent être éliminés par divers systèmes de réparation de l'ADN (voir paragraphe 4.4). Une mutation sera produite si l'ADN est répliqué avant d'être réparé ou si la réparation est fautive (Farber, 1982). Les mutations peuvent être engendrées lorsque les adduits produisent des mésappariements de bases ou un décalage du cadre de lecture. D'autres types de mutations résultent de réarrangement de fragments d'ADN (insertions, délétions, transpositions, recombinaisons, amplifications).

Les cellules contenant des mutations au niveau de séquence d'ADN correspondant à un protooncogène ou/et à un gène suppresseur tumoral, sont dites cellules initiées.

3.2.2) La promotion

La phase de promotion correspond à la prolifération clonale des cellules initiées sous l'effet de substances appelées "promoteurs". De ce fait, la probabilité d'avoir des mutations dans cette population de cellules initiées augmente par rapport à la population de cellules normales (Harris, 1991). Cette étape de promotion conduit à la formation de lésions pré-néoplastiques.

La promotion est partiellement réversible et inhibable par des agents antioxydants.

Les promoteurs ne possèdent pas ou peu d'activité cancérigène. Par exemple le TPA (12 O-tétradécanoyl-phorbol-13 acétate) constituant de l'huile de croton est impliqué comme promoteur de la cancérogenèse de la peau chez la souris et initiée par des hydrocarbures polycycliques aromatiques (Boutwell, 1964).

3.2.3) La progression

La progression correspond au passage de la lésion pré-néoplastique (tumeur bénigne) à un néoplasme (tumeur maligne). La population néoplasique s'accroît, ces cellules ne sont plus soumises au processus de régulation ; elle n'évoluent plus vers la différenciation terminale ou la mort cellulaire. Ces cellules prolifèrent sans contrôle et envahissent les tissus environnants.

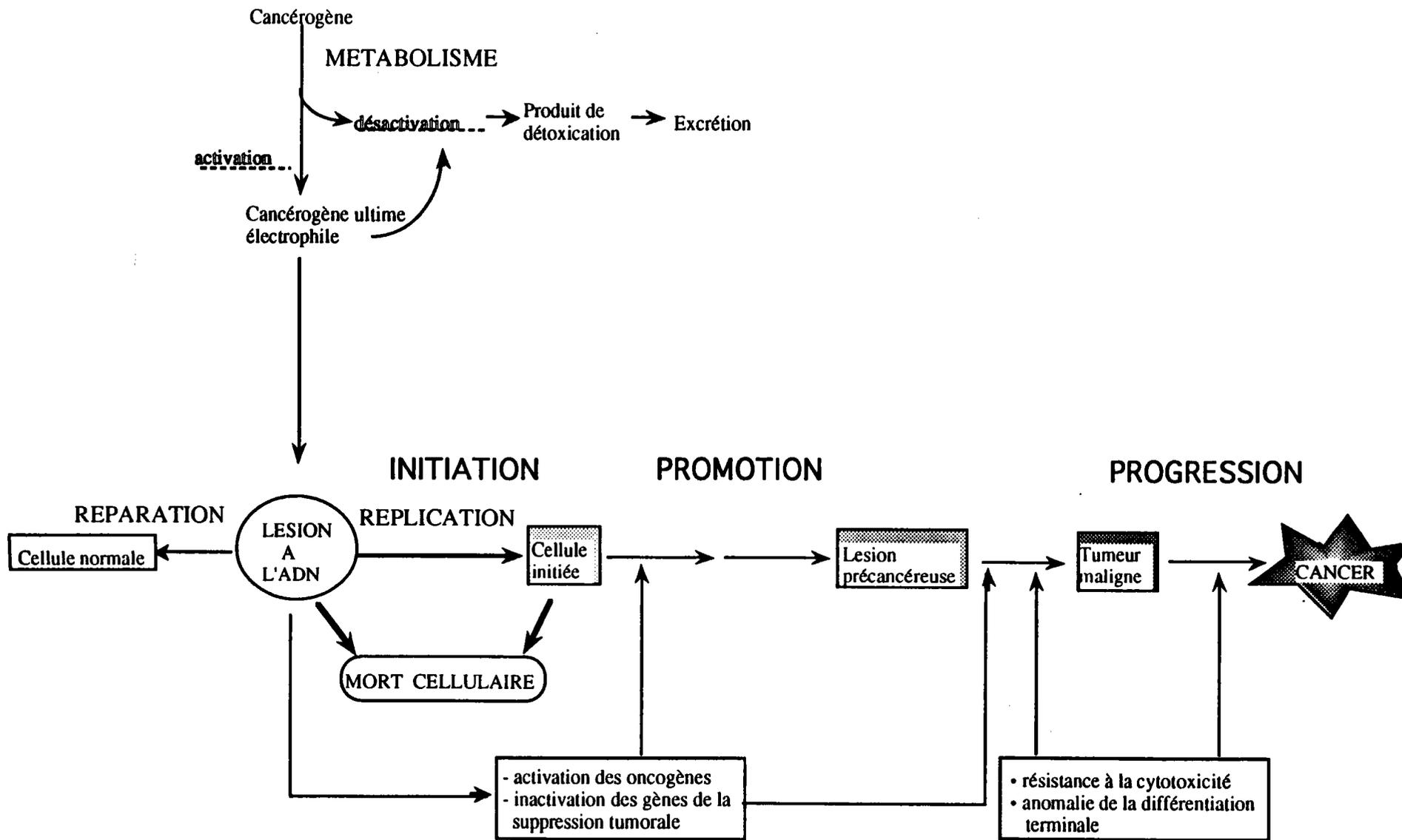


Figure 3 : principales étapes de la cancérogénèse chimique (d'après Harris, 1991)

4) Formation des adduits et leurs conséquences biologiques

Le processus de transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse dépend donc pour partie d'une altération de l'ADN de par la fixation covalente de dérivés électrophiles des substances cancérigènes.

Ainsi, l'étude de la formation de ces adduits et de la réparation de l'ADN devrait permettre d'évaluer l'exposition des individus à un cancérigène.

4.1) Réactivité et cible moléculaire des cancérigènes chimiques.

4.1.1) Formation des adduits

Le caractère commun aux diverses classes de cancérigènes est la formation soit directement soit après activation métabolique, des dérivés électrophiles qui peuvent réagir avec les sites nucléophiles de l'ADN.

Depuis les travaux de Miller et Miller (1947) et de Brookes et Lawley (1964) (voir paragraphe 3.1), de nombreuses études se sont succédées afin de déterminer les modes de fixation des cancérigènes à l'ADN. Le recours à l'administration de composés radiomarqués chez l'animal a permis de détecter et de quantifier les interactions des cancérigènes avec l'ADN. Ainsi, Lutz (1979) définit un index de liaison covalente à l'ADN (CBI : Covalent Binding Index). Cet index correspond au nombre de micromoles de produits lié à l'ADN de l'organe étudié par mole de nucléotide, rapporté au nombre de millimoles de produit administré par kilogramme d'animal.

$$\text{CBI} = \frac{\mu\text{moles d'adduit / mole de nucléotide de l'ADN}}{\text{mmoles de produit administré par kg d'animal}}$$

Cette index peut être également calculé à partir des valeurs de dpm comme indiqué ci-dessous,

$$\text{CBI} = \frac{\text{dpm de la substance liée par mg d'ADN}}{\text{dpm de la substance administrée par Kg d'animal}} \times 309.10^6$$

La plupart des études menées sur le CBI ont été faites après l'administration d'une seule dose à l'animal alors qu'il serait plus approprié de mesurer les lésions à l'ADN après des expositions chroniques qui tiennent compte des processus de liaison et de réparation.

Lutz a établi une classification des agents cancérigènes d'après la valeur de leur CBI : cancérigènes forts (CBI > 1000), cancérigènes moyens (CBI > 100) et cancérigènes faibles (CBI ≤ 10). La détermination globale des lésions à l'ADN ne révèle pas nécessairement la potentialité cancérigène d'un composé. Par exemple, les études sur le foie concernant la diméthylnitrosoamine (NDMA, CBI = 6000) montre que ce produit donne dix fois plus d'adduit de l'ADN que la diéthylnitrosoamine (CBI = 430) qui pourtant est plus cancérigène que la NDMA. Ceci peut être due à la différence de distribution et de réparation des lésions méthylées et éthylées (Dirheimer, 1986 ; Lutz, 1986).

De tous les cancérigènes chimiques, les agents alkylants ont été particulièrement bien étudiés, ce sont ceux dont le mécanisme d'action chimique et biologique est le mieux compris.

4.1.2) Mécanisme de formation des adduits à l'ADN par les agents alkylants

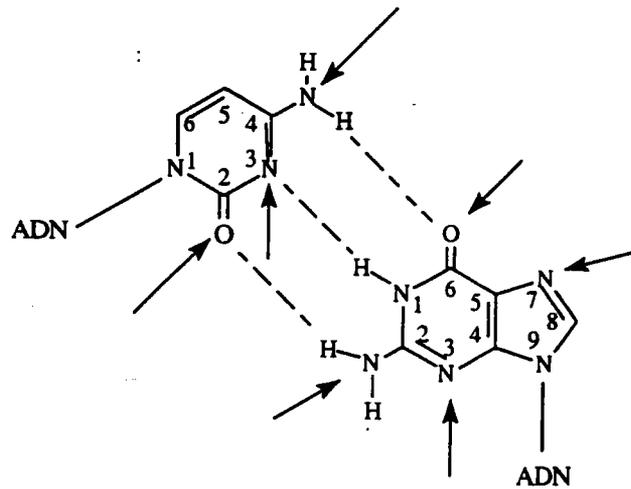
Les agents alkylants constituent un important groupe de mutagènes et de cancérigènes. On distingue 1) les agents alkylants directes comme par exemple les alkylsulfates ([diméthyl ou diéthyl] sulfate), les alkylalcanesulfonates ([méthyl et éthyl] sulfonate), les alkylnitrosourées (méthyl, éthylnitrosourée), 2) les agents alkylants indirectes qui sont activés métaboliquement avant d'altérer l'ADN, c'est le cas des dialkylnitrosamines.

Les effets biologiques de nombreux agents alkylants sont déterminés par la nature de l'adduit à l'ADN mais également par leur persistance (Karran et Lindahl, 1985). Ces agents ont été largement utilisés en laboratoire pour comprendre les mécanismes de mutagenèse et de cancérogenèse. Une douzaine de sites susceptibles d'être alkylés ont été mis en évidence sur l'ADN *in vitro* (Singer et Grunberger, 1983). Ce sont des atomes riches en électrons (N, O, S, ou C) qui sont localisés au niveau des positions N-1, N-3 et N-7 de l'adénine; N-3, N-7 Q⁶ de la guanosine, N-3 et Q² de la cytosine, N-3, Q⁴ et Q² de la thymine et au niveau des groupements phosphates (Figure 4).

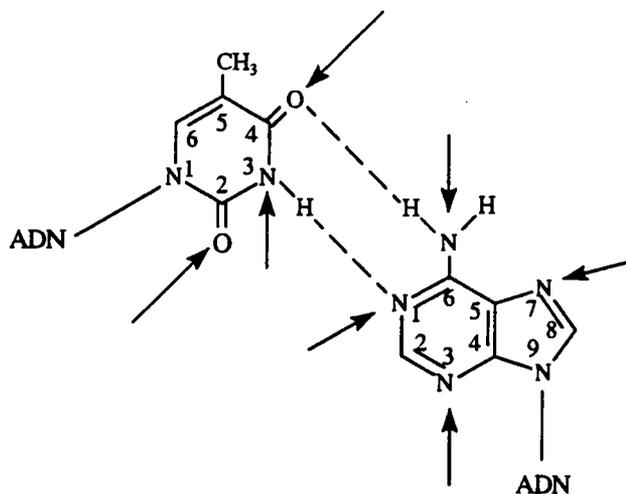
Les agents alkylants se lient à différents sites de l'ADN suivant leur pouvoir électrophile exprimé par la constante de Swain et Scott et le caractère nucléophile du site. La sélectivité des réactions de substitution nucléophiles peut être déduite de la relation de Swain et Scott

$$\log \frac{k_N}{k_{H_2O}} = S_n$$

avec k_N et k_{H_2O} qui sont deux constantes du 2^{ème} ordre avec les nucléophiles N et H₂O. (Lawley, 1976).



CYTOSINE - GUANINE



THYMINE - ADENINE

Figure 4 : Sites d'action des cancérogènes sur les bases de l'ADN

Les agents de forte sélectivité nucléophile comme le diéthylsulfate ou le diméthylsulfate, vont réagir avec les atomes d'azote de l'ADN : particulièrement sur la position N-7 de la guanine (site le plus nucléophile de l'ADN) suivant un mécanisme de substitution nucléophile bimoléculaire (S_N2) (Lawley, 1984.) La position N-3 de l'adénine est également un site très nucléophile. Les agents de faible sélectivité nucléophile comme les nitrosourées (MNU, ENU) vont aussi réagir avec les atomes d'oxygène par un mécanisme de substitution nucléophile d'ordre 1 (S_N1).

La proportion relative de chaque adduit va donc dépendre de la sélectivité nucléophile de l'agent alkylant considéré. De nombreux travaux ont permis de déterminer les proportions relatives des différents adduits de l'ADN (*in vivo* et *in vitro*) suite à l'action d'agents alkylants. Le tableau 2 résume les proportions (exprimées en pourcentage) des alkylations obtenues sur de l'ADN double brin *in vitro*, par les principaux agents alkylants (Singer et Grunberger, 1983)

Tableau 2 : Alkylation d'un double brin d'ADN *in vitro* (Singer et Grunberger, 1983)

Me₂SO₄ (DMS) : diméthyl sulfate; **MeMS** : Méthyl méthane sulfonate ; **MeNU (MNU)** : méthyl nitrosourée ; **Et₂SO₄ (DES)**: diéthyl sulfate ; **EtMS (EMS)** : éthyl méthane sulfonate ; **EtNU (ENU)** : éthyl nitrosourée.
nd = non détecté

Sites d'alkylation	Alkylation totale (pourcentage)					
	Me ₂ SO ₄ (DMS)	MeMS	MeNU (MNU)	Et ₂ SO ₄ (DES)	EtMS (EMS)	EtNU (ENU)
ADENINE						
N-1	1,9	3,8	1,3	2	1,7	0,2
N-3	18	10,4	9	10	4,9	4,0
N-7	1,9	1,8	1,7	1,5	1,1	0,3
GUANINE						
N-3	1,1	0,6	0,8	0,9	0,9	0,6
O ⁶	0,2	0,3	6,3	0,2	2	7,8
N-7	74	83	67	67	65	11,5
THYMINE						
O ²			0,11	nd	nd	7,4
N-3			0,3	nd	nd	0,8
O ⁴			0,4	nd	nd	2,5
CYTOSINE						
O ²	nd	nd	0,1	nd	nd	3,5
N-3	< 2	< 1	0,6	0,7	0,6	0,2
DIESTER		0,8	17	16	13	57

Les agents méthylants sont environ vingt fois plus réactifs vis à vis des acides nucléiques que les agents éthylants dans les mêmes conditions (Singer et Grunberger, 1983). La mutagénicité et la cancérogénicité des agents alkylants sont corrélées avec leur capacité à se lier aux atomes d'oxygène.

4.1.3) Importance des différentes lésions à l'ADN

Loveless (1969) a suggéré que la lésion en Q^6 de la guanine est importante pour l'induction d'une tumeur du fait que l' Q^6 -méthylguanine peut théoriquement s'apparier avec la thymine au lieu de la cytosine lors de la réplication de l'ADN. La mutation qui en résulte au terme de deux divisions serait une transition GC => AT.

Les études sur les cultures de cellules ont montré une corrélation entre le pouvoir mutagène des agents alkylants et leur capacité à former de l' Q^6 -alkylguanine dans l'ADN (Beranek *et al.*, 1983 ; Beranek , 1990).

Le pouvoir cancérigène des agents alkylants monofonctionnels serait déterminé par le rapport initial 7-alkylguanine / Q^6 -alkylguanine. L'alkylation en Q^6 de la guanine déterminerait la cancérigénicité des agents chez les rongeurs (Bartsch *et al.*, 1983). De même, il a été montré que chez des bactéries, l' Q^6 -alkylguanine autant que l' Q^4 -alkylthymine sont mutagènes (Singer *et al.*, 1978).

Toutes les lésions à l'ADN ne conduisent pas à une mutation. Les adduits 3-alkylpurines et Q^2 -alkylpyrimidines entraînent la mort de la cellule si elles ne sont pas réparées avant la division cellulaire. La cytotoxicité est liée au fait que le groupe alkyle présent dans le petit sillon de la double hélice de l'ADN va bloquer l'ADN polymérase lors de la réplication (Karran et Lindahl, 1985).

La position $N-7$ de la guanine est le site le plus réactif de l'ADN pour les agents alkylants (Tableau 2). Cette lésion persistante n'est pas dangereuse pour la cellule et n'interfère pas *in vitro* dans la synthèse de l'ADN (Lawley et Orr, 1970 ; Karran *et al.*, 1982 ; Boiteux et Laval, 1983). Cependant l'alkylation en position 7 de la guanine rend la liaison glycosidique instable. La libération de la base conduit à l'apparition d'un site apurique (AP), pré mutagène dans l'ADN (voir paragraphe 4.6.2). L'alkylation en position 7 de la guanine favorise également la rupture du cycle imidazole donnant une forme ouverte 2,6-diamino 4-hydroxy, 5N-méthylformamidopyrimidine (Fapy). Les résidus Fapy bloquent la synthèse d'ADN *in vitro* (Boiteux et laval, 1983).

Les agents bifonctionnels (moutarde de soufre) peuvent réagir avec deux guanines (position 7) et créer des pontages intra et inter-brins conduisant à la mort cellulaire. Dans ce cas, la réaction avec la $N7$ -guanine est importante.

4.4) Réparation de l'ADN

La réparation de l'ADN est un déterminant important dans l'étape d'initiation de la cancérogenèse par les agents alkylants. Plusieurs systèmes de réparation ont été mis en évidence chez les procaryotes et chez les eucaryotes.

4.4.1) Réparation par transfert du groupe alkyl.

Ce type de réparation concerne les résidus Q^6 -alkylguanine. Il s'agit d'un transfert direct stoechiométrique du groupement alkyl sur le résidu cystéinyle de la protéine acceptrice appelée alkyl- Q^6 -guanine ADN-alkyltransférase. L'ADN est restauré en une seule étape par cette protéine. Comme le site accepteur "cystéine" n'est pas régénéré, le nombre d' Q^6 -alkylguanine réparé sera égal au nombre de molécules d'alkyltransférase actives (Pegg et Byers, 1992). Cette enzyme qui élimine une lésion pré mutagène est essentielle dans les moyens de défense de l'organisme contre les effets mutagènes et cancérigènes des agents alkylants. Chez les bactéries exposées à des faibles doses d'agents alkylants, on observe une induction de l'expression de l' Q^6 alkyl guanine-ADN-transférase (Lindahl, 1982). Il s'agit de la réponse adaptative aux agents alkylants. Chez les mammifères, la régulation à la concentration d'alkyltransférase diffère selon l'espèce et le type cellulaire. Une induction de l'activité de l'alkyltransférase a été observé dans les cellules d'hépatomes de rat exposés à des composés N-nitrosés (Laval, 1991).

4.4.2) Réparation par excision de bases

Les ADN-glycosylases catalysent ce type réparation qui s'effectue en plusieurs étapes. En premier lieu, une N-glycosylase excise la base alkylée laissant un site apurique ou apyrimidique (site AP). Une AP-endonucléase excise la chaîne phosphodiester près du site AP, puis une exonucléase excise un fragment du brin endommagé. Le brin intact sert de matrice de polymérisation d'un nouveau segment d'ADN qui sera soudé grâce à une ligase (article de synthèse, Laval et Laval, 1980).

Chez les bactéries *Escherichia coli*, on rencontre principalement deux types d'ADN-glycosylase (Lindahl, 1982). Une enzyme constitutive réparant principalement la 3-méthyladénine (3-méthyladénine-ADN-glycosylase I) et une autre enzyme inductible (ADN-glycosylase II) qui répare la 3-méthyladénine mais également la 3-méthylguanine et la 7-méthylguanine (spécificité de substrat moindre pour cette enzyme).

Chez les mammifères, il n'existerait qu'un seul type d'ADN-glycosylase de faible spécificité de substrat.

4.4.3) Réparation des résidus Fapy.

Les résidus Fapy sont réparés par un système enzymatique appelé Fapy-ADN-glycosylase. Chez *Echerichia coli* cette enzyme est codée par le gène *fpg*. Cette enzyme présente chez les

bactéries et dans les cellules de mammifère répare également les lésions de l'ADN engendrées par les radiations ionisantes ou par les processus d'oxydation endogène comme par exemple la 8-oxo-7,8-dihydro-2'déoxyguanosine (8-oxodG). La fonction physiologique principale de cette enzyme serait donc la réparation des lésions produites par les radicaux libres ou par les espèces réactives de l'oxygène (Tchou *et al* , 1991, Boiteux *et al* , 1992, O'Connor *et al* , 1993). Elle répare aussi les formes ouvertes de l'adénine générées par irradiation de l'ADN. La Fapy-ADN-glycosylase (FPG protéine) possède également une activité enzymatique associée reconnaissant spécifiquement les sites AP ("strand nicking activity", O' Connor et Laval, 1989) et coupant les liaisons phosphodiesteres en 3' et 5' du site AP. Ainsi la coupure générée est limitée par des terminaisons 5'phosphate et 3'phosphate (Bailly *et al.*, 1989).

4.5) Conséquences biologiques de la formation des adduits

Comme nous l'avons vu précédemment, le système de réparation de l'ADN permet de diminuer considérablement les effets mutagènes et létaux des agents alkylants. Les taux de formation et la réparation des adduits varient suivant l'espèce, l'organe, la cellule et même le niveau subcellulaire comme le prouvent les exemples ci-dessous.

Ainsi des rats traités à la MNU ou à la ENU développent uniquement une tumeur du cerveau (Goth et Rajewsky, 1974). Les agents alkylants de type MMS sont moins inducteurs de tumeur du cerveau. La fréquence de ces tumeurs est proportionnelle au taux d' Q^6 -alkylguanine dans le cerveau. Cependant, on constate des différences suivant les espèces. En effet les souris ou les hamsters présentent des niveaux d'adduits Q^6 -alkylguanine dans le cerveau similaires à ceux observés chez les rats, mais l'induction de tumeur est beaucoup plus faible (article de synthèse, Swenberg *et al.*, 1985).

D'autre part, une exposition à la N-nitroso N-méthylbenzylamine entraîne une accumulation d' Q^6 -méthylguanine et de 7-méthylguanine constatée dans les cellules glandulaires et épithéliales de la cavité nasale des rats. Ce phénomène est probablement dû à leur faible capacité à réparer ces adduits ainsi qu'à un faible taux de prolifération cellulaire (Van Benthem, 1992).

De même, des différences dans la réparation de l' O^6 -méthylguanine et de l' O^4 -méthylthymine ont été observées dans le foie de hamster et de rat après traitement par une seule dose de diméthylnitrosamine (DMN). Chez les deux espèces, une augmentation rapide de l'ADN glycosylase est constatée alors que pour l' O^6 -méthylguanine-ADN-méthyltransférase cette augmentation a lieu que chez le rat (Hall *et al.*, 1990)

Le taux de mitose est également un facteur conditionnant l'organotropisme des substances cancérigènes. En effet, suite à une exposition à la diméthylhydrazine (20 mg/kg) les

concentrations de l'adduit O^6 -méthylguanine se révèlent plus importantes dans le foie que dans le colon chez le rat, alors que les tumeurs sont localisées essentiellement au niveau du colon. Cette différence serait due au fait que la réplication cellulaire au niveau du colon est plus importante qu'au niveau du foie. De même, le taux d'adduits du chlorure de vinyl dans l'ADN de foie de jeunes rats est supérieur à celui des rats adultes car les taux de divisions cellulaires au sein du foie des jeunes rats sont plus importants. Par conséquent leur sensibilité pour l'angiosarcome est plus élevée (Ciroussel *et al.*, 1990).

L'induction de néoplasme par les agents alkylants peut également être spécifique d'une population cellulaire. Par exemple, la diméthylhydrazine induit essentiellement un angiosarcome du foie chez le rat. En effet, on constate que durant les huit premiers jours d'exposition le rapport O^6 -méthylguanine / 7-méthylguanine est cinquante fois plus élevé dans le cas des cellules de Kupffer et endothéliale que dans les hépatocytes. Cette différence entre les populations cellulaires provient du fait que les hépatocytes ont un taux d'enzyme de réparation constitutive et inductible (O^6 -méthylguanine-ADN-méthyltransférase) beaucoup plus important que les cellules endothéliales et les cellules de Kupffer (Swenberg *et al.*, 1982; Swenberg *et al.*, 1985).

D'autres facteurs de susceptibilité ont été caractérisés. Gaubatz et Tan (1993) montrent que la 7-méthylguanine est réparée beaucoup plus efficacement dans les reins de souris jeunes que parmi ceux des souris âgées suite à un traitement à la N-méthylnitrosourée. Cette diminution de l'efficacité de la réparation serait due à une altération structurale de la chromatine dans les tissus sénescents.

L'induction d'une tumeur dans un organe est fonction de facteurs multiples comme la capacité de réparation, la prolifération cellulaire, l'âge des tissus, mais également des spécificités de l'individu comme des facteurs métaboliques (capacité à métaboliser les cancérogènes), physiologiques (hérédité, sexe, état hormonal et nutritionnel).

Au niveau subcellulaire (au sein de l'ADN), la localisation des adduits n'est pas un phénomène aléatoire. Le potentiel de fixation d'un cancérogène comme le N-hydroxy-2-acétylamino fluorène serait influencé par la conformation de l'ADN (forme B ou Z) *in vitro* (Rio et Leng, 1983).

La composition en bases des séquences de l'ADN peut affecter le profil de fixation d'un cancérogène. L'étude de la distribution des N^7 -alkylguanine générées par des agents alkylants permet d'observer la formation de ces adduits sur certaines séquences de l'ADN. Ainsi, la formation de 7-alkylguanine par la chloroéthylnitrosourée se fait sur des motifs continus de guanine. Par contre les alkylations dues à la MNU se font préférentiellement sur la seconde guanine d'une séquence GGA ou GGT (article de synthèse, Richardson et Richardson, 1990). L'alkylation par la MNU d'un dodécamère synthétique confirme l'influence des bases adjacentes (Dolan *et al.*, 1988). Ces mêmes auteurs montrent que la réparation de

l'Q⁶méthylguanine d'un dodécamère synthétique double brin est plus lente quand la base située en 5' de l'Q⁶-méthylguanine est une guanine. Elle est plus efficace lorsqu'il s'agit d'une cytosine.

Les mutations ne se font pas au hasard. Certaines régions de l'ADN sont plus susceptibles aux alkylations (triplet GGN). Il a également été montré qu'un gène exprimé est réparé plus efficacement qu'un gène silencieux (article de synthèse, Hanawalt, 1987).

4.6) Les sites apuriques

4.6.1) Formation et structure des sites apuriques

Les sites apuriques ou apyrimidiques (AP) sont des lésions fréquentes de l'ADN. Ils résultent d'une rupture de la liaison N-glycosidique entre la base purine ou pyrimidine et le désoxyribose (Figure 5)

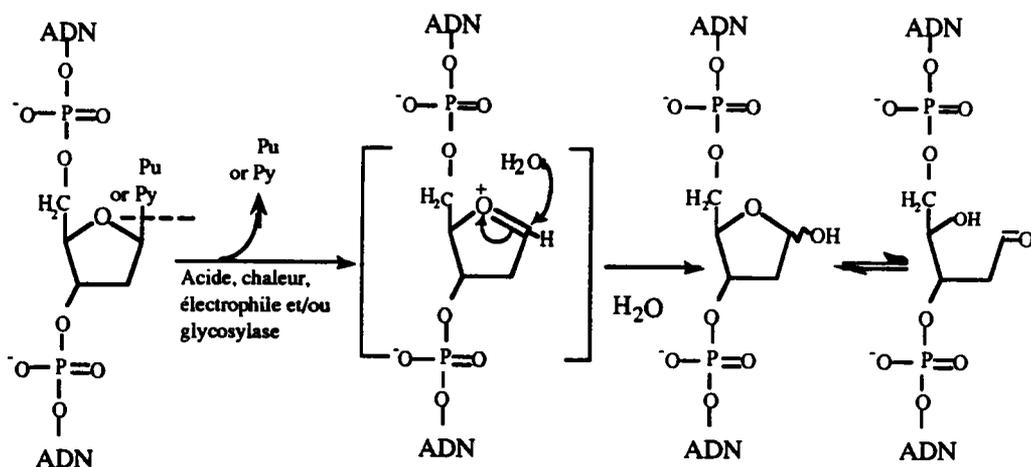


Figure 5 : Formation et structure des sites apuriques et apyrimidiques (AP)

Chez l'homme il a été estimé qu'environ 10000 sites AP sont produits par cellule et par jour (article de synthèse Lindahl, 1982; Loeb et Preston, 1986).

L'hydrolyse de la liaison N-glycosidique a lieu spontanément à pH neutre mais ce phénomène est considérablement augmenté par des modifications chimiques des bases, par exemple les alkylations en position N7 de la guanine, N3 et N7 de l'adénine, N3 de la cytosine. Les sites AP peuvent être également formés par des agents physiques (radiation ionisante) ou chimique (bléomycine) (Steighner et Povirk, 1990). La vitesse d'hydrolyse de la liaison N-

glycosidique augmente avec la température mais également avec l'acidification du milieu (Loeb et Preston, 1986).

Les sites AP sont également des intermédiaires dans le processus de réparation par excision des bases altérées effectuée par les ADN-glycosylases.

Un site AP dans l'ADN est un mélange d'espèce en équilibre entre un cycle ouvert avec une fonction aldéhyde et deux espèces hémiacétales (Figure 6)

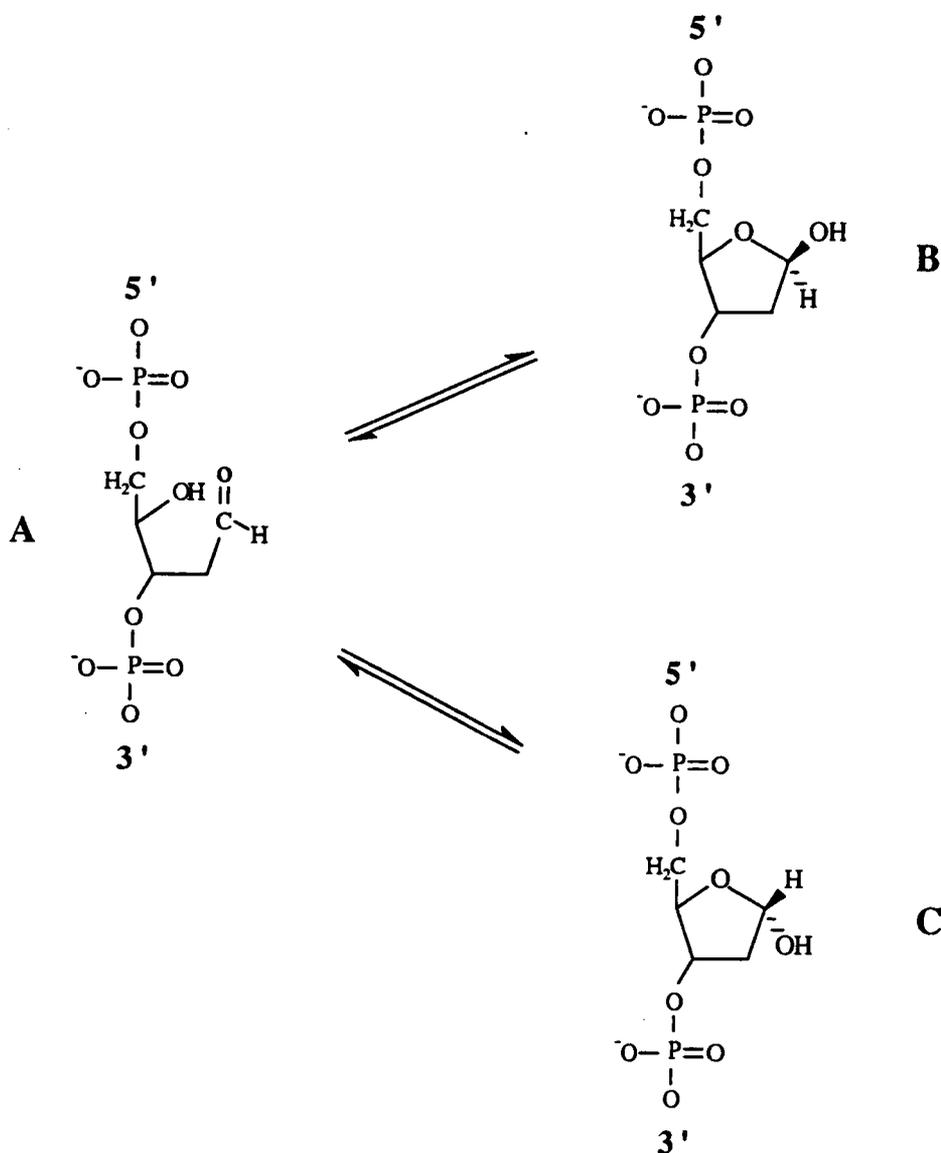


Figure 6 : Structure chimique d'un site AP (forme aldéhyde (A) ; forme α et β hémiacétales (B et C)).

La caractérisation des sites AP dans un ADN double brin montre que les deux formes hémiacétales sont majoritaires, la forme aldéhyde constituerait 1% des sites AP totaux, mais cette forme est très réactive (Doetsch et Cunningham, 1990).

4.6.2) Réparation et pouvoir mutagène des sites AP

a) Réparation des sites AP

Un site apurique (AP) consiste en un résidu 2'-désoxyribose lié aux nucléotides voisins par une liaison phosphodiester en 3' et 5' (Bertrand *et al.*, 1989). Les AP endonucléases présentes chez les procaryotes et les eucaryotes vont permettre la réparation des sites AP.

La majorité des AP endonucléases catalysent l'hydrolyse de la liaison phosphodiester en 5' du site AP et génère une extrémité 3'OH (endonucléase de classe II). Chez *Escherichia coli*, l'endonucléase principale est le produit du gène *xth*. Cette endonucléase a également la propriété d'agir comme une exonucléase sur un double brin d'ADN *in vitro* d'où le nom d'exonucléase III donné à cette enzyme (exonucléase III ou endonucléase II ou endonucléase VI). *Escherichia coli* possède une seconde enzyme qui est l'endonucléase IV (produit du gène *nfo*) dont la spécificité de substrat est très proche de la précédente. L'endonucléase IV semblerait plus spécifique des sites AP engendrés par les antibiotiques ou les radicaux oxygène.

La coupure en 5' du site AP produit un résidu 5'-désoxyribosephosphate qui doit être excisé pour poursuivre la suite de la réparation par l'ADN polymérase et la ligase. La fonction exonucléase (5'→3') de l'ADN polymérase I est inefficace. Aussi une enzyme isolée chez *Escherichia coli* (la 5'dRpase), dont le magnésium est le cofacteur, permet de libérer l'extrémité 5' du résidu désoxyribosephosphate. Une activité enzymatique similaire est présente dans les extraits cellulaires de mammifères (Figure 7).

Une autre voie de réparation mineure permet la réparation des sites AP impliquant une coupure en 3' du site AP et une β -élimination (endonucléase de classe I). Chez *Escherichia coli*, l'endonucléase III agissant sur les cycles pyrimidines modifiés (activité ADN glycosylase) permet la coupure en 3' du site AP et catalyse une β -élimination *in vitro*.

Bailly et Verley (1989) proposent le nom de "AP lyases" pour les enzymes qui catalysent la réaction de β -élimination et dont l'activité serait associée à celle de l'ADN glycosylase. Cette appellation est préférée à celle d'endonucléase de classe I.

