

REVUE DE L'ÉCOLE DE LA FAMILLE ET DE LA PÉDAGOGIE

19758



Association de France
Éducateurs



ANNALES

21 - 22 Septembre 1995
September 21 - 22, 1995

Centre des Congrès
Espace François Rabelais
Chinon, France

Colloque International/International Symposium

MARQUEURS BIOLOGIQUES DE POLLUTION

BIOLOGICAL MARKERS OF POLLUTION

21-22 Septembre 1995

September 21-22, 1995

Centre des Congrès
Espace François Rabelais
CHINON (France)

19958

SOMMAIRE

SESSION 1: BIOMARQUEURS MOLECULAIRES, INTERACTIONS AVEC LES
MACROMOLECULES

MOLECULAR BIOMARKERS/INTERACTIONS WITH
MACROMOLECULES

CONFERENCE PLENIERE/PLENARY CONFERENCE

-Biomarqueurs moléculaires, interactions avec les macromolécules.

G. Dirheimer & G. Kerth.

P. 1

COMMUNICATIONS ORALES/ORAL PRESENTATIONS

- L'ADN hypermodifié comme biomarqueur de génotoxicité chez les végétaux.

Etude du dépérissement du houblon et de l'épicéa.

B. Rether, F. Weber-Lofti, A. Laouedj, G. Keith, D. Schontz & P. Guillemaut.

P. 23

- Le test micronoyaur amphibien : un nouvel outil biologique pour la détection
de la génotoxicité des eaux douces.

V. Ferrier, L. Gauthier, C. Zoll-Moreux & J. L'Haridon.

P. 31

- The evaluation of environmental pollution using the *Tradescantia* micronucleus assay.

A. Sadowska, B. Lata, E. Pluygers & Z. Wagner.

P. 39

- Caractérisation des composés moléculaires fixant le Cd chez des huîtres (*Crassostrea
gigas*) provenant d'un site contaminé.

C. Mouneyrac, B. Berthet, R.P. Cosson & J.C. Amiard

P. 47

SESSION 2 : BIOMARQUEURS MOLECULAIRES/METABOLISMES
MOLECULAR BIOMARKERS/METABOLISMS

CONFERENCE PLENIERE/PLENARY CONFERENCE

- Cytochrome **P4501A** and other enzymes as molecular biomarkers for use in pollution monitoring.
D.R. Livingstone.

-COMMUNICATIONS ORALES/ORAL PRESENTATIONS

- Measurement of MFO levels in roach as a biomarker of PAH levels in freshwater systems in the U.K.
D.B.O'Hare, R.Siddall, R.A.Gill & P. W.J.Robotham.
- Utilisation de l'acetylcholinesterase de *Perna perna* et de *Mytilus galloprovincialis* comme bioindicateur de contamination dans la baie d'Agadir (Sud du Maroc).
S.Najimi, A.Bouhaimi, M.Daubeze, A.Zekhnini, J.F.Narbonne & A.Moukrim.
- Marqueurs biochimiques de pollution par les **composés** aromatiques polycycliques chez la moule et le **serran** : Etude *in situ* sur les côtes **méditerranéennes** nord **occidentales**.
J.F.Narbonne, D.Ribera, X.Michel, M.Lafaurie, J.L.Monod, C.Raoux & P.Garrigues.
- **Detoxifying, Enzymes** for **Exposure Assessment** of Aquatic Macrophytes.
C. Schrenk, S.Pflugmacher, P.Schröder, H.Sandermann, Jr.C.Steinberg & A.Kettrup

COMMUNICATIONS AFFICHEES/POSTERS

- Induction des **alkoxyzcoumarine** et **alkoxyrésorufine**, 0-dealkylases des végétaux **supérieurs** par les xénobiotiques.
Y.Batard, A. Zimmerlin, M.Schalk, F. Durst & D. Werck-Reichhart.
- Induction des activités **alkoxyrésorufine O-dealkylases** hépatiques et pulmonaires du rat après exposition à des sols pollués.
M. O. Fouchecourt & J. L. Rivière.
- Effets conjoints du sulfate de cuivre et du methidathion sur les activités **EROD** et **AChE** de truitelles arc-en-ciel.
P. Flammarion, B.Migeon & J. Garric.
- Stability of avian blood cholinesterase stored on **filter paper** - its usefulness in monitoring wildlife **exposure** to anticholinesterase pesticides.
S. Trudeau, G. Sans Camer & P.Mineau.

-Antioxydant systems and lipoperoxidation as biomarkers in the freshwater bivalve, *Unio* sp.

A. Doyotte, C. Cossu, M. C. Jacquin & P. Vasseur.

P. 127

SESSION 3 : MARQUEURS PHYSIOLOGIQUES/PHYSIOLOGICAL MARKER

CONFERENCE PLENJEXEIPLENARY CONFERENCE

-Physiological biomarkers.

M.H. Depledge.

P. 131

COMMUNICATIONS ORALES/ORAL PRESENTATIONS

-Field evaluation of the response of a mussel monitor to its dynamic environment.

J.M. Aerts, D. Berckmans, F. Van Hoof, H. Sluys & B. Leys.

P. 143

-Polysaccharide- and xenobiotic-metabolizing enzymes as biomarkers of contamination of *Lymnaea palustris* (Mollusca, Gastropoda) by atrazine and hexachlorobenzene in freshwater mesocosms.

