
**IDENTIFICATIE EN VALIDATIE VAN GEVOELIGE MERKERS VOOR DE
BIOMONITORING VAN WERKNEMERS BLOOTGESTELD AAN POTENTIËLE
MUTAGENEN/CARCINOGENEN. TOEPASSING VOOR ARBEIDERS
BLOOTGESTELD AAN EPOXIDE-VORMENDE CARCINOGENEN EN KOBALT-
BEVATTENDE STOF**

Prof. M. Kirsch-Volders (Coördinator)
Dr. Ch. Laurent
Prof. D. Lison
Prof. B. Nemery
Prof. H. Veulemans

Laboratorium voor Cellulaire Genetica - VUB
Laboratoire ORME - ULG
Unité de Toxicologie Industrielle et Médecine du Travail - UCL
Laboratorium voor Pneumologie - KUL
Laboratorium voor arbeidshygiëne en Toxicologie - KUL

D.W.T.C.

ST/01: Identificatie en validatie van gevoelige merkers voor de biomonitoring van werknemers blootgesteld aan potentiële mutagenen/carcinogenen. Toepassing voor arbeiders blootgesteld aan epoxide-vormende carcinogenen en kobalt-bevattende stof.

1994-1998

KIRSCH-VOLDERS M. - Coördinator

Vrije Universiteit Brussel (VUB)
Laboratorium voor Cellulaire Genetica

LAURENT Ch.

Université de Liège (ULg)
Laboratoire d'Oncologie, Radiobiologie et Mutagenèse Expérimentale

LISON D.

Université Catholique de Louvain (UCL)
Unité de Toxicologie Industrielle et Médecine du Travail

NEMERY B.

Katholieke Universiteit Leuven (KUL2)
Laboratorium voor Pneumologie (Eenheid voor Longtoxicologie)

VEULEMANS H.

Katholieke Universiteit Leuven (KUL1)
Laboratorium voor Arbeidshygiëne en Toxicologie

Samenvatting

Een federaal netwerk van vijf universitaire ploegen met erkende en complementaire expertise in (geno)toxiciteit en arbeidsgeneeskunde heeft gevoelige biomerkers geïdentificeerd en gevalideerd voor het inschatten van het kankerrisico bij beroepsblootstellingen aan epoxide vormende carcinogenen enerzijds, en kobalt en zijn verbindingen anderzijds. Voor de bepaling van de biologische inwerking van epoxide vormende carcinogenen werd bewezen dat de gemodificeerde Edmandegradatie een gevoelige en specifieke techniek is om hemoglobine-adducten op te sporen bij relatief lage (beroeps)blootstellingen aan ethyleen- en propyleenoxide (circa 0.01 ppm). Biomonitoringstudies bij arbeiders blootgesteld aan ethyleenoxide en propyleenoxide wijzen eerder in de richting van glutathion-S-transferase dan naar microsomale epoxide hydrolase als belangrijke risicofactor betrokken bij de detoxificatie. De uitvoerige analyse van het carcinogeen vermogen van kobalt en zijn legeringen werd benaderd via een stelselmatige aanpak enerzijds van mechanismen naar biomonitoring studies, en anderzijds van een seriële evaluatie van de voornaamste merkers voor genotoxiciteit *in vitro* en *in vivo*. Het DNA brekend vermogen van het kobalt/wolframcarbide mengsel *in vitro* is altijd meer uitgesproken dan dat van kobalt alleen, in primaire menselijke lymfocyten en in rat alveolaire cellen. Het vermogen tot inductie van genmutaties door kobalt alleen of zijn verbindingen *in vivo* in transgene muizen werd niet vastgesteld. Biomonitoring werd uitgevoerd op basis van algemene toxische en specifieke genotoxische biomerkers voor 80 arbeiders in de kobaltsector en 40 controles. De statistische analyse is in verwerking. De bekomen resultaten worden nu samengevat met andere aanvullende gegevens uit de literatuur en ingebouwd in een interactief gebruikersvriendelijke website ter beschikking van de arbeidsgeneeskundige wereld en de overheid.

KEYWORDS: Beroepsblootstellingen, biomonitoring, epoxide vormende carcinogenen, kobaltverbindingen,(geno)toxiciteit

**Identificatie en validatie van gevoelige merkers voor de biomonitoring van werknemers
blootgesteld aan potentiële mutagenen/carcinogenen**

KIRSCH-VOLDERS M. - Coördinator

Vrije Universiteit Brussel (VUB)
Laboratorium voor Cellulaire Genetica
Pleinlaan 2
1050 Brussel
tel: 02/629.34.23.
fax: 02/629.34.08.
E-mail: mkirschv@vub.ac.be

LAURENT Ch.

Université de Liège (ULg)
Laboratoire d'Oncologie, Radiobiologie et Mutagenèse Expérimentale
Tour de Pathologie 1, CHU B23
4000 Liège
tel: 04 / 366.24.47. - 04 / 366.25.33.
fax: 04 / 366.24.33.
E-mail : chr.laurent@ulg.ac.be

LISON D.

Université Catholique de Louvain (UCL)
Unité de Toxicologie Industrielle et Médecine du Travail
Clos Chapelle aux Champs 30.54
1200 Bruxelles
tel: 02/764.32.20.
E-mail : lison@toxi.ucl.ac.be

NEMERY B.

Katholieke Universiteit Leuven (KUL2)
Laboratorium voor Pneumologie (Eenheid voor Longtoxicologie)
Herestraat 49 (O&N 7e verdieping)
3000 Leuven
tel: 016/34.71.21.
fax: 016/34.71.24.
E-mail: ben.nemery@med.kuleuven.ac.be

VEULEMANS H.

Katholieke Universiteit Leuven (KUL1)
Laboratorium voor Arbeidshygiëne en Toxicologie
Kapucijnenvoer 35
3000 Leuven
tel: 016/33.69.95.
fax: 016/33.69.97.
E-mail : Hendrik.Veulemans@med.kuleuven.ac.be

I. INLEIDING

1. ALGEMENE CONTEXT VAN HET ONDERZOEK

Dit project beoogt de biomonitoring van beroepsblootstellingen aan epoxide vormende carcinogenen en kobalt met een geïntegreerd netwerk van laboratoria die voldoende expertise hebben ontwikkeld om samen de meeste eindpunten te controleren die nodig zijn om de meest gevoelige biomerkers voor blootstelling te identificeren.

Werknemers blootgesteld aan epoxide-vormende carcinogenen in een studie en aan kobalt (alleen of zijn legeringen) in een andere studie zullen gevolgd worden voor verschillende relevante eindpunten. Vergelijking van deze eindpunten zal dan verder het opstellen van betere richtlijnen voor blootstellingslimieten toelaten. Het hoofddoel is dus primaire preventie van beroepskankers.