Les séquences tripeptidiques Lys-Trp-Lys et Lys-Tyr-Lys permettent également une rupture en 3' du site AP et une réaction de β -élimination (Pierre et Laval, 1981).

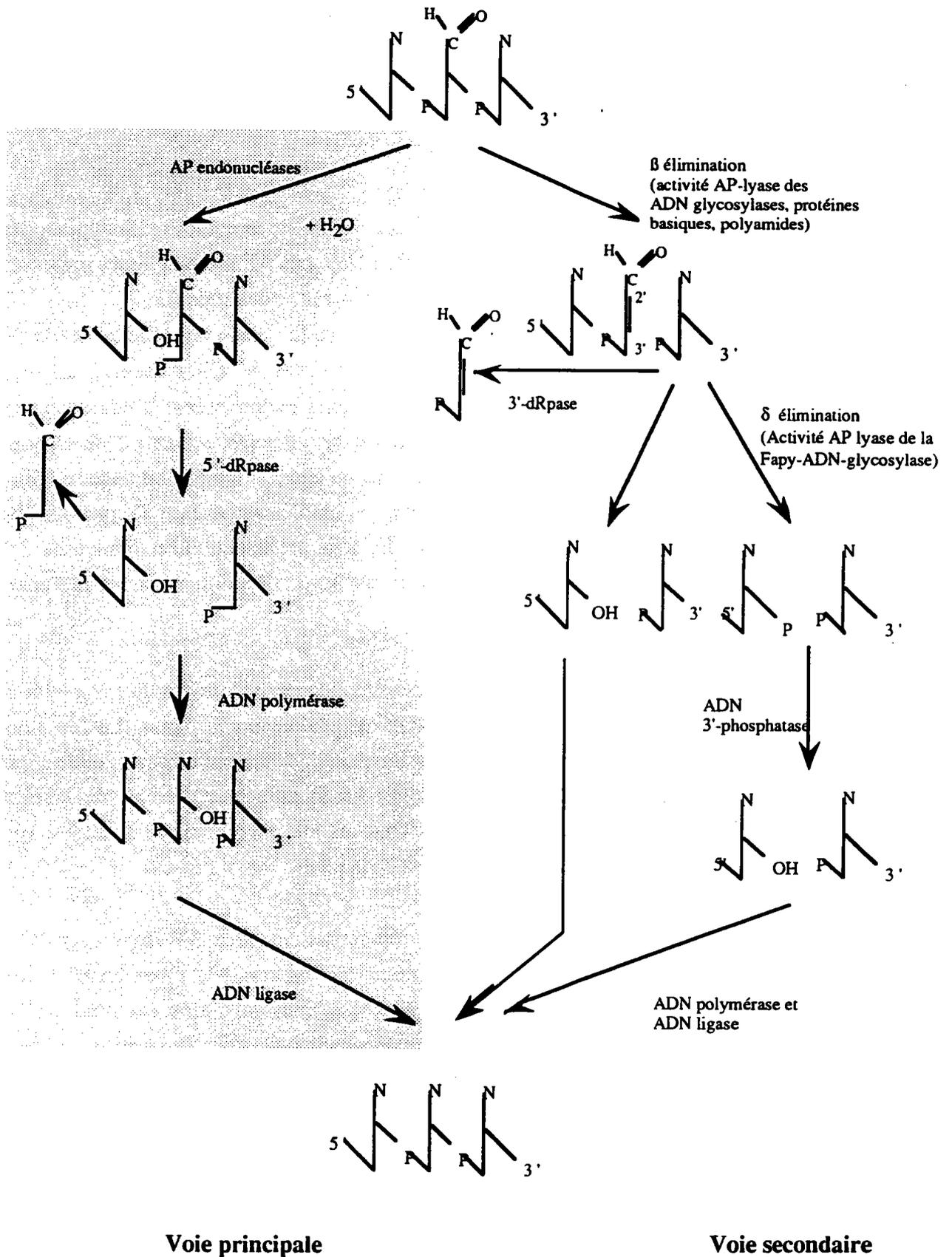


Figure 7 : Réparation des sites apuriques. Voie principale (gauche) et voie secondaire (droite) (Lindahl, 1990)

Une réaction de δ élimination, suite à la première élimination, peut également être catalysée par les "AP lyases" comme dans le cas de la FAPY-ADN glycosylase.

L'étape suivante dans la réparation consiste en l'excision du résidu désoxyribosephosphate (ou phosphate) par l'endonucléase IV et l'exonucléase III (chez *Escherichia coli*) permettant ainsi à l'ADN polymérase et à l'ADN ligase de combler la coupure (Lindahl, 1990 et Doetsch et Cunningham, 1990 - figure 7)

b) Mutagenicité des sites AP

Si les sites AP ne sont pas réparés, ils ont des effets mutagènes et/ou létaux.

Les premières démonstrations de la mutagenicité potentielle des sites AP ont été réalisées sur des matrices constituées de poly [d(A-T)] dépurinées puis dupliqués par l'ADN polymérase purifiée. On constate une augmentation du nombre d'erreurs dans l'incorporation des nucléotides complémentaires effectuée par l'ADN polymérase (article de synthèse, Loeb et Preston, 1986).

Les études *in vivo* ont été réalisées sur les bactéries et sur les cellules de mammifères. La dépurination d'un ADN de bactériophage ϕ x 174 am³ *in vitro* et la transfection de cet ADN chez *Escherichia coli*, a permis de montrer une diminution considérable de la multiplication des phages dans *Escherichia coli*. Les auteurs ont montré qu'approximativement 3,5 sites AP dans l'ADN du phage ϕ x 174 am³ constituent une lésion létale. Cependant, les sites AP chez les bactéries sont mutagènes que si le système de réparation SOS a été induit. Dans le cas contraire, les sites AP sont des lésions qui bloquent la réplication de l'ADN chez les bactéries (Schaaper et Loeb, 1981).

En effet, les ADN polymérases de procaryotes sont très fidèles lors de la réplication aussi elles contournent ("bypass") difficilement les sites AP. A l'inverse, les ADN polymérases des eucaryotes effectuent des erreurs lors de la réplication et de ce fait elles contournent très facilement les sites AP. La deoxyadénosine est fréquemment insérée à l'opposé du site *in vitro* (Loeb et Preston, 1986).

Chez les mammifères, l'introduction de sites AP dans l'ADN du virus SV 40 provoque une diminution considérable de la survie des virus après transfection comme dans le cas des phages (environ 3 sites AP dans le génome du SV 40 constitue une lésion létale - Gentil *et al.*, 1984).

Les propriétés mutagènes d'un seul site AP situé à l'opposé d'un résidu guanine introduit dans un plasmide vecteur capable de se répliquer dans les cellules de mammifères et dans les bactéries ont été étudiées. Le plasmide est inséré dans les cellules de mammifères COS7,

puis les mutations sont analysées chez les bactéries. Cette étude a permis de montrer qu'un seul site abasique induit une incidence de 1% en mutagénèse. Dans ce système, aucune insertion préférentielle de base opposée au site AP a été mise en évidence et les mutations par décalage du cadre de lecture sont peu fréquentes. Par contre une insertion préférentielle de l'adénine a été observée chez les bactéries (Vasseur *et al.*, 1986 ; Gentil *et al.*, 1990).

La potentialité mutagène des sites AP étant démontrée dans les cellules de mammifères, il est donc intéressant de pouvoir quantifier ces lésions dans l'ADN. Ces dernières années, plusieurs méthodes ont été développées pour évaluer les sites AP dont les principales sont présentées succinctement ci-dessous.

4.6.3) Mise en évidence des sites AP

Un essai pour apprécier la formation des sites AP consiste à déterminer les coupures simples brins de l'ADN endommagé, après un traitement alcalin ou après l'action des AP endonucléases *in vitro*. Cette quantification indirecte comporte quelques inconvénients, en effet, il est difficile d'obtenir des préparations d'endonucléases pures. Quant à la méthode du traitement alcalin de l'ADN, elle peut provoquer des altérations de bases et générer des coupures sur le brin d'ADN qui ne seraient pas dues aux sites AP initialement présents (Liuzzi et Talpaert-Borlé, 1988).

Aussi plusieurs autres méthodes de détection ont été développées ces dernières années, dont les principales sont présentées ci-dessous.

a) Détection des sites AP par la méthoxyamine

Cette méthode est basée sur la réactivité chimique de la fonction aldéhyde du désoxyribose au niveau du site AP. Ainsi un réactif spécifique de la fonction aldéhyde marqué par un isotope radioactif devrait permettre une évaluation rapide des sites AP. Les réactifs possédant uniquement un groupe $-NH_2$ se sont révélés inappropriés car ils dégradent le site apurinique. Par contre les composés comprenant un groupe $-ONH_2$ comme la méthoxyamine réagissent quantitativement avec la fonction aldéhyde du site AP sans provoquer la rupture de la chaîne polynucléotidique (Talpaert-Borlé et Liuzzi, 1983). La ^{14}C méthoxyamine réagit très peu avec l'ADN non modifié, les sites AP sont quantifiés en évaluant la radioactivité liée à l'ADN. Cette méthode reste peu sensible car l'activité spécifique de la méthoxyamine est limitée par la présence d'un seul carbone marqué. La méthoxyamine a la propriété de pénétrer à l'intérieur des cellules et peut être utilisée pour détecter les sites AP formés *in vivo* (Fortini *et al.*, 1990). Les sites AP formés *in vivo* modifiés par la méthoxyamine deviennent résistants

à l'action des AP endonucléases des mammifères, alors que l'endonucléase III et IV de *E.coli* ne sont pas inhibées par cette modification du site. La quantification des sites AP dans l'ADN des cellules de mammifère est effectuée grâce à l'analyse (southern blots) des fragments de restriction obtenus après traitement de cet ADN par les endonucléases bactériennes (Rosa *et al*, 1991 ; Fortini *et al.*, 1993)

b) Détection des sites AP par la 9-aminoellipticine (9-AE)

Cette méthode consiste à mesurer la fluorescence du produit de l'interaction entre l'amine hétérocyclique (9-AE) et le site AP. Cette fluorescence est spécifique de la présence de site AP dans l'ADN. La quantification des sites AP ne dépend pas de la nature de l'ADN (simple ou double brin). La limite de détection est de 1 site pour 1000 paires de bases. Cependant cette sensibilité est obtenue que si la concentration optimum de 9-AE est déterminée. En effet en cas d'excès de 9-AE on constate une diminution de la fluorescence due à un quenching du chromophore (Bertrand *et al*, 1987). Pour de faible concentration, la 9-AE peut également couper l'ADN en 3' du site AP.

La propriété de la 9-AE de se lier au sites AP et de couper l'ADN est due à la formation d'une base de Schiff en position 1' du désoxyribose (Bertrand *et al* 1989). La 9-AE permet également d'inhiber la réparation des sites AP par l'exonucléase III de *E.coli* (Lefrançois *et al*, 1990).

D'autres molécules chimiques ont également la propriété de couper l'ADN au niveau des sites AP. Ainsi Constant *et al* (1988) ont montré que l'adénine couplée à la 9-aminoacridine s'intercale et coupe spécifiquement l'ADN au niveau des sites AP.

c) Détection des sites AP par post-marquage ^{32}P .

Cette technique permet de quantifier les sites AP dans l'ADN avec une grande sensibilité (1 femtomole par essai). Le marquage au niveau des sites AP se fait par la T4 polynucléotide kinase après hydrolyse de l'ADN dépuriné par la phosphodiésterase de venin de serpent et la phosphatase alcaline. Ce marquage par le ^{32}P est indépendant de la nature de l'ADN.

Il est possible d'obtenir le ratio des quatre nucléotides situés en 5' du sites AP permettant ainsi d'identifier les lésions qui ont lieu au niveau des "points chauds" (hotspots). Ceci après séparation CLHP des dinucléotides suivie d'une hydrolyse par la nucléase P1 ; les mononucléotides ainsi générés sont analysés par CLHP.

Néanmoins cette procédure est difficile à mettre en œuvre, elle nécessite une séparation sur gel d'électrophorèse et CLHP des dinucléotides marqués (Weinfeld *et al* 1990). Cette méthode

serait intéressante pour quantifier les lésions de l'ADN cellulaire, dans les tissus où le prémarquage de l'ADN n'est pas possible.

d) Détection des sites AP par ELISA.

Les sites AP réagissent avec le réactif O-4-nitrobenzylhydroxylamine (O-4-NBHA) pour former un résidu O-NBHA. Un anticorps monoclonal spécifique des sites AP modifié par l'O-4-NBHA a été obtenu par Chen *et al* (1992). Cet anticorps ne présente aucune réactivité croisée avec l'ADN non modifié et permet grâce à l'utilisation d'un essai enzymo-immunologique (ELISA) de détecter 1 site AP pour 10^4 paires de bases soit 10 femtomoles de sites AP pour 70 à 100 ng d'ADN. Cette sensibilité est comparable à celle du post-marquage ^{32}P . Cependant, les sites AP qui ne contiennent pas une fonction aldéhyde ne sont pas détectés. Par contre, la stabilisation des sites AP par la NBHA permet de conserver intactes ces sites pendant l'étape de purification de l'ADN à partir des cellules.

e) Détection des sites AP par enzymo-immunologie après réaction avec une hydrazine biotinylée

Cette méthode vise à simplifier la procédure de détection des sites AP et à augmenter la sensibilité. Kubo *et al.* (1992) ont préparé un réactif spécifique de la fonction aldéhyde : "aldehyde Reactive Probe" (ARP). Comme dans la méthode précédente, il s'agit d'une O-alkylhydroxylamine mais cette amine est couplée à la biotine. Le procédé est identique à celui décrit précédemment. Ainsi, de l'ADN de thymus de veau est enduit sur une plaque de microtitration puis est incubé avec le réactif ARP. Le taux d'ARP fixé à l'ADN est alors déterminé par la méthode avidine / biotine couplée à la peroxydase.

Le réactif ARP est très spécifique des sites AP. Aucune réactivité n'est observée avec d'autres types de lésions de l'ADN [dimères de pyrimidines, uracile, sites AP réduit par NaBH_4 ou modifié par la méthoxyamine, ni les résidus (formamido)-pyrimidine].

La détection des sites se fait sur un ADN simple ou double brin, de même qu'elle peut se réaliser sur les sites AP formés après l'action des ADN glycosylases.

Sur un ADN irradié, le réactif ARP permet également la détection des coupures simple brin.

La méthode "Aldehyde Reactive Probe" permet également de détecter les sites AP produits sur l'ADN de cellules traitées au méthylméthanesulfonate ou irradiées. La sensibilité de la détection est de 1 site AP pour 10^4 nucléosides.

Parmi les méthodes actuellement disponibles pour évaluer le nombre de sites AP dans l'ADN, l'essai ELISA présente plusieurs avantages ; à savoir sa sensibilité et sa simplicité d'exécution qui nous permettent d'envisager l'analyse d'un grand nombre d'échantillon.

5) Evaluation du taux d'adduction de l'ADN

Les adduits résultant de l'interaction ADN-cancérogène peuvent constituer un marqueur d'exposition à cet agent. Différentes méthodes analytiques ont été développées pour doser ces adduits (article de synthèse, Phillips, 1990).

Les techniques les plus utilisées seront présentées dans ce paragraphe.

5.1) Méthodes immunochimiques

Le principe de base des méthodes immunochimiques repose sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre des fragments d'ADN modifiés par un cancérogène (articles de synthèse, Poirier, 1981 ; Wild, 1990). L'obtention des premiers anticorps à partir de bases modifiées et conjuguées à la serum-albumine bovine (BSA) datent des années 60 (Tanenbaum et Beiser, 1963). Depuis lors un grand nombre d'anticorps spécifiques ont été obtenus en utilisant comme antigène des nucléotides ou des bases modifiées (haptènes) couplés à une protéine porteuse.

5.1.1) Obtention des anticorps.

Les anticorps polyclonaux ou monoclonaux sont obtenus après immunisation d'animaux (lapin et souris le plus souvent). Les adduits comme tout autre haptène doivent être couplés à une protéine porteuse pour induire une réponse immunitaire. Deux protéines sont couramment utilisées ; la KLH (hémocyanine de *Megathura crenulata*) et la BSA ou mBSA (serum albumine bovine ou BSA méthylée). La KLH présente l'avantage d'être plus immunogène que la BSA, la distance phylogénique avec les animaux classiquement immunisés étant plus grande que dans le cas de la BSA. Le choix de la protéine est fonction de l'haptène et de l'animal à immuniser (Strickland et Boyle, 1984).

Le couplage de l'haptène à la protéine a été développé par Erlanger et Beiser (1964). Cette technique consiste à oxyder le nucléoside par le périodate, ce qui permet l'ouverture du cycle ribose. La fonction aldéhyde ainsi formée réagit spontanément avec le groupement aminé libre de la protéine pour donner un cycle nucléophile. Ce cycle peut-être stabilisé par réduction avec le borohydrure de sodium. Pour les alkylpurines (7-méthylguanine, 3-méthyladénine) une autre méthode de couplage a été développée grâce à la synthèse d'analogues des purines par exemple les composés carboxyméthyl (Shuker 1988, Shuker et Farmer, 1988).

Différents protocoles d'immunisation ont été décrits ; il semble qu'une faible dose de conjugué (0,5 mg à 1 mg) administrée chez le lapin de manière à assurer une libération lente de l'immunogène et des injections de rappels espacées de 5 à 10 semaines, permettent d'obtenir des anticorps de haute affinité (Müller *et al* , 1982). Les souris sont généralement utilisées pour produire des anticorps monoclonaux. L'avantage des anticorps monoclonaux par rapport aux polyclonaux produit chez le lapin est qu'ils sont disponibles en quantité illimitée (Kriek *et al*, 1984).

5.1.2) Applications.

a) Détection et quantification des adduits.

Plusieurs méthodes de détection immunologique ont été décrites. Les plus utilisées sont le RIA et l'ELISA.

Dans le cas du dosage RIA, l'échantillon à analyser contenant l'haptène non marqué est mis en compétition avec le même haptène radioactif (traceur) pour la liaison avec l'anticorps. Cette technique est de plus en plus remplacée par les dosages enzymoimmunologiques tels que l'ELISA ou USERIA qui sont 10 à 100 fois plus sensibles (Santella, 1988 ; Poirier *et al*, 1988 ; Weston *et al*, 1988).

Le dosage immunologique en phase solide (ELISA) consiste en l'utilisation de plaque de microtitration sur lequel l'haptène conjugué à la protéine porteuse est absorbé. On ajoute la solution d'antigène libre à doser ainsi qu'une solution d'anticorps spécifique. Il y a une compétition pour la fixation d'anticorps entre la forme libre de l'antigène et la forme adsorbée sur la plaque. La quantité d'anticorps fixée est déterminée grâce à un second anticorps dirigé contre celui-ci, marqué par une enzyme ; son substrat est une substance chromogène (ELISA) ou radiomarqué (USERIA).

De nombreux adduits sont actuellement dosés par des méthodes immunologiques, par exemple : des anticorps polyclonaux contre la 7-méthylguanine (Shuker, 1988) ; un anticorps monoclonal contre les 3-alkyladenines (Eberle *et al*, 1990).

Les principaux avantages des dosages immunologiques peuvent être résumés de la façon suivante: rapidité, faible coût, sensibilité Par exemple la limite de détection de la 3-méthyladénine par ELISA est de l'ordre de 3 fmoles (Prevost *et al*, 1990). L'inconvénient majeur réside dans le risque de réactivités croisées avec des antigènes non recherchés.

b) Purification des adduits

Les anticorps anti-adduits de l'ADN peuvent être également utilisés pour leur purification. Ces techniques d'immunopurification ont fait l'objet d'important développement ces dernières années ; des applications nombreuses ont été décrites. Les anticorps sont utilisés dans la phase préparative (chromatographie d'immunoaffinité) préalable à l'analyse quantitative des échantillons qui peut être réalisée au moyen de méthode immulogique (ELISA), ou autre (CLHP, CPG-SM). La combinaison chromatographie d'immunoaffinité avec une méthode analytique permet une spécificité et une sensibilité accrues de l'analyse (Wild, 1990).

5.2) Le postmarquage au ^{32}P

Cette technique mise au point par Randerath et ses collaborateurs (Randerath *et al.*, 1981 ; 1989) permet de séparer et de doser les nucléotides modifiés sans qu'il soit nécessaire de connaître leur structure chimique exacte. Elle est basée sur le marquage au [^{32}P]-phosphate des désoxyribonucléosides 3'-monophosphates, obtenus par hydrolyse enzymatique de l'ADN. Ce marquage est obtenu par transformation en désoxyribonucléosides -[^{32}P]-5'-3'diphosphate par la polynucléotide kinase en présence de [γ - ^{32}P]-ATP. Une chromatographie généralement bidimensionnelle permet de séparer les adduits des nucléotides non modifiés. Les adduits sont quantifiés par autoradiographie ou comptage en scintillation liquide. Ainsi une limite de détection de 1 adduit pour 10^8 nucléotides a été atteint pour les composés polycycliques (article de synthèse, Dirheimer, 1986).

Les petits adduits de type 7-alkylguanines peuvent être également évalués par postmarquage au ^{32}P avec une sensibilité de l'ordre de 1 adduit pour 10^7 nucléotides (Hemminki et Mustonen, 1990 ; Mustonen et Hemminki, 1992).

5.3) Postmarquage fluorescent

Le postmarquage fluorescent sera traité suivant trois approches différentes (article de synthèse ; Shuker *et al.*, 1993).

5.3.1) Détection des adduits à l'ADN (*in situ*) suite à une exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les adduits dérivant de la réaction du benzo(a)pyrenediol-époxyde (BPDE) avec l'ADN ont été très étudiés. Ces adduits contiennent un groupe pyrenyl très fluorescent, mais la mesure de

cette fluorescence ne peut se faire qu'après hydrolyse de l'ADN ; avec l'ADN, la fluorescence est minimale.

Ces adduits dérivant des diol-époxydes ont également un groupe caractéristique *cis-vic*-diol qui peut interagir sélectivement avec les acides boroniques pour former un diéster cyclique stable. La synthèse d'une sonde fluorescente contenant un groupe fluorescéine et un acide boronique (N-(5-fluoresceinyl)-N'-(3-boronatophényl)-thiourée ou FABA) permet de mesurer directement les adduits sur l'ADN. Cette méthode permet de détecter un résidu FABA pour 10^5 bases. Elle est spécifique des groupes d'adduits dérivés des anti-diol-époxydes qui sont les isomères les plus cancérigènes (Uziel et Houck, 1991).

5.3.2) Détection des nucléosides-5'-monophosphates par marquage à l'aide du Dansyl-chloride

Cette méthode consiste à fixer un fluorophore 5-diméthylaminophthalen, 1-sulfonylchloride (Dansyl chloride) sur l'extrémité 5'phosphate d'un acide nucléique. Cette liaison se fait avec le résidu 5'phosphate des mononucléotides qui ont été modifiés via une 5'-phosphoramidation avec l'éthylenediamine (Kelman *et al.*, 1988).

Cette approche a été utilisée pour détecter les résidus 8-hydroxydésoxyguanosine 5'-monophosphate (8-OH dGmp) dans un ADN de thymus de veau irradié (rayon X). La limite de détection est une base oxydée sur 10^6 nucléotides normaux en utilisant un détecteur de fluorescence conventionnel. La fluorescence laser devrait permettre d'améliorer cette détection (Sharma *et al.*, 1990).

5.3.3) Modification des alkylguanines par les malondialdéhydes substituées

Cette méthode consiste à convertir la guanine en un réactif très fluorescent grâce à la malondialdéhyde en solution acide (Moschel et Leonard, 1976). Cette réaction de dérivation spécifique de la guanine semblait insensible à la nature du groupe alkyl en position 7 de la guanine. Sabbioni *et al.* (1986) ont donc préparé des dérivés de la 7-méthylguanine par réaction avec la phénylmalondialdéhyde (PhMal) et la pentafluorophénylmalondialdéhyde (PFMal). Les dérivés PFMal sont très fluorescents mais s'hydrolysent facilement.

Cette approche de dérivation des 7-alkylguanines a fait l'objet d'une partie de notre travail (chapitre 4).

5.4) Méthodes chromatographiques

Les méthodes chromatographiques sont couramment utilisées pour la détection et la purification des adduits.

La séparation par chromatographie liquide haute performance (CLHP) est une méthode très employée. Le mode de détection est fonction des molécules étudiées. Par exemple la fluorescence peut-être utilisée pour détecter de nombreux types d'adduits : adduits N7-guanine de l'aflatoxine B1 et adduit à la 7-méthylguanine (Bennett *et al.*, 1981 ; Herron et Shank, 1979).

Cependant, la spectrofluorimétrie conventionnelle est remplacée par des modes de détection plus sensibles comme la spectrofluorimétrie d'excitation synchrone (Harris *et al.*, 1986 ; Baudot et André, 1992).

Un autre mode de détection de grande sensibilité couramment utilisé est fondée sur l'électrochimie (Park et Ames, 1989). Cependant, la nature des nucléotides modifiés et l'utilisation d'un gradient de solvant pour leur séparation en CLHP rend leur analyse difficile en une seule étape .

La chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM) est largement utilisée pour la détection des adduits. Dans ce cas, une extraction et une dérivation afin d'augmenter leur volatilité est nécessaire (Shuker *et al.*, 1991 ; Friesen *et al.*, 1991).

6) Intérêt du dosage des adduits

6.1) Notion de doses biologiques effectives

Les études épidémiologiques, les essais sur les animaux de laboratoires et les tests *in vitro* permettent d'identifier les substances potentiellement cancérogènes chez l'Homme. Les essais sur les animaux mettent en évidence des relations dose-réponse, mais ces essais sont peu sensibles pour les faibles expositions (Tomatis, 1985).

Les essais *in vitro* donnent des indications sur le potentiel cancérogène et le métabolisme des molécules chimiques mais requièrent l'extrapolation d'une situation *in vitro* à une situation *in vivo* ce qui peut conduire à des erreurs d'interprétation.

Quant aux études épidémiologiques, le temps de latence de l'apparition de la maladie étant long, il est difficile d'évaluer les expositions rétrospectivement (Weinstein, 1991).

De même, les mesures des concentrations de produits chimiques dans l'environnement (air, eau,...) sont relativement imprécises pour déterminer une exposition au niveau individuel. En

effet, ces mesures ne tiennent pas compte de la variation qui peut exister entre les individus dans l'absorption, le métabolisme, la pharmacocinétique et la distribution des composés.

La détection des adduits permet, grâce au développement de méthodes très sensibles, de mesurer directement chez l'Homme l'exposition à des concentrations de cancérogènes rencontrés dans l'environnement (Farmer *et al.*, 1987).

L'évaluation des adduits permet de mesurer la "dose biologique effective" qui représente la quantité de cancérogène ou de son métabolite qui réagit avec les macromolécules cellulaires comme l'ADN au niveau des tissus cibles (Perera, 1987). La mesure des adduits permet donc d'évaluer l'interaction d'un cancérogène avec une cible critique.

6.2) Notion d'épidémiologie moléculaire

L'épidémiologie moléculaire consiste à mettre en relation des effets biochimiques produits par un cancérogène sur différents individus au risque d'apparition d'un cancer. Cette approche permet de tenir compte des facteurs d'hôtes (génétiques et métaboliques - articles de revue : Harris, 1989 ; Perera, 1987, Perera *et al.*, 1990 ; Weinstein 1991 ; Wogan, 1992). Ainsi, la détection des adduits à l'ADN ou aux protéines constitue un marqueur d'exposition qui peut être intégré dans les études épidémiologiques. D'autres marqueurs sont également considérés dans le cadre de l'épidémiologie moléculaire *e.g.* les réponses cellulaires précoces aux atteintes chromosomiques (sister chromatic exchange, micronoyaux), les mutations au niveau des oncogènes ou des gènes de la suppression tumorale (p 53) (Figure 8).

6.3) Applications : mesure d'expositions

Les premières applications de la mesure des adduits de l'ADN comme mesure d'expositions à une substance cancérogène, concernées la surveillance biochimique de populations exposées au benzo(a)pyrène (Perera *et al.*, 1982) et aux aflatoxines (Groopman *et al.*, 1985). Depuis lors, l'analyse des adduits de l'ADN dans le but de contrôler l'exposition à des cancérogènes chimiques connaît un essor important. Ces mesures entrent dans le cadre d'études préventives pour les risques de cancer. Dans le cadre d'une surveillance biochimique, l'analyse des adduits de l'ADN des lymphocytes T, des monocytes ainsi que les adduits à l'hémoglobine ou à l'ovalbumine permet d'évaluer les expositions sur plusieurs mois subies par un individu.

La mesure des adduits réparés et excrétés dans l'urine, constitue une méthode non invasive permettant de mesurer les expositions récentes (article de synthèse : Shuker et Farmer, 1992). Les expositions peuvent être classées en quatre groupes : (1) les expositions liées au "mode de vie", c'est à dire le comportement individuel (alimentaire, consommation d'alcool, de tabac)

qui représente la source principale des expositions (Doll et Peto, 1981 - voir paragraphe 1), (2) les expositions professionnelles, (3) les expositions environnementales ainsi que (4) les expositions iatrogènes.

Seules les expositions liées à l'alimentation feront l'objet d'un développement.

L'exposition aux cancérogènes due à l'alimentation peut être le résultat d'une contamination directe des aliments par un cancérogène ou une contamination par des précurseurs des substances cancérogènes. Dans ce dernier cas les aliments contiennent des composés précurseurs qui après ingestion sont transformés en produits cancérogènes.

6.3.1) Contamination alimentaire par des cancérogènes

La contamination de céréales par les aflatoxines produites par les champignons du genre *Aspergillus* constitue un facteur de risque de cancérisation du foie. De fait, plusieurs études ont été menées afin de développer un biomarqueur qui permettrait de mesurer l'exposition à ces cancérogènes. L'aflatoxine B1 est métabolisée par les enzymes du cytochrome P450 en un métabolite réactif (8,9-époxyde) qui réagit avec l'ADN (en position 7 de la guanine) et la serum albumine (au niveau des lysines). Cette activation métabolique varie selon les individus entraînant des niveaux différents d'adduits (Groopman *et al.*, 1988). Wild *et al.* (1990) ont montré la présence d'adduit à l'albumine chez les individus exposés à l'aflatoxine B1. De même, une bonne corrélation existe entre la concentration en adduits aflatoxine-N⁷-guanine mesurée dans l'urine et l'ingestion d'aflatoxine B1 chez une population chinoise (Groopman *et al.*, 1992).

Le dosage des adduits à l'albumine permettrait d'évaluer les expositions à moyen terme, alors que les adduits urinaires permettraient d'apprécier les expositions à court terme. L'évaluation de l'exposition à l'aflatoxine B1 est d'autant plus importante que cette mycotoxine induit une mutation principale (transversion G→T) *in vitro*, qui est retrouvée sur plus de 50 % des fumeurs au niveau d'un point chaud (codon 249) du gène p53 (Hsu *et al.*, 1991, Bressac *et al.*, 1991 ; Groopman, 1992).

La viande grillée au charbon de bois peut également entraîner une exposition aux hydrocarbures polycycliques aromatiques (HPA). Une étude sur des volontaires montre que la consommation de boeuf grillé (280 g par jour) durant une période de sept jours entraîne une augmentation significative des adduits caractéristiques de l'exposition aux HPA dans l'ADN des globules blancs. Cependant, le nombre de sujets (quatre exposés et quatre témoins) de cette étude étant restreint, ces résultats doivent être confirmés (Rothman *et al.*, 1990 ; Schut et Shiverick, 1992).

Des nitrosamines et des composés nitrosés (CNO) peuvent être également présents dans l'alimentation (voir paragraphe 2.2.2)

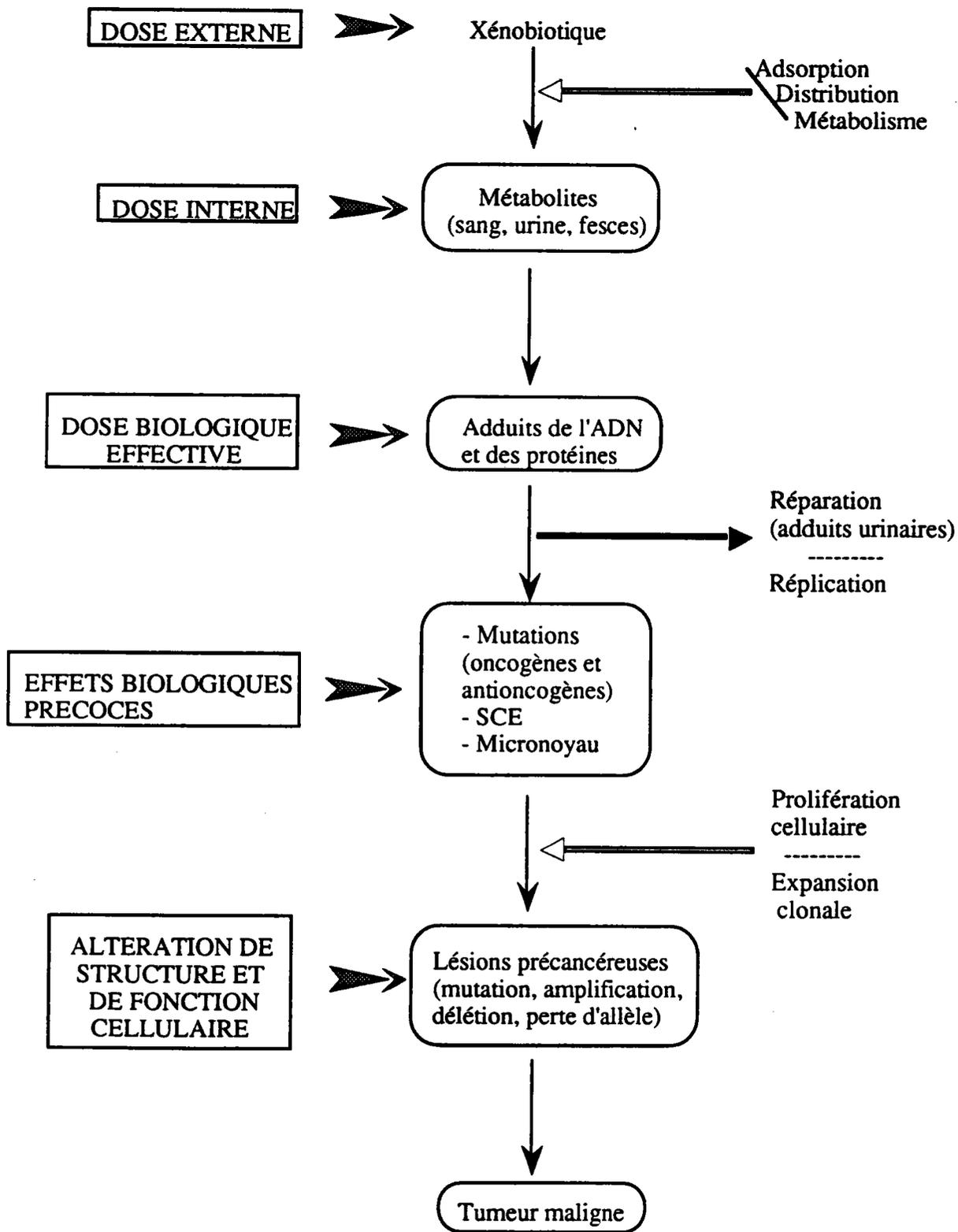


Figure 8 : Biomarqueurs pour l'épidémiologie moléculaire et leur liaison avec le processus de cancérisation (d'après Weinstein, 1991 ; Wogan, 1992)
 (SCE = sister chromatic exchange)

6.3.2) Contamination alimentaire par des précurseurs cancérogènes

Les CNO peuvent être formés *in vivo* à partir de précurseurs contenus dans l'alimentation (voir chapitre 2.2.2). Les nitrites et les nitrates peuvent être synthétisés *in vivo* par les bactéries, les macrophages activés et les neutrophiles. Chez ces deux derniers, l'oxyde nitrique synthase (NOS) catalyse la formation de l'oxyde nitrique (NO), espèce radicalaire qui pourrait entraîner la formation de nitrosamines, déminer et oxyder les bases de l'ADN (Bartsch *et al.*, 1992).