W. Baturu, L. Lagadic & Th. Caquet.

P. 151

-Biochemical assessment of Cellular Energy Allocation in *Daphnia magna* exposed to toxic stress as an alternative to the conventional «Scope for Growth» methodology.

W.M. De Coen, C.R. Janssen & G. Persoone.

P. 163

-Approche écophysologique de la bioindication de la qualité de l'eau par les plantes aquatiques : rôle du phosphore.

F. Robach, S. Merlin, T. Rolland & M. Trémolières.

P. 171

-L'activité Nitrate Réductase chez les plantes aquatiques : un outil biologique du suivi de la contamination ammoniacale.

T. Rolland, F. Robach, M. Trémolières & S. Dester.

P. 185

COMMUNICATIONS AFFICHEES/POSTERS

-La fluorescence algale : outil de mesure du stress provoqué par des herbicides inhibiteurs de la photosynthèse.

A. Ei Jay.

P. 202

-Biotritel, capteur biologique de pollution de l'eau par surveillance en continu de l'activité photosynthétique d'algues.

J.M. Ory & F. Jacques.

P. 211

-Biomarqueurs de contamination : les perturbations intestinales induites par le platine (Pt IV) chez le Téléostéen *Brachydanio rerio*.

R. Jouhaud, S. Biagianti-Risbourg & G. Vernet.

P. 217

SESSION 4 : INDICATEURS BIOLOGIQUES VEGETAUX/ PLANT BIOINDICATORS

CONFERENCE PLENIERE/PLENARY CONFERENCE

- Les bioindicateurs végétaux de pollution.

S. Muller.

COMMUNICATIONS ORALES/ORAL PRESENTATIONS

- Des indices macrophytes pour estimer la qualité des cours d'eau : premières propositions du groupement d'intérêt scientifique « macrophytes des eaux continentales ».

J. Haury, M.C. Peltre, S. Muller, M. Trémolières, J. Barbe, A. Dutartre, & M. Guerlesquin.

- Bio-indication végétale dans les zones faiblement polluées. Intérêt de l'étude des dépôts sur les surfaces foliaires.

J.P. Garrec & C. Rose.

- Lichens et bioindication, applications pratiques.

M. Lerond, C. Van Haluwyn & D. Cuny.

- La **fiabilité** des lichens comme bioindicateurs de la pollution plombique.

S. Deruelle.

COMMUNICATIONS AFFICHEES/POSTERS

- Contribution à l'étude des groupements de macrophytes aquatiques de la **Semois** en rapport avec la qualité globale des eaux et du milieu.

D. Thoen, L. Roussel & J. Nicolas.

- Ecologie des principaux macrophytes aquatiques du **Scorff**. Application à la bioindication.

H. Daniel & J. Haury.

- Relations macrophytes et qualité des eaux dans le fleuve Charente au niveau d'Angoulême.

A. Dutartre, H. Codhunt & N. Mary.

- **Mercury transfert (Hg) localization using bryophytic bioindicators as descriptors of the hydrological functioning (river-groundwater exchange) in the plain of the upper Rhine in Alsace.**

U. Roeck, N. Classer & M. Trémolières.

- Effets de l'atrazine sur l'évolution des peuplements phytoplanctoniques lacustres.

A. Bérard & T. Pelte.

- L'accumulation des dérivés hydroxylés des triaxines dans la plantule de maïs : un marqueur de contamination.

M. Rave ton, F. Nurit, M. Kaouadji, P. Ravanel, M. Tissut.

P. 227

SESSION 5 : INDICATEURS BIOLOGIQUES ANIMAUX/ANIMAL BIOMAR

CONFERENCE PLENIERE/PLENARY CONFERENCE

- Les animaux comme indicateurs biologiques de pollution.

M. Echaubard.

P. 243

COMMUNICATIONS ORALES/ORAL PRESENTATIONS

- L'abeille, sentinelle de l'environnement.

C. Fléché, S. Zeggane, C. Flamini, J.P. Faucon

P. 255

- Les foraminifères benthiques (protozoaires) comme bioindicateurs de pollution en milieu littoral : le point des connaissances actuelles.

Chantal Bourdillon.

P. 261

- Les Foraminifères, bio-indicateurs des environnements paraliques : réaction à différents types de pollution dans l'estuaire de l'Adour.

M.N. de Casamajor & J.P. Debenay.

P. 271

- Ecotoxicological impact of zehra mussels (*Dreissena polymorpha*) as a food source for lesser scaups (*Aythya affinis*).

C. Teissier, G. Cham berland, E. Mazak, G. Fox, D. Flipo & J. S. Blais.

P. 283

COMMUNICATIONS AFFICHEES/POSTERS

- Evaluation des effets des produits phytosanitaires sur les arthropodes auxiliaires des parties aériennes des cultures.

J.N. Reboulet.

P. 291

- Gradient d'urbanisation et avifaune : la diversité intra- et inter-guilde comme indicateur biologique de la dégradation de l'environnement urbain.

P.A. Reynaud.

P. 301

- Effet sur les peuplements de lombriciens d'insecticides du sol utilisés en culture de maïs.

A. Chabert & L. Fayolle.

P. 302

- Les Thécamoebiens, nouveaux bio-indicateurs potentiels des écosystèmes dulçaquicoles.

J.P. Debenay, M. Ruel, M. Le Gall & C. Tavvry.