2. DOELSTELLINGEN VAN HET ONDERZOEK

De gevoeligheid van verschillende biomerkers voor blootstelling en hun causale relatie voor twee types industriële potentiële mutagenen/carcinogenen: de epoxide-vormende carcinogenen en kobalt bevattend stof.

De vooropgestelde respectievelijke doelstellingen van de individuele ploegen kunnen als volgt samengevat worden:

ST/01/001: KUL1 (Prof. Dr. Veulemans)

Identificatie en validatie van hemoglobine- en DNA-adducten als parameters in de biomonitoring van arbeiders blootgesteld aan epoxide vormende carcinogenen.

- Verdere ontwikkeling en validering van de methodeterbepaling van hemoglobine- en DNA-adducten. De ontwikkelde technieken worden toegepast in het kader van de veldstudie.
- Een vergelijkend onderzoek naar de kinetiek van de adductvorming aan hemoglobine en DNA van verschillende epoxides. Daarnaast zal de link tussen de adductvorming en het optreden van cytogenetische effecten bestudeerd worden.
- Een onderzoek naar interindividuele variaties in enzyme-activiteit bij het metabolisme van epoxides.
- Een onderzoek naar parallellismen in het metabolisme van de verschillende epoxides.

ST/01/002: KUL2 (Prof. Dr. Nemery)

Experimenteel en klinisch-epidemiologisch onderzoek naar de eventuele carcinogeniciteit van kobalthoudende verbindingen.

- *In vitro* experimenteel onderzoek : De effecten van kobalt en kobalt-houdende verbindingen op dierlijke en humane alveolaire epitheelcellen zullen worden onderzocht met betrekking tot (1) celdysfunctie en celbeschadiging door oxydatieve mechanismen; (2) genotoxiciteit.
Beide eindpunten zijn relevant m.b.t. longkanker.
- Klinisch-epidemiologisch onderzoek : Nagaan of er bij patiënten met longaantasting (fibrose) door beroepsmatige blootstelling aan kobalt evidentie is voor cytogenetische letsels.

De bevindingen zullen vergeleken worden met die verkregen bij vergelijkbare patiënten met longfibrose die niet aan kobaltblootstelling te wijten is (om de eventuele specifieke carcinogeniciteit van kobalt te demonstreren) en bij gezonde al dan niet aan kobalt blootgestelde werknemers.

De geplande biomonitoring van patiënten ondervond problemen doordat de recrutering van donoren zeer moeizaam verliep. Bijgevolg werd slechts bloed ontvangen van 6 patiënten. Dit werd aan de VUB onderworpen aan genetische eindpunten. De resultaten van deze minimale studie worden echter niet beschouwd aangezien dit biologisch en statistisch niet verantwoord is.

ST/03/008: VUB (Prof. Dr. Kirsch-Volders)

Identificatie van (cyto-)genetische veranderingen bij beroepsblootstellingen aan epoxide-inducerende carcinogenen of aan kobalt : experimenteel en klinisch epidemiologisch onderzoek.

(a) Epoxide-inducerende carcinogenen.

Om de relatieve genotoxiciteit van epoxide-inducerende carcinogenen te evalueren, moeten verschillende eind-points bestudeerd worden. Onze bijdrage richt zich naar het opsporen van DNA-brekend vermogen in vergelijking met SCE (ULg) en adducten (ULg en KUL).

(b) Harde metalen met kobalt en zijn verbindingen.

- hebben Co en zijn verbindingen genotoxische effecten in lymfocyten als reporter cellen voor biomonitoring en in longcellen als targetcellen voor longtumoren?
- zijn deze genotoxische effecten rechtstreekse effecten op het DNA of via interferentie met herstelsystemen?
- welke combinaties zijn de meest genotoxische?
- worden de genotoxische effecten opgespoord bij *in vivo* blootstellingen bij de mens?

Gelet op de belangrijke wetenschappelijke ontwikkelingen gekend door het *in vitro* kobaltproject heeft het laboratorium de voorkeur gegeven aan deze studie. De *in vitro* experimenten op styreen die reeds gepubliceerd werden door andere laboratoria in het buitenland werden dan als niet priorotair beschouwd.

ST/10/014: UCL (Prof. Dr. Lison)

Experimentele en epidemiologische studie van de genotoxiciteit van ingeademde kobaltstof bevattende deeltjes.

Het genotoxisch potentieel van kobalt bevattend stof en harde metalen zal vanuit twee aanvullende invalshoeken vergeleken worden :

- experimenteel via de studie van DNA-letsels ten gevolge van dit stof
- in een klinisch-epidemiologische studie via de evaluatie van de graad van blootstelling aan kobalt bij twee groepen van eraan blootgestelde werknemers.

ST/12/010: ULg (Dr. Laurent)

Evaluatie van de lesies aan het menselijk genetisch materiaal, geïnduceerd door verschillende epoxides, door gebruik van cytogetische en moleculaire bio-indicatoren.

Ter beschikking stellen van het netwerk van de ontwikkelde en gevalideerde moleculaire en cytogenetische technologische expertise om de geïnduceerde effecten van een beroepsblootstelling aan epoxides te ramen en/of kwantificeren. Deze expertise omvat:

- Studie van de frequentievariëaties van uitwisselingen tussen zusterchromatides (SCEs) en van de kinetika van het voorkomen (of verdwijnen) van high frequency cells van SCEs (HFCs).
- Studie van stabiele chromosomale anomalieën met behulp van een recente technologie: whole chromosome painting.
- De celproliferatie-index (PRI) wordt onderzocht.
- Studie van DNA-adducten: De verschillende adducten worden onderzocht via G.C./M.S.

II Theoretische context

(a) Kobalt en zijn verbindingen.