Les métabolites réactifs des nitrosamines conduisent à différents types d'adduits. Le niveau d'Q⁶-méthyl-désoxyguanosine (Q⁶-MedG) mesuré dans l'ADN de l'oesophage est particulièrement élevé chez les patients atteints de cancer dans une région de Chine où l'alimentation est contaminée par les nitrosamines (Umberhauer *et al.*, 1985). Les lésions Q⁶-méthyl-désoxyguanosine dans l'ADN de tissu gastrique pourrait rendre compte de l'activation de l'oncogène "ras". Cependant, ces études ne permettent pas d'établir une relation entre le degré d'alkylation dans l'ADN et l'incidence du cancer gastrique (Hall *et al.*, 1991).

De plus, les concentrations en 3-Méthyladénine, en 7-méthylguanine ainsi qu'en nitrate et en N-nitrosoprolin mesurés dans les urines de population à haut risque pour le cancer gastrique (colombien), n'ont pu être corrélées aux observations cliniques (Stillwell *et al.*, 1991).

Les peptides peuvent également être convertis en N-nitrosopeptides dont certains sont mutagènes et stables dans les conditions physicochimiques de l'estomac. De plus, ces produits sont décomposables en acides diazotiques et diazopeptides qui sont des agents alkylants (Challis, 1989). Néanmoins, le rôle de ces composés dans l'étiologie du cancer de l'estomac reste à démontrer.

Chapitre 2
OBJECTIFS

Ce projet a pour objectif de développer une technique d'évaluation des 7-alkylguanines d'ADN incubé avec un liquide biologique nitrosé chimiquement afin d'en déduire sa génotoxicité.

1) Bases scientifiques du projet

Les fluides biologiques, comme les sucs gastriques ou les urines, peuvent contenir des substances génotoxiques ou leurs précurseurs qui joueraient un rôle dans le développement des cancers. Par exemple, des mutagènes ont été détectés dans les urines de fumeurs de tabac brun qui sont vraisemblablement responsables du cancer de la vessie (Yamasaki et Ames, 1977 ; Malaveille *et al.*, 1989). De même, les taux de composés nitrosés ou leurs précurseurs sont plus élevés dans les sucs gastriques de patients atteints de gastrite chronique (Bartsch *et al.*, 1989). Cependant, il n'est pas encore établi que la formation des CNO (composés N-nitrosés) chez les patients présentant un estomac achlorhydrique (conditions précancéreuses) est supérieure à celle effectuée dans les estomacs ne présentant pas ces symptômes (Pignatelli *et al.*, 1993).

Les composés nitrosés présents dans les sucs gastriques jouent un rôle important dans l'alkylation de l'ADN. Kyrtopoulos *et al.*, (1987) ont montré le pouvoir éthylant et méthylant de suc gastrique après nitrosation en évaluant la formation de l'O⁶-méthyl-2'-déoxyguanosine et l'O⁶-éthyl-2'-déoxyguanosine à partir de la 2'-déoxyguanosine. Ils ont également montré la possibilité de formation d'O⁶-alkylguanine dans de l'ADN, suite à une incubation avec des sucs gastriques. De même, Chen *et al.*, (1991) ont évalué la formation de 7-méthylguanine d'un ADN de thymus de veau incubé avec des sauces de poissons.

Il semble de plus en plus probable que la grande majorité des produits formés par nitrosation intragastrique ne possède pas un groupe N-NO. De ce fait, l'analyse par la technique de la chromatographie gazeuse couplée à un analyseur d'énergie thermique (GC-TEA) n'est pas possible, d'autant plus que ces produits sont relativement instables. Par exemple, la partie amine terminale (-NH₂) des peptides peut être transformée en dérivés diazo (C=N⁺=N) en présence de composés nitrosés. Ces dérivés diazo peuvent donner des agents alkylants (ion diazonium) (article de synthèse, Challis, 1989).

Vu la diversité des produits présents dans l'alimentation, la nourriture, un grand nombre de précurseurs peuvent se trouver dans les sucs gastriques. La muqueuse stomacale se trouve donc potentiellement exposée à un vaste mélange de produits alkylants.

Les adduits majeurs produits par de nombreux agents alkylants sont sur la position N7 de la 2'-déoxyguanosine (Singer et Grunberger, 1983 ; Lawley, 1984).

Compte tenu de ces travaux, il apparaît donc possible d'incuber de l'ADN de thymus de veau dans un liquide biologique (suc gastrique) afin d'évaluer la formation des N7-

alkyldéoxyguanosine dans l'ADN. Les N7-alkyldéoxyguanosine sont instables, par conséquent l'ADN peut-être facilement dépuriné pour donner des N7-alkylguanines correspondantes. Ces N7-alkylguanines possèdent des propriétés de fluorescence et peuvent donc être analysées en CLHP (Herron et Shank, 1979), ou par méthodes immunochimiques comme l'ELISA (par exemple pour la 7-MeGua, Shuker, 1988).

2) Approche expérimentale

De l'ADN de thymus de veau ("ADN sonde") est incubé avec un fluide biologique pouvant contenir des agents alkylants. Après dépurination de cet ADN, les N7-alkylguanines contenues dans le surnageant de dépurination sont analysées après purification et concentration sur colonne d'immunoaffinité au moyen de la CLHP couplée à un détecteur de fluorescence.

Le premier objectif de ce projet a donc été d'obtenir un antisérum de lapin afin de préparer des colonnes d'immunoaffinité. Cet antisérum doit reconnaître une gamme aussi large que possible de N7-alkylguanines. En effet, les études précédentes (Eberle *et al.*, 1990) montrent qu'il est possible d'obtenir un anticorps (dans leur cas monoclonal) capable de reconnaître une série de 3-alkyladénines.

Ainsi, la chromatographie d'immunoaffinité constitue la phase préparative précédant l'analyse quantitative des échantillons par CLHP.

La combinaison de la chromatographie d'immunoaffinité à une méthode analytique non immunologique permet d'augmenter la sensibilité et spécificité d'analyse puisqu'elle repose sur la reconnaissance des produits par les anticorps et sur un second critère qui est dans notre étude la propriété de fluorescence (Wild 1990, Prevost *et al.*, 1990 ; Friesen *et al.*, 1991).

Le second objectif consiste en l'amélioration de la fluorescence des 7-alkylguanines par réaction avec la phénylmalondialdéhyde. Comme nous l'avons vu dans le paragraphe 5.3.3 du chapitre 1), cette substance réagit avec la 7-méthylguanine pour donner un composé très fluorescent (Sabbioni *et al.*, 1986). Cette réaction de dérivation sera appliquée pour toute une série de 7-alkylguanines (Figure 9).

Une approche complémentaire avait été envisagée au départ de ce projet. (Figure 9) Elle consistait à effectuer un dosage des sites apuriques directement dans l'ADN au moyen d'une sonde fluorescente spécifique. L'idée initiale était de développer une sonde fluorescente composée d'un fluorophore couplé à une adénine. Cette approche a été réalisée en

collaboration avec l'équipe du Professeur J. Lhomme (LEDSS, UA CNRS 332, Université scientifique et médicale de Grenoble). Compte tenu du caractère préliminaire des résultats obtenus, nous avons préféré les rapporter dans le chapitre "perspectives et conclusions", en sachant bien qu'un développement futur est envisagé.

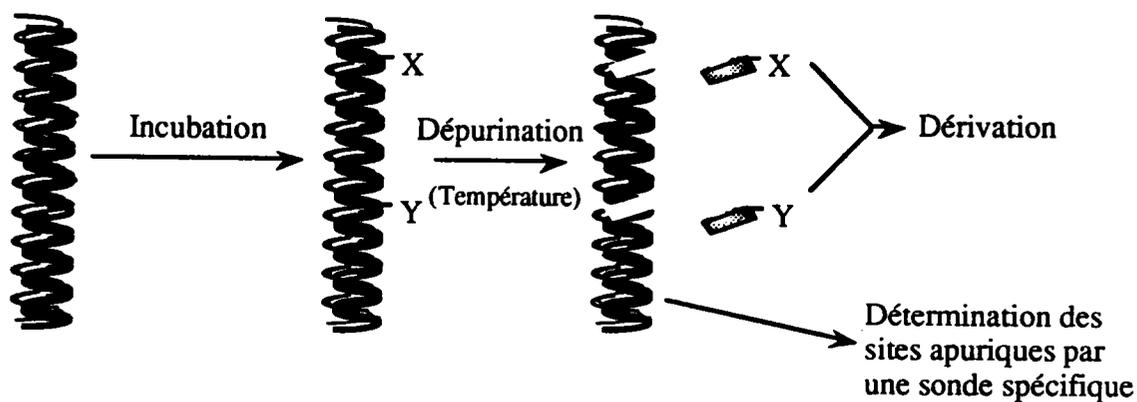


Figure 9 : Incubation d'un ADN dans un fluide biologique suivi de la détermination des 7-alkylguanines (X et Y) et des sites apuriques

Chapitre 3

ANALYSE DES 7-ALKYLGUANINES PAR SPECTROFLUORIMETRIE APRES PURIFICATION IMMUNOCHIMIQUE

Ce chapitre consacré à l'analyse CLHP avec détection de fluorescence des 7-alkylguanines de l'ADN incubé dans un fluide biologique est composé de deux parties :

- La première concerne le développement des colonnes d'immunoaffinité pour la purification des 7-alkylguanines contenues dans le surnageant de dépurination de l'ADN. Cette partie comprend (i) la synthèse des antigènes pour traiter les lapins, (ii) la caractérisation de l'antiserum par des essais ELISA compétitifs, (iii) la préparation des colonnes d'immunoaffinité et la détermination de leur capacité de rétention des 7-alkylguanines.

- La seconde partie est constituée (i) de la validation du protocole de traitement de l'ADN, de la purification et de l'analyse des 7-alkylguanines, (ii) l'application pour la mise en évidence de la présence éventuelle d'agents alkylants dans les sucs gastriques.

1) Chromatographie d'immunoaffinité

1.1) Introduction

Le principe de base des colonnes d'immunoaffinité repose sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre une base modifiée ou une famille de composé. Ces anticorps étant fixés par la fraction Fc de l'IgG à une protéine A de *Staphylococcus aureus* laissant libre le site de liaison à l'antigène. Nous avons vu dans le chapitre consacré à la bibliographie, qu'il était possible d'obtenir des anticorps capables de reconnaître différents types de bases modifiées (Eberle *et al.*, 1990), aussi cette étude a pour but d'obtenir des anticorps reconnaissant différentes 7-alkylguanines. Les bases modifiées étant de trop faible poids moléculaire pour induire une réponse immunitaire chez l'animal, le couplage préalable à une protéine porteuse est indispensable

1.2) Matériel et méthodes

1.2.1) Synthèse des antigènes d'immunisation et d'enrobage

Ces expériences ont pour but d'obtenir des anticorps reconnaissant une famille de composé *i.e.* les 7-alkylguanines. La synthèse utilisée est un exemple classique de couplage d'un haptène à une protéine porteuse (Friesen *et al.*, 1981)

L'albumine bovine méthylée (mBSA, Sigma, 100 mg) ou de l'ovalbumine (Sigma) est dissoute dans de l'eau distillée (7,5 ml), la solution est ajustée à pH= 6,5, et incubée en présence de N-éthyl-N'-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC, 200 μ M). 2 ml d'une solution de 7(2-carboxyéthyl)guanine (7CEGua, 100 μ M) en solution dans de l'eau (ajouter 20 μ l de NaHCO₃ saturé pour assurer la limpidité de la solution) sont ajoutées par fraction de 100 μ l sur une période de 3 heures. Le pH devant être maintenu à 6,5 (voir schéma de synthèse au paragraphe 1.4.1)

La protéine modifiée est purifiée sur colonne de gel séphadex G-50 M (Pharmacia Fine Chemicals Uppsala Suède, 40 cm, 2,5 cm de diamètre pour l'exclusion des molécules de poids moléculaires inférieurs à 20000) afin d'éliminer l'excès d'haptène.

L'éluant est une solution acide de chlorure de sodium (NaCl 0,15 M, HCl 0,05 M) ; l'acide permet l'élution de la protéine en introduisant une charge positive sur le groupement 7CEGua de la protéine. Le système de chromatographie liquide est constitué d'un détecteur UV et d'un collecteur de fraction (modèle FC 220, Gilson). Le premier pic élué est détecté à une longueur d'onde $\lambda = 254$ nm. La solution de protéine modifiée obtenue est dialysée contre de l'eau à 4°C et concentrée à l'aide d'un dialyseur concentrateur Micro - Prodicon modèle 320 (Bio-molecular Dynamics, Beaveiton, OR, USA). Une membrane de dialyse tubulaire (Pro-DiMem PA-10) permet l'exclusion des molécules dont le poids moléculaire est de 10000 environ.

La solution de conjugué est alors lyophilisée. L'efficacité de la réaction de couplage est déterminée à partir de l'absorption à 280 nm de la solution du conjugué et de celle d'une solution de la protéine porteuse seule (mBSA ou ovalbumine) de même concentration. Les coefficients d'absorption molaire de l'haptène et de la protéine sont supposés ne pas avoir été modifiés par le couplage.

1.2.2) Immunsation des lapins

Deux lapins sont traités par des injections sous cutanées au niveau du cou et du dos, d'une émulsion de 1 mg de conjugué nucléoside-protéine dans de l'eau avec de l'adjuvant complet de Freund (volume total des injections : 1 ml). Quatre semaines après les premières injections, les animaux reçoivent un premier rappel. 8 semaines plus tard, les lapins reçoivent deux injections intramusculaires de 0,5 ml d'une solution de 500 μ g de conjugué émulsionné avec 1 ml d'adjuvant de Freund incomplet. Quatorze semaines après le début du traitement, le sang des animaux est recueilli après sacrifice (Immunsation effectuée à l'élevage Scientifiques des Dombes, Roman, Ain).

1.2.3) Réactivités croisées de l'antisérum

Les réactivités croisées de l'antisérum pour les différentes bases sont évaluées par des essais ELISA de type compétitifs .

Les analyses ELISA sont réalisées sur des plaques rigides de microtitration à 96 puits (Dynatech M 129B, Poly Labo Block, Strasbourg, France)

Un échiquier de croisement permet de faire varier la quantité d'antigène d'enrobage (entre 1 et 50 ng/puit) et le taux de dilution (entre 1/10 et 1/10⁵) de l'antisérum afin de fixer ces paramètres pour les analyses ELISA compétitif.

Conditions de réalisation des ELISA compétitifs

Etape 1 : La paroi des 96 puits est enduite au moyen de 40 µl d'une solution de 7CEG-OVAL diluée dans du tampon PBS azide à raison de 40 ng/puit. Les plaques sont séchées une nuit à 37°C. Ces plaques peuvent alors être conservées environ 2 mois à l'abri de la lumière et à température ambiante.

Etape 2 : Cette étape est réalisée à 4°C. Les cupules sont lavées 6 fois dans un bain de tampon PBS-Tween (0,05%) puis séchées sur du papier adsorbant. 25 µl d'une solution de 7-alkylguanine (inhibiteur) dilué dans du tampon PBS sont réparties dans les puits afin d'obtenir une gamme de concentration de 1 à 10⁷ fmoles/puit. 25 µl d'antisérum (dilué à 1/40000 dans du tampon PBS) sont répartis dans chaque puit. Les contrôles positifs ne contiennent que l'antisérum (50 µl) et permettent de définir l'absorbance maximale. Les contrôles négatifs sont réalisés avec 50 µl de tampon PBS). Le mélange antigène-anticorps est incubé 15 min à 4°C. Les puits sont ensuite vidés et lavés 6 fois dans un bain de PBS-Tween toujours à 4°C.

Etape 3 : 50 µl d'anticorps de chèvre (dilution 1/5000) dirigé contre les IgG de lapin et couplé à la peroxydase (Sigma n°A6154, St Louis, MO, USA) sont ajoutés à chaque puit et incubés 90 min à température ambiante. les puits sont vidés et lavés avec du PBS-Tween puis 2 fois avec de l'eau ultrapure (Millipore).

Etape 4 : 50 µl d'une solution de substrat constituée de 10 ml de tampon citrate (50 mM, pH = 5) contenant 1 mg de tétraméthylbenzidine (dans 0,1 ml de DMSO) et 2 µl d'eau oxygénée à 30 % sont ajoutés dans chaque puit au moyen d'une pipette à huit canaux (Socorex ISBA Sa, Renens, Suisse). La microplaque est alors incubée 40 minutes à température ambiante.

Etape 5 : La réaction est stoppée par l'addition de 50 µl d'acide chlorhydrique (1 M). Les absorbances sont alors mesurées à 450 nm au moyen d'un lecteur automatique de

microplaque Bio-Kinetics Reader EL 312 (OSI, Paris, France) couplé à un ordinateur Victor V286C.

D'un point de vue pratique, les essais sont réalisés de la manière suivante sur une plaque de microtitration de 96 puits (12 colonnes, 8 puits par colonne). Les colonnes 1, 6, 11 sont réservées aux contrôles positifs, la colonne 12 au contrôle négatif et les autres colonnes reçoivent les différentes concentrations en 7-alkylguanines (de 1 à 10^7 fmole/puit).

1.2.4) Préparation de la fraction IgG de l'antisérum

Les anticorps (IgG) de 16 ml de sérum de lapin sont précipités par l'addition de 10,6 ml d'une solution saturée de sulfate d'ammonium (concentration finale de 40 %). Après une agitation douce pendant 30 min, le précipité est récupéré par centrifugation (1700 g) et lavé deux fois avec une solution de sulfate d'ammonium à 50 %. Après centrifugation (10 min, 1700 g), le culot est remis en suspension dans 16 ml de PBS et dialysé à 4°C pendant environ 12 heures contre 4 litres de PBS afin d'éliminer l'excès de sel. Le dialysat est centrifugé (10 min, 1700 g), le culot obtenu est éliminé alors que le surnageant constitue la fraction IgG utilisée pour la préparation des colonnes d'immunoaffinité.

1.2.5) Préparation des colonnes d'immunoaffinité

Le protocole utilisé dans notre laboratoire (Friesen *et al.*, 1991) correspond avec quelques modifications à celui de Goding, 1986.

6 ml de gel de protéine A-sépharose CL4B (Pharmacia Uppsala, Suède) sont lavés dans du tampon Tris (0,1 M, pH = 7,4), puis mis en suspension dans ce même tampon dans un volume total de 12 ml. La fraction d'anticorps (IgG) dialysée (voir paragraphe 1.2.4) est alors ajoutée à la suspension de gel et incubée pendant 30 min à température ambiante sous agitation douce. Le gel est récupéré par une centrifugation lente (10 min, 1700 g) et lavé 2 fois dans du tampon Tris pour éliminer les anticorps non liés. Le gel est ensuite lavé avec un tampon triéthanolamine (0,2 M, pH = 8,2). Après centrifugation (1700 g), le gel est traité avec 50 ml de diméthylpimélimidate (Pierce, 20 mM, réalisé extemporanément dans le tampon triéthanolamine) et agité 45 min à température ambiante.

Le gel est centrifugé (1700 g) et traité par 50 ml d'une solution d'éthanolamine (20 mM dans du tampon triéthanolamine) pendant 5 min. Ensuite, le gel est récupéré puis lavé 3 fois avec du tampon PBS-azide. Il est alors conditionné dans des microcolonnes en polystyrène (Pierce) munie de "frités" hydrophobes (Pierce) par volume de 1,5 ml. Dans cette expérience, le gel obtenu, ayant une grande capacité (2 nmoles), a été dilué par 6 ml de gel de Sépharose CL4B

(Pharmacia). Cette méthode permet ainsi de réduire le coût de préparation des colonnes d'immunoaffinité.

1.2.6) Synthèse de la [^{14}C] 7-éthylguanine

La synthèse de la [^{14}C] 7-éthylguanine consiste à incuber la [^{14}C]guanosine à haute activité spécifique avec l'iodoéthane en solution dans le diméthylacétamide (DMA) et à hydrolyser en milieu acide le nucléoside alkylé (Figure 11).

Pratiquement, la guanosine ($\text{U-}^{14}\text{C}$, 5 μCi , 0,01 μmole) est mise en solution dans du DMA (10 μl) contenant 0,05 μmole d'iodoéthane. La synthèse est réalisée à l'abri de la lumière pendant une nuit sous agitation et à température ambiante. Le solvant est alors évaporé et le résidu obtenu est redissous dans 10 μl d'acide chlorhydrique (HCL 0,1M) puis chauffé 1 heure à 100°C.

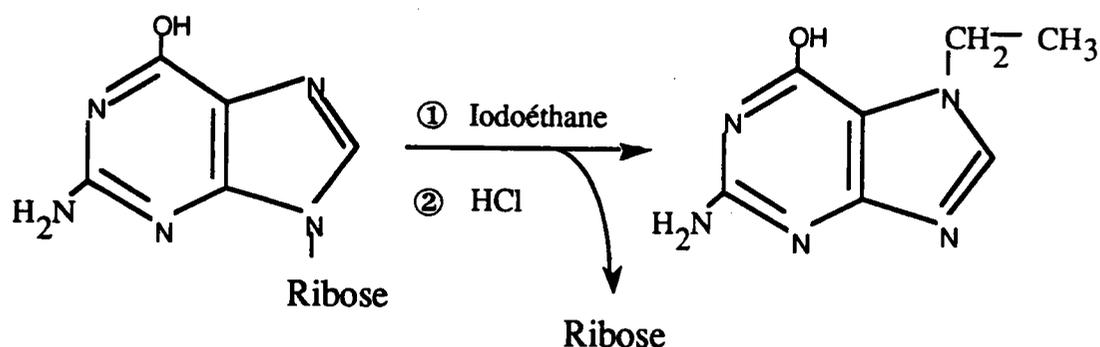


Figure 11 : Schéma de réaction de synthèse de la [^{14}C] 7-éthylguanine

Après évaporation et redissolution dans l'acide heptafluorobutyrique (HFBA, 0,1%, Pierce), le produit est purifié par CLHP sur colonne phase inverse Nucléosil C18 (Magnum, 10 μm , Société Française de Chromatocolonne, Eragny France) avec détection UV ($\lambda = 260\text{nm}$). Le gradient d'éluion est de type linéaire (90 % A à 20 % de B en 20 min) constitué de HFBA (0,1 %) pour le solvant A et de méthanol (HPLC grade, Merck) pour le solvant B.

Le pic correspondant à la 7-éthylguanine est collecté, le solvant est évaporé puis le résidu est repris dans un mélange HCl 0,1 M, tampon PBS. Cette solution constitue le standard interne à haute radioactivité (250 mCi/ mmole de 7-éthylguanine).

1.2.7) Utilisation des colonnes d'immunoaffinité

Afin de tester les performances des colonnes d'immunoaffinité, on utilise comme composé de référence une des 7-alkylguanines ayant une bonne réactivité croisée avec l'antisérum. Pour cela, la 7-éthylguanine a été choisie et par la suite nous avons synthétisé l'analogue structural marqué au carbone 14 qui sera utilisé comme standard interne.

Le principe d'utilisation des colonnes d'immunoaffinité est le suivant : 3,6 pmoles de 7-éthylguanine correspondant à environ 2000 dpm en solution dans 2 ml de tampon PBS (4°C) contenant différentes concentrations de bases à tester, sont appliquées sur une colonne d'immunoaffinité préalablement équilibrée par rinçage avec du tampon PBS à 4°C. La colonne est lavée par du tampon PBS (3 ml) puis par 10 ml d'eau ultra pure (eau MilliQ, Millipore), cette opération étant réalisée à 4°C. La ¹⁴C 7-éthylguanine est éluée par 5 ml d'acide acétique (1M) à température ambiante. Les éluats sont récupérés par fraction de 1 ml, la radioactivité est mesurée par un compteur à scintillation (modèle LS 1801, Beckmann) après avoir ajouté 4 ml de liquide scintillant (Ready Safe, Beckmann) à chaque fraction.

1.2.8) Conditions de séparation CLHP des différentes bases

Le système chromatographique utilisé est constitué de deux pompes Waters (Modèle 510, Water Assoc. Inc., Milford, USA), d'un contrôleur automatique de gradient Waters (Modèle 680), d'un détecteur de fluorescence (Spectroflow 980, ABI Analytical Kratos division, Ramesey, NJ, USA) et d'un intégrateur Modèles SP 4290 V (Spectra Physics Inc). La séparation des 7-alkylguanines se fait sur colonne phase inverse Ultrasphère ODS, 5 µm (150 x 6 mm, Beckmann) munie d'une précolonne Ultrasphère ODS, 5 µm (4,6 x 4,5) en utilisant un gradient linéaire d'acide heptafluorobutyrique 0,1 % v/v (HFBA, HPLC grade, Pierce) et d'acétonitrile (HPLC grade, Rathburn Chemicals LTD). L'éluion se fait à température ambiante. La limite de détection est de 35 à 40 pmoles de 7-alkylguanine dans ce système.

1.3) Protocole expérimental

Les expériences se sont déroulées de la manière suivante. Dans un premier temps, nous avons synthétisé les Ag d'immunisation et d'enrobage (cf paragraphe 1.2.1). Après immunisation des lapins (paragraphe 1.2.2), le sérum obtenu est caractérisé par des essais ELISA permettant de définir les différentes réactivités croisées (paragraphe 1.2.3) et d'effectuer des colonnes d'immunoaffinité (paragraphe 1.2.4 et 1.2.5). Afin d'étudier le

fonctionnement des colonnes et de définir leur capacité de rétention pour les différentes bases, une base marquée au [^{14}C] et reconnue par l'antisérum, sert de standard interne.

1.4) Résultats

1.4.1) Synthèse des antigènes d'immunisation et d'enrobage

Cette synthèse conduit pour l'antigène d'immunisation à la 7-(2-carboxyéthyl)guanine-méthylserumalbumine bovine (7-CEtGua-mBSA) et à la 7-(2-carboxyéthyl)guanine ovalbumine (7 CEGua-OVAL) pour l'antigène d'enrobage (Figure 12).

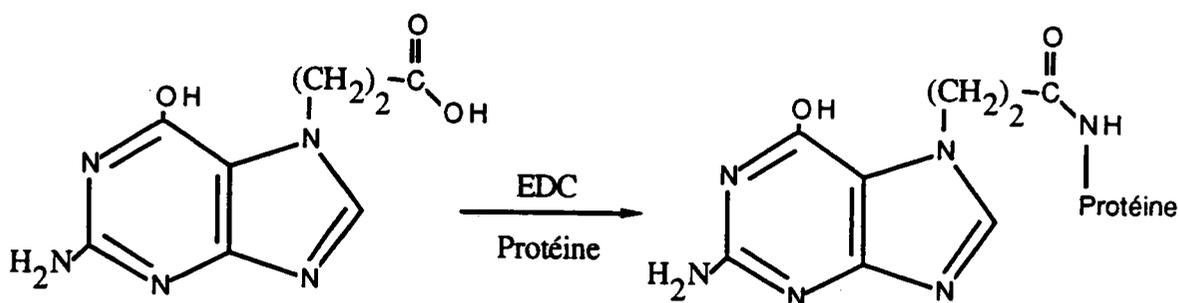


Figure 12 : Synthèse des antigènes 7-carboxyéthylguanine-proteine (7-CEtGua-proteine)

La 7-CEtGua a été synthétisée à partir d'une alkylation de la guanosine par la β -propiolactone (2 minutes à 110°C). La 7-carboxyéthylguanosine ainsi obtenue est hydrolysée dans une solution d'HCl (2 moles/l) à 100°C pendant une heure (Roberts et Warwick, 1963).

La pureté du produit est $>95\%$ par CLHP. Le couplage de l'haptène à la protéine porteuse se fait en phase aqueuse par du N'-éthyl-N'-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC).

Le rendement obtenu pour l'antigène d'immunisation est de 21%, le taux de couplage calculé par l'absorption UV est de 13 moles de 7(2-carboxyéthyl)guanine par mole de mBSA.

Le rendement obtenu pour l'antigène d'enrobage est de 19% et le taux de couplage est de 10 moles de 7(2-carboxyéthyl)guanine par mole d'ovalbumine. Malgré un faible rendement dû à une perte de produit lors de la lyophilisation, la quantité de protéine conjuguée récupérée est largement suffisante pour l'immunisation des lapins. Ceci, d'autant plus que le taux de modification de la protéine d'immunisation est élevé (13 haptènes / molécule de protéine)

1.4.2) Caractéristiques de l'antisérum

Les essais ELISA de type compétitif ont permis de définir la spécificité de l'antisérum vis à vis des différentes bases et d'évaluer l'effet de la température sur la sensibilité de l'ELISA comme l'ont observé Shuker et Farmer (1988). Pour cela, les essais ELISA ont été effectués à température ambiante et à +4°C pour deux des 7-alkylguanines en l'occurrence la 7-éthylguanine et la 7-hydroxyéthylguanine (Figure 13).

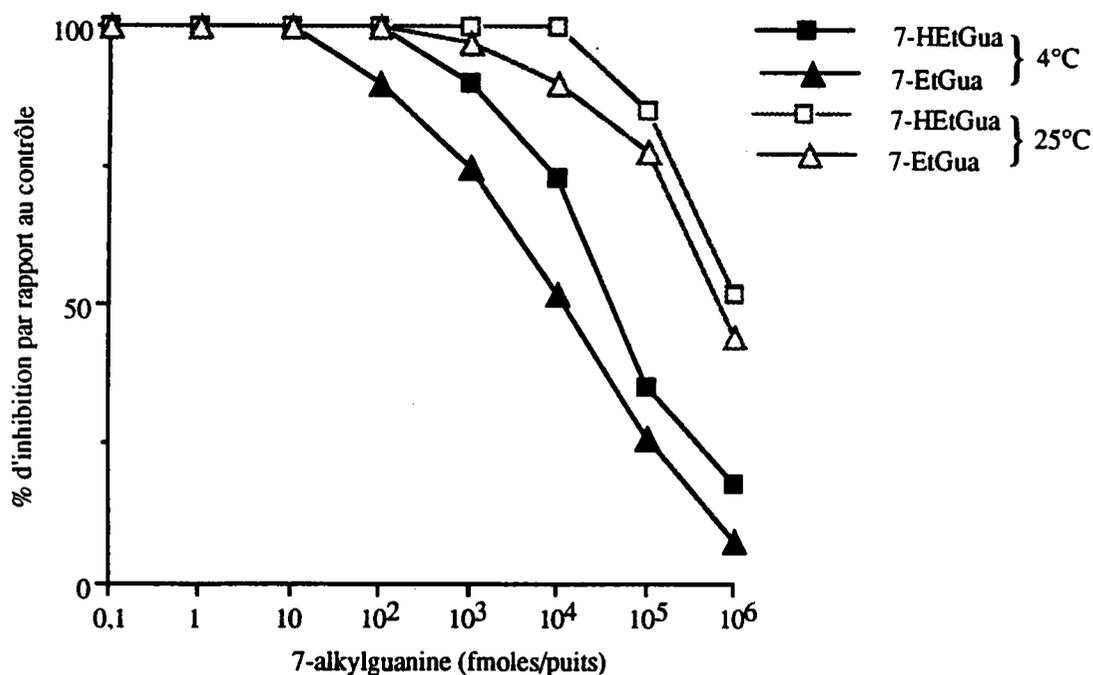
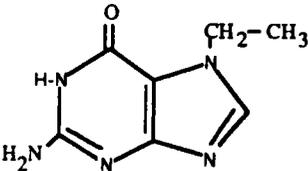
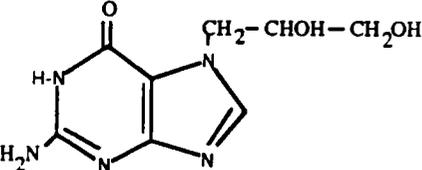
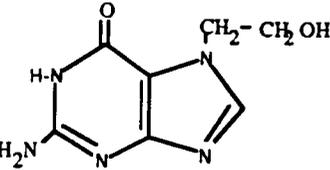
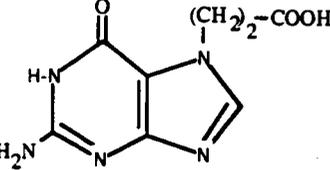
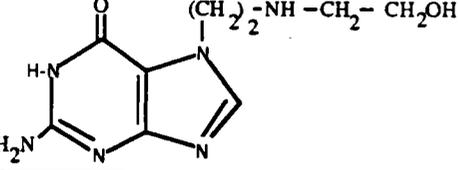
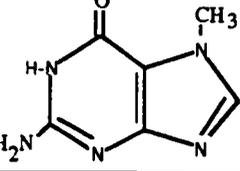
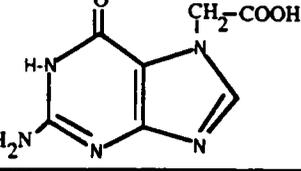
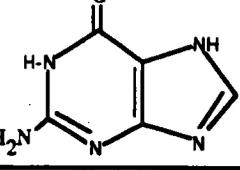
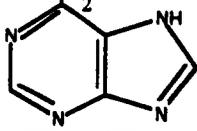


Figure 13 : Courbe d'inhibition de la 7-éthylguanine (7-EtGua) et de la 7-hydroxyéthylguanine (7-HEtGua) à température ambiante et à 4°C.

La figure 13 représente l'évolution du pourcentage d'inhibition en fonction de la concentration en 7-alkylguanine (fmole/puit).

La sensibilité obtenue avec une incubation à 4°C est plus élevée par rapport à une incubation effectuée à température ambiante. Ainsi, ces courbes révèlent que les quantités de 7-éthylguanine ou de 7-hydroxyéthylguanine donnant 50 % d'inhibition sont respectivement de 11 pmoles/puit et de 50 pmoles/puit à 4°C alors qu'elle sont de 1000 pmoles/puit et 5000 pmoles/puit environ à température ambiante. Cette différence étant due au fait que la dissociation du complexe antigène-anticorps est fortement ralentie à 4°C (Zetner et Duly 1974). Par conséquent, tous les autres composés seront donc testés à 4°C.

Tableau 3 : Réactivité croisée des purines avec l'antisérum évaluée au moyen d'un ELISA compétitif à 4°C

Purine	Concentration pour 50 % d'inhibition (pmole/puit)	Structure
7-éthylguanine (7-EtGua)	11	
7-(2,3-dihydroxypropyl)guanine (7-DHPGua)	28	
7-(2-hydroxyéthyl)guanine (7-HEtGua)	50	
7-(2-carboxyéthyl)guanine (7-CEtGua)	90	
7-(2-[(2-hydroxyéthyl)amino]éthyl)guanine (NorGOH)	200	
7-méthylguanine (7-MeGua)	700	
7-carboxyméthylguanine (7-CMeGua)	> 1000	
Guanine	> 1000	
Adénine	> 1000	

Le tableau 3 reprend les différents résultats obtenus à partir des courbes d'inhibition pour chaque purine afin de conclure sur la réactivité croisée de l'antisérum.

L'antisérum reconnaît toute une série de 7-alkylguanines de façon variable puisque la concentration de purine requise pour 50 % d'inhibition s'étend de 11 pmole/puit pour la 7-EtGua (purine la mieux reconnue par l'antisérum) à 700 pmoles/puit dans le cas de la 7-MeGua. On constate qu'il n'y a pratiquement pas de réaction croisée avec la 7-carboxyméthylguanine, la guanine et l'adénine (50% inhibition obtenu pour une concentration supérieure à 1000 pmole/puit).

Une fois les caractéristiques de l'antisérum établies, nous l'avons utilisé pour la préparation des colonnes d'immunoaffinité.

1.4.3) Fonctionnement et détermination de la capacité des colonnes d'immunoaffinité

En premier lieu nous avons vérifié que le standard interne [^{14}C] 7-éthylguanine synthétisé précédemment (paragraphe 1.1.6) était bien retenu par les colonnes d'immunoaffinité. Nous avons déposé 3,6 pmoles de ce standard correspondant à 2000 dpm afin de définir un profil d'élution par évaluation de la radioactivité de chaque fraction collectée. Le profil d'élution (figure 14) montre que la radioactivité est principalement éluée dans les trois premières fractions d'acide acétique (95 % de la radioactivité initiale).