P. 317

- **Les Foraminifères benthiques : un outil pour caractériser les estuaires et baies des côtes atlantiques. Cas de la rivière d'Auray (Morbihan).**
F. Redois & J.P.Debenay.
- **Tentative d'utilisation de *Dreissena polymorpha* comme bioindicateur de pollution virale.**
J. Baron, J. Lesavre & L. Schwartzbrod.
- **Sensitivity of a marine amphipod to non-contaminant variables and to copper in the sediment.**
F.O.Costa, A.D. Correia & M.H. Costa.
- **Clams, *Ruditapes decussatus* L., as a pollution bioindicator, Zinc and lead accumulation and depuration.**
L. Castro, C. Carmo & I. Peres.

ANPP-Colloque International/*International Symposium*
Marqueurs Biologiques de **Pollution/Biological Markers of Pollution**
21-22 Septembre 1995/*September 21-22, 1995*
Chinon - France

Biomarqueurs moléculaires - Interactions avec les macromolécules

G. Dirheimer & G. Keith

Unité Propre de Recherche N° 9002

“Structure des Macromolécules Biologiques et Mécanismes de Reconnaissance”
Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS et Université Louis Pasteur
15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France

RESUME

Le dosage des nucléotides de l'ADN modifiés par les cancérigènes ou leurs métabolites ultimes est un bon bioindicateur des doses efficaces des substances génotoxiques, susceptibles d'être cancérigènes. Il a l'avantage de prendre en compte le polymorphisme génétique de la population humaine et de pouvoir identifier des sujets à plus haut risque. Trois types de méthodes sont utilisées (a) les postmarquages au [³²P], méthodes extrêmement sensibles permettant de détecter un adduit, c'est-à-dire un nucléotide modifié, parmi 10⁹ à 10¹⁰ nucléotides normaux (b) les immunoessais (c) les techniques fluorimétriques. Les méthodes de postmarquage ont été utilisées pour doser les adduits dans les tissus de fumeurs de cigarettes et dans des études épidémiologiques chez des travailleurs de fonderies et de cokeries, chez des bitumeurs et des garagistes, enfin chez des utilisateurs de colles à base de styrène. La détection des adduits sur des protéines sanguines comme l'hémoglobine est également décrite.

Mots-clés : Postmarquage au [³²P], adduits de l'ADN, adduits de l'hémoglobine, médecine du travail, fumée de cigarettes

SUMMARY

Molekular Biomarkers - Interactions with macromolecules

The measure of DNA nucleotides modified by chemical carcinogens or their reactive metabolites is a good biomarker of effective dose for the genotoxic chemicals having carcinogenic potency. It takes into account the genetic polymorphism of the human population and can permit to detect more susceptible subjects. Three type of methods are used (1) the [³²P]-postlabeling assays which are extremely sensitive techniques detecting one adduct, i.e. modified nucleotide, per 10⁹-10¹⁰ normal nucleotides (2) the immunoassays (3) the fluorimetric assays. The postlabeling methods have been utilized in detecting adducts in DNA from tissues of cigarette smokers and in human occupational exposure studies concerning foundry workers, coke oven workers, roofers, styrene exposed lamination workers and personnel servicing and loading diesel vehicles. The detection of hemoglobin and albumen adducts is also described.

Key-Words : [³²P]-postlabeling, DNA adducts, hemoglobin adducts, occupational medicine, cigarette smoke.

Introduction

Il ne suffit pas de connaître avec précision les contaminants de notre environnement, il faut connaître leur devenir dans les systèmes biologiques et savoir si aux doses mesurées, ils ont des effets toxiques sur les différents êtres vivants. La présence d'un contaminant toxique dans l'environnement ne constitue pas en soi un danger. Il faut qu'il devienne accessible à ses molécules cibles dans l'organisme. Cela dépend de beaucoup de facteurs aussi bien extrinsèques : dose, durée d'action, voie d'exposition, présence d'autres substances chimiques, qu'intrinsèques : âge, sexe, état de santé, alimentation etc. De plus, le polymorphisme génétique de la population humaine, en ce qui concerne par exemple les enzymes métabolisant les xénobiotiques, est énorme, ce qui complique encore la situation. Il est très difficile de tenir compte de tous ces facteurs pour évaluer le risque. On peut contourner ces obstacles en recherchant les effets de leur action au niveau de molécules biologiques cibles ou reporters. Si ces molécules sont modifiées c'est que le toxique aura été absorbé, qu'il aura été transporté au niveau des cellules cibles, aura franchi les **barrières** cellulaires, qu'il n'aura pas été entièrement détoxiqué et éliminé avant de pouvoir agir, qu'il aura éventuellement été métabolisé en dérivés plus actifs et que sa concentration ou celle de ses métabolites, aura été suffisante (dose interne) pour qu'il puisse réagir au niveau des cibles moléculaires, forcer les **barrières** de protection et entrer en compétition avec les substrats naturels de celles-ci.

Même en connaissant parfaitement la toxicocinétique et le métabolisme d'un toxique, ce qui est rarement le cas, il est difficile d'en déduire le taux de **réactivité** au niveau des **molécules** cibles. L'utilisation de biomarqueurs d'exposition, c'est-à-dire de systèmes biologiques dont on va mesurer les modifications, permet de se rendre compte beaucoup plus rapidement du danger de l'exposition à certains toxiques et des concentrations à ne pas dépasser dans l'environnement.

Peuvent être considérés comme biomarqueurs d'exposition : toutes les modifications biochimiques, physiologiques, cytologiques, immunologiques et moléculaires mesurables dans des systèmes biologiques en relation directe ou indirecte avec l'exposition aux toxiques de même que la mesure des produits résultant de ces modifications que l'on peut trouver dans les liquides biologiques comme le sang ou l'urine.