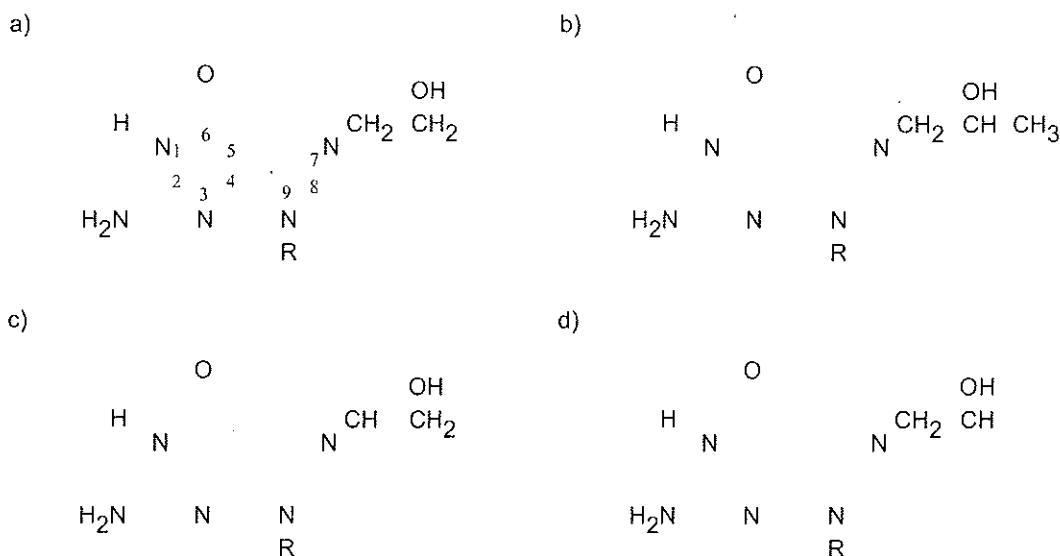
Het onderzoeksproject start vanuit de toenemende belangstelling voor het mogelijk kankerverwekkende risico van kobalt (longkanker waargenomen in de hard metaalindustrie). De werkhypothese, afkomstig van experimentele en epidemiologische data, is dat de carcinogeniciteit van metallisch kobalt significant verhoogd wordt in het geval van inhalatie van stof dat zowel metallisch kobalt als wolframcarbide bevat. Deze specifieke toxiciteit zou voortvloeien uit de verhoogde productie van vrije zuurstofradicalen wanneer de twee partikeltypes geassocieerd zijn, die verantwoordelijk zouden zijn voor de genotoxische effecten (DNA-schade).

Kobaltverbindingen worden door de International Agency for Research on Cancer geclassificeerd als "mogelijk carcinogeen voor de mens" (groep 2B) (IARC, 1991). De genetische toxicologie van kobalt werd beschreven door Beyersmann & Hartwig (1992). Tot op heden werden de meeste genotoxiciteitsstudies verricht met oplosbare kobalt(II)zouten. In *in vitro* systemen op zoogdiercellen bleek Co(II) DNA-breuken te induceren, alsook zusterchromatide-uitwisselingen, aneuploidie, DNA-proteïne crosslinks, micronucleï, genmutaties en morfologische celtransformatie maar geen chromosoomaberraties. Na *in vivo* studies met knaagdieren werd besloten dat CoCl₂ aneuploidie induceerde, maar ook chromosoomaberraties en dominant lethale effecten. Dit project beoogde de studie van de (geno)toxiciteit van metallisch kobalt en kobalt geassocieerd met wolframcarbide, *in vitro* en *in vivo* en werd uitgevoerd in nauwe samenwerking tussen de "Unité de Toxicologie Industrielle et Medecine du Travail" van de UCL, het "Laboratorium voor Pneumologie" van de KUL en het "Laboratorium voor Cellulaire Genetica" van de VUB (zoals weerspiegeld in de gemeenschappelijke publicaties). Globaal gezien volgen metalen twee wegen om hun genotoxiciteit uit te oefenen: inductie van oxidatieve schade en interactie met DNA-herstelprocessen. Het voorkomen van deze mechanismen werd eveneens nagegaan.

(b) Epoxide-vormende carcinogenen.

Onderzoek verricht door KUL 1:

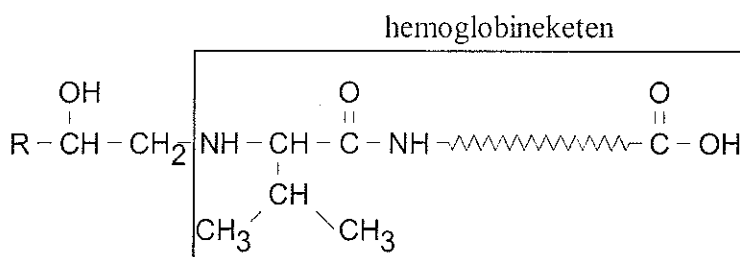
Adducten zijn het resultaat van de chemische binding tussen reactieve stoffen en macromoleculen in het lichaam. Macromoleculen zoals proteïnen en DNA, bevatten verschillende plaatsen met een excès aan elektronen, voornamelijk ter hoogte van stikstof-, zwavel- en zuurstofatomen. Deze plaatsen zijn zeer reactief ten opzichte van electrofiële producten, die er covalent kunnen binden ter vorming van adducten. Deze adducten kunnen dan aanleiding geven tot mutaties, een volgende stap in de mogelijke ontwikkeling van (beroeps)kanker, geïnduceerd door blootstelling aan chemische agentia. Enkele van de meest bekende van deze adductvormende stoffen zijn aflatoxines, epoxides, amines, polyaromatische koolwaterstoffen en sommige chemotherapeutische geneesmiddelen. Een aantal mutagenen zijn op zichzelf niet reactief, maar worden via het metabolisme omgezet in een electrofiel intermediair zoals de epoxidemetabolieten van bijvoorbeeld ethyleen, propyleen en styreen. De meest voorkomende DNA-adducten van deze epoxides worden weergegeven in figuur 1.



Figuur 1: De chemische structuur van de belangrijkste DNA-adducten van ethyleenoxide (EO) N-7-(2-hydroxyethyl)guanine (a) en propyleenoxide (PO), N-7-(2-hydroxypropyl)guanine (b). De reactie van styreen 7,8-oxide (SO) met N-7-guanine levert twee diastereoisomeren N-7-(2-hydroxy-1-phenylethyl)guanine (c), het N-7--adduct en N-7-(2-hydroxy-2-phenylethyl)guanine (d), het N-7--adduct, op.

De lage concentratie DNA in beschikbare weefsels zoals menselijk bloed maakt de routinematige bepaling van DNA-adducten moeilijk. Daarom werd gezocht naar alternatieven. Bloedproteïnes zoals hemoglobine en albumine, komen bij uitstek in aanmerking aangezien ze in hoge concentraties kunnen geïsoleerd worden uit bloed. De concentratie aan adducten wordt bovendien verhoogd door de accumulatie gedurende de volledige levensduur van hemoglobine (ca 120 d) en albumine (ca 20 d). Proteïne-adducten, zijn immers in tegenstelling tot DNA-adducten niet onderhevig aan enzymatisch herstel. Dit betekent ook dat de meting van hemoglobine-adducten geen momentopname is, maar eerder een schatting inhoudt van de cumulatieve blootstelling aan een product.

Daar waar de voordelen van hemoglobine-adducten als schatters van de blootstelling duidelijk zijn, geldt dat voor hun gebruik in de risicoschatting een directe relatie moet bestaan met de hoeveelheid gevormde DNA-adducten. Ons onderzoek concentreerde zich op de vorming van N-terminaal valine adducten door de 3 bestudeerde epoxides (figuur 2).