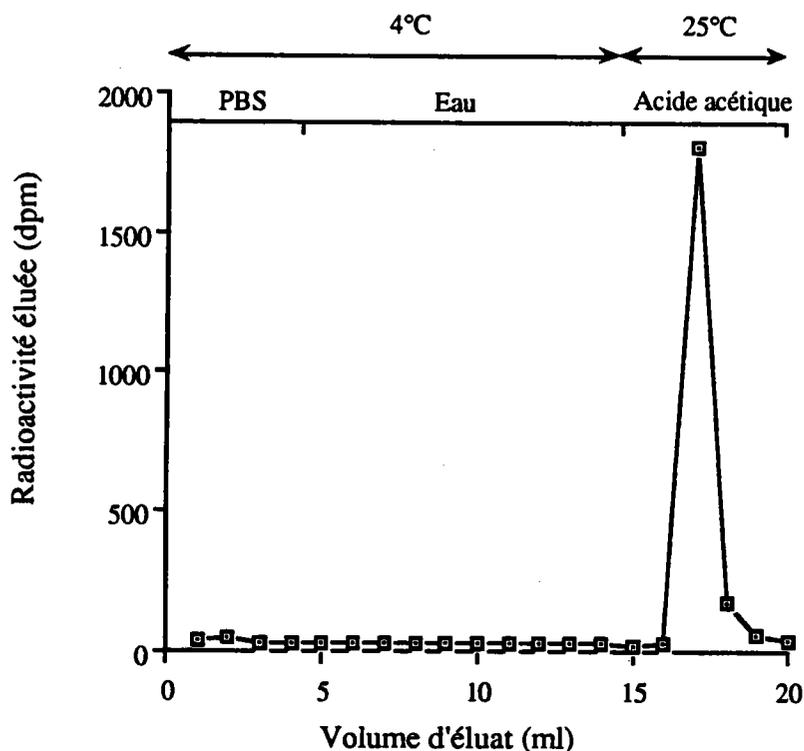


Figure 14 : Profil d'élution de la [^{14}C] 7-éthylguanine

Les composés retenus sur la colonne seront donc élués par 3 ml d'acide acétique pour les expériences suivantes.

Afin de définir la capacité des colonnes d'immunoaffinité pour les purines définies dans le tableau 3, des solutions contenant des quantités croissantes (0 à 5000 pmoles) de chaque 7-alkylguanines non marquées et une quantité fixe de [^{14}C] éthylguanine (3,5 pmoles, 2000 dpm) ont été déposées sur les colonnes.

Les trois premières fractions acides sont collectées afin d'évaluer la radioactivité. Les résultats sont exprimés en pourcentage de [^{14}C] éthylguanine retenue sur la colonne (Figure 15).

Quand la capacité de la colonne est dépassée, on observe une diminution de la radioactivité dans la fraction acide acétique ; la capacité des colonnes correspond à la saturation qui est de 400 pmoles pour les 7-alkylguanines reconnues efficacement par l'antisérum (c'est à dire la 7-éthylguanine, 7-hydroxyéthylguanine, la 7(2,3-dihydroxypropyl)guanine, la 7-méthylguanine), la guanine étant moins bien reconnue par l'antisérum.

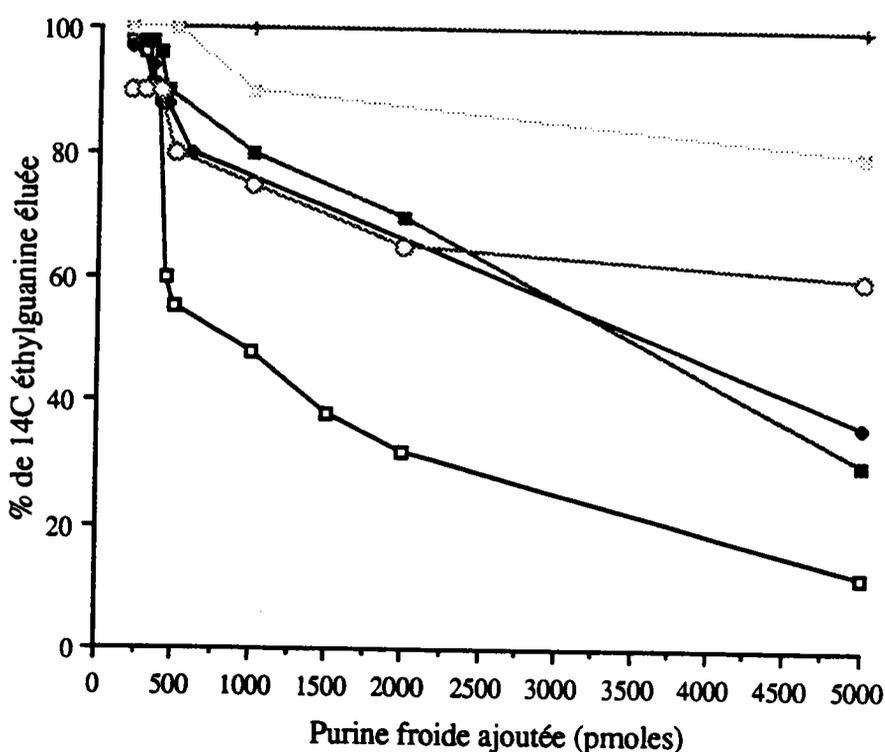


Figure 15 : Capacité des colonnes d'immunoaffinité pour les différentes purines

(□) 7-EtGua ; (◆) 7(2,3)-DHPGua ; (■) 7-HEtGua ; (○) 7-MeGua

(×) Guanine ; (+) Adénine ; (Δ) NorGOH

Nor-G-OH : 7(2[2(hydroxyéthyl)amino]éthyl)guanine

Cette analyse de la capacité des colonnes a été confirmée par l'analyse CLHP (Figure 15). les conditions CLHP de l'élué des 7-alkylguanines ont été décrites dans le paragraphe 1.2.8.

Comme le montre les chromatogrammes A et B, le passage sur colonne d'immunoaffinité des 7-alkylguanines, n'affecte pas leur détection par fluorescence. En effet, le profil d'élution avec purification des 7-alkylguanines (chromatogramme B) est identique à celui sans purification préalable (chromatogramme A).

La guanine et l'adénine sont faiblement reconnues par l'antisérum cependant comme nous le montre le chromatogramme C (Figure 16) une forte surcharge en guanine et en adénine (100 ng = 700 pmoles) perturbe la rétention des autres bases, en particulier pour la 7-méthylguanine une diminution de 50% de la rétention de cette base est constatée.

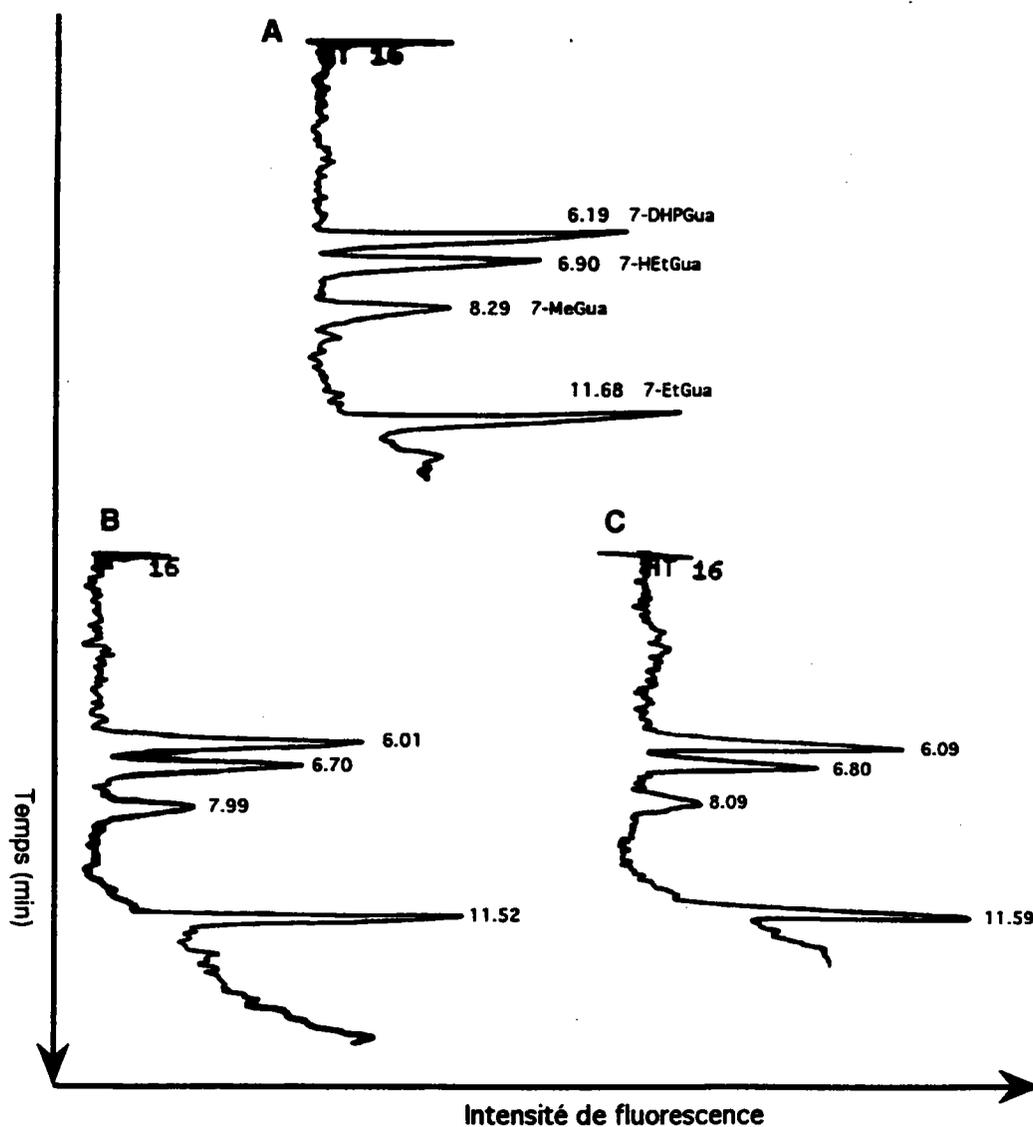


Figure 16 : Profils d'élution des 7-alkylguanines détectée par fluorescence

(A) 10 ng de chaque base (B) 10 ng de chaque base après élution sur colonne d'immunoaffinité (C) 10 ng de chaque base + 100 ng de guanine et d'adénine après élution sur colonne d'immunoaffinité

(ex : 280 nm, em (filtre) : 315 nm) après séparation sur colonne phase inverse (Ultrasphere ODS, 5 μ m, 150 x6 mm) utilisant un gradient linéaire acide heptafluorobutyrique (0,1 %) et acétonitrile, sensibilité du fluorimètre : 0,005 mA.

2) Applications : intérêt de l'utilisation des colonnes d'immunoaffinité

Les résultats précédents ont montré la sélectivité des colonnes d'immunoaffinité pour les 7-alkylguanines (7-MeGua, 7-EtGua, 7-HEtGua, 7(2,3)-DHPGua). Aussi pour montrer l'intérêt des colonnes d'immunoaffinité, ce travail est divisé en deux parties, à savoir (i) valider cette méthode en analysant les adduits obtenus en traitant un ADN déterminé (ADN sonde) par des agents alkylants (ii).incuber l'ADN dans un liquide biologique (suc gastrique) et de la même manière analyser les adduits éventuellement formés.

2.1) Ethylation de l'ADN de thymus de veau par le diéthylsulfate (DES) et l'éthylnitrosourée (ENU)

2.1.1) Matériel et méthodes

L'ADN de thymus de veau est traité par le DES ou la ENU selon un protocole adapté de la littérature (Lefrançois *et al.*, 1990).

2 mg d'ADN de thymus de veau (Type 1, Sigma D1501) est mis en solution dans un tampon cacodylate de sodium à pH = 7, à la concentration de 400 µg/ml. Il est incubé 1 heure à 37°C en présence de DES (Reidel) ou de ENU (Sigma) en solution dans l'éthanol. Après incubation, l'ADN éthylé est précipité par de l'éthanol absolu froid. Après centrifugation (10 min à 1800g) le surnageant est éliminé. L'ADN éthylé est repris et dépuriné dans du tampon acétate 25 mM, pH 5, pendant 6 heures à 55°C. A cette étape, le standard interne de ¹⁴C 7-éthylguanine (2000 dpm, 3,6 pmoles) est ajouté afin de vérifier le rendement des différentes étapes d'analyse.

L'ADN dépuriné est précipité par de l'éthanol absolu froid et laissé 1 heure à -20°C, pour favoriser la précipitation. Par la suite, le surnageant contenant les bases alkylées est évaporé au moyen d'un concentrateur Speed Vac (Savant Instruments, Bioblock Scientific, Illkich France). Le résidu, repris dans 2 ml de tampon PBS, est déposé sur une précolonne de gel de sépharose CL 4B jouant le rôle de filtre et enfin sur colonne d'immunoaffinité. Après des étapes de lavage au PBS (3 ml) et à l'eau (10 ml), de la colonne d'immunoaffinité, la fraction contenant la 7-éthylguanine est éluée avec 3 ml d'acide acétique. Cette fraction est évaporée à sec. Le résidu est repris dans 100 µl de HFBA (0,1 % V/V) puis analysé par CLHP avec détection de fluorescence. Les fractions de 1 ml sont collectées à la sortie du détecteur par un collecteur de fraction (modèle Frac 100, Pharmacia). L'évaluation de la radioactivité contenue dans ces fractions nous permet de connaître le rendement de la purification.

2.1.2) Résultats

Deux concentrations, 0,6 mM et 3 mM pour le DES, 0,6 mM et 1 mM pour l'ENU ont été utilisées. Chaque échantillon comprend 3 essais.

Tableau 4 : Quantité de 7-éthylguanine détectée dans le surnageant de dépurination d'ADN traité par des agents éthylants

	Agents alkylant (mM)	7-éthylguanine ± écart type (pmole / mg ADN)
DES	0,6	35±5
	3	400±50
ENU	0,6	ND
	1	15±5

ND : non détectable

Ces résultats montrent qu'il est possible de détecter de la 7-éthylguanine provenant du surnageant de l'ADN éthylé dépuriné (chromatogramme D, figure 17). Les profils d'élution montrent la présence d'une petite quantité de guanine dans le surnageant de dépurination de l'ADN témoin (agent éthylant absent du tampon d'incubation) chromatogramme C (Figure 17). Dans le cas où l'ADN a été incubé en présence d'agent éthylant on remarque que la quantité de 7-éthylguanine obtenue avec le DES est plus importante qu'avec la ENU pour une concentration identique de 0,6 mM.

Ces résultats ont permis de montrer l'efficacité de purification des colonnes d'immunoaffinité pour un surnageant de dépurination de l'ADN et la possibilité d'analyser les adduits formés *in vitro* sur " l'ADN sonde ". Nous avons donc appliqué la même méthode d'analyse dans le cas où l'ADN est incubé avec des sucs gastriques.

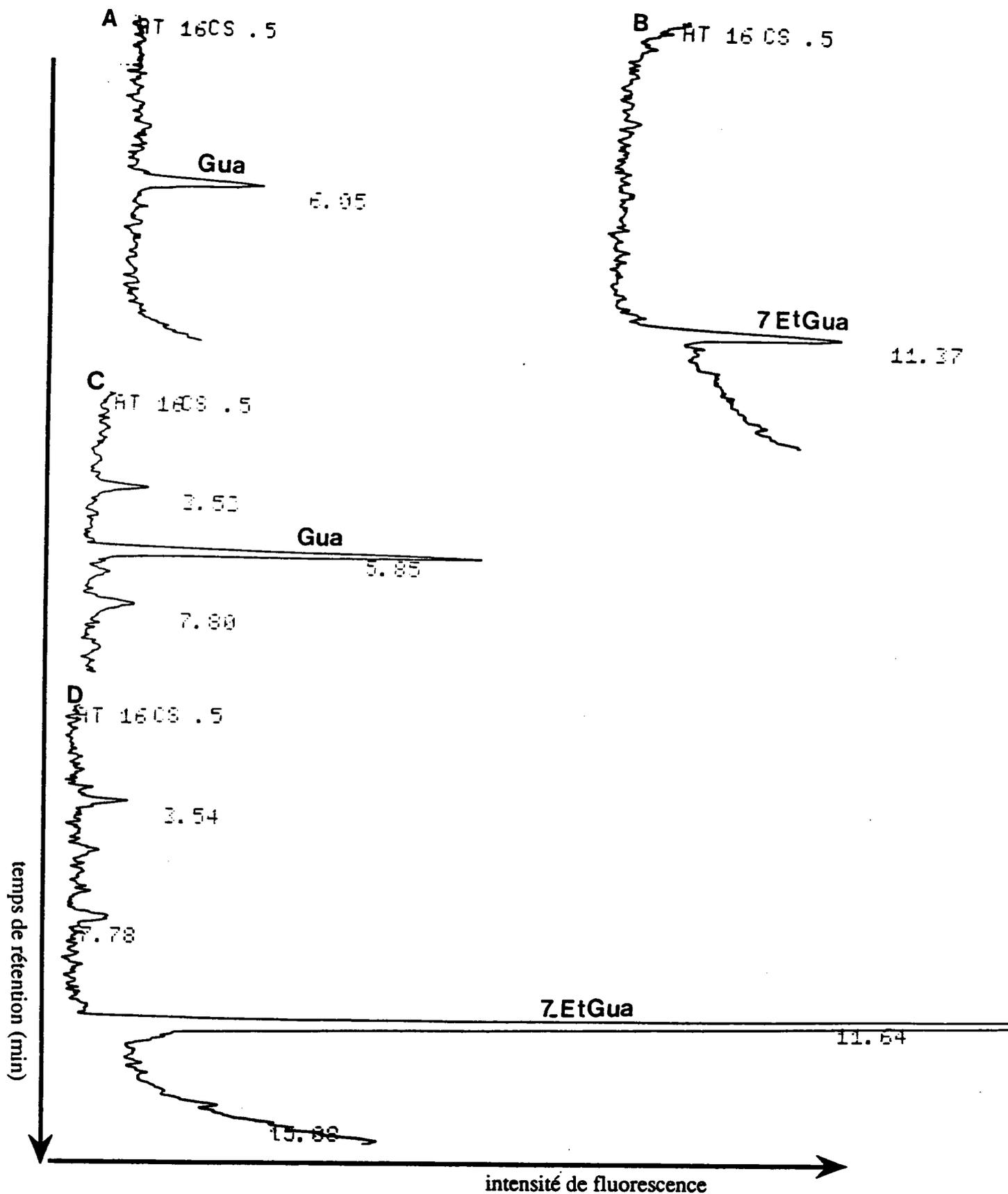


Figure 17: Profil d'éluion de la guanine et de la 7-éthylguanine

(mêmes conditions chromatographiques que pour la figure 16)

A : standard guanine

C : ADN dépuriné (témoin)

B : standard 7-éthylguanine

D : ADN traité par 3 mM de DES et dépuriné

2.2) Analyse de l'ADN de thymus de veau incubé avec des sucs gastriques

2.2.1) Matériel et méthode

a) Nitrosation

Les sucs gastriques sont au préalable centrifugés pendant 10 min à 12000g. 6,4 ml de surnageant du suc sont nitrosés en présence de 80 mM de nitrite de sodium (NaNO_2 , Merck) après ajustement du pH à 1,5 avec de l'acide chlorhydrique (HCl de 1 à 4 M). La solution est alors incubée 1 heure à 37°C sous agitation.

L'arrêt de la réaction de nitrosation se fait par addition de sulphamate (Merck), afin d'obtenir une concentration de 120 mM. Après avoir ajusté le pH à 7,4 avec de la soude (2 à 4 M), une aliquote de 800 μl est prélevée pour l'analyse de la génotoxicité au moyen du SOS chromotest. Le reste de l'échantillon est incubé en présence d'ADN.

b) Incubation avec l'ADN de thymus de veau.

5 ml d'ADN de thymus de veau (1,5 mg/ml de tampon cacodylate de sodium) est incubé 1 heure à 37°C en présence de suc gastrique nitrosé. Comme pour l'expérience précédente, l'ADN est récupéré après précipitation au n-propanol. L'utilisation du n-propanol pour précipiter l'ADN évite une éventuelle éthylation de l'ADN par l'éthanol. L'ADN est alors remis en solution dans un tampon acétate (25 mM) pH = 5 et dépuriné une nuit à 37°C sous agitation. Le standard interne [^{14}C] 7-éthylguanine (3,6 pmoles) et les standards deutérés des 3-alkyladénines (100 pmoles de chaque) sont ajoutés à cette étape.

Dans cette expérience, nous avons allongé le temps de dépurination (10 heures), l'ADN s'étant dissout très difficilement dans le tampon.

Le surnageant de dépurination est évaporé puis est filtré sur précolonne avant d'être déposé sur colonnes d'immunoaffinité placées en série ; les premières colonnes vont retenir les 7-alkylguanines qui seront analysées par CLHP, les secondes les 3-alkyladénines qui seront analysées par CPG-SM.

c) SOS Chromotest

La méthode utilisée (Malaveille *et al.*, 1989) est une variante de celle décrite par Quillardet et Hofnung (1984).

En bref, une culture de *Escherichia coli* PQ 37 en phase exponentielle ($2 \cdot 10^8$ bactéries)/ml est diluée par un même volume de milieu L (voir annexe) tamponné par 0,4 M de tampon tris (pH 7,4). 100 μl de suc gastrique nitrosé, stérile (filtre Millipore Millex GS de 0,45 μm de

porosité) sont ajoutés à 100 µl de la suspension bactérienne. Après une heure d'incubation à pH=7 sous agitation, la suspension bactérienne est alors de nouveau diluée par 0,8 ml de milieu L tamponné avec 0,2 ml de tampon Tris, pH=7,4 et incubées deux heures supplémentaires.

Une aliquote de 120 µl est prélevé pour l'évaluation de l'activité β-galactosidase et de la phosphatase alcaline.

Le dosage de la β-galactosidase et de la phosphatase alcaline se fait selon la méthode de Quillardet et Hofnung (1984). La densité optique est mesurée à 405 nm après addition des substrats des enzymes en utilisant un lecteur de plaque ELISA. Les microplaques sont incubées 30 minutes pour la phosphatase alcaline et de deux heures pour la β-galactosidase. L'absorbance est mesurée pour chaque temps d'incubation à 405 nm.

L'activité enzymatique représente la différence entre les absorbances avant et après incubation. Cette double lecture permet d'éviter les interférences colorimétriques lors de la détermination de l'activité enzymatique. En parallèle, l'activité enzymatique due aux échantillons de suc gastriques seuls est évaluée (bactéries absentes des cupules).

Le rapport de l'activité β-galactosidase sur celle de la phosphatase alcaline représente l'induction du gène *sfia* (gène SOS). Un témoin positif est effectué en utilisant 0,59 µmole de méthylméthanesulfonate : l'inductibilité SOS est de 3,5 par nmole de MMS pour cette série d'expérience.

d) Conditions de séparation CLHP des purines.

Le système chromatographique est identique à celui décrit dans le paragraphe 1.2.8. Un collecteur de fraction (modèle Frac 100, Pharmacia) est couplé à la sortie du détecteur de fluorescence. La séparation de la guanine, de la 7-MeGua, 7-EtGua, 7-HEtGua se fait sur colonne phase inverse Nucléosil 5µm (C18, 25 cm, Interchrom, Interchim, Monluçon, France) munie d'une précolonne Ultrasphère ODS 5µm (4,6 cm x 4,5 mm, Beckmann). Cette colonne s'étant avérée plus performante que la précédente. Elle nous a permis d'améliorer la séparation et par conséquent de diminuer la limite de détection qui est alors comprise entre 8 et 12 pmoles de 7-alkylguanines (Figure 18).

e) Analyse CPG-SM des 3-alkyladénines

Ces analyses ont été effectuées par A. Schouft d'après la méthode de Prévost *et al.*, (1993).

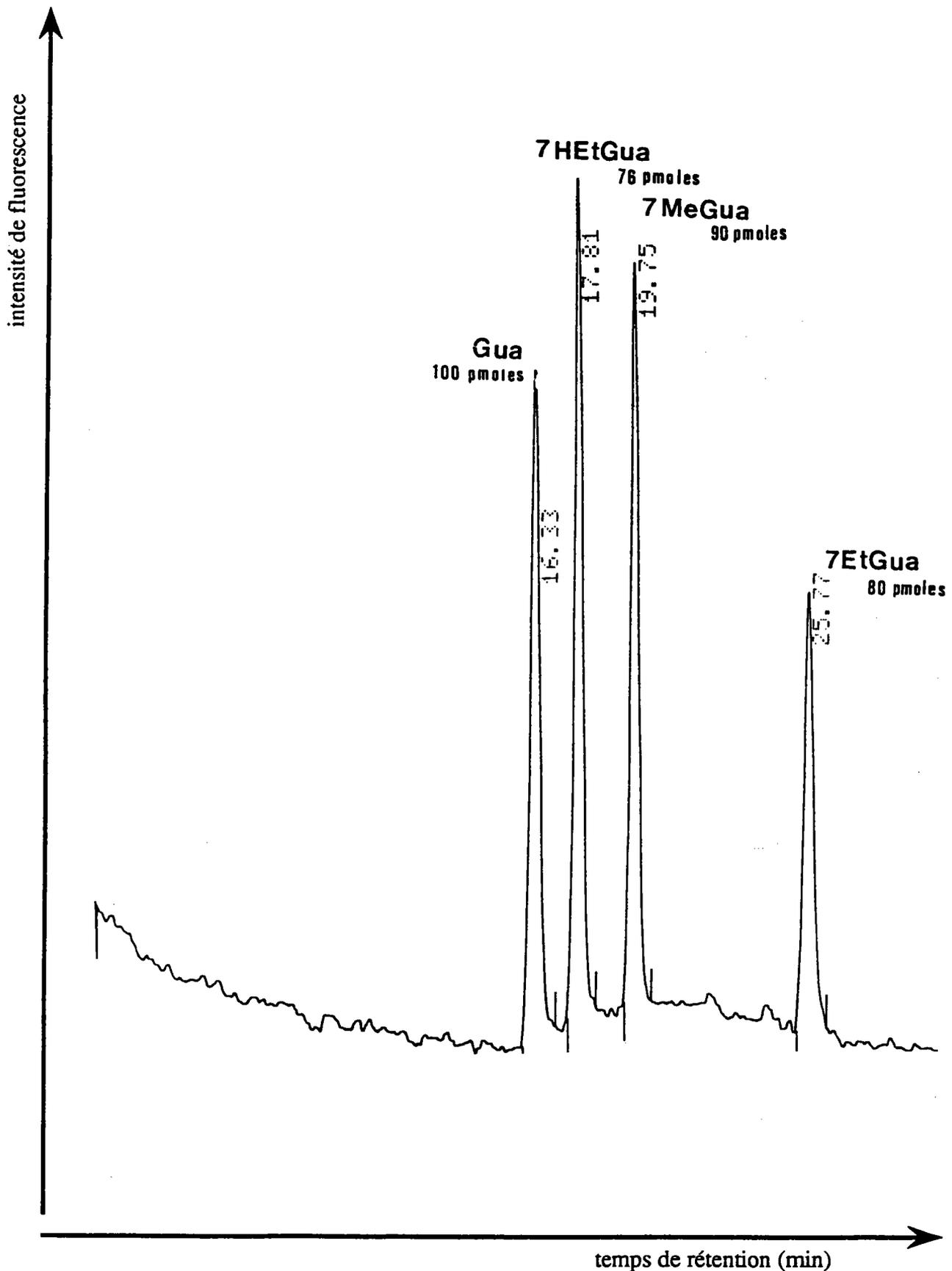


Figure 18 : Profil typique d'élution des 7-alkylguanines par CLHP (standards), détection par fluorescence

$\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$, filtre 315 nm. Colonne C18 Nucléosil $5\mu\text{m} - 25 \text{ cm}$. Gradient A : HFBA (0,001 %), B acétonitrile (0 - 5 min = 95 % A ; 10 - 30 min = 90 % A ; 30 - 35 min = 20 % A ; 35 - 40 min = 95 % A). Débit 0,5 ml /min. Sensibilité du fluorimètre : 0,003 mA.

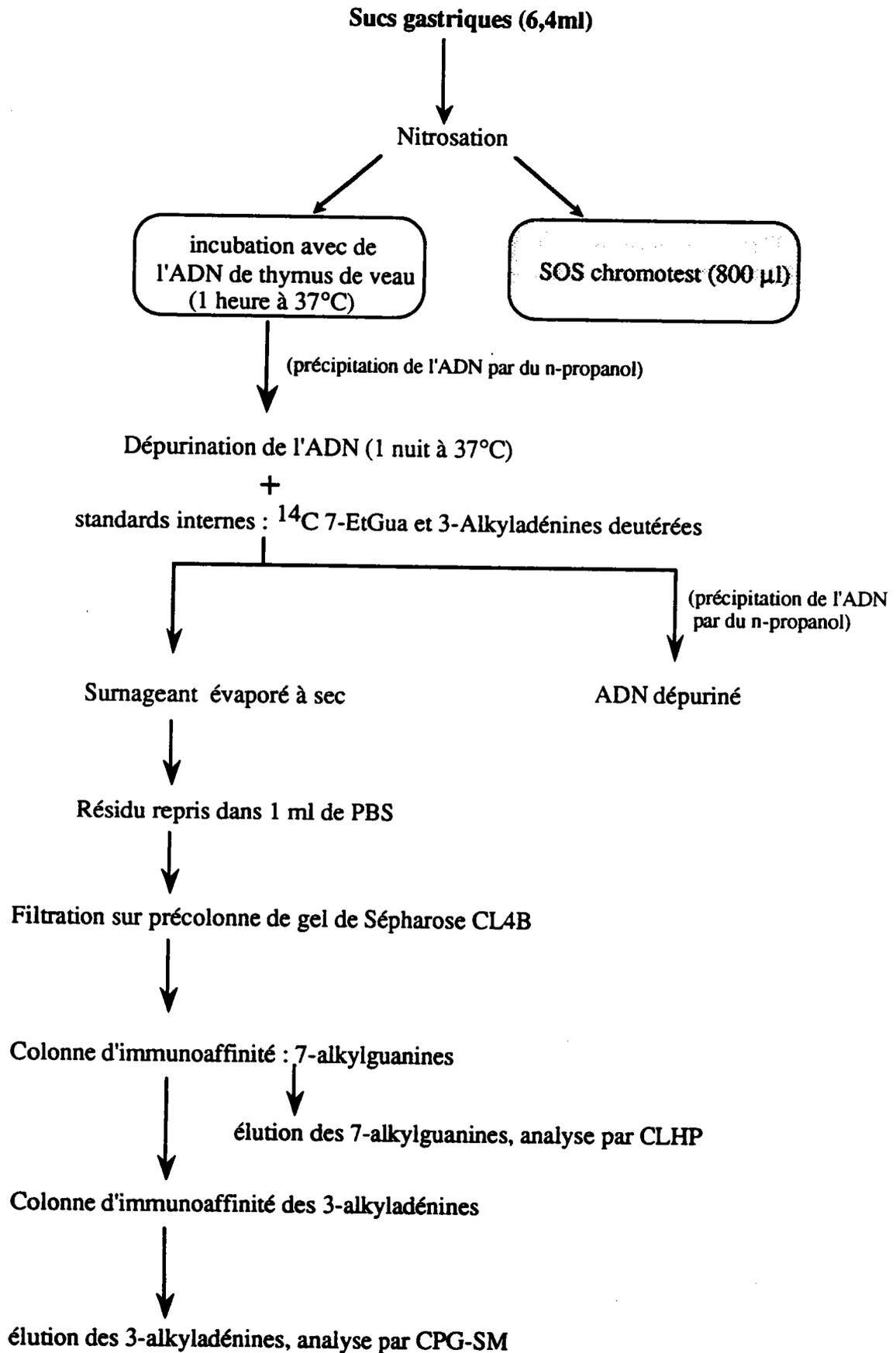


Figure 19 : Recherche d'agents alkylants dans les sucs gastriques

2.2.2) Protocole expérimental (schéma figure 19)

a) Incubation de l'ADN dans un suc gastrique acide contenant un agent alkylant

Une première expérience a été conduite afin de vérifier si notre méthode permet d'évaluer le taux d'adduction de l'ADN préalablement incubé dans un suc gastrique contenant un agent éthylant. Le pH du suc gastrique utilisé était de pH=1,5. Six types d'essais ont été réalisés:

- n°1: ADN incubé dans du tampon cacodylate (témoin)
- n°2: ADN incubé dans du tampon cacodylate + 1 mM de DES.
- n°3: ADN incubé dans du suc gastrique + 1mM de DES.
- n°4: ADN incubé dans du tampon cacodylate + 1mM de ENU.
- n°5: ADN incubé dans du suc gastrique + 1mM de éthylurée.
- n°6: ADN incubé dans du suc gastrique.

Le DES et l'éthylurée ont été ajoutés dans les sucs gastriques avant l'étape de nitrosation. L'évaluation de la génotoxicité (SOS chromotest) n'a pas été faite sur tous les échantillons mais uniquement sur le suc gastrique nitrosé.

L'ADN est incubé dans les sucs gastriques après l'étape de nitrosation (paragraphe 2.2.1-b). après l'incubation l'ADN est dépuriné, le surnageant de dépurination contenant les bases alkylées est déposé sur les colonnes d'immunoaffinité 7-alkylguanines et 3-alkyladénines. Elles sont éluées puis analysées par CLHP et CPG-SM.

b) Recherche des agents alkylants dans les sucs gastriques de Colombiens

Cette expérience a été réalisée avec des sucs gastriques provenant de Colombie. La population de cette région étant à haut risque pour le cancer gastrique.

Les échantillons de suc gastrique étant de faible volume, nous avons effectué des mélanges suivant le pH des sucs et la pathologie du patient. Ainsi, nous avons constitué 7 mélanges rapportés dans le tableau 5.

Comme dans la première expérience dans un échantillon de suc gastrique (identique à celui lors de la première expérience) de l'éthylurée (1mM) et de la méthylurée (1mM) ont été ajoutées avant l'étape de nitrosation comme précurseur.

Chaque échantillon sera traité comme dans l'expérience précédente.

Tableau 5: Caractéristiques des sucs gastriques

Echantillon	Type de sucs gastriques	pH	Diagnostique
1	basiques	7,3	displasique
2	acides	2,15	displasique
3	basiques	7,6	gastrite superficielle
4	acide	2,01	gastrite superficielle
5	basique	7,6	diagnostique non établi
6	acides	1,5	normal
7	acides supplémentés en précurseurs (éthylurée 1 mM ; méthylurée 1 mM)	1,5	normal

2.2.3) Résultats

a) Incubation de l'ADN dans un suc gastrique acide supplémenté en agent alkylant

Nous avons voulu vérifier si un agent éthylant (DES ou ENU) présent dans le suc gastrique induisait la formation de 7-éthylguanine et de 3-éthyladénine dans l'ADN. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 6.

Tableau 6: Quantité de 7-éthylguanine et 3-éthyladénine détectées dans les surnageants de dépurination suite à l'incubation de l'ADN dans le suc gastrique nitrosé

Echantillons	7-éthylguanine (pmoles/mg ADN)	3-éthyladénine (pmoles/mg ADN)
ADN seul (Témoin)	ND	ND
ADN + DES (1 mM)	47	12,5
ADN + DES (1 mM) + suc gastrique	46	13,3
ADN + ENU (1 mM)	5	3,2
ADN (+ éthylurée -1 mM + suc gastrique)	2	1,6
ADN + suc gastrique (pH = 1,5)	ND	ND

ND = non détecté (inférieur à la limite de détection qui est ≤ 8 pmoles))

Les résultats montrent que la quantité de 7-éthylguanine et de 3-éthyladénine est identique quand l'ADN est incubé en présence de DES avec ou sans suc gastrique. Le suc gastrique n'interfère pas dans l'éthylation de l'ADN par le DES.