Selon les toxiques, les molécules cibles seront différentes : on suivra l'effet du plomb au niveau des enzymes de la biosynthèse de l'hémoglobine, celui des organophosphorés par le dosage des cholinestérases, mais là déjà se présente une difficulté car les cholinestérases, dont l'inhibition est la plus nocive pour l'organisme, ne sont pas celles qui sont le plus accessibles. Or peu de cellules sont aisément accessibles chez l'homme, à part celles du sang, celles que l'on peut trouver dans l'urine ou au niveau des muqueuses d'accès facile. C'est pourquoi dans le cas des cholinestérases, on effectue un dosage dans le plasma en admettant un effet parallèle au niveau du système nerveux, des muscles des glandes exocrines et des ganglions. Je me limiterai dans cet exposé à l'étude de

modifications des macromolécules et essentiellement à celles de l'ADN et des protéines sanguines en tant que biomarqueur des substances génotoxiques.

Pourquoi donner tant d'importance aux substances génotoxiques ? C'est à cause de leur responsabilité dans les cancers qui sont en train de devenir la cause majeure de décès dans les pays développés. Cela ne tient pas tellement à une augmentation de la mortalité par cancers, mais à une diminution remarquable et continue de la mortalité due aux maladies cardiovasculaires pendant ces 40 dernières années. Par exemple, le cancer est maintenant la cause essentielle de mort chez les femmes aux USA et si cette tendance continue, elle le sera chez tous les citoyens autour de l'an 2000. L'augmentation du tabagisme, depuis 1900 jusqu'au début des années 1960, a transformé le cancer du poumon, qui était une maladie rare au début du siècle, en une forme prédominante de mort par cancer. Cependant, la mortalité annuelle par cancer du poumon chez l'homme, ajustée à l'âge, a cessé de croître après plus de 50 années de croissance. Chez les femmes aux USA, les cancers des poumons ont dépassé les cancers des seins comme cause de mortalité en 1986 et on prévoit qu'ils vont encore augmenter pendant 10 ans. L'augmentation de l'incidence des cancers rénaux, accompagnée par une augmentation plus faible de la mortalité, est au moins en partie due au tabagisme. L'incidence des cancers de l'oesophage et du foie a augmenté de 12,3 et de 14,5%, respectivement, probablement à cause de l'effet combiné du tabagisme et de l'alcoolisme.

Or ces cancers sont dus à notre environnement, c'est-à-dire à notre façon de vivre, de nous nourrir et souvent de "mal de vivre", de fumer, de polluer notre environnement, de nous exposer au soleil, etc. Leur nombre pourrait donc être sérieusement réduit par une prévention sérieuse.

De très nombreuses données indépendantes ont conduit à admettre aujourd'hui que la première étape de la cancérogenèse chimique est une altération de l'ADN qui n'est pas correctement réparée dans la cellule. Cette altération peut être soit une fixation covalente d'un cancérogène, ou plutôt de son métabolite ultime, sur les bases de l'ADN avec formation d'adduits, soit la modification d'une base de l'ADN par exemple par alkylation ou par action d'agents physiques (rayonnement UV ou radiations ionisantes).

Plusieurs méthodes ont été mises au point depuis une dizaine d'années pour mettre en évidence et quantifier les adduits, c'est-à-dire les nucléotides modifiés de l'ADN. J'insisterai sur la méthode de postmarquage au [^{32}P] phosphore qui est plus générale car contrairement aux autres méthodes, elle ne nécessite aucune connaissance préalable des adduits recherchés et je dirai quelques mots sur les méthodes fluorimétriques et sur les méthodes immunologiques.

1) Méthode de postmarquage au [^{32}P] des adduits

La méthode de postmarquage a été mise au point par Randerath et al. (1981). Cette méthode est qualifiée de "postmarquage" car elle est utilisée in vitro après extraction de l'ADN, des tissus ou cellules à analyser, par opposition au marquage, par radioélément direct in vivo.

Elle est basée (Figure 1) sur le marquage au [^{32}P]-phosphate des désoxyribonucléosides 3'-monophosphates obtenus par hydrolyse enzymatique

de l'ADN par un mélange de nucléase micrococcale et de phosphodiesterase de rate. Ce marquage est obtenu par leur transformation en désoxyribonucléosides [³²P]-5'-3'-diphosphates par la polynucléotide kinase en présence de γ -[³²P]-ATP. Une limite de détection de l'adduit pour 107 nucléotides a ainsi été atteinte pour des composés polycycliques. Les nucléotides normaux (A,T,G,C) sont séparés des adduits par chromatographie sur couche mince (CCM) de polyéthylène imine (PEI) cellulose, puis eux-mêmes séparés par deux ou trois chromatographies supplémentaires. Les adduits sont détectés par autoradiographie des CCM et les adduits excisés et comptés au compteur à scintillation. Cette méthode ne nécessite que très peu d'ADN (1-10 μ g), ce qui est essentiel, compte tenu des faibles quantités d'ADN humain généralement disponibles, mais l'utilisation d'ATP fortement marqué : 3000 Ci/mmole, est nécessaire.