Figuur 2 : Chemische structuur van het N-terminaal valine-adduct in hemoglobine door EO (R = H), PO (R = CH₃) and SO (R = C₆H₅)

Recent werd ook nogal wat onderzoek verricht naar mogelijke invloeden van de enzymen betrokken bij de activatie en de deactivatie van de reactieve metabolieten. De tijd tussen activatie van het epoxide (P 450 systeem) en de deactivatie ervan (epoxide hydrolase en glutathion S-transferase) is immers een bepalende factor voor de hoeveelheid gevormd adduct. In het bijzonder werd veel aandacht besteed aan de relatie tussen genetische polyformismes in detoxificatie-enzymen en eventuele nadelige gezondheidseffecten. Vooral glutathion-S-transferases als belangrijke detoxificatie-enzymen (o.a. ook voor de door ons bestudeerde epoxides) kregen veel aandacht. De aan- of afwezigheid van bepaalde types van deze enzymen (vb. van de mu-klasse GSTM1 en van de theta-klasse GSTT1) zou de concentratie van het toxisch agens op een bepaalde locatie kunnen beïnvloeden. Zo werd door Föst et al. (1991) vastgesteld dat de deficiëntie in het erythrocytisch GSTtheta (GSTT1) *in vitro* leidde tot een hoger adductgehalte van N-terminaal valine. Deficiëntie in GSTM1 zorgde voor significant verhoogde DNA adductgehalten in de longen van rokers (Soni et al., 1998). Genotypering voor deze iso-enzymen bij mensen werd recent mogelijk dankzij de ontwikkeling van een PCR-technieken (GSTM1 : Brockmöller et al., 1993; GSTT1 : Pemble et al., 1994). Het laboratorium van Medische Scheikunde van Dr. P. Kremers (ULg) ontwikkelde deze technieken eveneens binnen een DWTC-project. Het doel van deze studie was dan ook te onderzoeken of de betrokken genotypes de N-terminaal valine-adductvorming bij een grote groep werknemers (n=348) beïnvloeden.

Onderzoek verricht door ULg :

Les adduits à l'ADN

Le mécanisme et les taux de de formation des adduits à l'ADN est fonction de la nature et des propriétés physico-chimiques de l'agent ainsi que des voies et vitesses des processus de métabolisation. Si un adduit peut être formé par la réaction d'un agent électrophile avec un nucléophile, il peut également être produit par la réaction d'un radical hydroxyl consécutif à un stress oxydant, ou encore résulter d'une activation électronique des différentes bases azotées après excitation par des rayons UV (Cadet J., 1994). En outre, un certain nombre et type d'adduits sont produits de façon endogène tels ceux résultants de l'oxydation des lipides (Chaudhary A.K., 1996 a ; Törnqvist 1998). Du point de vue théorique, les trois constituants d'un nucléotide peuvent faire l'objet d'une réaction électrophile, cependant la plupart des agents électrophiles effectuent des réactions avec les centres nucléophiles pyrimidiques et puriques, les atomes d'oxygène et d'azote étant largement plus impliqués que les atomes de carbone.

Au sein de la molécule d'ADN, les groupements phosphates ne sont pas exempts d'adduits, certains agents alkylants entraînant la formation de phosphotriesters. La relation adduit-mutation est complexe et est influencée par des facteurs tant quantitatifs (dose et nombre d'adduits) que qualitatifs (position de l'adduit). Pour les agents alkylants simples comme l'oxyde d'éthylène, chaque type d'adduits pourrait être lié à un type de mutation particulière (Farmer P., 1995). Cette situation ne se rencontre pas dans le cas d'adduits de taille plus importante comme ceux formés par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HaP) ; un même adduit pouvant être responsable de plusieurs types de mutations (Jelinsky S., 1995 ; Loechler E., 1995, 1996).

La présence d'adduits à l'ADN constitue un événement important en ce qui concerne la survenue de mutations et, dès lors, dans les mécanismes multi-étapes de la cancérogenèse (Brookes P., and Lawley P., 1960, 1964 ; Lawley P., 1994, Hemminki K., 1992). Rappelons cependant que la complexité de ces mécanismes est telle qu'aucune relation simple et directe entre le taux d'adduits et le risque de survenue de cancers ne peut être établie précisément (Svenberg J., 1985).

En ce qui concerne l'établissement de relations dose-effet entre l'exposition à un agent mutagène et la formation d'adduits, l'ADN doit être considéré comme une molécule cible. La mesure des adduits à l'ADN pourrait donc constituer un outil précieux pour la détection d'expositions, à condition de disposer de technologies permettant d'identifier précisément la nature du groupement adduit, d'estimer leur taux et de mesurer le type de nucléotide concerné ainsi que le site de fixation de l'adduit (Svenberg J., 1995).

La dosimétrie moléculaire est un outil qui devrait permettre d'établir le degré de proportionnalité existant entre la dose d'exposition à un agent génotoxique et la nature et la quantité d'adduits formés (Segeberback D., 1983 ; Li F., 1992 ; Leclercq L., 1998). Cependant, cette relation de proportionnalité (théoriquement linéaire) est dépendante de l'intervention de processus agissant simultanément et qui peuvent aboutir à des relations supralinéaire ou sublinéaire :

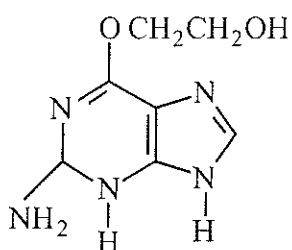
- a) l'induction prolongée de lésions et la saturation des voies de bioactivation ;
- b) la saturation des processus de détoxification ;
- c) la saturation des différents mécanismes enzymatiques impliqués dans la réparation des lésions à l'ADN ;
- d) la stabilité des adduits.

Les adduits à l'ADN et époxydes

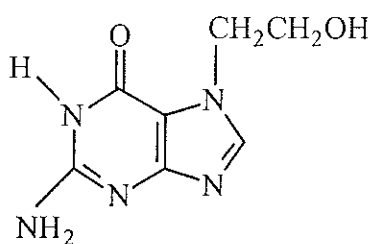
Développée, à partir d'un modèle expérimental concernant les adduits à l'oxyde d'éthylène (EO) (Kolman A., 1986 ; Li F., 1992), la méthode d'analyse est d'application à d'autres agents alkylants et notamment aux adduits à l'oxyde de propylène (PO) (Ehrenberg L., 1981 ; IARC vol 60 ; Wu K., 1996).

L'exposition *in vitro* d'ADN à l'oxyde d'éthylène entraîne la formation de trois types d'adduits résultant de la substitution nucléophile des azotes des bases puriques sur l'oxyde d'éthylène (SN2) : la N7 (2 hydroxyethyl) guanine (7HEG), la O⁶ (2 hydroxyethyl) guanine (6HEG) et la N3 (2 hydroxyethyl) adénine (3HEA).

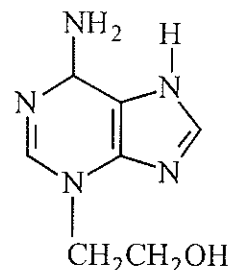
D'un point de vue quantitatif, les taux relatifs d'adduits formés diffèrent, les adduits 6HEG et 3HEA sont minoritaires, l'adduit majoritaire est la 7HEG qui représente plus de 90% de l'ensemble des adduits formés (Bolt H., 1988 ; Tate A., 1991 ; Segeberback D., 1983 ; Li F., 1992 ; Leclercq L., 1998).