Le suc gastrique seul ne permet pas la formation de 7-alkylguanine, par contre l'ajout d'éthylurée permet après nitrosation la formation de 7-Et-Gua et de 3-EtAd. La nitrosation permet la formation de l'éthylnitrosourée (ENU) à partir de l'éthylurée. Comme dans l'expérience précédente la formation de 7-éthylguanine et de 3-éthyladénine est plus importante dans le cas où l'ADN est incubé en présence de DES plutôt qu'en présence de ENU. Ceci reflète la différence de pouvoir électrophile des deux agents éthylants (voir Tableau 2, chapitre 1 paragraphe 4.1.2).

b) Recherche des agents alkylants dans les sucs gastriques de Colombiens

Cette expérience a pour but de détecter la présence d'agents alkylants dans les sucs gastriques de patients à risque pour le cancer de l'estomac. Les diagnostics établis sur ces patients sont indiqués dans le tableau 5.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Génotoxicité (facteur d'induction SOS) et pouvoir alkylant des sucs gastriques après nitrosation (détection d'alkyl purines dans le surnageant de l'ADN dépuriné)

SG (pH)	Facteur d'induction SOS	7-EtGua (pmole / essai)	7-HEtGua (pmole / essai)	7-MeGua (pmole / essai)	3-EtAd (pmole / essai)	3-HEtAd (pmole / essai)	3-MeAd (pmole / essai)
1 (7,3)	toxique	ND	ND	≤ 8	3,9	3,89	9,2
2 (2,15)	7,58	ND	ND	≤ 8	1,58	1,54	5,15
3 (7,6)	12,71	ND	6	≤ 8	1,29	1,65	4,93
4 (2,01)	11,08	ND	ND	19	1,31	1,12	5,14
5 (7,6)	25,46	ND	6	23	1,31	1,12	5,83
6 (1,5)	1,04	ND	ND	≤ 8	0,78	1,21	3,61
7 (1,5)	3,14	11	ND	137	7,38	1,09	129

SG : groupe de sucs gastriques
 ND : non détecté
 ≤ 8 : bruit de fond pour la 7-MeGua
 essai : 7,5mg d'ADN de thymus de veau.

La mesure d'induction SOS permet de déterminer la génotoxicité de chaque échantillon. Les inductions SOS sont assez importantes excepté pour l'échantillon 6 correspondant à un suc gastrique normal (contrôle), indiquant ainsi la présence de génotoxiques dans les sucs gastriques nitrosés.

En ce qui concerne la présence de 7-alkylguanines il a été possible de mettre en évidence la formation de 7-méthylguanine pour deux des sucs gastriques analysés, il s'agit de l'échantillon 4 regroupant les patients atteints de gastrite superficielle dont le suc gastrique est acide (mesure de 7-méthylguanine deux fois celle du bruit de fond) et de l'échantillon 5 un suc gastrique basique (mesure de la 7-méthylguanine trois fois celle du bruit de fond). Pour ces deux échantillons le facteur SOS est important. Les chromatogrammes de l'échantillon 3 (suc gastrique basique) et de l'échantillon 5 présente un pic dont le temps de rétention correspond à la 7-hydroxyéthylguanine (Figures 20 et 21); cependant il semble difficile d'affirmer la présence de cet adduit, la quantité étant très faible (6 pmoles environ), en dessous de la limite de détection que nous avons fixé par sureté à 8 pmoles. Par manque d'échantillon il ne nous a pas été possible de refaire l'expérience afin de confirmer la présence de cet adduit.

De plus les chromatogrammes des figures 20 et 21 présentent des petits pics correspondants à des produits retenus par la colonne d'immunoaffinité mais qui n'ont pas été identifiés.

L'échantillon 7 correspond à un contrôle positif, le suc gastrique utilisé est identique à celui de l'échantillon 6, mais de l'éthylurée et de la méthylurée (1 mM) ont été ajoutées avant la nitrosation. Pour cet échantillon, le taux de 7-méthylguanine est très important par rapport à la 7-éthylguanine, on observe le même résultat concernant la 3-méthyladénine et la 3-éthyladénine. Cette différence s'explique par le fait que les agents méthylants ont une efficacité de réaction avec les acides nucléiques vingt fois plus importante que les agents éthylants dans les mêmes conditions (voir tableau 2, chapitre 1, Singer et Grunberger, 1983).

Dans tous les échantillons un "bruit de fond" de 7-méthylguanine a été mesuré. La quantité de 7-méthylguanine mesurée dans l'échantillon témoin (6) est d'environ 8 pmoles (limite de la détection).

Cette étude montre que l'analyse de la formation des 7-alkylguanines dans le surnageant de l'ADN suite à une incubation révèle la présence d'agents alkylants dans les sucs gastriques. Compte tenu de la limite de détection (≤ 8 pmoles pour la 7-méthylguanine), des expériences supplémentaires seraient nécessaires pour confirmer et identifier la présence de ces agents alkylants.

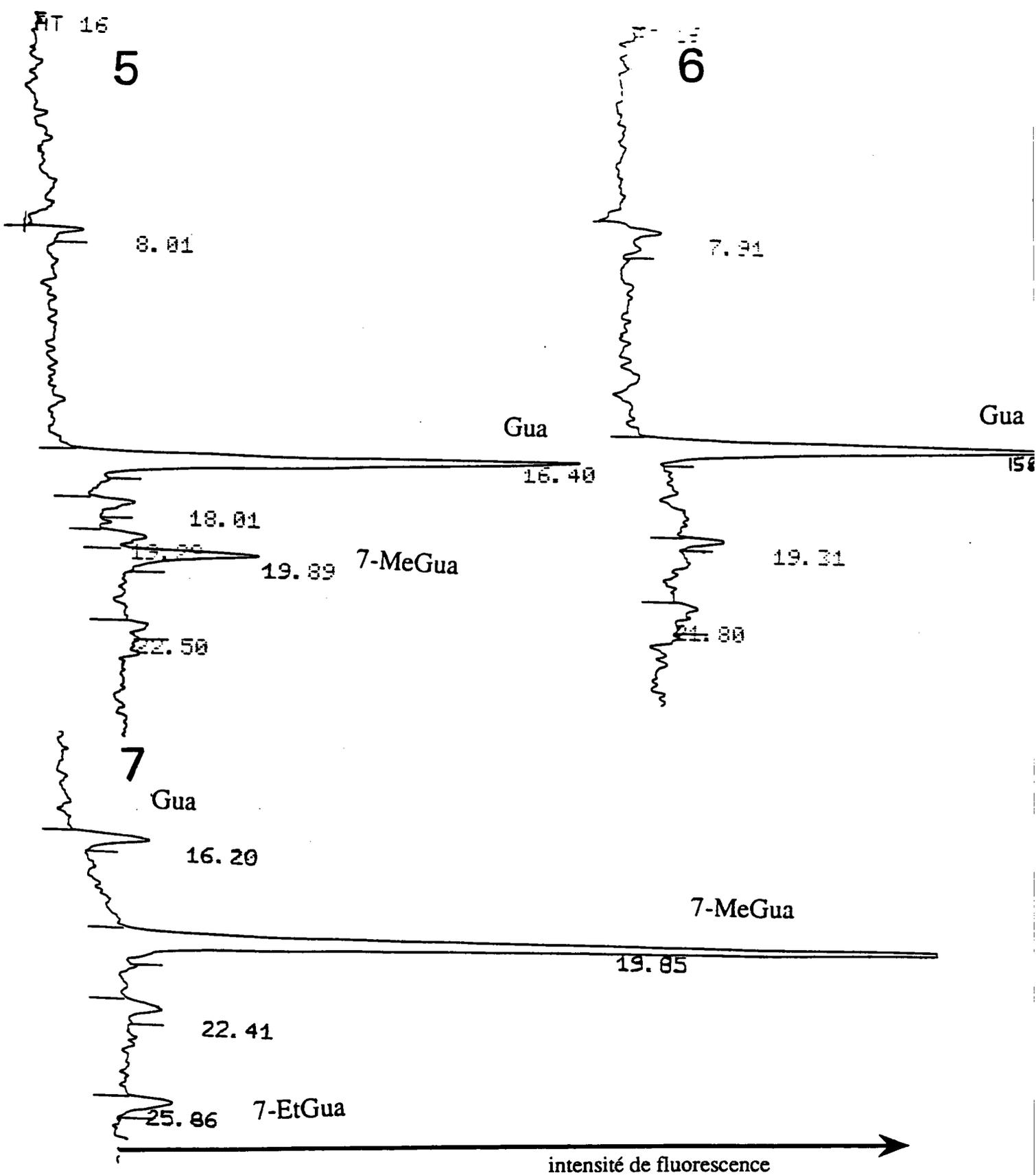


Figure 20 : Profil d'éluion des 7-alkylguanines obtenu pour les échantillons 5, 6, 7 respectivement : sucs gastriques basique, contrôle, suc gastrique acide + éthylurée 1mM et méthylurée 1mM.
(conditions chromatographiques identiques à celles de la figure 18)

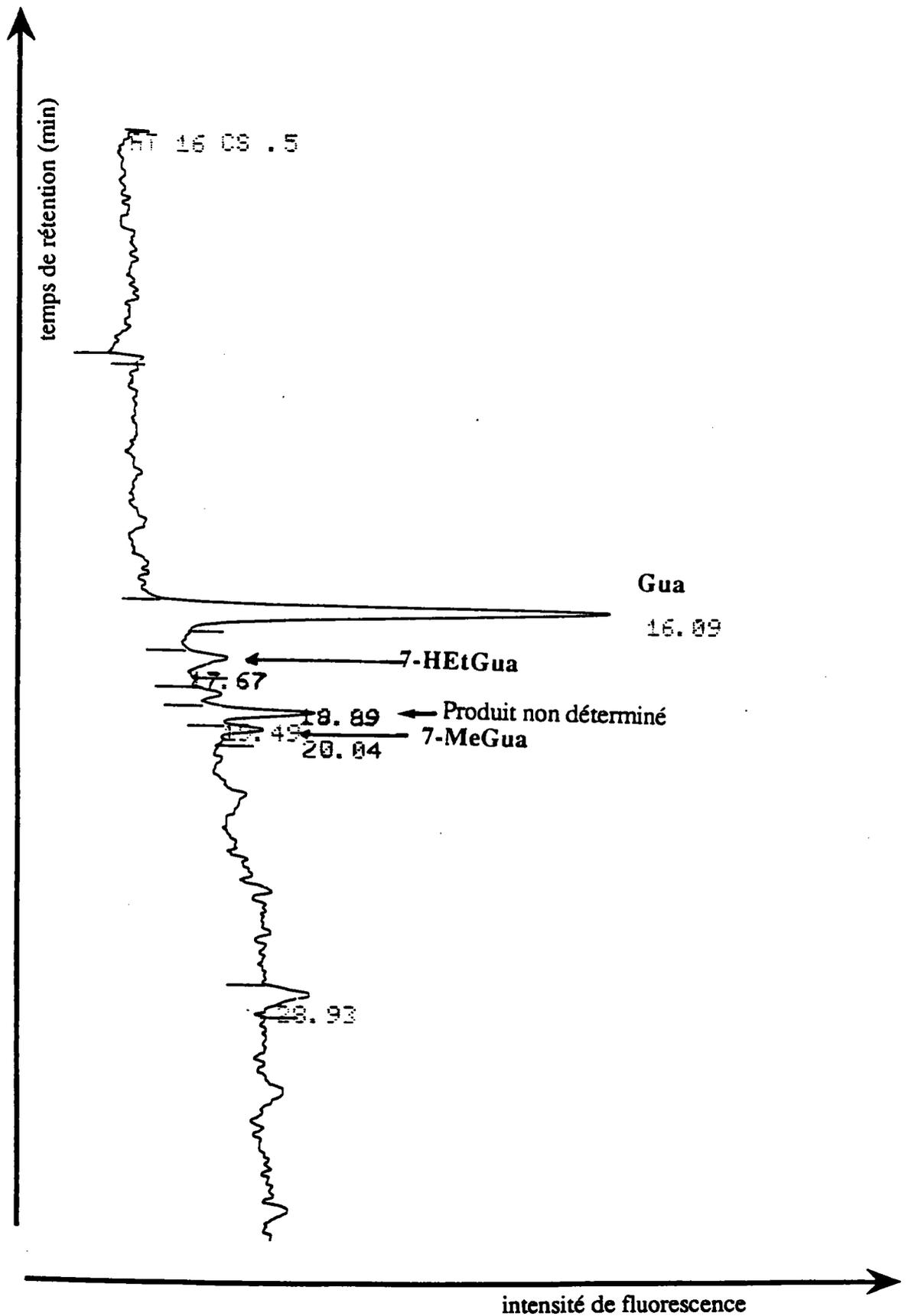


Figure 21 : Profil d'élution des 7-alkylguanines obtenu pour l'échantillon 3 (suc gastrique basique, gastrite superficielle)
(conditions chromatographiques identiques à celles de la figure 18)

3) Discussion

Les résultats présentés dans ce chapitre concernent (i) l'obtention d'un anticorps pouvant réagir avec plusieurs guanines alkylées (ii) l'utilisation d'un "ADN sonde" pour évaluer la génotoxicité d'un suc gastrique après nitrosation *in vitro* par analyse des 7-alkylguanines dans le surnageant de l'ADN dépuriné.

Les colonnes d'immunoaffinité élaborées à partir de l'antiserum de lapin permettent de purifier quatre alkylpurines: la 7-méthylguanine, la 7-éthylguanine, la 7-hydroxyéthylguanine, la 7-(2,3-dihydroxypropyl)guanine. Ce résultat indique que la partie de la molécule reconnue par les anticorps est commune aux 7-alkylguanines. Cependant la réactivité croisée est limitée, en effet la 7-carboxy(méthyl)guanine, la NorGOH ne sont pas retenues sur les colonnes d'immunoaffinité.

L'utilisation des colonnes d'immunoaffinité pour purifier et concentrer les 7-alkylguanines permet d'améliorer la sensibilité et la spécificité de la détection en diminuant le bruit de fond des chromatogrammes ce qui permet une meilleure intégration des pics chromatographiques. La limite de détection obtenue pour la 7-méthylguanine est de 8 pmoles alors que les études précédentes utilisant la même méthode de détection fixaient cette limite à 40 pmoles (Herron et Shank, 1979).

L'utilisation simultanée des deux types de colonnes, la première série spécifique des 7-alkylguanines, la seconde des 3-alkyladénines permet de purifier le surnageant de dépurination de l'ADN en une seule étape avant l'analyse.

L'analyse des sucs gastriques de Colombie nous a permis de montrer la formation de 7-méthylguanine dans deux échantillons mais les quantités détectées sont faibles. Il y a eu formation de 7-(méthyl et éthyl) guanine et de 3-(méthyl et éthyl) adénine dans l'ADN suite à l'incubation dans le suc gastrique contenant de l'éthylurée et de la méthylurée.

La mutagénicité des sucs gastriques nitrosés provenant de région à forte incidence pour le cancer de l'estomac n'est pas augmentée par addition de facteur S9 (activation métabolique) dans le test d'Ames indiquant la présence d'agents mutagènes directs (Montes *et al*, 1974). Elle augmente après nitrosation acide (Pignatelli *et al*, 1993). Cette génotoxicité révèle la présence de composés précurseurs activables par le NO_2^- en milieu acide qui n'ont pas été encore identifiés. Diverses hypothèses sur la formation de composés mutagènes ont été formulées. La réduction des nitrates en nitrites donnerait lieu à une nitrosation chimique de précurseurs alimentaires (amine, amide, urée). Plusieurs espèces bactériennes présentes dans l'estomac achlorhydrique ont une activité nitrate réductase catalysant la nitrosation d'amines secondaires (voir chapitre 1 paragraphe 2.2.2). Des études récentes montrent que la concentration en CNO totaux n'est pas en relation avec le pH ni les données anatomopathologiques (Sobala *et al*, 1991 ; Pignatelli *et al*, 1993). Les concentrations en

CNO mesurées dans les sucs gastriques prélevés sur des patients à jeun varie de 1 à 10 μM . Elle est multipliée par un facteur mille après nitrosation acide. Ainsi l'incubation de 2'-désoxyguanosine dans les sucs gastriques nitrosés permet la formation d' Q^6 -ethyl-2'-désoxyguanosine et d' Q^6 -méthyl-2'-désoxyguanosine. La concentration de 2'-désoxyguanosine utilisée dans cette étude est très forte, équivalente à 8 mg/ml d'ADN . Aucune corrélation n'a été mise en évidence entre l'activité alkylante des sucs gastriques et leurs caractéristiques (suc normal ou achlorhydrique; gastrite ou dysplasie) (Kyrtopoulos, 1987).

Dans notre étude la présence d'agents alkylants dans les sucs gastriques nitrosés a été mise en évidence. Cependant, la sensibilité de la méthode d' analyse des 7-alkylguanines n'est pas suffisante pour ces études . La limite de détection des 7-alkylguanines est de l'ordre de 10 pmoles par essais. Il reste à vérifier ces résultats avec un plus grand nombre de jus gastriques et en améliorant la limite de détection des 7-alkylguanines.

La fluorescence des 7-alkylguanines étant limitée nous avons donc envisagé de développer une méthode de dérivation afin d'augmenter cette propriété .

Chapitre 4

DERIVATION DES 7-ALKYLGUANINES PAR LA PHENYLMALONDIALDEHYDE

Ce chapitre concerne la dérivation des 7-alkylguanines par la phénylmalondialdéhyde. Il comporte deux parties, (i) la synthèse des différentes bases dérivées, leur caractérisation chimique (spectre de masse, UV et fluorescent, RMN) et la dérivation de faibles quantités de 7-alkylguanines (< à 50 pmoles), (ii) la purification des bases dérivées par colonnes d'immunoaffinité.

1) Introduction

Moschel et Leonard (1976) ont montré que la guanine est dérivable en un produit très fluorescent, par réaction avec la malondialdéhyde en solution acide. Cette réaction de dérivation, très spécifique de la guanine n'est pas altérée par la présence d'un groupement alkyl en position 7 de la guanine. Afin d'améliorer la détection des 7-alkylguanines, nous avons étudié la dérivation de ces bases par la phénylmalondialdéhyde en vérifiant leurs propriétés de fluorescence.

Deux dérivés de la 7-méthylguanine ont été préparés par la réaction avec d'une part la phénylmalondialdéhyde (PhMal) et d'autre part la pentafluorophénylmalondialdéhyde (PFMal) (Sabbioni et al., 1986). La volatilité du dérivé fluorescent PFMal de la 7-méthylguanine permet son analyse en CPG-SM, cependant ce dérivé s'hydrolyse facilement.

2) Synthèse et caractérisation chimique des dérivés fluorescents des 7-alkylguanines

2.1) Matériel et méthodes

2.1.1) 7-alkylguanines

La 7-carboxyéthylguanine a été synthétisée au laboratoire selon la méthode de Roberts et Warwick (1963) (paragraphe 1.4.1 chapitre 3), la 7-carboxyméthylguanine a été synthétisée par D.Shuker.

La 7-éthylguanine, la 7-hydroxyéthylguanine proviennent de Chemsyn Sciences Laboratories (Lenexa, Kansas, USA). la 7-méthylguanine provient des laboratoires Fluka (Fluka Chemie-Bucks, Switzerland). Tous ces produits ont une pureté chimique supérieure à 98 % en CLHP.

2.1.2) Synthèse de la phénylmalondialdéhyde

La phénylmalondialdéhyde a été synthétisée selon la méthode de Moschel et Leonard (1976). Brièvement, 0,5 mole de diéthylformamide sont ajoutés à 0,3 mole de chlorure d'hydroxy phosphore (POCl_3). Le mélange est maintenu à 30 °C pendant 5 minutes. 0,1 mole d'acide phénylacétique est alors ajouté. Le mélange est maintenu à 70°C pendant 6 heures puis décomposé dans 500 g de glace et neutralisé avec du carbonate de potassium.

La solution est agitée dans la glace jusqu'à dissolution complète de la partie solide et amenée à pH très alcalin par de la soude (NaOH 10 M), laissée à 40 °C 2 heures afin de terminer la production de diméthylamine. La solution est ensuite extraite au toluène, séchée à l'aide de MgSO_4 . Le toluène est par la suite évaporé et le résidu est distillé. L'acroléine ainsi obtenu est hydrolysée pour obtenir la phénylmalondialdéhyde comme indiqué ci-après. L'acroléine dans l'éthanol est traitée par une solution de soude à 20% et chauffée sous reflux. L'éthanol est distillé, le mélange est refroidi, extrait avec du dichlorométhane. Enfin, la phase aqueuse est amenée à pH = 2 (HCl) puis concentrée. Le précipité formé est filtré, lavé à l'eau et recristallisé dans l'éther.

2.1.3) Synthèse des dérivés fluorescents 7-alkylguanine : méthode générale

10 mg de 7-alkylguanine sont ajoutés à 25 mg de phénylmalondialdéhyde dans 1,5 ml d'acide acétique glacial (Merck). La réaction est chauffée une heure à 110 °C et les produits sont alors recristallisés.

La 7-éthylguanine phénylmalondialdéhyde (PhMal-7-Et-Gua), la 7-méthylguanine phénylmalondialdéhyde (PhMal-7-MeGua) recristallisent spontanément dans de l'acide acétique à 4°C. Pour la guanine phénylmalondialdéhyde (PhMal-Gua), la 7-hydroxyéthylguanine phénylmalondialdéhyde (PhMal-7-HetGua), la 7(2,3-dihydroxypropyl)guanine phénylmalondialdéhyde (PhMal-7(2,3-DHP)-Gua), l'acide acétique est évaporé et le produit est redissous dans un mélange de 1 ml d'éthanol/eau (70/30) dans des tubes à recristallisation de 2 ml (Aldrich, St Quentin Fallavier-France). Les tubes sont laissés 1 heure à température ambiante puis mis à 4°C jusqu'à l'obtention de cristaux (24 heures environ).

La 7-carboxyméthylguanine phénylmalondialdéhyde (PhMal-7-CMGua) et la 7-carboxyéthylguanine phénylmalondialdéhyde (PhMal-7-CEtGua) recristallisent dans un mélange éthanol/eau (50/50).

2.1.4) Dérivation de faible quantité de 7-alkylguanines (2 à 50 pmoles)

Pour les faibles quantités de 7-alkylguanine (de 2 à 50 pmoles), la dérivation se fait dans des tubes coniques de 200 μ l (Alltech-Deerfield, IL, USA) silanisés par du diméthylchlorosilane (DMCS 20 % dans de l'hexane). Les tubes sont ensuite rincés au méthanol et séchés à l'acétone. Les 7-alkylguanines sont solubilisées dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl 0,1 M) à la concentration de 1 mg/ml (cette solution concentrée est conservée en fractions aliquot à -20°C).

Les dilutions successives sont effectuées dans de l'eau ultra-pure (Millipore) et amenées à pH = 9 environ par de l'ammoniaque concentrée. Une gamme de 2 à 25 pmoles de 7-alkylguanines en solution aqueuse est déposée dans les tubes coniques. La solution est évaporée, puis le résidu est repris par 10 μ g de phénylmalondialdéhyde (500 μ g/ml d'acide acétique glacial) et chauffé durant 40 min à 110°C . Après évaporation de l'acide acétique, le résidu est repris par un mélange composé d'acétonitrile/ KH_2PO_4 (20/80) et analysé par CLHP.

2.1.5) Caractéristiques chimiques des PhMal-7-alkylguanine et conditions d'analyse en CLHP

Les spectres de RMN ont été effectués par le Dr D. MOLKO (centre d'Etude Nucléaire de Grenoble). Les spectres de masse ont été faits par Mr J.H. LAMB (MRC Toxicology Unit - Laboratoire du Dr P. FARMER; Carshalton, UK) et les spectres fluorescents (spectrofluorimétrie d'excitation synchrone) par le Dr A. WESTON (NCI-Bethesda USA).

Les PhMal-7-alkylguanines ont été séparées pour l'analyse CLHP sur colonne phase inverse Nucleosil (C18, 10 μ m, 250x8x4 mm, Macherey Nagel-Düren-Allemagne) munie d'une précolonne remplie de phase ODS (Pellicular ODS-Whatmann) à température ambiante et à un débit de 1,3 ml/min. Le gradient d'éluion est composé de tampon phosphate (KH_2PO_4 , 10 mM, pH = 7,1) additionné de 2% de tétrahydrofurane (THF) pour le tampon A et d'acétonitrile (solvant B). Le gradient d'éluion comporte une étape isocratique de 10 min (15 % B) et une étape linéaire de 5 min (15 % à 80 % B).

La détection de la fluorescence est réalisée à l'aide d'un détecteur Spectroflow 980 (Applied Biosysteme) à une longueur d'onde d'excitation de 246 nm muni d'un filtre (475 nm).

2.2) Protocole

Dans un premier temps, il était nécessaire de dériver des quantités importantes (dizaine de mg) de 7-alkylguanine afin d'obtenir des cristaux permettant leur caractérisation chimique par les analyses des spectres RMN, de fluorescence et de spectrométrie de masse.

Les concentrations de 7-alkylguanines obtenues après incubation de l'ADN dans les fluides biologiques étant très faibles, il était nécessaire de vérifier au préalable les rendements de dérivation pour les faibles concentrations. Après la réaction de dérivation (voir paragraphe "2.1.4" du matériel et méthode) les produits sont analysés par CLHP suivant les conditions décrites dans le paragraphe "2.1.5" du matériel et méthodes.

3) Résultats

3.1) Synthèse des dérivés fluorescents des 7-alkylguanines.

La dérivation des 7-alkylguanines se fait selon la réaction de la figure 22

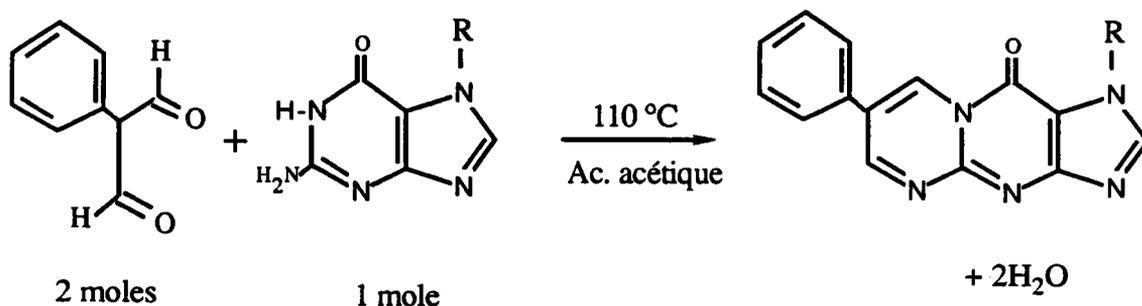


Figure 22 : Synthèse des dérivés fluorescents des 7-alkylguanines
(R = groupe alkyl)

Après recristallisation, les produits PhMal-7-alkylguanine sont de couleur jaune plus ou moins intense.

Les cristaux PhMal-7-EtGua sont très brillants, en forme d'aiguille, le rendement de recristallisation est de 80%. Ceux de la PhMal-7-DHPGua sont également très brillants de couleur jaune claire et de forme allongée. Les cristaux de la PhMal-7-MeGua et de la PhMal-7-HEtGua sont légèrement brillants et ronds, le rendement de recristallisation est respectivement de 80% et 70%. Les autres produits (PhMal-7-CMGua, PhMal-7CEtGua et

PhMal-Gua) ont des cristaux jaune foncés mats et très petits, le rendement est de l'ordre de 50%.

La PhMal 7-CMGua et la PhMal 7-CEtGua sont solubles dans l'eau additionnée de NaHCO₃. Les autres PhMal 7-alkylguanines sont parfaitement solubles dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). Suivant la nature du groupe alkyl, on observe des différences de solubilité dans les solvants organiques (Tableau 8).

Tableau 8 : Solubilité des dérivés des 7-alkylguanines dans différents solvants

	H ₂ O + NaHCO ₃	Acétate d'éthyl	Acétone	Chloro- forme	Méthanol	Acéto- nitrile	DMSO
PhMal 7-MeGua	-	-	-	+	+	+	+
PhMal 7-EtGua	-	-	-	+	±	±	+
PhMal 7-HEtGua	-	-	-	-	±	±	+
PhMal 7-DHPGua	-	-	-	-	-	-	+
PhMal 7-CEtGua	+	-	-	-	-	-	+
PhMal 7-CMGua	+	-	-	-	-	-	+

(±): soluble pour des concentrations ≤ à 0,5mg/ml.

3.2) Confirmation de la structure chimique et de la pureté des produits synthétisés.

Comme nous l'avons précisé dans le paragraphe 2.2.1 les spectres de masse, les spectres RMN et les spectres de florescence ont été effectués en collaboration avec différents laboratoires . Un résumé des résultats est présenté sous forme de tableaux.

3.2.1) Spectre de masse.

Afin de confirmer la masse moléculaire, tous les produits ont été traités en spectrométrie de masse : bombardement par des atomes accélérés (FAB: Fast atom bombardement). Cette technique permet d'obtenir un pic correspondant à [MH⁺] (ion moléculaire + un proton). Dans tous les cas un ion majeur qui correspond à l'ion [MH⁺] a été observé, confirmant la masse moléculaire des produits (Tableau 9). Dans un second temps la fragmentation des dérivés PhMal-7-AlkylGua dont le groupe alkyl est le plus important que le groupe methyl présente un ion à 264, cet ion correspond à l'ion [MH⁺] de la PhMal-Gua. Ce résultat indique que le fragment commun formé est un noyau stable. Cette caractéristique peut être exploitée

pour identifier un groupe alkyl d'une guanine produit sur l'ADN suite à une incubation dans un milieu biologique.

Tableau 9 : Analyse par spectrométrie de masse (FAB et MS/MS) des phénylmalonylguanines substituées en position 7

Produits	Poids moléculaire	FAB (MH ⁺) ^a	MS/MS ^b
PhMal-Gua	263	264	246, 237, 236, 209, 182
PhMal-7-MeGua	277	278	263, 250, 237, 209, 182
PhMal-7-EtGua	291	292	277, 264, 247, 237, 209, 192, 182
PhMal-7-HEtGua	307	308	290, 280, 264, 250
PhMal-7-DHPGua	337	338	321, 264, 194
PhMal-7-CMGua	321	322	304, 278, 276, 264, 250, 150, 149
PhMal-7-CEtGua	335	336	318, 290, 276, 264, 238

(a) : 0,2 M d'acide para-toluène sulfonique dans du glycérol

(b) : Energie de collision (12 eV) - Spectre secondaires de[MH⁺]

3.2.2) Spectre ultraviolet (UV) et spectres de florescence.

Les spectres UV ont été réalisés dans l'eau. Les PhMal-7-AlkylGua ont deux pics d'absorbance, le premier entre 278 et 284 nm, le second entre 325 et 328 nm.

Les spectres fluorescents mesurés dans l'eau des différents produits ont des profils très semblables. L'analyse de ces produits par florescence d'excitation synchrone confirme nos résultats quant'à l'amélioration de la florescence par rapport aux 7-alkylguanines. Cependant la florescence de ces produits est très inférieure (limite de détection comprise entre 32 et 125 pmoles/500µl) à celle obtenue pour les adduits à la guanine du benzo(a)pyrène (limite de détection: 50 fmoles/500µl). La méthode de la florescence d'excitation synchrone pour les dérivés PhMal-7-AlkylGua n'est pas plus performante dans les conditions d'analyses utilisées dans cette étude ($\Delta\lambda$:200nm) que la mesure de la florescence à l'aide d'un détecteur classique (Tableau 10).

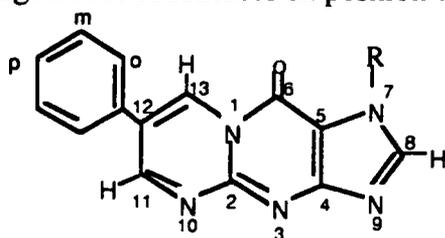
Tableau 10 : Détail des caractéristiques spectroscopiques des dérivés phénylmalondialdéhydes de 7-alkylguanines (ultraviolet, fluorescence et fluorescence d'excitation synchrone) dans l'eau

Produits	Ultraviolet		Fluorescence		Fluorescence synchronisée	
	λ max	ϵ (10^{-4})	Emission (λ excitation nm)	Excitation (λ émission nm)	Synchroni- sation ($\Delta\lambda$ 200 nm)	Limite de détection (pmole totale / 500 μ l)
PhMal-Gua	245s	1,57	(280)	(527)	297	32
	284	1,15	528s	251		
			556	268		
			593	289		
PhMal-7-MeGua	247	2,41	(280)	(527)	298	125
	278	2,41	528	252		
	328	0,45	554	292		
			595	333s		
PhMal-7-EtGua	253	2,99	(280)	(527)	299	32
	281	2,36	528	250-290		
	326	0,6	551	332s		
			594			
PhMal-7-HEtGua	245	3,59	(280)	(527)	297	32
	281	2,85	527	250-300		
	325s	0,77	593s	295		
				333s		
PhMal-7-DHPGua	245	2,95	(280)	(527)	298	125
	280	2,52	527	250-295		
	325	0,67	595s	333s		
PhMal-7-CMGua	244	3,03	(274)	(527)	297	125
	281	2,42	528	250-295		
	325	0,65	548	332s		
			594s			
PhMal-7-CEtGua	245	2,75	(280)	(527)	298	125
	284	2,09	528	245		
	325	0,54	555	268		
			594s	290s		

3.2.3) Spectre de résonance magnétique nucléaire (RMN) de l'hydrogène

Les sept dérivés PhMal-7-alkylGua ont donné des signaux caractéristiques confirmant la structure chimique des produits. Ces signaux correspondant aux protons H-8, H-12, H13 et au groupe phényl, ils se trouvent dans des positions spectrales assez constantes indiquant un environnement chimique similaire pour le noyau (PhMal-Gua) des sept molécules dérivés. Des signaux correspondant aux groupes alkyl ont également été observés dans les spectres (Tableau 11).

Tableau 11 : Analyse par résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton des phénylmalonalguanines substituées en position 7



déplacement chimique (δ ppm) dans le d_6 -DMSO

Produits	H-8	H-12, H-13	H-phényl	alkyl
PhMal-Gua	8,48	9,56 - 9,58	7,45 - 8,04	3,5 (N-H)
PhMal-7-MeGua	8,6	9,45 - 9,55	7,62 - 8,14	4,22 (-CH ₃)
PhMal-7-EtGua	8,56	9,35 - 9,44	7,47 - 7,91	1,49 (-CH ₃ , tr) ; 4,44 - 4,53 (-CH ₂ -, q),
PhMal-7-HEtGua	8,56	9,31 - 9,47	7,46 - 7,90	3,78 - 3,85 (-CH ₂ -OH, m) ; 4,50 (N-CH ₂ -, tr) ; 5,03 (-OH, d)
PhMal-7-DHPGua	8,43	9,3 - 9,44	7,42 - 7,90	3,43 - 3,49 (-CH ₂ -OH, m) ; 3,88 - 3,97 (-CH-OH, m) 4,24 - 4,20 (N-CH ₂ -, m) ; 4,82 (-CH ₂ -OH, tr) ; 5,08 (-CH-OH-, d)
PhMal-7-CMeGua	8,63	9,44 - 9,57	7,59 - 8,03	5,40 (-CH ₂ -, s)
PhMal-7-CEtGua	8,62	9,48 - 9,56	5,59 - 8,03	3,10 (N-CH ₂ -, tr) ; 4,75 (-CH ₂ -CO ₂ H, tr)

3.3) Profil d'élution des PhMal-7-alkylguanines

Le profil d'élution montre que les 7 composés sont séparés sur colonne phase inverse (Figure 23) dans les conditions d'analyse détaillées dans le paragraphe "2.1.5" du chapitre matériel et méthodes. La limite de détection de ces dérivés est inférieure à 1 pmole.