Reddy et Randerath (1986) ont développé une variante de leur technique qui est une hydrolyse à la nucléase P1, tirée de *Penicillium citrinum*, après la première hydrolyse à la nucléase micrococcale et à la phosphodiesterase, comme dans la méthode décrite précédemment. Seuls les nucléotides normaux sont déphosphorylés par la nucléase P1 et donnent des nucléosides qui ne sont plus des substrats de la polynucléotide kinase : ils ne seront donc pas marqués car la polynucléotide kinase ne phosphoryle que les nucléotides. On peut ainsi détecter un adduit pour 10⁹ à 10¹⁰ nucléotides, soit moins d'un adduit par génome ou cellule humaine. Enfin une variante de la méthode originale qui extrait les adduits hydrophobes par le butanol a été décrite (Gupta 1985).

De très nombreuses études et revues ont été consacrées à la méthode de postmarquage en particulier un ouvrage publié par l'IARC (1993) qui contient 44 publications et un numéro spécial de Environ. Health Perspectives qui contient 37 articles. Un autre ouvrage a été publié récemment qui donne le catalogue de 550 adduits produits par plus de 200 agents modifiant l'ADN (IARC - 1994). Des revues donnant l'évaluation critique de la méthode de postmarquage (Randerath et Randerath 1994) et l'importance des adduits sur les **macromolécules** en tant que biomarqueurs de toxicité et de carcinogénicité (Chang et al., 1994) ont été publiées.

Des variantes de la **méthode** de Randerath ont été développées. Elles utilisent soit l'hydrolyse de l'ADN par la nucléase P1 et la phosphatase prostatique avant le marquage au [³²P] suivi par une digestion par la **phosphodiesterase** de venin de serpent (Gupta et al., 1993 ; Randerath et al., 1993a et b, Hatcher et al., 1993 ; Randerath et al., 1994), soit la méthode classique **suivie après** marquage au [³²P] soit par une digestion par la phosphodiesterase de venin de serpent et une seconde digestion par la nucléase P1 (Fukutome et al., 1994) soit une digestion additionnelle par la nucléase P1 (Pfau et al., 1994). Ces traitements sont effectués pour digérer les di- ou trinucleotides qui pourraient subsister quand on utilise les digestions classiques et pourraient conduire à la surestimation du nombre et de la **quantité** des adduits. En fait aussi bien la nucléase de staphylocoque que la phosphodiesterase de rate bovine et la nucléase P1 ne coupent pas toujours ou pas complètement la liaison phosphodiester 3' --> 5' à côté des adduits (par exemple les adduits de l'aflatoxine), mais coupent à deux ou trois liaisons de distance.

Des enrichissements en adduits ont également été obtenus par combinaison avec des HPLC. Deux revues récentes ont discuté les avantages de

séparations par HPLC du mélange marqué avant la séparation par CCM (Yu et al., 1993 ; Keith et Dirheimer 1995).

La méthode de Randerath est surtout utile pour la détection d'adduits de grande taille et hydrophobes, mais ce n'est pas le cas de toutes les modifications de l'ADN. Les alkylants provoquent par exemple des méthylation ou des éthylations des bases, les radiations et l'ozone, la formation des dérivés oxydes. Des méthodes particulières ont dû être mises au point pour ces nucléotides qui habituellement ont des comportements chromatographiques proches de ceux des quatre nucléotides classiques. Elles font souvent appel à la chromatographie liquide haute performance (Kato et al. 1993) ou à des colonnes d'immunoaffinité ou à l'immunoprécipitation des adduits (Hsia 1991, Kang et al. 1992, Cooper et al. 1992) (pour d'autres références voir Halliwell et Aruona, 1991).

L'ADN utilisé pour la détection des adduits peut même être isolé de tissus fixés ou incorporés dans la cire. Cependant la fixation prolongée dans le formol conduit à la perte progressive des adduits. Par contre une fois les tissus préparés pour des analyses histologiques et inclus dans la paraffine, il n'y a plus de perte des adduits (Hewer et Phillips, 1993).

Il convient d'ailleurs, en particulier dans des études quantitatives, d'utiliser en parallèle la méthode d'enrichissement à la nucléase P1 et celle d'enrichissement au butanol car certains adduits peuvent être partiellement ou totalement perdus avec l'une ou l'autre méthode. Ainsi la méthode au butanol permet de détecter un plus grand nombre et des taux supérieurs d'adduits dans des tissus oraux de fumeurs, que la méthode à la nucléase P1 (Jones et al. 1993) Gupta et Earley (1988) ont comparé les rendements obtenus concernant 75 différents adduits de structure connue ou inconnue en utilisant soit la méthode à la nucléase P1, soit la méthode au butanol. Ceux-ci variaient de 0-4% (15 adduits), 5-40% (12 adduits) 41-80% (13 adduits), 81-120% (18 adduits) et 120-370% (13 adduits) dans la méthode à la nucléase P1 par rapport à la méthode au butanol.

Les applications de la méthode de postmarquage au [³²P] ont été extrêmement nombreuses. Elles ont concerné les médicaments, les cancérogènes présents dans la nourriture et ceux présents dans l'atmosphère. Je me limiterai à ces derniers. La pollution de l'air est un problème mondial. Elle provient pour l'essentiel des combustions incomplètes qui se font dans les systèmes de chauffage, dans les moteurs des véhicules automobiles et dans divers processus industriels. Elles conduisent à la production d'hydrocarbures polycycliques et d'autres dérivés qui, après activation dans les organismes vivants, se fixent à l'ADN.