6HEG (± 5%)



7HEG (± 90-95%)



3HEA (± 5%)

Principaux adduits formés entre l'ADN et l'oxyde d'éthylène

Directement impliqué dans la liaison avec la cytosine au niveau de la double hélice d'ADN l'adduit en O⁶ de la guanine (6HEG) est reconnu pro-mutagène. Peu d'informations sont disponibles quant au rôle de l'adduit principal 7HEG (Walker V., 1990, 1992 a, 1992 b).

Cet adduit est reconnu instable et donc susceptible d'entraîner la présence d'un site apurinique potentiellement mutagène. En outre, les adduits en N7 de la guanine sont souvent le siège d'une ouverture de cycle imidazole, laquelle pourrait s'avérer suffisante pour entraîner une erreur de réplication (Chiu C., 1993 ; Segerback D., 1994)

III METHODOLOGIE

III.1 STEEKPROEF

a) Kobalt en zijn verbindingen

i) In vivo, souris transgéniques BigBlue (UCL)

Echantillons

Particules.

Les caractéristiques des particules de cobalt métallique (Co), de métaux durs (WC-Co) et de carbure de tungstène (WC) utilisées dans ces tests ont été décrites précédemment (Lison et al, 1995) :

composition	pureté	granulométrie (d ₅₀)	surface spécifique (m ² /g)
cobalt métal	99.87 %	4 µm	0.98
94:6	-	2 µm	1.99
carbure de tungstène	99.5 %	< 1µm	2.91

Animaux.

Les souris transgéniques Big Blue (femelles âgées de 7 semaines) ont été obtenues de la société Stratagene (Heidelberg, Allemagne), leurs correspondantes sauvages (C57BL/6) ont été achetées chez IFFA Credo (Bruxelles). Les animaux ont été maintenus dans une animalerie conventionnelle (22°C, 50 % humidité relative, cycle de 12 h lumière/obscurité).

Réactifs

Les réactifs spécifiques au test Big Blue ont été obtenus auprès de Stratagene (Heidelberg, Allemagne). Les autres produits chimiques étaient de qualité analytique.

ii) Biomonitoring.(UCL + VUB)

L'objectif du volet épidémiologique de cette recherche était de comparer différents paramètres de génotoxicité parmi 40 travailleurs exposés au cobalt seul, 40 travailleurs de l'industrie des métaux durs et 40 contrôles; ces 3 groupes étant appariés le mieux possible pour l'âge, le statut socio-économique et surtout les habitudes tabagiques qui sont bien connues pour influencer fortement les biomarqueurs de génotoxicité. Afin de pouvoir comparer des niveaux d'exposition équivalents, il était également souhaité de recruter des travailleurs exposés dont l'excrétion urinaire de cobalt en fin de semaine de travail soit de l'ordre de 20 µg/g créatinine.

Les marqueurs de génotoxicité suivants sont recherchés dans les lymphocytes circulants:

- aberrations chromosomiques
- micronoyaux
- cassures d'ADN et sites alkali-labiles (single cell gel electrophoresis assay)

L'intervention des radicaux hydroxyles est recherchée par le dosage de la 8-hydroxydéoxyguanosine urinaire (adduits OH à l'ADN). La susceptibilité individuelle au stress oxydatif est également appréciée par le dosage du taux de vitamine E plasmatique (α -tocophérol). Le tabagisme est quantifié par la mesure de la cotinine urinaire.

Le recrutement de ces travailleurs a posé de nombreuses difficultés liées entre autre au caractère "sensible" (génétique) des paramètres examinés ainsi qu'au climat difficile auquel a été confrontée l'industrie des métaux durs suite à la publication au cours de notre étude, des résultats d'une enquête épidémiologique mettant clairement en évidence un risque accru de cancer bronchique dans cette industrie (Moulin et al. 1998).

Après de multiples démarches, nous avons obtenu le soutien de l'association internationale des producteurs de cobalt (Cobalt Development Institute) qui nous a permis de recruter parmi 4 grands groupes européens.

Chaque travailleur est inclus dans l'étude avec un N° de code qui ne sera levé qu'à la fin de l'étude. A ce stade, nous ne connaissons donc pas encore la répartition exacte des exposés et contrôles. Le recrutement des sujets dans une dernière usine se poursuit durant les premiers mois de l'année 1999 (programme SSTC, 1999-2000, phase I, valorisation). L'objectif de recruter un total de 120 sujets sera donc presque atteint lorsque les prélèvements dans cette usine seront achevés.

Les travailleurs sont examinés à deux occasions par le médecin du travail local selon un protocole standard établi en Belgique : le vendredi soir (ou équivalent) et le lundi matin (ou équivalent). Le protocole est le suivant :

Examen clinique minimum.

- poids
- taille
- TA
- pouls
- auscultation pulmonaire

Questionnaire.

- renseignements administratifs (anonyme)
- carrière professionnelle (emplois précédents, durée d'exposition au Co, autres substances)
- antécédents médicaux, chirurgicaux
- consommation de médicaments, d'alcool
- tabagisme, ex-fumeurs, date d'arrêt

Tests biologiques.

Pour tous les sujets : exposés (Co et WC-Co) et contrôles.

Les examens biologiques seront réalisés après une semaine d'exposition stable et représentative pour chaque sujet.

le vendredi soir : Co-U

le lundi matin suivant :

- cytogénétique sur lymphocytes circulants (aberrations chromosomiques et micronoyaux) et single cell gel electrophoresis (SCGE),
- 8OH-déoxyguanosine, cotinine et créatinine urinaires
- vitamine E plasmatique.

Les examens cytogénétiques et SCGE sont effectués au laboratoire du Prof. Kirsch-Volders (VUB). Les autres analyses sont effectuées par le laboratoire de Toxicologie industrielle et de Médecine du Travail (UCL).

Procédures de prélèvement et de conservation.

vendredi soir :

- urine : 25 ml sans conservateur, conservation 4°C et envoi à Bruxelles le lundi.

lundi matin, à jeun :

- urine (8OHdG, cotinine et créatinine) : 25 ml sans conservateur. conservation 4°C et envoi par courrier express à Bruxelles le jour même.
- plasma lundi matin pour vit E : tube 5 ml hépariné, protégé de la lumière, conservé à 4°C et envoyé par courrier express à Bruxelles le jour même.
- sang total (cytogénétique et SCGE) : tube 10 ml calparine fourni par la VUB, conservé à 4°C et envoyé par courrier express à Bruxelles (max 24 h de transport au total).