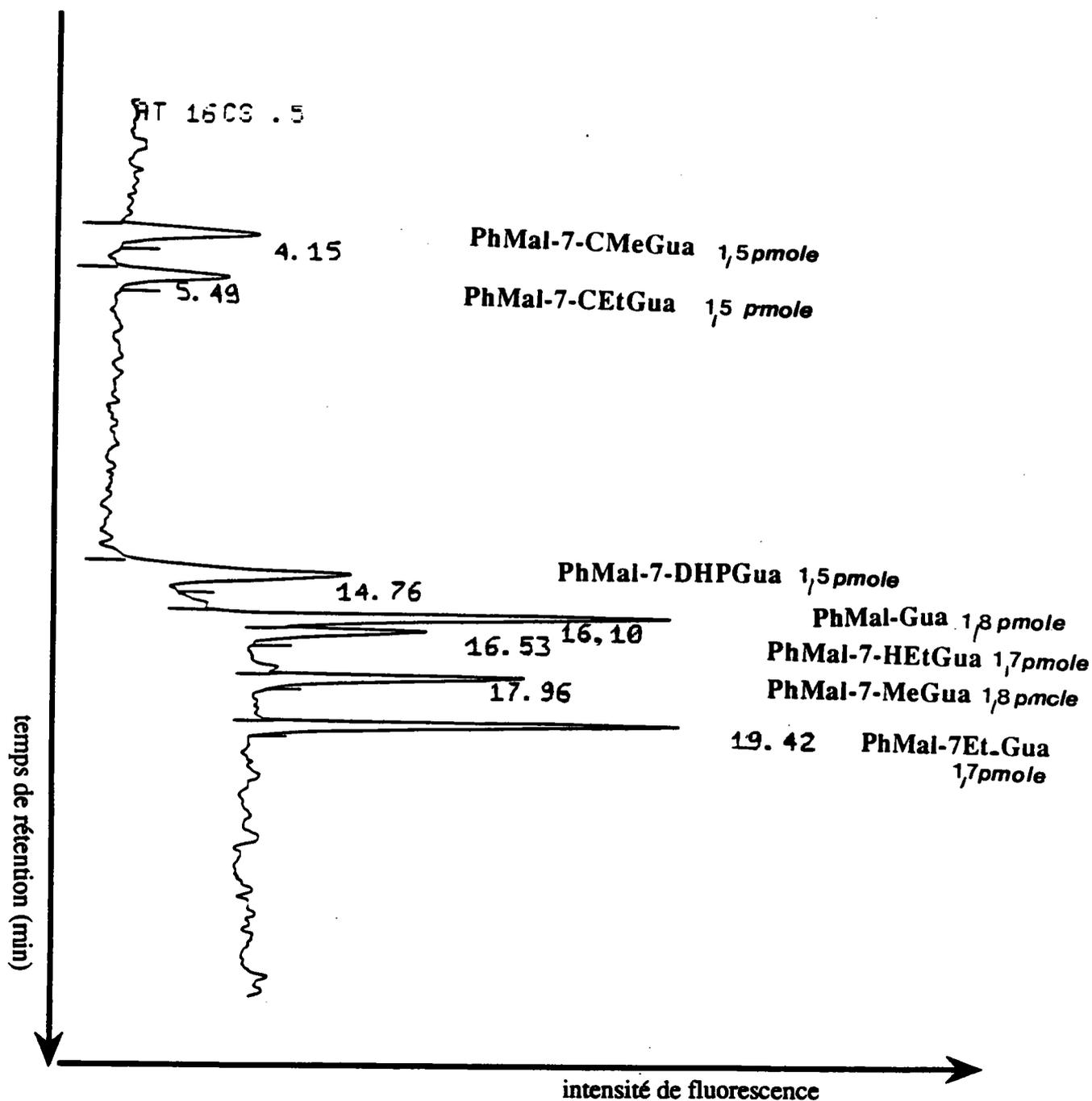


Figure 23 : Profil d'élution des PhMal-7-alkylguanines

3.4) Dérivation de faible quantité de 7-alkylguanines : courbes de standardisation

L'intérêt de la réaction de dérivation est d'améliorer la sensibilité de la détection des 7-alkylguanines.

Pour de faibles concentrations de 7-alkylguanines (concentration inférieure à 50 pmoles) de grandes variations du rendement de dérivation sont constatées. Bien que chaque facteur intervenant dans la réaction ait été étudié (température, durée de chauffage de la réaction, concentration en phénylmalondialdéhyde), il n'a pas été possible d'obtenir des rendements de dérivation reproductibles pour une concentration de 7-alkylguanines déterminée.

Aussi, pour s'affranchir de ce problème, nous avons décidé d'ajouter un standard interne afin de quantifier le taux de la réaction de dérivation.

Le standard interne choisi est la 7-EtGua (10 pmoles). Des quantités variables de 7-MeGua et de 7-HEtGua sont ajoutées avant la dérivation (de 1 à 20 pmoles). La réaction de dérivation est analysée par CLHP (paragraphe "2.1.5" du chapitre matériel et méthode), les rapports d'intégration PhMal 7-MeGua / PhMal 7-EtGua et PhMal 7-HETGua / PhMal 7-EtGua sont calculés d'après les surfaces d'intégration données par l'intégrateur.

Le rapport PhMal 7-MeGua / PhMal 7-EtGua en fonction de la quantité de 7-MeGua à dériver définit une droite de coefficient linéaire 1 (Figure 24). Le coefficient est de 0,96 pour le rapport PhMal 7-HEtGua / PhMal 7-EtGua en fonction de la quantité de 7-HEtGua à dériver.

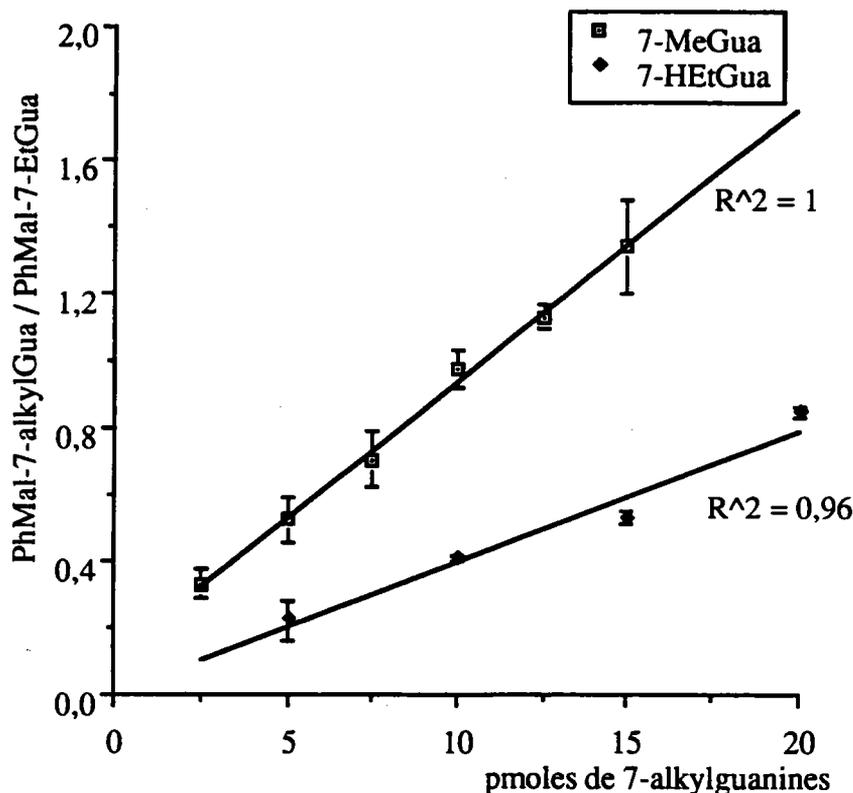


Figure 24 : Courbes de standardisation de la dérivation de la 7-MeGua et de la 7-HEtGua

Cependant les rendements de dérivation de la 7-MeGua sont meilleurs que pour la 7-HEtGua. Ainsi la sensibilité de détection de la 7-MeGua est meilleure

Il ne nous a pas été possible de dériver une quantité inférieure à 2 pmoles de 7-alkylguanine. Au cours de la réaction de dérivation, de nombreux composés inconnus se sont formés, altérant la ligne de base des chromatogrammes. De ce fait, il était nécessaire de purifier les composés fluorescents avant de les analyser. La purification sur colonne d'immunoaffinité des 7-alkylguanines s'étant avérée performante, une approche similaire a été développée. Nous avons donc tenté d'obtenir un antiserum dirigé contre les PhMal-7-alkylguanines.

4) Purification des dérivés fluorescents sur colonnes d'immunoaffinité

La démarche suivie est similaire à celle employée pour la purification des 7-alkylguanines. Ainsi, deux lapins seront immunisés après couplage de la PhMal-7-CEtGua à une protéine porteuse. La reconnaissance des différentes PhMal-7-alkylguanine par l'antisérum est évaluée au moyen d'un test ELISA de type compétitif.

4.1) Matériel et méthode

4.1.1) Synthèse des antigènes d'immunisation et d'enrobage

A une suspension de PhMal-7-CEtGua (0,05 mmole) dans un ml de diméthylformamide (DMF), sont ajoutés 55 μ moles de diisopropyléthylamine [(i-Pr)₂EtN] (catalyseur basique) et 55 μ moles de 2-succinimido, 1,1,3,3-tétraméthyl uronium tétrafluoborate (TSU). Cette réaction est suivie par chromatographie sur couche mince. Lorsque la solution devient claire, des aliquots de 100 μ l de sérum albumine bovine méthylée (50 ng dans 2 ml d'eau + 5 ml de PBS) sont ajoutés.

Après ajout complet de la mBSA, la solution est laissée une heure à température ambiante, centrifugée (10 min à 1700 g) et purifiée sur colonne Sephadex G50 M afin d'éliminer la fraction d'haptène non liée à la protéine.

Une réaction similaire est réalisée avec pour protéine porteuse l'ovalbumine. De la même manière que pour les 7-alkylguanines, l'efficacité de la réaction de couplage est évaluée par la

détermination du nombre d'haptène fixé à la protéine porteuse en comparant les absorbances de la protéine seule et du conjugué à 280 nm.

4.1.2) Immunsation des lapins

Le protocole utilisé est identique à celui décrit dans le chapitre 3 (1.2.1). En résumé, deux lapins ont été immunisés par la PhMal-7-CEtGua-mBSA. Après 14 semaines de traitement, le sang est recueilli et caractérisé par des essais ELISA de type compétitif.

4.1.3) Réactivité croisée de l'antisérum

Un échiquier de croisement permet de fixer la quantité d'antigène d'enrobage et le taux de dilution de l'antisérum.

L'évaluation de la réactivité croisée des PhMal-7-AlkylGua avec l'antisérum, par ELISA compétitif à 4°C, à été décrite au paragraphe 1.2.3 du chapitre 3.

4.1.4) Préparation de la fraction IgG de l'antisérum et des colonnes d'immunoaffinité

La méthode est identique à celle employée dans le paragraphe 1.2.4 et 1.2.5 du chapitre 3. La fraction IgG provenant des 20 ml de serum de lapin (n°1), est incubée après dialyse avec 6 ml de gel de protéine A sépharose CL4B et conditionné par volume de 1 ml.

4.1.5) Synthèse du standard interne : PhMal-[¹⁴C]-7-CEtGua

a). Synthèse de la [¹⁴C]-7-CEtGuanine à partir de la [U¹⁴C]Guanosine

La [U¹⁴C] Guanosine (5 µCi, 2,8 µg-Dositek) est alkylée dans 50 µl d'eau par de la β propiolactone (5 µl). Le volume réactionnel est chauffé pendant 1 à 2 minutes à 110°C.

La 7-carboxyéthylguanosine est hydrolysée par de l'acide chlorhydrique (50 µl HCl 2M) à 110°C pendant une heure. La réaction est neutralisée par 50 µl de soude (NaOH 2M). La 7-CEtGua est purifiée par CLHP sur colonne phase inverse Nucléosil 100 (250x8x4 mm, Macherey Nagel), couplée à un détecteur de fluorescence (λ excitation = 280 nm, filtre = 315 nm). Les fractions correspondant à la 7-CEtGua sont récupérées grâce à un collecteur de fraction (Pharmacia Frac 100) couplé au système chromatographique.

Par la suite, les fractions correspondant à la [¹⁴C]-7-CEtGuanine sont évaporées à sec.

b) Synthèse de la PhMal-[¹⁴C]-7-CEtGuanine

Le résidu de [¹⁴C]-7-CEtGuanine est repris par une solution de Phénylmalondialdéhyde dans de l'acide acétique (50 µl d'une solution à 1mg/ml) et chauffée une heure à 110°C.

Comme précédemment, la PhMal[¹⁴C]-7-CEtGuanine est purifiée par CLHP par le même système chromatographique. Les fractions correspondant à la PhMal[¹⁴C]-7-CEtGuanine sont collectées et concentrées par évaporation.

4.1.6) Fonctionnement des colonnes d'immunoaffinité.

Le protocole utilisé est identique à celui utilisé pour les colonnes d'immunoaffinité 7-alkylguanine (paragraphe 1.2.7).

Brièvement, 4,5 pmoles de PhMal[¹⁴C]-7-CEtGuanine (2500 dpm) en solution dans 2 ml de tampon PBS (4°C) sont appliqués sur colonne d'immunoaffinité. La colonne est ensuite lavée au moyen de 3 ml de tampon PBS et de 10 ml d'eau ; la PhMal[¹⁴C]-7-CEtGuanine est éluée par 5 ml d'acide acétique 1M. Les éluats sont récupérés par fraction de 1 ml pour l'évaluation de la radioactivité.

4.2) Résultats

4.2.1) Synthèse des antigènes d'immunisation et d'enrobage

Comme pour les 7-alkylguanines, nous désirons obtenir des anticorps qui reconnaissent toute une série de PhMal-7-alkylguanines.

La figure 25, résume la réaction de synthèse.

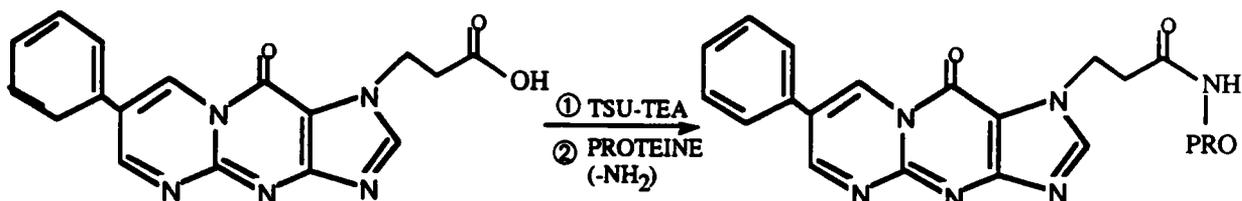


Figure 25 : Reaction de synthèse de la PhMal 7-CEtGua-Protéine

(TSU : 2-succinimido, 1,1,3,3-tétraméthyl uronium tétrafluoroborate : TEA = triéthylamine)

Le rendement obtenu pour l'antigène d'immunisation est de 46%, le taux de couplage calculé par l'absorption UV est de 4 moles de PhMal 7-CEtGua par mole de mBSA.

Pour l'antigène d'enrobage, le rendement obtenu est de 84 %, son taux de couplage est de 3 moles de PhMal-7-CEtGua par mole d'ovalbumine.

4.2.2) Caractéristiques de l'antisérum

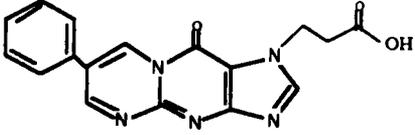
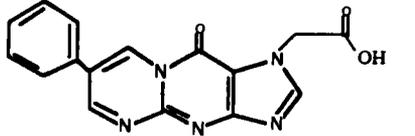
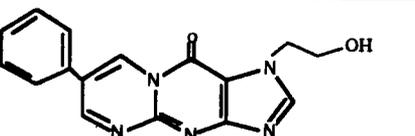
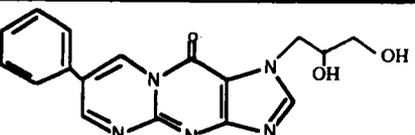
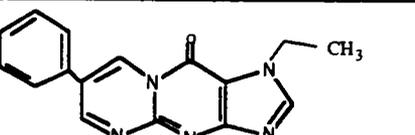
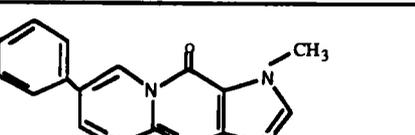
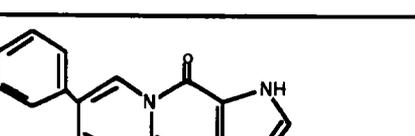
Un échiquier de croisement a permis de fixer la quantité d'antigène d'enrobage à 10 ng/puit et le taux de dilution de l'antisérum est de $1/2.10^4$.

L'évaluation de la réactivité croisée des PhMal 7-alkylguanine avec l'antisérum au moyen d'un test ELISA compétitif à 4°C, permet de construire des courbes d'inhibition afin d'évaluer la concentration nécessaire à l'obtention de 50 % d'inhibition. Les résultats sont résumés dans le tableau 9.

Pour la 7(2-[2-hydroxyéthyl amino] éthyl) guanine (NOR-G-OH), il n'a pas été possible d'obtenir un standard dérivé pur. De ce fait, la réactivité croisée avec l'antisérum n'a pas pu être évaluée.

Les dérivés PhMal des alkylguanines présentent une bonne réactivité croisée avec l'antisérum. Les molécules sont bien reconnues par les IgG contenues dans l'antisérum. En effet, la concentration de PhMal-7alkylguanine nécessaire pour obtenir 50 % d'inhibition varie de 0,2 à 160 pmoles/puit. Cet antisérum a donc été utilisé afin de préparer des colonnes d'immunoaffinité.

Tableau 9 : Réactivité croisée des purines dérivées par la phénylmalondialdéhydes avec l'antisérum, évaluées au moyen d'ELISA compétitifs à 4°C.

PhMal 7-AlkylGua	Concentration pour 50% d'inhibition (pmole/puit)	Structure
7-carboxyéthylguanine-phénylmalondialdéhyde (PhMal 7-CEtGua)	0,2	
7-carboxyméthylguanine-phénylmalondialdéhyde (PhMal 7-CMeGua)	0,5	
7-Hydroxyéthylguanine-phénylmalondialdéhyde (PhMal 7-HEtGua)	6	
7-(2,3-dihydroxypropyl)guanine-phénylmalondialdéhyde (PhMal 7(2,3)-DHPGua)	12	
7-Ethylguanine-phénylmalondialdéhyde (PhMal 7-EtGua)	50	
7-Méthylguanine-phénylmalondialdéhyde (PhMal 7-MeGua)	130	
Guanine-phénylmalondialdéhyde (PhMal Gua)	160	

4.2.3) Fonctionnement et détermination de la capacité des colonnes d'immunoaffinité.

a) Vérification de la pureté du standard radioactif PhMal[¹⁴C] 7-CEt-Gua

La vérification de la pureté du standard radioactif PhMal[¹⁴C] 7-CEt-Gua se fait par analyse CLHP d'un aliquot de la fraction concentrée. Des fractions (650 µl) sont collectées pendant

toute la durée du gradient d'élution afin de vérifier que le maximum de la radioactivité corresponde avec le pic d'élution de la PhMal[^{14}C] 7-CEt-Gua. Le produit obtenu a une pureté de 70 % (Figures 25 et 26).

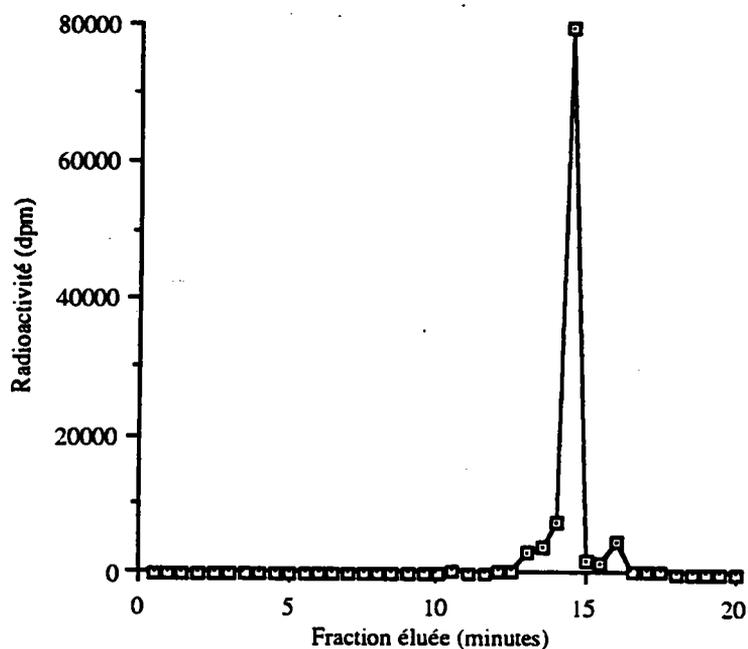


Figure 25: Radiochromatogramme de la PhMal[^{14}C] 7-CEt-Gua.

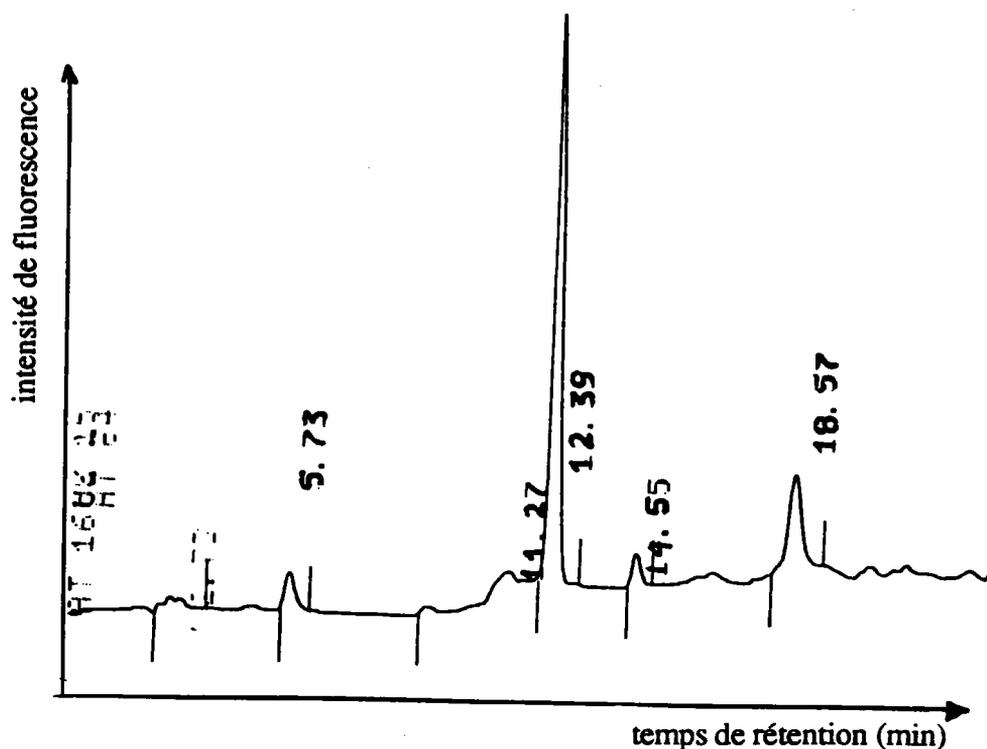


Figure 26 : Profil d'élution de la PhMal[^{14}C]-7-CEt-Gua sur colonne phase inverse : évaluation de la fluorescence

La différence de 1,39 minute observée entre le pic de radioactif et le pic de fluorescence est s'explique par la longueur de la liaison entre les deux appareils de détection

Nous avons remarqué que la PhMal[^{14}C]-7-CEt-Gua se dégradait lentement au cours du temps dans l'acide heptafluorobutyrique. Aussi, pour la suite des expériences, ce composé a été conservé dans un tampon phosphate (KH_2PO_4 , 10 mM, pH 7).

b) Fonctionnement des colonnes d'immunoaffinité

La PhMal[^{14}C]-7-CEt-Gua a été utilisée pour tester la capacité des colonnes d'immunoaffinité sachant que seulement 70 % de la radioactivité doit être présente dans la fraction acide lors de l'élution. Le profil d'élution (Figure 27) indique une élution de 27 % de la radioactivité dans la fraction acide

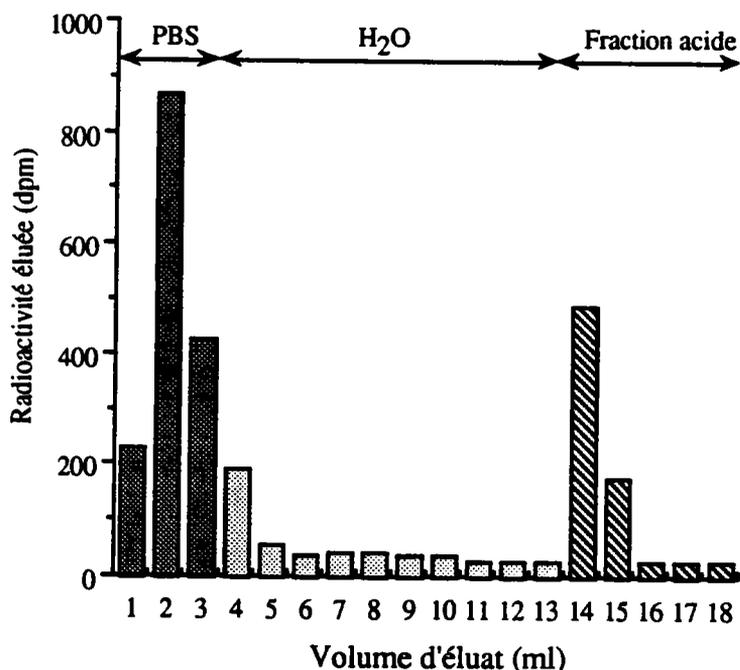


Figure 27 : Profil d'élution de la PhMal[^{14}C] 7-CEt-Gua

Le produit PhMal[^{14}C]-7-CEt-Gua est donc très faiblement retenu par la colonne, la capacité était inférieure à 4 pmoles.

La fraction d'anticorps fixée à la protéine A doit être faible ce qui pourrait expliquer la très faible capacité des colonnes. La fraction IgG de l'antisérum a donc été réincubée avec 2,5 ml de protéine A en utilisant un nouveau lot de réactif de pontage, à savoir le diméthyl pimélimidate lors de la préparation du gel (voir paragraphe 1.2.7). Le nouveau lot de colonne ne présente pas une meilleure capacité vis à vis de la PhMal[^{14}C]-7-CEt-Gua.

Ces colonnes de trop faible capacité ne nous permettent pas de purifier les PhMal-7-alkylguanines. Nous avons donc utilisé le sérum provenant du second lapin, bien que l'échiquier de croisement effectué lors des expériences préliminaires de l'ELISA montraient une moins bonne réponse de cet antisérum vis-à-vis de l'antigène d'enrobage.

4.2.4) Spécificité de l'antisérum du second lapin

De la même manière que pour le premier antisérum, une série de tests ELISA de type compétitifs est réalisée afin de définir la réactivité croisée de cet antisérum avec les PhMal-7-alkylguanines.

Cet antisérum présente très peu de réactivité croisée avec les PhMal 7-AlkylGua (Figure 28)

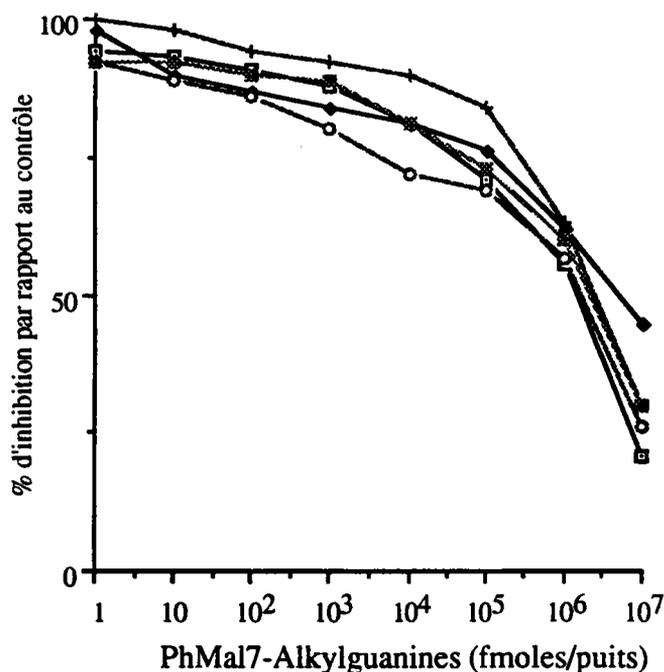


Figure 28 : Courbes d'inhibition des PhMal 7-alkylguanines à 4°C

(□) PhMal 7-CEtGua, (◆) PhMal 7-CMGua, (○) PhMal 7-MeGua
(+) PhMal 7-EtGua, (■) PhMal 7HEtGua

La concentration nécessaire en PhMal-7-alkylguanine pour obtenir 50 % d'inhibition par rapport au contrôle est supérieure à 10³ pmoles/puit.

Cet antisérum contenant peu d'immunoglobuline IgG capables de reconnaître les PhMal 7-alkylguanines, il n'était pas possible de préparer des colonnes d'immunoaffinité avec cet antisérum pour purifier les dérivés PhMal-7-alkylGua.

5) Discussion

Une série de dérivés phénylmalondialdéhyde des 7-alkylguanines a été synthétisée (méthyl, éthyl, hydroxyéthyl, dihydroxypropyl, carboxyméthyl et carboxyéthyl) guanine, l'analyse des spectres RMN et spectres de masse permettent de confirmer la structure chimique de ces composés. Ces dérivés ont des propriétés de fluorescence supérieure à celle des 7-alkylguanines. La limite de détection des dérivés fluorescents est de 1 pmole/essai. Les études en fluorescence d'excitation synchrone n'ont pas permis d'augmenter la sensibilité de détection.

Le rendement de dérivation des 7-alkylguanines est variable. Aussi pour s'affranchir de ce problème nous avons utilisé la 7-éthylguanine comme standard interne. Les limites de détection sont de 2 pmoles pour la 7-méthylguanine et de 4 pmoles pour la 7-hydroxyéthylguanine. La dérivation ne semble pas augmenter de façon importante la sensibilité de mesure de ces bases. En effet la limite de détection obtenue par mesure de la fluorescence directe de la 7-méthylguanine était de 8 pmoles. Cependant une amélioration de la sensibilité peut être envisagée en augmentant le rendement jusqu'à 100%. Une augmentation du rendement de la réaction a déjà été constaté en ajustant le pH des solutions de 7-alkylguanine à 9 avec de l'ammoniaque avant la dérivation. Les solutions de 7-alkylguanines sont réalisées dans l'acide chlorhydrique 0,1N, l'ajout d'ammoniaque permet de déprotonner les bases qui sont alors sous forme hydrochlorures.

Les dérivés PhMal-7-alkylguanine se forment rapidement à 110°C (en 25 minutes) pour les faibles concentrations de base (2 à 50 pmoles). Les études cinétiques de formation des dérivés ne nous a pas permis de déterminer un temps de réaction nécessaire pour un rendement de 100% ; des composés inconnus se forment également rapidement.

Nous avons fait d'autres essais afin d'améliorer la formation des dérivés et de minimiser la production des composés parasites. Des dérivations ont ainsi été effectuée avec différentes concentrations en phénylmalondialdéhyde. En effet pour les faibles concentrations de 7-alkylguanines, les conditions stoechiométriques de la réaction ne sont plus vérifiées. Un excès de PhMal est nécessaire pour favoriser la dérivation. Ainsi pour des quantités de 1 à 50 pmoles de 7-alkylguanine, des concentrations de PhMal de 40 μ M à 40 mM dans l'acide acétique ont été ajoutées. La concentration de 3,4 mM a été retenue (soit 500 μ g PhMal /ml d'acide acétique). Le remplacement de l'acide acétique par un acide plus fort à savoir l'acide trifluoroacétique n'a pas permis d'augmenter le rendement : les dérivés s'hydrolysant dans cet acide.

Une étude récente sur la formation d'un adduit malondialdéhyde sur la désoxyguanosine montre que cette réaction d'adduction est réversible. L'hydrolyse est rapide à forte température (100°C) (Agarwal et Draper, 1992). Cette réaction est similaire à celle que nous avons effectué. Lors de la dérivation, la synthèse des PhMal-7-alkylguanines génère deux molécules d'eau, qui pourraient favoriser la réaction d'hydrolyse des dérivés (Figure 29).

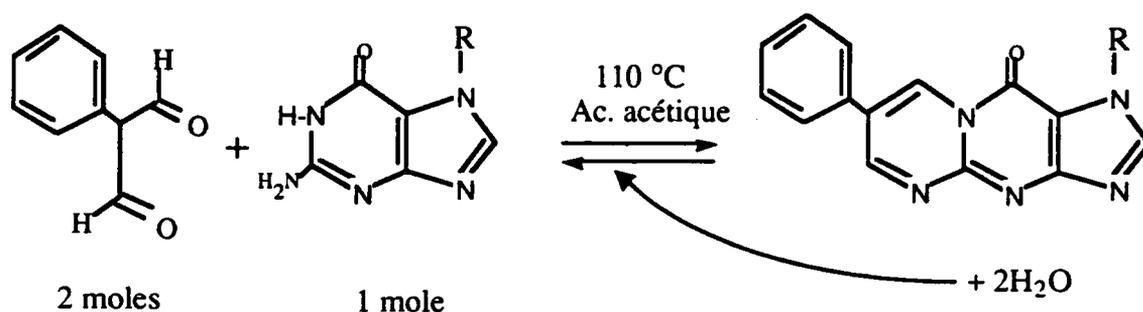


Figure 29 : Mécanisme possible de l'hydrolyse des dérivés fluorescents des 7-alkylguanines (R = groupe alkyl)

Cette hypothèse pourrait expliquer le problème de rendement de dérivation. Les produits se formeraient, l'eau produite favoriserait l'hydrolyse. Pour tester cette hypothèse la réaction de dérivation devra être effectuée en présence d'un composé capable de piéger les molécules d'eau (tamis moléculaire).

Dans un second temps nous avons synthétisé les antigènes afin d'immuniser des lapins. Le but étant d'obtenir un antiserum spécifique des PhMal-7-alkylguanines pour la production de colonne d'immunoaffinité. Les anticorps (voir chapitre 3) doivent reconnaître toute une famille de molécules. La similitude du noyau fluorescent a été confirmée par les études spectroscopiques. Aussi la reconnaissance de la molécule doit être dirigée vers cette partie commune aux dérivés fluorescents. Le couplage de la protéine a donc été réalisé à partir de la fonction carboxylique de la PhMal-7-carboxyéthylguanine transformée en ester actif. Un des deux antisérums obtenu suite à l'immunisation des lapins reconnaît une série de bases dérivées. Cependant l'élaboration de colonnes ne nous a pas permis de purifier les produits, la capacité de rétention de ces colonnes est très faible. Nous avons vérifié que l'antiserum ne s'était pas dégradé pendant le stockage.

La dérivation des 7-alkylguanines permet de diminuer la limite de détection par spectrofluorimétrie. Cette technique de dérivation doit être encore améliorée avant d'être appliquée à des échantillons biologiques.

Le post-marquage au ^{32}P permet d'obtenir une sensibilité de détection d'environ 10 fmoles pour la 7-méthylguanine (Hemminki et Mustonen, 1990). Malgré une sensibilité importante cette technique est plus difficile à développer, elle nécessite des précautions de manipulation importantes pour éviter tout risque de contamination radioactive alors que l'utilisation de la PhMal ne demande pas de précaution particulière. En effet ce produit à la concentration de 2 mg/ boîte de Petri ne s'est pas révélé mutagène dans le test d'Ames avec les souches TA 100 et TA 98 (Moschel et Leonard, 1976).