Chez l'homme se pose le problème des échantillons d'ADN à analyser comme marqueurs. Il est évident que seules les cellules nucléées renferment de l'ADN. Ce sont donc les globules blancs du sang qui sont la source principale d'ADN facilement accessible, dont on extrait l'ADN dans les études épidémiologiques. Les biopsies et les autopsies permettent un accès à l'ADN d'autres tissus, de même que les opérations et l'ablation de tumeurs. Le placenta peut être récupéré lors des accouchements. Des lavages bronchiques ont également permis d'obtenir des cellules. Des cellules épithéliales exfoliées du système urinaire ont été isolées à partir de l'urine. Des cellules des muqueuses buccales ont été obtenues par grattage.

Les premiers travaux épidémiologiques ont concerné le tabagisme. La fumée de tabac représente un mélange chimique très complexe comprenant au moins 50 cancérigènes donnant des adduits à l'ADN, mais également des nitrosamines conduisant à la méthylation des bases de l'ADN avec formation de 7-méthylguanine et de 6-méthylguanine essentiellement. Randerath et al. ont utilisé les diverses méthodes qu'ils ont mises au point pour détecter des adduits sur l'ADN à partir de tissus pulmonaires de sujets cancéreux, de cellules du larynx et de placenta de fumeurs. Les adduits sont tellement nombreux qu'ils donnent une zone radioactive en diagonale, une vraie "voie lactée" de taches. Le niveau des adduits atteint 100 pour 10^9 nucléotides dans les poumons et le larynx des fumeurs. Leur niveau est proportionnel aux doses et au temps d'exposition. Ils persistent de nombreuses années après arrêt du tabagisme (Phillips et al., 1988). Des adduits ont aussi été trouvés au niveau du cœur, des reins, de la vessie, de l'oesophage et du pancréas (pour une revue : voir Randerath et Randerath, 1993). Des biopsies du col de l'utérus, suite à des hystérectomies, ont été analysées. Les auteurs ont trouvé que les femmes qui fument plus de 15 cigarettes/jour ont deux fois plus de risques de développer un cancer de l'utérus (Phillips et Ni She, 1993).

La fumée "non inhalée" des cigarettes, ("sidestream smoke"), est produite à une température plus basse et avec une efficacité de combustion moindre (moins d'oxygène) que la fumée inhalée. Elle contient des concentrations bien plus fortes de nombreux cancérigènes que la fumée inhalée et en particulier 50 fois plus de nitrosamines, mais également de substances agissant directement sur l'ADN, ne nécessitant donc pas d'activation métabolique. Des composés oxygénés réactifs y ont également été trouvés. Il y a 20 fois plus de benzopyrène dans la phase particulière du "side stream smoke" que dans le "main stream smoke" (Carmichael et al., 1993).

Curieusement, la quantification des adduits à l'ADN de globules blancs chez les fumeurs, ex-fumeurs et non-fumeurs a donné des résultats contradictoires et les différences trouvées n'étaient pas significatives (pour une revue voir Schutt et Shivery, 1992). Cependant quand les globules blancs ont été fractionnés en lymphocytes, monocytes et granulocytes, le taux des adduits était beaucoup plus élevé dans les cellules mononucléées des fumeurs que dans les granulocytes (environ 2 fois) (Savela et Hemminki, 1991). D'autre part, les ADN de tissus bronchiques et de lymphocytes renfermaient 7 fois plus de 7-méthylguanine chez les fumeurs que chez les non fumeurs (Mustonen et al., 1993).

Dans le cadre de la médecine du travail, des adduits ont été recherchés chez les ouvriers des cokeries, des fonderies, des usines de fabrication d'aluminium, chez les goudronneurs, les garagistes et des utilisateurs de colles au styrène (pour des revues récentes voir Beach et Gupta, 1992 et Shoket, 1993).

Dans l'étude des fonderies, les ouvriers ont été rangés en catégories fortement, moyennement ou faiblement exposés, selon le niveau de pollution en benzopyrène de l'air de leur poste de travail (Phillips et al., 1988 ; Perera et al., 1988 ; Reddy et al., 1991). Des adduits aromatiques ont été trouvés chez 3 sur 4 des ouvriers fortement exposés, 8 sur 10 chez les moyennement exposés, 4 sur 10 des faiblement exposés et 1 sur 18 des témoins non exposés. Les adduits variaient de non détectables à 100 pour 10^9 nucléotides. Dans deux fonderies

d'aluminium, des adduits ont pu être détectés à l'ADN de globules blancs de tous les travailleurs exposés (46) et dans une usine la moyenne du taux des adduits était plus élevée que chez les 29 contrôles (Shoket et al., 1991).

Chez des travailleurs de cokeries en Silésie, région du Sud de la Pologne, fortement industrialisée, 245 adduits en moyenne ont été trouvés pour 10^9 nucléotides, mais les contrôles faits chez les habitants de la ville où se trouvait la cokerie avaient des valeurs presque aussi élevées indiquant une forte pollution locale. Par contre, les contrôles effectués à la campagne avaient des valeurs 2 à 3 fois plus faibles (Hemminki et al., 1990 a et b) ; Ovrebo et al., 1992). De grandes variations interindividuelles ont été trouvées dans ces études.