Le protocole de cette étude a été approuvé par la Commission d'Ethique biomédicale de l'UCL. Chaque sujet pressenti choisit librement sa participation à l'étude et signe un document de consentement qui lui explique les conditions dans lesquelles la recherche est menée. Il est en particulier précisé que les résultats des tests de génotoxicité (SCE, AC et SCGE) ne seront pas remis individuellement parce que la valeur de ces résultats au niveau individuel n'est pas connue. Il est d'emblée entendu que seuls des données au niveau du groupe seront discutées. Ces documents (questionnaires, consentement) ont été traduits en anglais et dans les langues respectives des usines où le recrutement s'est réalisé.

iii) Toxiciteitsstudie (KUL2)

De meeste studies i.v.m. partikel-toxiciteit voor de long worden uitgevoerd met macrofagen. Interactie van de partikels met deze cellen wordt verondersteld een eerste kritisch gebeuren te zijn in de ontwikkeling van een inflammatoir proces. Er zijn echter ook andere cellen aanwezig in de alveoli die relevant kunnen zijn voor de ontwikkeling van kanker en fibrose, nl. de alveolaire type II cellen (AT-II). Gezien hun ligging in de alveolen kunnen ook zij rechtstreeks blootgesteld worden aan de partikels, of ze kunnen indirect beïnvloed worden via mediators die door de macrofagen worden vrijgegeven. AT-II verhinderen dat de longblaasjes collaberen door de productie van surfactant, ze zijn in staat cytokines te produceren of andere mediators van het inflammatoir proces, en na beschadiging van de alveolaire type I cellen zullen ze prolifereren en differentiëren en aldus het epitheel herstellen.

Alveolaire macrofagen (AM) (o.a. van de rat) kunnen geïsoleerd worden door een bronchoalveolaire lavage uit te voeren. AT-II worden geïsoleerd door trypsinisatie van de long, centrifugatie op een gradiënt en differentiële hechting aan een petri-schaal. Verdere opzuivering gebeurt door de monolaag-culturen te wassen wanneer de cellen goed gehecht zijn.

iv) In vitro menselijke lymfocyten (VUB)

Geheel bloed werd afgenomen van gezonde, jonge donoren (niet rokers, leeftijd < 30j.) door venipunctie in gehepariniseerde tubes (Vacutainer, Benton Dickinson Oxford, UK). Isolatie van lymfocyten gebeurde door middel van centrifugatie op Ficoll-Paque (Pharmacia, Biotech, Brussel, België). Lymfocyten werden in cultuur gebracht in Ham's F10 medium met 15% foetaal kalf serum (FCS) en 2% fytohemagglutinine (PHA) als mitogen. Eén milliliter culturen werden gedurende 24 uur geïncubeerd bij 37°C en 5% CO₂.

De blootstelling aan de metaalverbindingen gebeurde door toevoeging van 10 µl partikelsuspensie in de gepaste concentratie, na 24 uur stimulatie van de cellen. De behandeling was verschillend, naargelang het experiment.

b) **Epoxide-vormende carcinogenen**

i). In vitro experimenten (KUL1)

Ehrenberg en Hussain (1981) beschreven met de volgende 2 differentiaalvergelijkingen de reactie tussen de macromoleculen in ons lichaam (hemoglobine, albumine, DNA) en een adductvormend agens (Epoxy : epoxide).

$$d [\text{Epoxy}]/dt = - k_e * [\text{Epoxy}]$$

$$d [\text{Epoxy-Y}]/dt = k_{\text{Epoxy-Y}} [Y][\text{Epoxy}]$$

(waarbij Epoxy : epoxide, k_e : de eliminatieconstante van het epoxide uit bloed ; Epoxy-Y : epoxide adduct aan macromolecule Y ; $k_{\text{Epoxy-Y}}$: tweede-orde reactiesnelheidsconstante van de reactie tussen het epoxide en macromolecule Y).

Door de bepaling van de eliminatieconstante k_e in één experiment en de bepaling van de hoeveelheid adduct in functie van de beginconcentratie epoxide in een ander experiment kan de tweede-orde reactiesnelheidsconstante bepaald worden. Daarom werden experimenten in bloed (proefdieren en menselijk) opgezet om deze constanten te bepalen voor de reactie tussen de 3 bestudeerde epoxides enerzijds en N-terminaal valine, cysteine (enkel voor SO), het carboxyluiteinde (enkel voor SO) in hemoglobine en N-7-guanine in DNA anderzijds.

ii) **Dierexperimenten (KUL1)**

In het kader van het project 1990-1994 (HH/01/044) werden een aantal muiseperimenten uitgevoerd. Hierbij werden muizen (NMRI, wit, mannelijk, lichaamsgewicht: 25-30 g) intraperitoneaal (ip) geïnjecteerd met een mengsel van styreen, maïsolie en DMSO (4:9:1) in een range van 0.28 tot 4.61 mmol styreen/kg lichaamsgewicht. Als referentie werden muizen geïnjecteerd met een mengsel van maïsolie en DMSO (9:1). Na 3 u werden bloed, lever, longen en milt gecollecteerd. Determinatie van hemoglobine-adducten in het bloed gebeurde volgens de gemodificeerde Edmandegradatie techniek, zoals beschreven in III.3.2. De overige weefselstalen werden op droog ijs getransporteerd naar Praag, Tjechië. N-7 en O⁶-guanine-adducten werden bepaald via een gemodificeerde ³²P-postlabelling techniek.

In een tweede muiseperiment werden 7 groepen van 3 muizen per dosis geïnjecteerd met dossissen tussen 3.61 en 19.45 mmol/ kg lichaamsgewicht. Na 3 h werd opnieuw bloed en lever gecollecteerd. Het geïsoleerde hemoglobine en de levers werden gemengd zodat de bekomen adductgehalten kunnen beschouwd worden als een gemiddelde waarde voor 3 dieren.

In een derde experiment werd de adductvorming aan N-terminaal valine in muizen vergeleken met de adductvorming in ratten geïnjecteerd met styreen en SO. SO vormt naast ter hoogte van N-terminaal valine ook adducten ter hoogte van cysteine en van het carboxyluiteinde. De adductvorming op deze plaatsen kon dankzij een samenwerking met het laboratorium van Prof Dr Stephen Rappaport, University of North Carolina, bestudeerd worden.

iii) **Arbeiders blootgesteld aan ethyleenoxide (EO) (KUL1)**

Een eerste studiegroep werd gevormd door 18 werknemers blootgesteld aan EO tijdens de chemische sterilizatie van medisch materiaal. De gemiddelde leeftijd van de arbeiders was 31 jaar (range 24-44). Er waren 10 niet-rokers (56 %), waarvan 3 echter blootgesteld waren aan passief roken. Zeven arbeiders woonden in de stad, wat mogelijk gerelateerd was met een hogere blootstelling aan pollutanten. 9 (50%) arbeiders waren operators, die in 3 shifts werkten.