Chapitre 5

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

1) Synthèse des résultats

L'objectif majeur de ce travail était de développer une technique de détection des 7-alkylguanines d'ADN incubé avec un suc gastrique nitrosé afin d'identifier des produits responsables de génotoxicité. Nos premiers travaux ont consisté à mettre au point une méthode de détection des 7-alkylguanines dans le surnageant de dépurination de l'ADN par mesure de la fluorescence après purification et concentration sur colonne d'immunoaffinité. Ces colonnes réalisées avec un antiserum de lapin retiennent préférentiellement la 7-éthylguanine, la 7-méthylguanine, la 7-hydroxyéthylguanine, la 7(2,3)-dihydroxypropylguanine) alors que la guanine est moins bien retenue.

L'incubation de l'ADN avec les sucs gastriques nous a permis de mettre en évidence le pouvoir alkylant de certains sucs gastriques nitrosés chimiquement. Cependant toutes les mesures de bases alkylées à partir des sucs sont très proches de la limite de détection.

La sensibilité de cette méthode n'apparaît donc pas suffisante pour les applications biologiques. Afin d'augmenter cette sensibilité, nous avons dérivé chimiquement les 7-alkylguanines pour accroître leur fluorescence et faciliter ainsi leur détection par spectrofluorimétrie.

2) Perspectives

2.1) Dérivation des 7-alkylguanines par la phénylmalondialdéhyde

Le rendement de dérivation pourrait être amélioré en particulier pour les faibles concentrations en 7-alkylguanines. Les études concernant l'influence de la température la concentration en PhMal et le temps d'incubation n'ont pas permis d'augmenter le rendement de dérivation. L'étude de Agarwal et Draper (1992) sur la réaction de la malondialdéhyde sur la désoxyguanosine montre que l'adduit s'hydrolyse rapidement. La réaction de dérivation des PhMal-7-alkylguanines générant de l'eau, une hydrolyse partielle des produits pourrait expliquer le fait que le rendement de synthèse ne soit pas de 100 %. Une confirmation de cette hypothèse est néanmoins nécessaire en utilisant un tamis moléculaire capable de retenir les molécules d'eau lors de la synthèse. La dérivation devant être effectuée en présence d'acide acétique anhydre.

La purification et la concentration des produits dérivés permettraient également de diminuer le bruit de fond sur les chromatogrammes dû à la formation des composés inconnus .

L'immunisation de deux lapins ne nous a pas permis d'obtenir une quantité suffisante d'anticorps. Le mode de synthèse de l'antigène peut-être conservé, mais le taux de couplage de l'haptène à la protéine porteuse pourrait être amélioré afin d'optimiser la réponse immunitaire.

2.2) Applications

La sensibilité de la méthode de détection des 7-alkylguanines est déterminante pour permettre des études sur la teneur en agents alkylants avant ou après nitrosation des sucs gastriques ou d'autres fluides biologiques. Les concentrations en composés N-nitrosés sont de l'ordre de 1 à 10 μM dans les sucs gastriques de patients à jeun. La nitrosation chimique permet de nitroser les précurseurs, donc d'augmenter la concentration des agents génotoxiques.

Les sucs gastriques sont généralement prélevés après une période d'au moins 12 heures de jeûne. Ce système permet d'avoir une homogénéité dans les prélèvements. Par contre il n'est peut-être pas représentatif de la situation digestive. Il n'est pas exclu que des composés réactifs (CNO) soient décomposés après cette période de jeûne (Sobala *et al.*, 1991). En incubant l'ADN dans les sucs gastriques provenant de patients à jeun, nous avons peut-être une sous estimation des composés alkylants présents après l'alimentation.

Chez les patients ayant subi une gastrectomie partielle, on observe un reflux des sels biliaires dans l'estomac (Keighley *et al.*, 1984). Ces sels biliaires peuvent être déconjugués et métabolisés par les bactéries. Ils peuvent être nitrosés, les acides biliaires nitrosés sont mutagènes dans le test d'Ames mais également sur les lymphoblastes humains (lignées TK6 ; Paju *et al.*, 1982).

De la carboxyméthylguanine a été détectée après hydrolyse d'ADN de thymus de veau incubé avec de l'acide N-nitrosoglycocholique (Shuker *et al.*, 1987). Les colonnes d'immunoaffinité utilisées (chapitre 3) ne retiennent pas la 7-carboxyméthylguanine, pour effectuer ce dosage la production d'anticorps doit donc être envisagée. En revanche, le second antiserum obtenu contre les PhMal-7-alkylguanines a une bonne réactivité croisée pour la PhMal-7-CMGua. Cependant, la purification sur colonne d'immunoaffinité n'est pas possible, ces colonnes présentent une capacité de rétention négligeable, mais on peut envisager d'utiliser l'antiserum restant pour effectuer un dosage ELISA de la PhMal-7-carboxyméthylguanine. La 7-CMGua pourrait être purifiée par CLHP et dosée après dérivation par ELISA.

Les nitrosopeptides sont également des agents alkylants. le N-(N'acétyl-L-propyl)-N-nitrosoglycine produit de l'O6-carboxyméthylguanine et 7-carboxyméthylguanine sur l'ADN *in vitro* (Challis, 1989 ; Fairhust, 1990).

L'incubation de l'ADN dans les sucs gastriques donnerait des renseignements sur le type de génotoxiques ou de leurs précurseurs présents en fonction des bases alkylées détectées.

2.3) Quantification du nombre de sites apuriques (AP)

A l'origine de ce projet, le dosage des sites apuriques dans l'ADN au moyen d'une sonde fluorescente avait été envisagée comme approche complémentaire au dosage des 7-alkylguanines.

La mesure des sites apuriques constitue une mesure des atteintes totales des guanines modifiées en position N7.

Une première approche a été effectuée et est basée sur la réactivité des hydrazines pour la fonction aldéhyde du site AP. Deux hydrazines commerciales ont été testées : le Lucifer Yellow et le cascade Blue mais sans résultat. Ceci peut-être à cause de l'encombrement stérique de ces molécules fluorescentes.

La suite de ces travaux fait l'objet d'une collaboration avec l'équipe de Professeur Lhomme (Grenoble). Une molécule fluorescente constituée d'un analogue de la méthoxyamine couplée à la fluoresceine est déjà synthétisée. Les résultats en cours devraient montrer que la molécule réagit avec la fonction aldéhyde du site AP.

Références bibliographiques

- Agarwal S, Draper HH, (1992), Isolation of malondialdehyde-deoxyguanosine adduct from rat liver DNA, *Free Radical Biology & Medicine*, **13**, 695-699
- Bailly V, Verly W G, O' Connor T, Laval J, (1989), Mechanism of DNA strand nicking at apurinic/apyrimidinic sites by *Escherichia coli* (formamidopyrimidine) DNA glycosylase, *Biochem. J.*, **262**, 581-589
- Bailly V, Verly WG, (1989a), AP endonucleases and AP lyases activity, *Nucleic Acids Res.*, **17**, 3617-3618
- Bartsch H, Ohshima H, Pignatelli B, Calmels S, (1992), Endogenously formed N-nitroso compounds and nitrosating agents in human cancer etiology., *Pharmacogenetics*, **2**, 272-277
- Bartsch H, Terracini B, Malaveille C, Tomatis L, Wahrendorf J, Brun G, Dodet B., (1983), Quantitative comparison of carcinogenicity, mutagenicity and electrophilicity of 10 direct-acting alkylating agents and the initial O6:7-alkylguanine ratio in DNA with carcinogenic potency in rodents., *Mutat.Res.*, **110**, 181-219
- Bartsch H, Tomatis L, (1983), Comparison between carcinogenicity and mutagenicity based on chemicals evaluated in the IARC monographs., *Environ.Health.Perspect.*, **47**, 305-317
- Baudot P, Andre JC, (1992), Intérêt et application en biologie, toxicologie et hydrologie de la spectrofluorimétrie d'excitation synchrone., *Ann.Fals.Exp.Chim.*, **85**, 61-77
- Bennett RA, Essigmann JM, Wogan GN., (1981), Excretion of aflatoxin-guanine adduct in urine of aflatoxin B1-treated rats., *Cancer Res.*, **41**, 650-654
- Beranek D T, (1990), Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents, *Mutat. Res.*, **231**, 11-30
- Beranek DT, Heflich RH, Kodell RL, Morris SM, Casciano DA., (1983), Correlation between specific DNA-methylation products and mutation induction at the HGPRT locus in Chinese hamster ovary cells., *Mutat.Res.*, **110**, 171-180
- Bertrand J R, Malvy C, Paoletti C, (1987), Quantification by fluorescence of apurinic sites in DNA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **143**, 768-774
- Bertrand J R, Vasseur J J, Gouyette A, Rayner B, Imbach J L, Paoletti C & Malvy C, (1987), Mechanism of cleavage of apurinic sites by 9-aminoellipticine, *J. Biol. Chem.*, **264**, 14172-14175
- Bertrand J R, Vasseur JJ, Rayner B, Imbach JL, Paoletti J, Paoletti C, Malvy C, (1989), Synthesis, thermal stability and reactivity towards 9- aminoellipticine of double stranded oligonucleotides containing a true abasic site, *Nucleic Acids Res.*, **17**, 10307-10319
- Boeing H, (1991), Epidemiological research in stomach cancer: progress over the last ten years., *Cancer Res.Clin.Oncol.*, **117**, 133-143
- Boiteux S, Laval J, (1983), Imidazole open ring 7-methylguanine an inhibitor of DNA synthesis., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **110**, 552-558
- Boiteux S, Gajewisk E, Laval J, Dizdaroglu M, (1992), Substrate specificity of *Escherichia coli* Fpg protein (Formamidopyrimidine-DNA Glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization, *Biochemistry*, **31**, 106-110.

- Boutwell RK, (1964), Some biological aspects of skin carcinogenesis, *Prog. exp. Tumor. Res.*, **4**, 207-250
- Boutwell RK, (1964), Some biological aspects of skin carcinogenesis., *Prog.Exp.Tumor.Res.*, **4**, 207-250
- Bressac B, Kew M, Wands J, Ozturk M., (1991), Selective G to T mutations of p53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa., *Nature.*, **350**, 429-431
- Brookes P, Lawley PD., (1964), Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin: relation between carcinogenic power of hydrocarbon and their binding to desoxyribonucleic acid., *Nature*, **202**, 781-784
- Cairn J, (1978), Science and society, In Freeman WH & company (eds) USA.
- Cairns J, (1989), The evolution of cancer research., *Cancer Cells*, **1**, 1-8
- Calmels S, Béréziat JC, Ohshima H, Bartsch H, (1991), Bacterial formation of N-nitroso compounds from administered precursors in the rat stomach after omeprazole-induced achlorhydria, *Carcinogenesis*, **12**, 435-439
- Calmels S, Ohshima H, Vincent P, Gounot AM, Bartsch H, (1985), Screening of microorganisms for nitrosation catalysis at pH 7 and kinetic studies on nitrosamines formation from secondary amines by *E. coli* strains, *Carcinogenesis*, **6**, 911-915
- Caygill C, Hill M, Craven J, Hall R, Miller C., (1984), Relevance of gastric achlorhydria to human carcinogenesis., In O'Neill IK, Von Borstel R, Miller C, Long J & Bartsch H (eds) N-nitroso-compounds: Occurrence, biological effects and relevance to human cancer (IARC Scientific publication n°57) International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, , 895-900
- Challis BC, (1989), Chemistry and biology of nitrosated peptides., *Cancer Surv.*, **8**, 363-384
- Chen BX, Kubo K, Ide H, Erlander BF, Wallace SS, Kow YW., (1992), Properties of monoclonal antibody for the detection of abasic sites, a common DNA lesion., *Mutat.Res.*, **273**, 253-261
- Chen CS, Pignatelli B, Malaveille, Bouvier G, Shuker D, Hautefeuille A, Zhang RF, Bartsch H, (1992), levels of direct-acting mutagens, total N-nitroso compounds in nitrosated fermented fish products, consumed in a high-risk area for gastric cancer in southern China, *Mutat.Res.*, **265**, 211-221
- Ciroussel F, Barbin A, Eberle G, Bartsch H., (1990), Investigation on relationship between DNA ethenobase adduct levels in several organs of vinyl-chloride-exposed rats and cancer susceptibility., *Biochem.Pharmacol.*, **39**, 1109-1113
- Constant J F, O' Connor T R, Lhomme J, Laval J, (1988), 9-((10-(aden-9yl)-4,8 diazadecyl)amino)-6-chloro-2-methoxy-acridine incises DNA at apurinic sites., *Nucleic Acids Res.*, **16**, 2691-2703
- Correa P, (1975), A model for gastric cancer epidemiology, *Lancet*, **2**, 58-60
- Correa P, (1983), The gastric precancerous process., *Cancer Surv.*, **2**, 437-448
- Correa P, (1988), A human model of gastric carcinogenesis, *Cancer Res.*, **48**, 3554-3560
- Dirheimer G, (1986), Cancérogènes chimiques et ADN, liaison covalente et modifications chimiques, *Ann.Biol.Clin.*, **44**, 647-655

- Doetsch P W, Cunningham R P, (1990), The enzymology of apurinic/apyrimidic endonucleases, *Mutat. Res.*, **236**, 173-201
- Dolan ME, Oplinger M, Pegg AE., (1988), Sequence specificity of guanine alkylation and repair ., *Carcinogenesis.*, **9**, 2139-2143
- Doll R, Peto R, (1981), The causes of cancer. Quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today., Oxford University Press. Oxford, New York., ,
- Durand MJ, Shuker DEG, (1993), Adducts and apurinic sites in "probe" DNA as markers of DNA-damaging potential in biological fluids., In Galteau MM, Henny J, Siest G (eds) Biologie Prospective "8ème colloque International de Pont-à-Mousson", in press,
- Eberle G, Glüsenkamp KH, Drosdziok W, Rajewky MF, (1990), Monoclonal antibodies for the specific detection of 3-alkyladenines in nucleic acids and body fluids., *Carcinogenesis*, **11**, 1753-1759
- Erlanger BF, Beiser SM, (1964) Antibodies specific for ribonucleosides and ribonucleotides and their reaction with DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **52**, 68-74.
- Fairhust N, (1990), Synthesis of modified purines., Thèse PhD Imperial College-South Kensington Londre., ,
- Farber E, (1982), Chemical carcinogenesis : a biologic perspective, *Am. J. Pathol.*, **106**, 271-296
- Farmer PB, Neuman HG, Henschler D., (1987), Estimation of exposure of man to substances reacting covalently with macromolecules., *Arch.Toxicol.*, **60**, 251-260
- Fortini P, Bignami M, Dogliotti E, (1990), Evidence for AP site formation related to DNA-oxygen alkylation in CHO cells treated with ethylating agents., *Mutat.Res.*, **236**, 129-137
- Fortini P, Calcagnile A, Vrieling H, Van Zeeland A, Bignami M, Dogliotti E, (1993), Mutagenic processing of ethylation damage in mammalian cells: The use of methoxyamine to study apurinic/apyrimidinic site-induced mutagenesis., *Cancer Res.*, **53**, 1149-1155
- Frisen MD, Garren L, Prevost V, Shuker DEG, (1991), Isolation of urinary 3-methyladenine using immunoaffinity columns prior to determination by low-resolution gas chromatography-mass spectrometry. . *Chem. Res. Toxicol.*, **4**, 102-106
- Gaubathz JW, Tan BH., (1993), Age-related studies on the removal of 7-methylguanine from DNA of mouse kidney tissue following N-methyl-N-nitrosourea treatment., *Mutat.Res.*, **295**, 81-91
- Gentil A, Margot A, Sarasin A, (1984), Apurinic sites cause mutations in simian virus 40., *Mutat. Res.*, **129**, 141-147
- Gentil A, Renault G, Madzak C, Margot A, Cabral-Neto JB, Vasseur JJ, Rayner B, Imbach JL, Sarazin A, (1990), Mutagenic properties of a unique abasic site in mammalian cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 704-710
- Goding JW., (1986), Monoclonal antibodies: principles and practice., Academic Press, London, ,

- Goth R, Rajewsky MF, (1974), Persistence of O6-Ethylguanine in rat-brain DNA: Correlation with nervous system-specific carcinogenesis by ethylnitrosourea., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, **71**, 639-643
- Groopman JD, Cain LG, Kensler TW., (1988), Aflatoxin exposure in human population: measurements and relationship to cancer., *Crit.Rev.toxicol.*, **19**, 113-145
- Groopman JD, Donahue PR, Zhu JQ, Chen JS, Wogan GN, (1985), Aflatoxin metabolism in humans: detection of metabolites and nucleic acid adducts in urine by affinity chromatography., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, **82**, 6492-6496
- Groopman JD, Hastler JA, Trudel LJ, Pikul A, Donahue PR, Wogan GN., (1992), Molecular dosimetry in rat urine of aflatoxin-N-7-guanine and other aflatoxin metabolites by multiple monoclonal antibody affinity chromatography and immunoaffinity/high performance liquid chromatography., *Cancer Res.* **52**, 267-274.
- Hall CN, Badawi AF, O'Connor PJ, Saffhill R, (1991), The detection of alkylation damage in DNA of human gastrointestinal tissues, *Br. J. Cancer*, **64**, 59-63
- Hall J, Bresil H, Serres M, Martel-Planche G, Wild CP, Montesano R., (1990), Modulation of O^6 -methyltransferase in rat and hamster liver after treatment with dimethylnitrosamine., *Cancer Res.* , **50**, 5426-5430
- Hanawalt PC., (1987), Preferential DNA repair in expressed genes., *Environ.Health Perspect.*, **76**, 9-14
- Harris CC, (1989), Interindividual variation among humans in carcinogen metabolism, DNA adduct formation and DNA repair., *Carcinogenesis*, **10**, 1563-1566
- Harris CC, (1991), Chemical and physical carcinogenesis : advances and perspectives for the 1990s, *Cancer Res.*, **51**, 5023s-5044s
- Harris CC, LA Veck G, Groopman J, Wilson VL, Mann D, (1986), Measurement of aflatoxin B1, its metabolites, and DNA adducts by synchronous fluorescence spectrophotometry., *Cancer Res.*, **46**, 3249-3253
- Hemminki K, Mustonen R, (1990), ^{32}P -Postlabeling of 7-methylguanine adducts in DNA, *Teratogenesis Carcinog. Mutagen.* , **10**, 223-230
- Herron DC, Shank RC, (1979), Quantitative high-pressure liquid chromatographic analysis of methylated purines in DNA of rats treated with chemical carcinogens, *Anal. Biochem.*, **100**, 58-63
- Hsu IC, Metcalf RA, Sun T, Welsh J, Wang NJ, Harris CC., (1991), p53 gene mutational hotspot in human hepatocellular carcinomas from Qidong., *Nature*, **350**, 427-428
- International Agency for research on Cancer , (1990), Cancer: causes, occurrence and control , Tomatis L, Aitio A, Day NE, Heseltine E, Kaldor J, Miller AB, Parkin DM, Riboli E., **100**,
- Karran P, Hjelmgren T, Lindahl T., (1982), Induction of a DNA glycosylase for N-methylated purines is part of adaptive response to alkylating agents., *Nature*, **296**, 770-773
- Karran P, Lindahl T, (1985), Cellular defence mechanisms against alkylating agents, *Cancer Surv.*, **4**, 583-599

- Keighkey MRB, Youngs D, Poxon V, (1984), Intra-gastric N-nitrosation is unlikely to be responsible for gastric carcinoma developing after operation for duodenal ulcer., *Gut*, **25**, 238-245
- Kelman DJ, Lilga KT, Sharma M., (1988), Synthesis and application of fluorescent labeled nucleotides to assay DNA damage., *Chem.Biol.Interactions.*, **66**, 85-100
- Kriek E, Den Engelse L, Scherer E, Westra JG., (1984), Formation of DNA modification by chemical carcinogens. Identification, localisation and quantification., *Biochem.Biophys.Acta.*, **738**, 181-201
- Kubo K, Ide H, Wallace SS, Kow YW, (1992), A novel, sensitive, and specific assay for abasic sites, the most commonly produced DNA lesion., *Biochemistry*, **31**, 3703-3708
- Kyrtopoulos SA, (1987), Investigation of DNA-damaging activity of human gastric juice. In Bartsch H, O'Neill IK, Schulte-Hermann R (eds). The relevance of N-nitroso compounds to human cancer: exposur mechanisms. IARC-Sci Publ N°24 .
- Kyrtopoulos SA, (1989), N-nitroso compound formation in human gastric juice, *Cancer Surv.*, **8**, 423-442
- Laval F, (1985), Repair of methylated bases in mammalian cells during adaptative response to alkylating agents, *Biochem.*, **67**, 361-364
- Laval F, (1991), Increase of O6-methylguanine-DNA_methyltransferase and N3-methyladenine glycosylase RNA transcripts in rat hepatoma cells treated with DNA-damaging agents ., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **176**, 1086-1092
- Laval F, Laval J, (1980), Enzymology of DNA repair, in Montesano R, Bartsch H, Tomatis L (eds) Molecular and cellular aspects of carcinogen Screening test, IARC Sci. Publi. N° 27, IARC, Lyon., 55-73
- Laval J, (1977), Two enzymes are required for strand incision in repair of alkylated DNA, *Nature*, **269**, 829-832
- Lawley PD, (1976), Methylation of DNA by carcinogens: some applications of chemical analytical methods. In: Montesano R, Bartsch H, Tomatis L, Davis W (eds). Screening tests in chemical carcinogenesis. IARC Sci Publ N°12 IARC, Lyon ,181-208
- Lawley PD, (1984) Carcinogenesis by alkylating agents. In Searle CE (eds), Chemical carcinogens (ACS Symposium series 182) American chemical Society, Washington DC 325-383.
- Lawley PD, Orr DJ., (1970), Specific excision of methylation products from DNA of *Echerichia coli* treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, *Chem.Biol.Interact.*, **2**, 154-157
- Lefrançois M, Bertrand JR, Malvy C, (1990), 9-amino-ellipticine inhibits the apurinic site-dependent base excision repair pathway, *Mutat. Res.*, **236**, 9-17
- Lindahl T., (1982), DNA repair enzymes., *Ann.Rev.Biochem.*, **51**, 61-67
- Liuzzi M, Talpaert-Borlé M, (1988), Use of methoxyamine to quantify apurinic-apyrimidinic sites., In Friedberg EC, Hanawalt PC (eds) Stanford University, California , DNA repair (volume 3). New York & Basel., , 443-457
- Loeb LA, Preston BD., (1986), Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites, *Ann.Rev.Genet.*, **20**, 201-230

- Loveless A, (1969), Possible relevance of O^6 alkylation of deoxyguanosine to mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides., *Nature*, **223**, 206-207
- Lutz WK, (1979), In vivo covalent binding of organic chemicals to DNA as a quantitative indicator in the process of chemical carcinogenesis, *Mutat.Res.*, **65**, 289-356
- Lutz Wk, (1986), Quantification evaluation of DNA binding data for risk estimation and for classification of direct and indirect carcinogens., *J.Cancer.Res.Clin.Oncol.*, **112**, 85-91
- Malaveille C, Vineis P, Estève J, Ohshima H, Brun G, Hautefeuille A, Gallet P, Ronco G, Terracini B, Bartsch H., (1989), Levels of mutagens in urine of smokers of black and blond tobacco correlate with their risk of bladder cancer., *Carcinogenesis*, **10**, 577-586
- Miller JA, (1970), Carcinogenesis by chemicals: an overview -G.H.A. Clowes memorial lecture. *Cancer Res.*, **30**, 559-576.
- Miller EC, Miller JA., (1947), The presence and significance of bound aminoazo dyes in the livers of rats fed p-dimethylaminoazobenzene., *Cancer Res.*, **7**, 468-480
- Miller JA, Miller EC., (1977), Ultimate chemical carcinogens as reactive mutagenic electrophiles., In: Hiatt HH, Watson JD & Winsten JA (eds) Origins of human cancer (book B), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, , 607-627
- Mirvish SS, (1983), The etiology of gastric cancer. Intra gastric nitrosamide formation and other theories., *J. Natl.Cancer Inst.*, **71**, 629-647
- Montes G, Cuello C, Gordillo G, Pelon W, Johnson W, Correa P., (1979), Mutagenic activity of gastric juice., *Cancer Lett.*, **7**, 307-312
- Moschel RC, Leonard NJ, (1976), Fluorescent modification of guanine, reaction with substituted malondialdehydes, *J. Org. Chem.*, **41**, 294-300
- Müller R, Adamkiewicz J, Rajewsky MF, (1982), Immunological detection and quantification of carcinogen-modified DNA components. In Bartsch H, Armstrong B (eds), Host factors in human carcinogenesis, IARC Sci.Publ.N°39, IARC Lyon, 463-479.
- Muñoz N, Asvall J, (1971), Time trends of intestinal and diffuse types of gastric cancer in Norway., *Int.J.Cancer.*, **8**, 144-157
- Mustonen R, Hemminki k, (1992), 7-methylguanine levels in DNA of smokers' and non-smokers' total white blood cells, granulocytes and lymphocytes, *Carcinogenesis*, **13**, 1951-1955
- O' Connor TR, Laval J , (1989), Physical association of the 2,6 diamino-4-hydroxy-5N-formamidopyrimidine DNA glycosylase of Escherichia Coli and an activity nicking DNA at apurinic/apyrimidinic sites, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, **86**, 5222-5226
- O'Connor TR, Graves RJ, de Murscia G, Castaing B, Laval J, (1993), Fpg protein of *Escherichia coli* is a zinc finger protein whose cysteine residues have a structural and/or functional role., *J. Biol. Chem.*, **268**, 9063-9069.
- Oshima H, Bartsch H, (1981), Quantitative estimation of endogenous nitrosation in humans by monitoring N-nitroso proline excreted in urine., *Cancer Res.*, **41**, 3658-3662

- Park JW, Ames B, (1989), 7-methylguanine adducts in DNA are normally present at high levels and increase on aging : analysis by HPLC with electrochemical detection, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, **85**, 7647-7470
- Pegg AE, Byers TL, (1992), repair of DNA containing O6-alkylguanine, *FASEB. J.*, **6**, 2302-2310
- Perera FP, (1987), Molecular cancer epidemiology: A new tool in cancer prevention., *J.Natl.Cancer.Inst.*, **78**, 887-898
- Perera FP, Jeffrey AM, Brandt-Rauf PW, Brenner D, Mayer JL, Smith S, Latriano L, Hemminki K, Santella RM., (1990), Molecular epidemiology and cancer prevention., *Cancer Detect.Prev.*, **14**, 639-645
- Perera FP, Poirier MC, Yuspa SH, Nakayama J, Jaretzki A, Curnen MM, Knowles DM, Weinstein IB, (1982), A pilot project in molecular cancer epidemiology: determination of benzo(a)pyrene-DNA adduct in animal and human tissues by immunoassays., *Carcinogenesis*, **3**, 1405-1410
- Peto R, (1977), Epidemiology, multistage models, and short-term mutagenicity test., In: Hiatt HH, Watson JD & Winsten JA (eds) Origins of human cancer (bookC), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, , 1403-1428
- Phillips DH, (1990), Modern methods of DNA adduct determination., In: Cooper CS & Grover PL (eds), Chemical carcinogenesis and mutagenesis I, Springer-Verlag Berlin, 503-546
- Pierre J, Laval J., (1981), Specific nicking of DNA at apurinic sites by tripeptides containing aromatic residues., *J.Biol.Chem.*, **239**, 10217-10220
- Pignatelli B, Malaveille C, Rogatto A, Hautefeuille A, Thuillier P, Muñoz N, Moulinier B, Berger F, De Monclos H, Lambert R, Correa P, (1993), N-nitroso compounds and their precursors in gastric juice from patients with and without precancerous lesion of stomach, *Eur.J.Cancer.*, in press,
- Prevost V, Shuker DEG, Bartsch H, Pastorelli R, Stillwell WG, Trudel LJ, Tannenbaum SR, (1990), The determination of urinary 3-methyladenine by immunoaffinity chromatography-monoclonal antibody-based ELISA: use in human biomonitoring studies, *Carcinogenesis*, **11**, 1747-1751
- Prevost V, Shuker DEG, Friesen MD, Eberle G, Rajewsky MF, Bartsch H., (1993), Immunoaffinity purification and gas chromatography-mass spectrometric quantification of 3-alkyladenines in urine: metabolism studies and basal excretion levels in man, *Carcinogenesis*, **14**, 199-204
- Poirier MC, (1981), Antibodies to carcinogen-DNA adduct., *J.Natl.Cancer.Inst.*, **67**, 515,519
- Poirier MC, Egorin MJ, Fichtinger-Schepman AM, Yuspa SH, Reed E (1988), DNA adducts of cisplatin and carboplatin in tissues of cancer patients. In Bartsch H, Hemminki K, O'Neill IK (eds), Methods of detecting DNA damaging agents humans: applications in cancer epidemiology and prevention. IARC Sci.Publ. N°89, IARC Lyon 313-320.
- Puju S, Shuker DEG, Bishop WW, Falchuk KR, Tannenbaum SR, Thilly WG., (1992), Mutagenicity of N-Nitroso bile conjugates in Salmonella typhimurium and diploid human lymphoblasts., *Cancer Res.*, **42**, 2601-2604
- Quillardet P, Hofnung M, (1985), The SOS chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures, *Mutat.Res.*, **147**, 65-78

- Randerath K, Randerath E, Danna TF, Van Golen L, Putman KL, (1989), A new sensitive 32P-postlabelling assay based on the specific enzymatic conversion of bulky DNA lesion to radiolabeled dinucleotides and nucleoside 5'-monophosphates., *Carcinogenesis*, **10**, 1231-1339
- Randerath K, Reddy MV, Gupta RC., (1981), 32P-labelling test for DNA damage., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, **78**, 6126-6129
- Richardson FC, Richardson KK, (1990), sequence dependent formation of alkyl DNA adducts: a review of methods, results and biological correlates , *Mutat.Res.*, **233**, 127-138
- Rio P, Leng M., (1983), Preferential binding of the chemical carcinogen N-hydroxy-2-aminofluorene to B-DNA as compared to Z-DNA, *Nucleic Acids Res.*, **11**, 4947-4946
- Roberts JJ, Warwick CP., (1963), The reaction of β propiolactone with guanosine, deoxyguanylic acid and RNA., *Biochem.Pharmacol.*, **12**, 1441-1442
- Rothman N, Poirier MC, Baser MC, Hansen ME, Gentile JA, Bowman C, Strickland PT (1990), Formation of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in peripheral white blood cells during consumption of charcoal-broiled beef., *Carcinogenesis*, **11**, 1241-1243
- Rosa S, Fortini P, Karran P, Bignami M, Dogliotti E., (1991), Processing in vitro of abasic site reacted with methoxyamine: a new assay for the detection of abasic sites formed in vivo, *Nucleic Acids Res*, **19**, 5569-5574
- Ross AH, Smith MA, Anderson JA, Small WP., (1982), Late mortality after surgery for peptic ulcer., *N.Eng.J.Med.*, **307**, 519-522
- Sabbioni G, Tannenbaum SR, Shuker DEG., (1986), Synthesis of volatile, fluorescent 7-methylguanine derivatives via reaction with two substituted fluorinated malondialdehydes, *J. Organi. Chem.*, **51**, 3244-3246
- Santella R., (1988), Application of new techniques for the detection of carcinogen adducts to human population monitoring., *Mutat.Res.*, **205**, 271-282
- Schaaper RM, Loeb LA, (1991), Depurination causes mutations in SOS-induced cells, *Proc.Natl.Acad..USA.* , **78**, 1773-1777
- Schut HA, Shiverick KT, (1992), DNA adducts in humans as dosimeters of exposure to environmental, occupational, or dietary genotoxins, *FASEB J.*, **6**, 2942-2951
- Sharma M, Box HC, Paul CR, (1990), Detection and quantification of 8-hydroxydeoxyguanosine 5'-monophosphate in X-irradiated calf-thymus DNA by fluorescence postlabelling., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **167**, 419-424
- Shuker DEG, Howell JR, Street BW, (1987), Formation and fate of nucleic acid and protein adducts derived from N-nitroso-bile acid conjugates., In Bartsch H, O'Neill IK, Schulte-Hermann, Relevance of N-nitroso compounds to human cancer: exposures and mechanisms., IARC Sci Pub N°84, International Agency for the Research on Cancer, Lyon, 187-190
- Shuker DEG, Farmer PB, (1988), Urinary excretion of 3-methyladenine in humans as marker of nucleic acid methylation. In Bartsch H, Hemminki K, O'Neill IK(eds), Methods for detecting DNA damaging agents in humans: application in cancer epidemiology and prevention IARC Sci.Publ. N°89, IARC Lyon, 92-96.

- Shuker DEG, Farmer PB, (1992), Relevance of urinary DNA adducts as markers of carcinogen exposure , *Chem.Res.Toxicol.*, **5**, 450-460
- Shuker DEG, Friesen MD, Garren L, Prevost V., (1991), A rapid gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of urinary 3-methyladenine: application in human subjects., In O'Neill IK, Chen J & Barsch H (eds), Relevance to human cancer of N-Nitroso compounds, tobacco smoke and mycotoxins. IARC Sci.Publ. N°105, IARC, Lyon., 102-106
- Shuker DEG, Durand MJ, Molko D, (1993), Florescent labelling of modified DNA bases. In Phillips DH, Castegnaro M, Bartsch H (eds), Postlabelling methods for detection of DNA adducts. IARC Sci. Publ. N° 124, IARC, Lyon, 221-231.
- Singer B, Bodell WJ, Cleaver JE, Thomas GH, Rajewky MF, Thon W., (1978), Oxygens in DNA are targets for ethylnitrosourea in normal and xeroderma pigmentosum fibroblasts in rat brain cell, *Nature*, **276**, 85-88
- Singer B, Grunberger D, (1983), Molecular biology of mutagens and carcinogens. In: Singer B & Grunberger D (eds) Plenum Press, New York, London. , ,
- Sobala GM, Pignatelli B, Schorah CJ, Bartsch H, Sanderson M, Dixon MF, Shires S, King RFG, Axon ATR. , (1991), Levels of nitrite, nitrate, N-nitroso compounds, ascorbic acid and total bile acids in gastric juice of patients with and without precancerous conditions of stomach. , *Carcinogenesis*, **12**, 193-198
- Stahlsberg H, Taksdal S, (1971), Stomach cancer following gastric surgery tor benign conditions., *Lancet*, ii, 1175-1177
- Steigher RJ, Povirk LF., (1990), Effect of in vitro cleavage of apurinic/apyrimidinic sites on bleomycin-induced mutagenesis of repackaged lambda phage., *Mutat.Res.*, **240**, 93-100
- Stillwell WG, Glogowski J, Xu HX, Wishnok JS, Zavala D, Montes G, Correa P, Tannenbaum SR., (1991), Urinary excretion of nitrate, N-nitroso proline, 3-methyladenine and 7-methylguanine in a Colombian population at high risk of gastric cancer., *Cancer Res.*, **51**, 190-194
- Stricklang PT, Boyle JM., (1984), Immunoassay of carcinogen-modified DNA., *Prog.Nucleic.Acid.Res.Mol.Biol.*, **31**, 1-58
- Suzuki K, Mitsuoka T, (1984), N-nitrosamine formation by bacteria of intestine., In O'Neill IK, Von Borstel RC, Long JE, Miller CT and Bartsch H, eds. N-Nitroso compounds : occurrence, biological effects and relevance to human cancer, Lyon, France, IARC Scientific Publications No. 57, International Agency for Research on Cancer, 275-281
- Swenberg JA, Bedell MA, Billings KC, Umbenhauer DR, Pegg AE., (1982), Cell specific difference in O6-alkylguanine DNA repair activity during continious carcinogen exposure, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **79**, 5499-5502
- Swenberg JA, Richardson FC, Boucheron JA, Dyroff MC, (1985), Relationships between DNA adduct formation and carcinogenesis, *Environ.Health.Perspect*, **62**, 177-183
- Tanenbaum SW, Beiser SM, (1963), Pyrimidine-specific antibodies which react with deoxyribonucleic acid, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, **48**, 662-668
- Talpaert-Borle M, Liuzzi M, (1983), Reaction of apurinic/apyrimidinic sites with [¹⁴C] methoxiamine: a methode for the quantitative assay of AP sites in DNA, *Biochim. Biophys.Acta*, **740**, 410-416.