Des études épidémiologiques ont également été effectuées chez des ouvriers appliquant du bitume sur les toits. Herbert et al., (1990) ont trouvé des adduits aromatiques à l'ADN de globules blancs chez 83% des travailleurs contre 17% chez les contrôles. Les valeurs chez les premiers allaient de 8 à 96 adduits pour 10^9 nucléotides, le maximum chez les témoins positifs étant de 3 adduits pour 10^9 nucléotides. Shoket et al., (1993) ont également trouvé des adduits chez ce genre de travailleurs, mais les valeurs moyennes étaient beaucoup plus élevées : 120 adduits pour 10^9 nucléotides chez les travailleurs contre 74 adduits en moyenne pour les témoins. Les différences entre travailleurs et témoins étaient statistiquement significatives.

Une étude quantitative a été effectuée sur des ouvriers qui collent des revêtements en plastique et qui manipulent du styrène. Celui-ci est métabolisé chez l'homme en oxyde de styrène qui donne un adduit sur l'oxygène en position 6 de la guanine. Le niveau des adduits était de 47 pour 10^9 nucléotides dans une première série et de 73 pour 10^9 nucléotides dans une deuxième série. Certains ouvriers avaient cependant des valeurs très fortes au dessus de 100 adduits. Les moyennes de contrôles étaient respectivement de 3 et de 11. Ces études étaient faites sur l'ADN des globules blancs.

Enfin une étude a été réalisée récemment chez des mécaniciens garagistes, chargés de la maintenance de bus et camions à moteur diesel, et du remplissage des réservoirs de ces véhicules dans des dépôts (Hemminki et al., 1994). Une moyenne de 31 ± 11 adduits a été trouvée pour l'ADN de lymphocytes contre 20 ± 7 chez les témoins. Remarquons enfin que le dosage dans l'urine de certains nucléotides modifiés ou substitués des cancérogènes, témoins de la présence d'adduits dans l'ADN, a également été proposé comme indicateur de génotoxicité. Nous ne traiterons cependant pas ce problème faute de place (pour une revue récente, voir Shuker et Farmer, 1992).

2) Méthodes utilisant des anticorps contre les adduits ou contre de l'ADN contenant des adduits

La méthode de postmarquage au [^{32}P] n'est pas la seule pour mettre en évidence et doser des adduits. La préparation d'anticorps contre des adduits ou contre de l'ADN contenant des adduits a permis des dosages très précis. Comme les anticorps sont préparés contre des adduits spécifiques, seuls des adduits spécifiques seront dosés. L'inconvénient de cette méthode tient à la préparation d'anticorps, soit polyclonaux, soit monoclonaux qui demande des mises au point parfois délicates. La connaissance préalable de la structure de l'adduit ainsi

que sa production en quantité suffisante, habituellement par synthèse chimique, sont nécessaires. La caractérisation soignée des antisera est nécessaire pour une interprétation satisfaisante des résultats, car des réactions croisées entre des adduits différents du même cancérigène ultime ou avec des adduits d'autres composés de structure chimique proche, sont possibles. Il y a, en particulier, des réactions croisées entre de nombreux adduits des hydrocarbures polycycliques aromatiques, par exemple entre benzopyrène diolépoxyde, benzathracène et chryène.

Des anticorps contre les adduits de petite taille et les nucléotides méthyles difficiles à détecter par le postmarquage au [^{32}P] se sont révélés particulièrement utiles (pour une revue récente, voir Poirier, 1994).

Les dosages sont ceux classiquement utilisés en immunologie RIA, ELISA ou USERIA (ultrasensitive enzymatic radioimmunoassay) qui est proche de la méthode ELISA, mais qui utilise un second anticorps radioactif. Ainsi en utilisant $1\ \mu\text{g}$ d'ADN dans le mélange antigène-anticorps USERIA est 5 fois plus sensible que ELISA qui est 100 fois plus sensible que RIA en ce qui concerne la détection d'adduits au benzopyrène (Hsu et al., 1981). Les limites de détection sont dans la fourchette d'1 adduit pour 10^6 à 10^8 nucléotides normaux quand on utilise de l'ordre de $1\ \text{mg}$ d'ADN, ce qui est assez loin de la sensibilité du postmarquage. Cependant en combinant la technique avec des purifications par HPLC et en partant par exemple de $10\ \text{mg}$ d'ADN d'excellentes sensibilités peuvent être obtenues. Une méthode encore plus récente, appelée DELFIA (Dissociation Enhanced Lanthanide Fluoroimmunoassay) utilise un système d'amplification avidine-biotine et de l'euprotium qui peut être rendu fortement fluorescent dans un environnement chimique donné; Cette méthode a une limite de détection de l'adduit/ 10^8 nucléotides (Shoket et al., 1993).

Les méthodes immunologiques offrent l'avantage de permettre de tester un grand nombre d'échantillons à la fois et est particulièrement adaptée à des études épidémiologiques humaines (pour DELFIA : 100 échantillons par semaine). Des études épidémiologiques ont également été faites en utilisant les méthodes immunologiques (pour une revue, voir Poirier, 1994).