In vergelijking met andere arbeiders (supervisors, laboratorium- of labellingpersoneel) werden de operators blootgesteld aan hogere EO concentraties, in het bijzonder tijdens het laden en het lossen van de autoclaven. In de aëratieruimte, waar het materiaal gebracht werd na het autoclaveren, waren enorm hoge concentraties EO aanwezig. De werknemers waren dan ook verplicht in deze ruimte een gasmasker te dragen.

iv) **Arbeiders blootgesteld aan propyleenoxide (KUL1)**

Een tweede groep, was een groep van 36 arbeiders uit een polypropyleenfabriek. De gemiddelde leeftijd van de arbeiders was 36 jaar (range 21-55). Het rookgedrag werd genoteerd omwille van de mogelijke impact ervan op de vorming van EO- en PO-adducten aan N-terminaal valine in hemoglobine. Er waren 12 rokers (33%) en van de niet-rokers waren er 3 blootgesteld aan passief roken. Ook de biometrische parameters gewicht (gemiddelde 78 kg; range 61-100) en lengte (gemiddelde 1.79 m; range 1.67-1.96) werden opgetekend.

Lekken (e.g. aan kleppen, pompen en flenzen) kunnen leiden tot fugatieve emissies en zo tot occasionele blootstellingen aan propyleen. Ongeveer 1.5 jaar voor de bloedstaalname werd de emissie op een aantal van deze punten in de constructie geschat. De concentratie propyleen in de lucht kon niet direct gemeten worden, maar werd geschat aan de hand van de totale VOC (Volatile Organic Compound) emissie. Deze werd gemeten op 136 punten. Op basis hiervan werd de totale propyleenemissie per jaar geschat op 8454 kg. 13 (9.6 %) van de bemonsterde punten werden aangeduid als zware lekken, welke tussen de 197 en 2297 kg propyleen per jaar emitteerden. Deze lekken, hoewel klein in aantal, namen 93 % van de totale propyleenemissie voor hun rekening. 9 (6.6 %) lekken emitteerden middelmatige hoeveelheden propyleen, i.e. tussen 46 en 51 kg propyleen per jaar. De resterende 114 (84%) punten vertoonden geen of slechts kleine verliezen aan propyleen (< 2.5 kg/jaar). Na de monitoring werden de zware lekken hersteld. Het feit dat de propyleenfabriek gebouwd was in open lucht, leidde bovendien tot de verwachting van over het algemeen lage en slechts occasionele blootstellingen bij de werknemers.

v) **Microsomaal epoxide hydrolase-arbeidersgroep (KUL1)**

Tenslotte werden ook bloedstalen genomen bij een groep van 64 ex-styreen arbeiders. De blootstellingen aan styreen tussen 1983 en 1992 waren goed gedocumenteerd (Veulemans, 1986; Viaene, 1998). Na 1992 bleef slechts een klein gedeelte van de arbeiders met styreen werken en geen enkele van de arbeiders was nog aan styreen blootgesteld de 3 maanden voorafgaand aan de bloedstaalname. Tussen 1992 en 1993, werden de arbeiders gescreend met een neurologische test batterij (NES) naar mogelijke irreversibele negatieve neurologische effecten ten gevolge van hun blootstelling (Viaene, 1998). Ook werden biometrische en enkele andere gegevens gerapporteerd in een uitgebreide enquête. Uit deze gegevens werden leeftijd, alcoholgebruik, rookgedrag, arbeidsduur en gemiddelde blootstelling geselecteerd om hun mogelijk relatie met de microsomaal epoxide hydrolase-activiteit te bestuderen.

De gemiddelde leeftijd van de arbeiders was 38.6 ± 9.9 jaar (range 26 - 63). Het gemiddelde alcoholverbruik was 9.4 ± 8.6 eenheden/week (range 0 - 35; 1 eenheid = 10 g alcohol). De groep niet-rokers bedroeg 64 % van de totale groep. Tussen 1983 en 1992, lamineerden deze arbeiders gemiddeld 3965 ± 1990 h (range 530-7900) en werden ze gemiddeld blootgesteld aan 154.1 ± 18.9 mg/m³ styreen (113.8-188.8).

vi) **Glutathion-S-transferase (GST) arbeidersgroep (KUL1)**

Er werden bloedstalen genomen bij 348 werknemers verdeeld over 3 bedrijven in Wallonië. 10 van deze werknemers kwamen uit een bedrijf actief in de productie van rubberbanden. In bedrijf 2 waren 93 werknemers tewerkgesteld in hoogovens. Zij werden verondersteld blootgesteld te zijn aan diverse alifatische en aromatische koolwaterstoffen.

Tenslotte waren 198 stalen afkomstig uit bedrijf 3, een cementfabriek. Bij deze werknemers werden naast een aantal algemene gegevens, ook gegevens genoteerd betreffende het rookgedrag (62% niet-rokers), hobbies, alcoholgebruik (gemiddelde 9.4 eenheden/week; 1 eenheid = 10 g alcohol), medicatie, jobomschrijving en ziekte. Een subgroep in bedrijf 3 bestond uit 47 arbeiders. De stalen werden ongeveer een half jaar na de andere verzameld en er werd bijzondere aandacht besteed aan de voorbereiding van de stalen (isolatie van hemoglobine). Deze groep had ongeveer dezelfde karakteristieken als de globale bestudeerde populatie (67% niet-rokers; 12.5 eenheden alcohol/week).