- Tchou J, Kasai H, Shibutani S, Chung MH, Laval J, Grollman Ap, Nishimura S, (1991), 8-Oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 4690-4694
- Tomatis L, (1985), The contribution of epidemiological and experimental data to the control of environmental carcinogens, *Cancer Lett.*, **26**, 5-16
- Umberhauer D, Wild Cp, Montesano R, Saffill R, Boyle JM, Huh N, Kirstein U, Thomale J, Rajewsky MF, Lu SH, (1985), O6-methyldeoxyguanosine in oesophageal DNA among individuals at risk of oesophageal cancer., *Int.J.Cancer.*, **36**, 661-665
- Uziel M, Houck K, (1991), Direct labelling of DNA-adducts formed from carcinogenic diol-epoxides with a fluorescent reporter compound specific for the cis vic-diol group., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **180**, 1233-1240
- Vainio H, Hemminki K, Wilbourn J, (1985), Data on carcinogenicity of chemicals in the IARC Monographs programme., *Carcinogenesis*, **6**, 1653-1665
- Van Benthem J, Vermeulen E, Winterwerp HHK, Wild CP, Schere E, Den Englese L, (1992), Accumulation of O6 and 7-methylguanine in DNA of N-nitroso-N-methylbenzylamine-treated rat in restricted to non-target organs for N-nitroso-methylbenzylamine induced carcinogenesis, *Carcinogenesis*, **13**, 2101-2105
- Vasseur JJ, Rayner B, Imbach JL., (1986), Preparation of a short synthetic apurinic oligonucleotide., *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **134**, 1204-1208
- Weinfeld M, Liuzzi M, Paterson MC., (1990), Response of phage T4 polynucleotide kinase toward dinucleotides containing apurinic sites: design of a 32P-postlabeling assay for apurinic sites in DNA., *Biochemistry*, **19**, 1737-1743
- Weistein IB, (1988), The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implication for cancer prevention and treatment., *Cancer Res.*, **48**, 4135-4143.
- Weistein IB, (1991), Cancer prevention: recent progress and future opportunities., *Cancer Res.*, **51**, 5080s-5085s
- Weston A, Rowe ML, Manchester DK, Farmer PB, Mann DL, Harris CC, (1988), Fluorescence and mass spectral evidence for the formation of benzo(a)pyrene anti-diol epoxide-DNA and hemoglobin adduct in humans., *Carcinogenesis*, **10**, 251-257
- Wild CP, (1990), Antibodies to DNA alkylation adducts as a analytical tools in carcinogenesis, *Mutat.Res.*, **233**, 219-233
- Wild CP, Jiang YZ, Allen SJ, Jansen LA, Hall AJ, Montesano R, (1990), Aflatoxin-albumin adducts in human sera from different regions of the world., *Carcinogenesis*, **11**, 2271-2274.
- Wogan GN, (1992), Molecular epidemiology in cancer risk assessment and prevention: Recent progress and avenues for future research, *Environ.Health.Perspect.*, **98**, 167-178
- Yamasaki E, Ames BN, (1977), Concentration of mutagens from urine by adsorption with the non polar resin XAD-2: cigarette smokers have mutagenic urine., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, **74**, 3555-3559
- Zetter A, Duly PE., (1974), Principles of competitive binding assays (saturation analyses) II. Sequential saturation. , *Clin.Chem.*, **20**, 5-14

ANNEXE

Solutions tampons

Tampon PBS: Solution saline tamponnée par du phosphate à pH= 7.4.

NaCl : 140 mM
KCl : 2,7 mM
KH₂PO₄ : 1,5 mM
Na₂HPO₄ : 10 mM

PBS Tween : PBS + 0,005 % Tween 20 (Vol/Vol).

PBS Azide : PBS + 0,02% d'azide de sodium (poids/vol.)

Tampon Cacodylate pH7,2

cacodylate de sodium : 200mM
EDTA : 1mM
perchlorate de sodium : 130mM

Milieu de culture des bacteries E coli (SOS Chromotest).

Milieu L (500 ml).

Bacto tryptone (Difco Laboratories) 5 g
Bacto Yeast extract (Difco Laboratories) 2,5 g
NaCl : 5 g

Milieu L ampicilline : 20 µg d'ampicilline/ml

Durand MJ, Shuker DEG, (1993), Adducts and apurinic sites in "probe" DNA as markers of DNA-damaging potential in biological fluids., In Galteau MM, Henny J, Siest G (eds) Biologie Prospective "8ème colloque International de Pont-à-Mousson", in press,

ADDUCTS AND APURINIC SITES IN "PROBE" DNA AS MARKERS OF DNA-DAMAGING POTENTIAL IN BIOLOGICAL FLUIDS

Marie-José Durand and David Shuker

Unit of Environmental Carcinogens and Host Factors
International Agency for Research on Cancer
150 Cours Albert Thomas, 69008 Lyon, France

INTRODUCTION

Biological fluids, such as gastric juice and urine, often contain genotoxic substances which may play a role in the aetiology of cancers in tissues in contact with these fluids. For example, elevated levels of mutagens, of unknown structure, have been found in urine of smokers of black tobacco who are at higher risk of developing bladder cancer than smokers of blond tobacco (Malaveille et al, 1989). Similarly, levels of total N-nitroso compounds or nitrosatable precursors were found to be higher in gastric juice of subjects at high risk of developing gastric cancer (Bartsch et al, 1989). However, these group specific methods which rely on either biological (mutagenicity) or chemical (the presence of an N-nitroso group) endpoints, are not easily adapted to the characterisation of key individual adducts or alkylating agents. The quantification and identification of genotoxic substances in complex milieux in a biologically meaningful way requires some novel analytical approaches. We have, therefore, explored the possibility of using a "probe" DNA method. DNA, which is well characterised as to the presence of adducts, is incubated with a biological fluid or food extract of interest and then recovered for analysis. This approach was first used to detect methylating agents in nitrite-treated gastric juice (Kyrtopoulos, 1987).

The rationale for the "probe" DNA approach is based on the fact that the major adducts formed by most alkylating agents are at N7 of 2'-deoxyguanosine (dG), with the proportion of this adduct compared to other adducts varying somewhat depending on the nature of the alkylating intermediate (Lawley, 1984). N7-alkyldG are somewhat unstable and can be readily depurinated to give the corresponding N7-alkylguanine (alkGua) by heating at neutral pH. Thus, individual adducts may be separated and quantified by determination of alkGua and an estimation of the total level of adduct formation may be obtained by measuring apurinic (AP) sites. This approach is summarised in Fig.1. Methods for the measurement of alkGua have been developed and will be briefly presented here. Our approach to the measurement of AP sites is based on the use of reactive fluorescent dyes (Bertrand et al, 1987) and is under development.

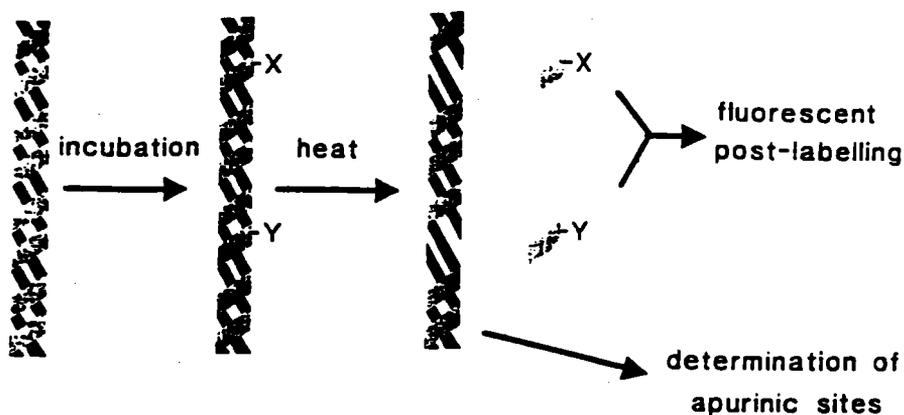


Fig. 1. Rationale for the use of "probe" DNA to detect alkylating agent activity in biological fluids.

IMMUNOCHEMICAL PURIFICATION OF ALKGUA

Recent advances in the preparation of antibodies against alkylpurines of diverse structure (reviewed by Shuker and Farmer, 1992) suggested that an antibody could be made which showed cross-reactivity with an homologues series of alkGua and which could then be used to prepare immunoaffinity columns. An antigen, based on 7-(2-carboxyethyl)guanine (7-CEGua), was designed to maximally expose the key structural features of alkGua for recognition by antibodies (Fig. 2).

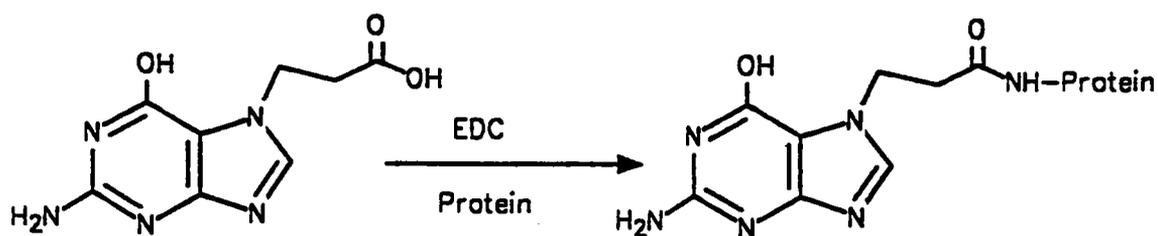


Fig. 2. Synthesis of 7-CEGua antigen

The 7-(2-carboxyethyl)guanine - methylated bovine serum albumin conjugate was used to immunise two rabbits. After several booster doses of antigen the serum was tested in a competitive ELISA and found to cross-react with several structurally related alkGua (Table). Interestingly, a number of alkGua were recognised better than 7-CEGua itself. A crude fraction of immunoglobulin G (IgG) was prepared from the serum by ammonium sulphate precipitation and covalently bound to protein A - Sepharose to make an immunoaffinity gel using essentially the same procedure as that recently described (Friesen et al, 1990). As predicted from the ELISA cross-reactivity data in the Table, a number of different alkGua were retained on the immunoaffinity columns and an example of this is shown in Fig.3. Trace A shows a standard mixture of 7-MeGua, 7-EtGua, 7-HOEtGua and 7-DHPGua with trace B showing the same mixture after retention on, and subsequent elution off, an immunoaffinity column. The capacity of 1 mL columns was 400 pmol of 7-EtGua.

Table. Cross-reactivity of 7-(2-carboxyethyl)guanine antiserum

Purine	Amount per well (pmol) for 50% inhibition
7-ethylguanine (7-EtGua)	11
7-(2,3-dihydroxypropyl)guanine (7-DHPGua)	28
7-(2-hydroxyethyl)guanine (7-HOEtGua)	50
7-(2-carboxyethyl)guanine (7-CEGua)	90
7-(2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl)guanine	200
7-methylguanine (7-MeGua)	700
7-carboxymethylguanine	>1000
guanine (Gua)	>1000
adenine (Ade)	>1000

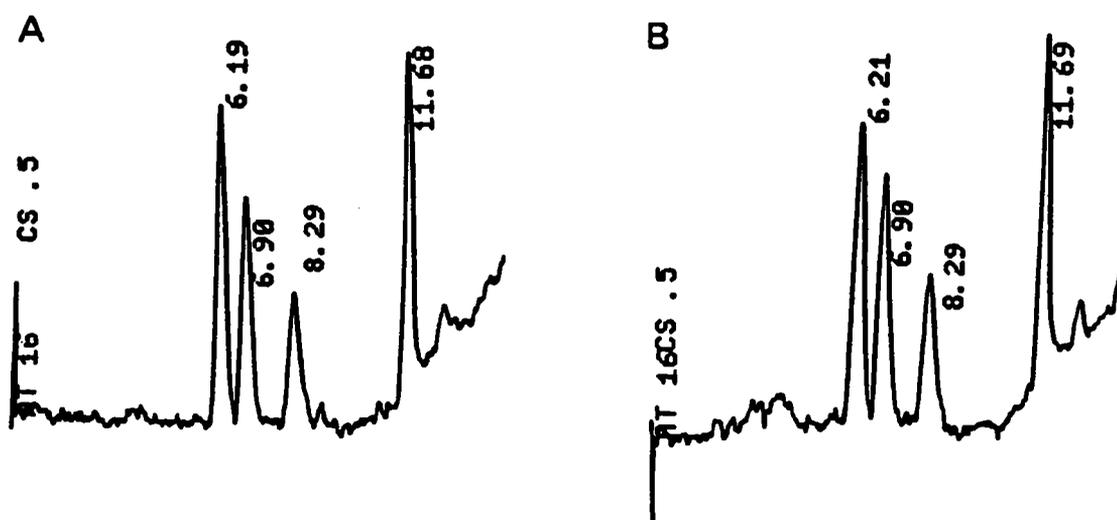


Fig. 3. HPLC chromatographic traces of a mixture of four alkGua before and after elution through an immunoaffinity column. AlkGua were detected using fluorescence detection (ex. 280nm, em. >315nm [filter]) after separation on a reversed phase column (Ultrasphere ODS 5 μ m, 150x4.6mm) using a linear gradient of acetonitrile and aqueous heptafluorobutyric acid (0.1% v/v).

DETECTION OF 7-EtGua IN DNA

Calf thymus DNA was treated with diethylsulphate (DES) according to a literature procedure (LeFrançois et al, 1990). The ethylated DNA was heated (6 hours at pH 5) to release 7-EtGua. At this point [14 C]-7-EtGua (2000dpm/3.6pmol) was added as an internal standard to correct for recovery in the subsequent steps. Depurinated DNA was precipitated, the supernatant evaporated to dryness and redissolved in PBS/0.02% azide prior to being eluted through an immunoaffinity column prepared as described above. After several steps of washing (PBS/azide followed by water) the fraction containing 7-EtGua was eluted with 1M acetic acid. Half the sample was counted for radioactivity by scintillation counting and the remainder was concentrated prior to analysis by reversed phase HPLC with fluorescence detection. The recovery of 7-EtGua was 95% (the levels of 7-EtGua were corrected for the amount of internal standard added). After treatment of DNA with 0.6 mM DES the level of 7-EtGua detected was 38-40 pmol/mg DNA.

DISCUSSION

The preliminary results presented in this paper indicate that the "probe" DNA approach to the quantification of DNA-damaging potential in biological fluids is feasible. It is unlikely that single alkylating agents are responsible for genotoxic activity in milieux such as gastric juice and it is, therefore, important that the available analytical methods are capable of detecting a range of adducts. The alkGua immunoaffinity column which is described exemplifies our approach to achieving this goal. In a model study, 7-EtGua was detected in DNA treated with diethylsulphate. However, in these experiments 7-EtGua was quantified using HPLC-fluorescence and the sensitivity of the method was limited by the low native fluorescence of 7-EtGua. We have recently developed a derivatization procedure in which alkGua are converted to highly fluorescent derivatives via reaction with phenylmalondialdehyde (Shuker et al., 1992). Current work is directed towards the combination of this method with the approach described above in order to have a sensitive procedure to quantify a range of alkGua in DNA.

ACKNOWLEDGMENTS

Marie-José Durand gratefully acknowledges the award of a studentship from the Ministère de la Recherche et Technologie and a Special Training Award from the International Agency for Research on Cancer.

REFERENCES

- Bartsch, H., Ohshima, H., Pignatelli, B. & Calmels, S. (1989) Human exposure to endogenous N-nitroso compounds: quantitative estimates in subjects at high risk for cancer of the oral cavity, oesophagus, stomach and urinary bladder. *Cancer Surveys* 8 335-362
- Bertrand, J.R., Malvy, C. & Paoletti, C. (1987) Quantification by fluorescence of apurinic sites in DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 143 768-774
- Friesen, M.D., Garren, L., Prevost, V. & Shuker, D.E.G. (1991) Isolation of urinary 3-methyladenine using immunoaffinity columns prior to determination by low-resolution gas chromatography-mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* 4 102-106
- Kyrtopoulos, S.A. (1987) Investigations of the DNA-damaging activity of human gastric juice. In Bartsch, H., O'Neill, I.K. & Schulte-Hermann, R. (eds), *The relevance of N-nitroso compounds to human cancer: Exposures and mechanisms (IARC Scientific Publication No. 84)* International Agency for Research on Cancer, Lyon, France pp 507-510
- Lawley, P.D. (1984) Carcinogenesis by alkylating agents. In; Searle, C.E. (ed), *Chemical Carcinogens (ACS Symposium Series 182)* American Chemical Society, Washington DC pp 325-383
- Lefrançois, M., Bertrand, J.R. & Malvy, C. (1990) 9-Amino-ellipticine inhibits the apurinic site-dependent base-excision repair pathway. *Mutat. Res.* 236 9-17
- Malaveille, C., Vineis, P., Estève, J., Ohshima, H., Brun, G., Hautefeuille, A., Gallet, P., Ronco, G., Terracini, B. & Bartsch, H. (1989) Levels of mutagens in the urine of smokers of black and blond tobacco correlate with their risk of bladder cancer. *Carcinogenesis* 10 577-586
- Shuker, D.E.G. & Farmer, P.B. (1992) Relevance of urinary DNA adducts as markers of carcinogen exposure. *Chem. Res. Toxicol.* 5 450-460

Fluorescent postlabelling of modified DNA bases

D.E.G. Shuker¹, M.-J. Durand¹ and D. Molko²

¹ International Agency for Research on Cancer,
Unit of Environmental Carcinogens and Host Factors,
150 cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France

² Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, DRFMC/SESAM,
Lésions des Acides Nucleiques, 38041 Grenoble Cedex, France

Summary. Postlabelling of modified DNA bases by methods other than the ³²P method has attracted little attention to date. Three approaches using fluorescence have been made: (a) detection of a characteristic adduct-DNA functionality, e.g. reaction of *cis*-vicinal diols of PAH-DNA adducts with a boronate-containing fluorescent molecule; (b) reaction of modified nucleotides with a reactive fluorescent molecule, e.g. detection of 8-HOdG-5'-monophosphate by reaction with dansyl chloride; (c) reaction of modified DNA bases with reagents giving fluorescent products, e.g. derivatization of 7-MeGua with phenylmalondialdehyde (PhMal).

Recent results in developing the latter approach are described. Reaction of a series of 7-alkylguanines, including 7-methyl-, 7-ethyl-, 7-(2-hydroxyethyl)-, 7-carboxymethyl-, 7-(2-carboxyethyl)- and 7-(2,3-dihydroxypropyl)-guanine, with PhMal gave fluorescent products showing similar spectral properties. The detection limit for fluorescence detection following reverse-phase HPLC separation was typically less than 1 pmol injected. In order to improve the sample clean-up before analysis, an antiserum has been prepared against the fluorescent derivative of 7-(2-carboxyethyl)guanine bound to carrier protein via the carboxyl group. The resulting antiserum cross-reacted with a number of PhMal derivatives.

Introduction

The great advantage of the ³²P-postlabelling method is that prior knowledge of the exact structure of DNA adducts is not required. However, some assumptions about the class(es) of adducts to be detected are useful in order to optimize chromatographic separations. The practical problems of handling relatively large quantities of ³²P may, however, deter potential users and it would seem reasonable to consider developing alternative postlabelling methods. The main requirements for a postlabelling procedure for DNA adducts are (i) that it must involve a chemical modification of the adduct (as selectively as possible) and (ii) that the modification confers properties on the modified adduct which enable its detection with great sensitivity.

One such alternative is fluorescent postlabelling, achieved either by attachment of a fluorescent 'tag' or by conversion of the adduct into a fluorescent derivative, in such a way that the resulting product is readily separable and quantifiable at low (typically, sub-picomole) levels. Although it is difficult to express precisely the absolute sensitivity of a fluorescence assay using a given fluorophore, since there is no fluorescence equivalent of an extinction coefficient, it is nonetheless clear that fluorescence assays can be extremely sensitive and that they can be improved by use of laser excitation and synchronous fluorescence procedures.

The available approaches to the measurement of DNA adducts using fluorescent postlabelling are reviewed below. In addition, some preliminary results on fluorescent postlabelling of N7-alkylguanine (7-alkGua) adducts are presented.

Existing procedures for fluorescent postlabelling

Detection of PAH adducts by fluorescent labelling of *cis*-vicinal diols in situ

A fluorescent reporter molecule, *N*-(5-fluoresceinyl)-*N'*-(3-boronatophenyl)-thiourea (FABA), which reacts specifically with *cis*-vicinal diols, has been used to quantitate PAH adducts in DNA treated with PAH-*anti*-diol epoxides (Uziel & Houck, 1991). The structure of the reaction product is shown in Figure 1.

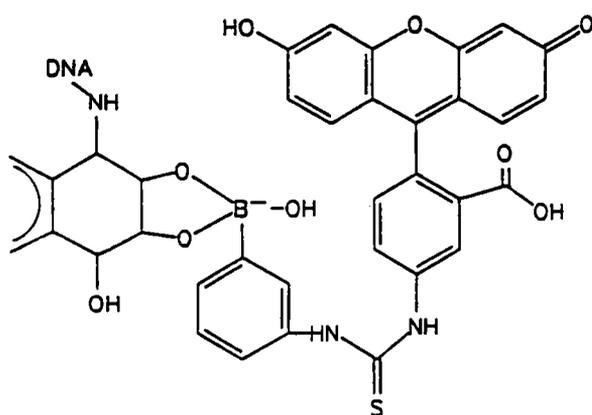


Figure 1. Structure of the putative product between *cis*-vicinal diols of PAH-*anti*-diol-epoxide adducts and FABA

The boronate moiety of FABA reacted selectively with the *cis*-vicinal diols which are present in DNA adducts formed by benz[*a*]anthracene-10,11-dihydrodiol-8,9-epoxide and benz[*a*]anthracene-3,4-dihydrodiol-1,2-epoxide but not with DNA adducted with 3-methylcholanthrene-11,12-dihydroepoxide, a simple K-region epoxide. The removal of excess unbound fluorescent reagent from modified DNA was achieved by gel filtration. Although the boronate-diol products were not isolated and independently characterized, the sensitivity of the assay was estimated to be one FABA residue per 100 000 bases using existing fluorescence detection methodology. This method clearly has inherent specificity for the group of PAH adducts derived from *anti*-diol-epoxides, which are, in some cases, the most carcinogenic isomers.

Detection of nucleoside-5'-monophosphates by labelling with dansyl chloride

A fluorescent group (5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl, dansyl) can be attached to the 5'-phosphate residue of mononucleotides which have been modified via 5'-phosphoramidation with ethylenediamine (Figure 2, Kelman *et al.*, 1988). This approach has been used to detect and quantify 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate (8-OHdGmp) residues in X-irradiated calf thymus DNA *in vitro* (Sharma *et al.*, 1990). The 5'-dansyl derivative of 8-OHdGmp was synthesized and characterized for use as an authentic standard.

The number of fluorescent residues per nucleotide can be increased by introduction of poly-L-lysine residues at the 5'-phosphate with subsequent reaction with fluorescamine (Kelman *et al.*, 1988), although this procedure does not seem to have been exploited for use with DNA adducts.

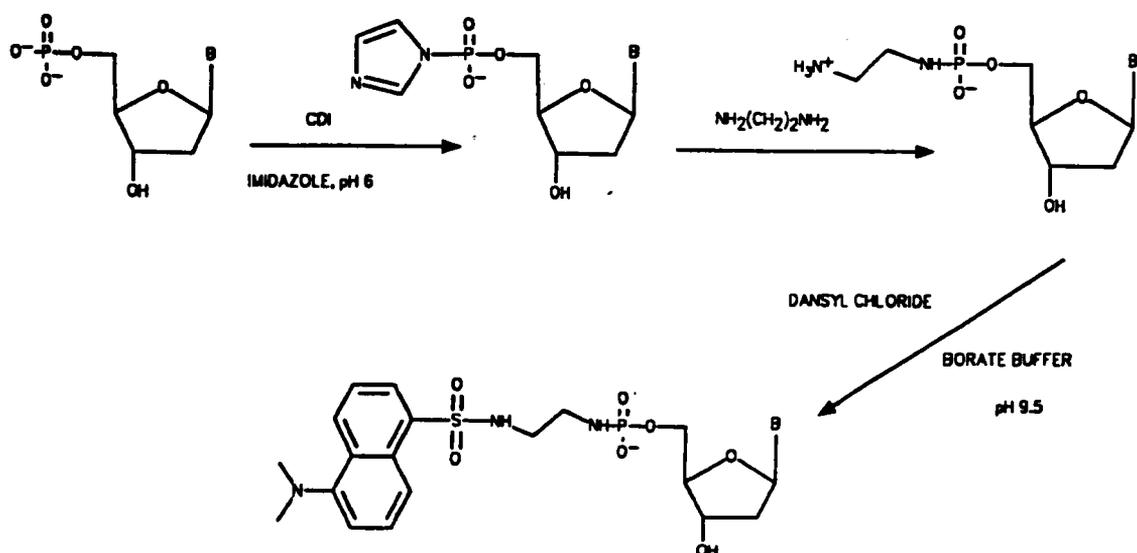


Figure 2. Structure of the dansyl derivative of a 5'-(ethylenediamine)-phosphoramidate nucleoside

Modification of guanine and derivatives with substituted malondialdehydes

Moschel and Leonard (1976) found that guanine could be converted into highly fluorescent derivatives by reaction, under mildly acidic conditions, with substituted malondialdehydes (Figure 3). Sabbioni *et al.*, (1986) reasoned that the presence of N7-alkyl groups should not interfere with this reaction and prepared derivatives of 7-methylguanine (7-MeGua) by reaction with both phenylmalondialdehyde (PhMal) and pentafluorophenylmalondialdehyde (PFMal, Figure 4). The PFMal derivative of 7-MeGua was not only fluorescent, but also volatile enough for GC-MS analysis. It was, however, susceptible to hydrolysis. This approach has now been extended to include the derivatization of a range of 7-alkGua using PhMal with separation and quantification by HPLC-fluorescence detection and recent results are described below.

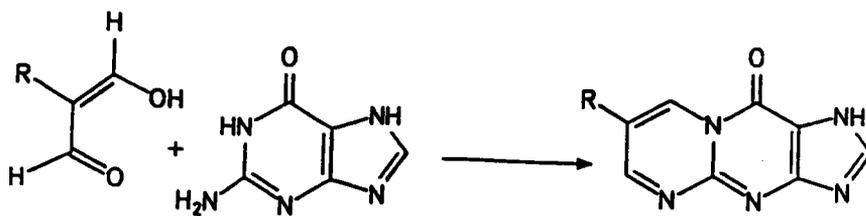


Figure 3. Reaction of substituted malondialdehydes with guanine

R = CH₃, CH₃O, C₆H₅, p-CH₃OC₆H₅, 3,4,5-(CH₃O)₃C₆H₂, p-(CH₃)₂NC₆H₄

Fluorescent postlabelling of 7-alkGua with phenylmalondialdehyde

N-7-Alkyldeoxyguanosines (N-7-alkdG) are the major adducts formed in DNA by many alkylating agents. N-7-AlkdG are unstable and may be readily depurinated by heating, giving rise to the corresponding 7-alkGua. 7-AlkGua are difficult to detect at low levels as they possess only weak native fluorescence (Hemminki, 1980). As part of a project directed towards the identification and quantification of alkylating agents in biological fluids using a 'probe' DNA approach (Kyrtpoulos, 1987), it became

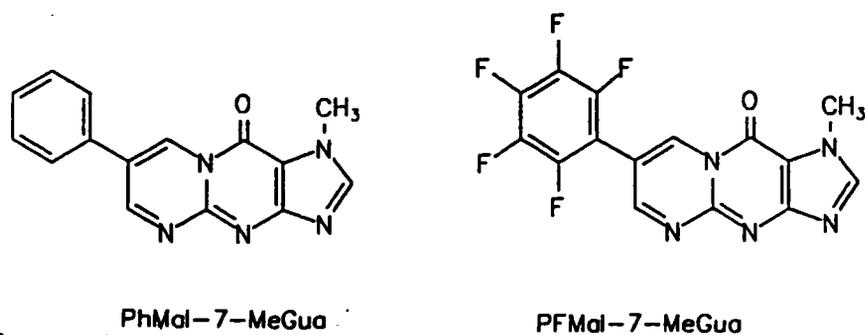


Figure 4. Phenylmalondialdehyde (PhMal) and pentafluorophenylmalondialdehyde (PFMal) derivatives of 7-methylguanine.

interesting to develop a general method for the determination of 7-alkGua. Based on results described above, a fluorescent postlabelling approach appeared promising and a range of PhMal-7-alkGua derivatives (strictly described as either 1,*N*²-[2-phenylprop-2-en-2-yl-1-ylidene]-7-alkylguanines or 7-phenyl-10-oxo-1-alkyl-9,10-dihydropyrimido[1,2-*a*]purines, Figure 5) were prepared by treatment of the corresponding 7-alkGua with phenylmalondialdehyde in aqueous acetic acid at 110°C for 1–2 h. The crude products were purified by repeated crystallization from aqueous ethanol and were normally more than 95% pure by HPLC analysis. NMR spectra (250 MHz in *d*₆-DMSO) showed common signals for the phenyl-substituted tricyclic ring system at 8.5–8.6 ppm (C²-H, s), 9.3–9.6 ppm (C⁸-H and C⁹-H, dd) and 7.5–8.1 ppm (C⁷-phenyl, m), as well as characteristic signals for the various alkyl substituents. Full experimental and spectral details will be published elsewhere.

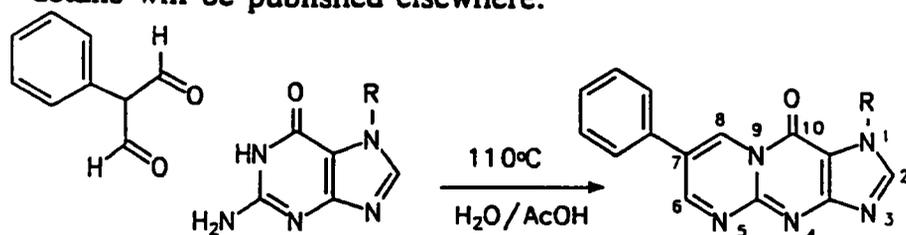


Figure 5. Formation of fluorescent derivatives of 7-alkGua by reaction with phenylmalondialdehyde

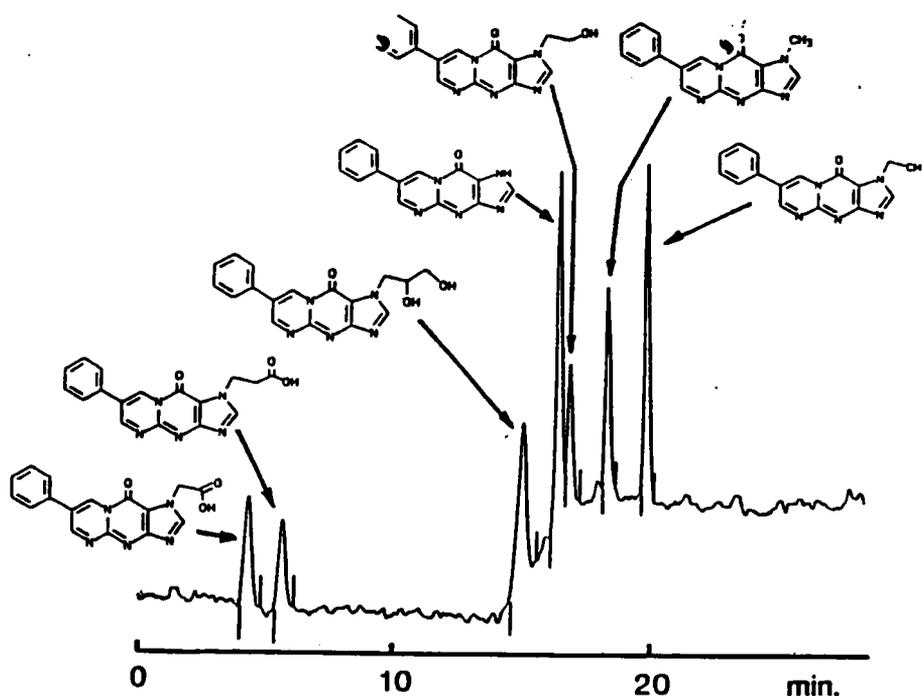
R = CH₃-, CH₃CH₂-, HOCH₂CH₂-, HOOCCH₂-, HOOC(CH₂)₂-, HOCH₂(HO)CHCH₂-.

The fluorescent PhMal-7-alkGua derivatives showed good chromatographic properties on reverse-phase HPLC, with all seven derivatives currently available being separated (Figure 6). Using a deuterium lamp-based fluorimetric detector, the detection limit was less than 1 pmol. Laser excitation would be expected to improve the sensitivity.

In anticipation of the need to concentrate and/or purify the fluorescent derivatives before quantification, an antiserum has been prepared against the common part of the molecules, namely the phenyl-substituted tricyclic ring system. The required antigen was prepared by conjugating PhMal-7-(2-carboxyethyl)guanine to methylated BSA (Figure 7) and using the modified protein to immunize rabbits. Screening of the antisera using competitive ELISA indicated that there was substantial cross-reactivity with a number of PhMal-7-alkGua. Work is currently under way to prepare and characterize immunoaffinity columns made from these antisera.

Conclusions

Several methods exist for fluorescent postlabelling of DNA adducts, which are of specific or general application. Methods that involve attachment of a fluorescent molecule to the adduct require that the unreacted excess of reagent be completely



Column - Nucleosil 100-C 18 (250 × 4.6 mm). Solvent A - KH_2PO_4 (10 mM, pH 7.2) + tetrahydrofuran (2%); Solvent B - Acetonitrile; Gradient - 85% A held for 10 min then to 20% A over 15 min at a flow rate of 1.3 ml/min. Fluorescence detection with excitation at 246 nm, emission at >470 nm

Figure 6. HPLC-fluorescence trace for PhMal-7-alkGua standards (1.5–1.8 pmol each)

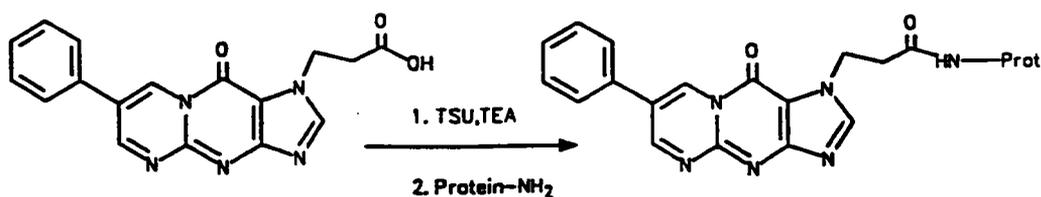


Figure 7. Preparation of PhMal-7-(2-carboxyethyl)guanine-protein conjugates

removed in order to reduce the background fluorescence. A recently developed method for derivatization of 7-alkylguanines using phenylmalondialdehyde does not have this problem since the precursors are only weakly or non-fluorescent. However, this method still needs to be optimized for small quantities of DNA adduct.

References

- Hemminki, K. (1980) Identification of guanine-adducts of carcinogens by their fluorescence. *Carcinogenesis*, 1, 311–316
- Kelman, D.J., Lilga, K.T. & Sharma, M. (1988) Synthesis and application of fluorescent labeled nucleotides to assay DNA damage. *Chem. Biol. Interactions*, 66, 85–100
- Kyrtopoulos, S.A. (1987) Investigations of the DNA-damaging activity of human gastric juice. In: Bartsch, H., O'Neill, I.K. & Schulte-Hermann, R., eds, *The Relevance of N-Nitroso Compounds to Human Cancer: Exposure and Mechanisms* (IARC Scientific Publications No. 84), Lyon, IARC, pp. 507–510
- Moschel, R.C. & Leonard, N.J. (1976) Fluorescent modification of guanine. Reaction with substituted malondialdehydes. *J. Org. Chem.*, 41, 294–300
- Sabbioni, G., Tannenbaum, S.R. & Shuker, D.E.G. (1986) Synthesis of volatile, fluorescent 7-methylguanine derivatives via reaction with 2-substituted fluorinated malondialdehydes. *J. Org. Chem.*, 51, 3244–3246