3) Méthodes fluorimétriques de détection des adduits à l'ADN

La troisième méthode de détection des adduits est la méthode fluorimétrique qui utilise les propriétés de fluorescence des hydrocarbures polycycliques et d'autres structures hétérocycliques. C'est le cas des adduits du benzo(a)pyrène-diolépoxyde ou de l'aflatoxine. Dans ce dernier cas, 1 mole d'aflatoxine B1 pour $1,5 \times 10^7$ nucléotides normaux a pu être détectée (12). Cependant la méthode n'est pas spécifique et ne distingue pas les différents adduits d'un même cancérigène ultime. C'est pourquoi, une étape préalable de purification et d'enrichissement comme l'utilisation de colonnes d'immunoaffinité est souvent utilisée. Une technique combinant HPLC en phase inversée et fluorescence, a récemment été mise au point (Alexandrov et al., 1992). Elle a une sensibilité limite de $2\ \text{pg}$ du dérivé benzo(a)pyrène-tétrol obtenu par hydrolyse acide de l'ADN et sa limite de détection est de 1 adduit pour 10^8 nucléotides normaux. Elle a été appliquée au dosage des adduits du benzo(a) pyrène époxyde à l'ADN de poumon et de globules blancs de fumeurs

(Rojas et al., 1994). Ces derniers auteurs ont fait une comparaison très intéressante entre les trois méthodes de détection des adduits : postmarquage au [³²P], ELISA et fluorescence. Une très bonne corrélation entre la méthode de postmarquage et de fluorescence a été obtenue. La corrélation entre ces 2 techniques et la méthode ELISA était beaucoup moins bonne et non significative. La méthode immunologique surestimait très largement (de 10 à 42 fois) la quantité des adduits du benzopyrène probablement à cause de sa plus large spécificité. La comparaison des trois méthodes est donnée dans le tableau 1.

4) Détection des adduits sur les protéines sanguines

Deux protéines du sang, l'hémoglobine et l'albumine, ont été plus particulièrement étudiées en ce qui concerne la formation d'adduits. Cependant, il faut signaler d'emblée que la présence de ces derniers ne doit pas nécessairement être prise comme une preuve de réaction avec l'ADN. Ils ne reflètent pas directement le potentiel et le pouvoir génotoxique des xénobiotiques étudiés. Cependant, tous les agents étudiés jusqu'ici, qui réagissent avec l'ADN, le font également avec l'hémoglobine. Ce sont donc des paramètres intéressants qui doivent être validés coup par coup selon le cancérigène.

Des rapports différents peuvent exister entre le taux d'adduits de l'ADN et des protéines. Cela n'a rien d'étonnant, car les adduits à l'hémoglobine sont stables, alors que beaucoup d'adduits à l'ADN sont réparés ou peuvent être perdus à la suite de dépurinations chimiques. Le niveau des adduits à l'hémoglobine reflète les expositions subies par les érythrocytes pendant toute leur existence, alors que celui de l'ADN dépend plus de l'instant auquel l'échantillon est prélevé. Cependant, certains adduits à l'ADN ont été trouvés plusieurs mois après l'exposition. Rappelons que la concentration du sang en hémoglobine est de 140 g/l et que sa durée de vie est d'environ 120 jours alors que celle de l'albumine est de 45 g/l et sa durée de vie est de 20-25 jours.

Les sites de réaction dans l'hémoglobine comprennent les atomes d'azote de l'histidine, l'atome de soufre de la cystéine, le groupe aminé libre de la valine N-terminale et les groupements carboxyliques de l'acide aspartique et de l'acide glutamique.

Les adduits de l'hémoglobine ont été plus particulièrement étudiés par l'équipe de Neuman à Wurzburg et par celle de Farmer à Leicester (Neuman, 1988 ; Farmer et al., 1986). Ainsi, le chlorure de vinyle est métabolisé en un époxyde de chloréthylène, hautement électrophile, qui donne de la 2-oxyéthylhistidine sur l'hémoglobine. L'oxyde d'éthylène donne des dérivés 2-hydroxyéthylés sur la cystéine, l'histidine et la valine, etc (Tableau 2) (pour une revue, voir Ectoc 1992).

La détection des adduits sur les protéines peut se faire par fluorescence dans le cas des dérivés aromatiques polycycliques. Ainsi les adduits des métabolites du benzopyrène sur l'hémoglobine peuvent être clivés par hydrolyse pour donner des tétrols libres. Après extraction et séparation par HPLC, ils peuvent être quantifiés par spectroscopie de fluorescence (Shugart, 1985). D'autres méthodes, utilisent la chromatographie gazeuse avec différents types de détection, avec ou sans dérivatisation, pour obtenir des dérivés fluorés.

Leurs sensibilités et leurs avantages et inconvénients sont donnés dans le Tableau 3.

Des niveaux de fond des adduits de l'ADN et de l'hémoglobine ont été identifiés pour une série de cancérogènes. Des niveaux de fond élevés sont particulièrement associés au tabagisme, mais des niveaux de fond élevés ont également été trouvés pour le chlorure de vinyle. Ils peuvent occulter les niveaux d'exposition.

Conclusion

La détermination des adduits aux macromolécules procure une estimation plus exacte de la dose efficace pour chaque individu en ce qu'elle prend en compte la variabilité génétique des activités enzymatiques etc... Elle peut ainsi aider à l'identification des individus à plus haut risque.

L'expérience acquise actuellement dans l'emploi des adduits à l'hémoglobine pour contrôler l'exposition aux agents génotoxiques montre que pour les oxydes d'éthylène et de propylène, les amines aromatiques, le chrome hexavalent et les hydrocarbures aromatiques polycycliques, la détermination des adduits à l'hémoglobine est une mesure plus exacte de la dose interne individuelle que la mesure des concentrations dans l'air environnant ou celle des niveaux des métabolites urinaires.

Enfin malgré les fortes variations interindividuelles qui reflètent peut être des susceptibilités métaboliques particulières, qu'il serait intéressant d'explorer, la méthode de dosage des adduits à l'ADN me semble une méthode d'avenir pour des études épidémiologiques.