vii) **Motivations de la détection des adduits (ULg)**

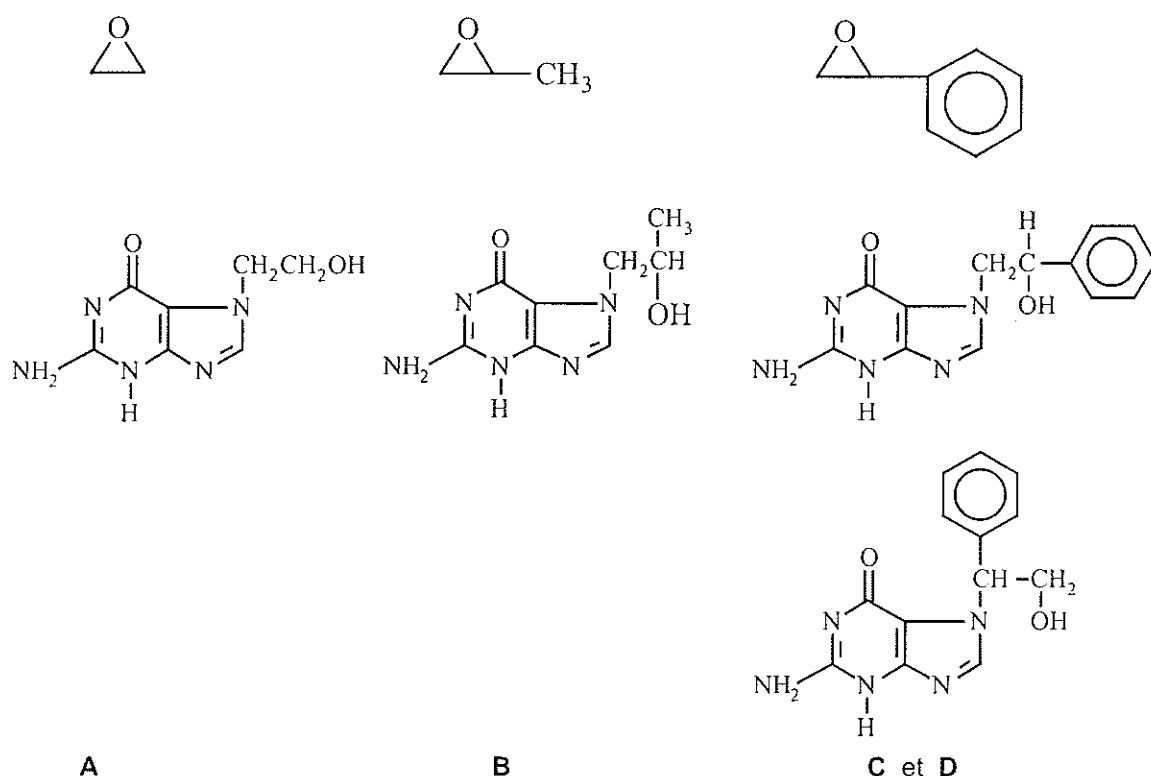
Directement impliqué dans la liaison avec la cytosine au niveau de la double hélice d'ADN l'adduit en O⁶ de la guanine (6HEG) est reconnu pro-mutagène. Peu d'informations sont disponibles quant au rôle de l'adduit principal 7HEG. Cet adduit est reconnu instable et donc susceptible d'entraîner la présence d'un site apurinique potentiellement mutagène. En outre, les adduits en N7 de la guanine sont souvent le siège d'une ouverture de cycle imidazole, laquelle pourrait s'avérer suffisante pour entraîner une erreur de réplication.

En tenant compte de cet ensemble de données et sachant que le rapport du taux d'adduit formés en O⁶ et en N7 de la guanine est peu variable en fonction des espèces, nous avons décidé d'orienter notre étude sur l'adduit majoritaire 7HEG. De plus, la limite de détection qu'il nous est imposé d'atteindre pour répondre au risque cancérigène minimum (environ une base modifiée sur dix millions ou même moins) ne nous permet pas d'étudier uniquement l'adduit en O⁶ de la guanine, ce dernier étant présent à de trop faibles quantités.. Les approches technologiques de mesures des d'adduits à l'ADN sont peu nombreuses ; chacune présente une série d'avantages selon que l'on recherche une identification qualitative du type d'adduit formé ou un dosage quantitatif de cet adduit.

Au niveau de la sensibilité, il semblerait que la méthode d'analyse au postlabeling au ³²P soit la plus sensible (Randerath K., 1981, 1985 b, Talaska G., 1993). Elle consiste à fixer un groupement phosphate marqué isotopiquement au nucléotide adduit. Un comptage par scintillation est alors réalisé en faisant migrer l'adduit sur une plaque TLC. Cependant cette méthode n'est pas sélective et ne permet pas une identification de la nature de l'adduit. La HPLC avec détection UV ou a fluorescence présente des désavantages similaire tout en offrant une sensibilité moindre. La spectrométrie de masse représente le meilleur compromis entre sensibilité et sélectivité. Directement couplée à une méthode de séparation préalable des entités provenant de la dégradation de l'ADN, à savoir la chromatographie gazeuse (GC/MS) et la HPLC (HPLC/MS) (Chiarelli M., 1992 ; Deforce D., 1996 ; Giese R. 1997 ; Halliwell B., 1992). La spectrométrie de masse permet une identification non-ambigüe de la nature moléculaire de l'adduit et apparaît comme une méthode capable de répondre aux impératifs de sensibilité et de sélectivité implicite à la détection des adduits.

Les époxydes aliphatiques dérivés de l'oxyde d'éthylène sont de puissants agents électrophiles qui se fixent covalentiellement sur les sites nucléophiles des macromolécules biologiques telles que l'ADN et les protéines.

Au niveau des trois époxydes que nous étudions, la substitution nucléophile se réalise préférentiellement au niveau de l'atome d'azote en N7 de la guanine. Ces 3 adduits principaux feront l'objet de l'analyse quantitative.



- A : 7-(2-hydroxyethyl) guanine (7HEG)
 B : 7-(2-hydroxypropyl)guanine (7HPG)
 C : 7-(2-hydroxy-2-phenylethyl)guanine
 D : 7-(2-hydroxy-1-phenylethyl)guanine)..

viii) Prélèvements et isolation des lymphocytes et adduits

A partir d'un prélèvement sanguin de 10 ml (simulation de conditions réelles de biomonitoring), les lymphocytes sont isolés (Lymphoprep). L'extraction d'ADN et le départ des protéines fixées sur ce dernier est conduit à l'aide d'un mélange d'isothiocyanate de guanidine et de DNAzol, un détergent repose sur le principe. Les adduits situés en N7 de la guanine présentent l'avantage de pouvoir être séparés du squelette d'ADN par simple chauffage de l'ADN à 100°C à pH neutre (NTH ou neutral thermal hydrolysis). Cette propriété permet d'éviter les désagréments liés aux dégradations enzymatiques. Les adduits ainsi libérés sont alors séparés physiquement des oligonucléotides restants par centrifugation au travers d'une membrane micropore (Centricon 30). La solution contenant l'adduit est alors prête pour l'analyse qualitative et quantitative (Carin P, 1990)..

ix) **Analyse des adduits (ULg)**

La méthode d'analyse est la spectrométrie de masse. Cette méthode repose sur l'ionisation d'une substance et sur son identification à l'aide des différents ions (moléculaire ou fragments) produits. Elle permet à la fois l'identification moléculaire de la substance analysée et sa détection en quantités extrêmement faible (en dessous du picogramme de substance).

Le mélange résultant de l'opération de microconcentration des adduits contenant différentes impuretés (un faible pourcentage de bases non modifiées et d'autres composés en traces éventuels), l'injection du mélange en spectrométrie de masse doit être précédée d'une purification préalable de l'adduit par une technique de chromatographie. Le spectromètre de masse est donc couplé soit à la chromatographie en phase gazeuse (GC/MS) ou à la chromatographie liquide à haute performance (HPLC/MS) (Dizdaroglu M., 1990 ; Ni J., 1996)..

x) **Standards de référence (ULg)**

La firme Chemsyn (USA) nous a fourni nos standards de références sous forme de bases modifiées ci-après : N7 (2 hydroxyethyl) guanine (7HEG), la O⁶ (2 hydroxyethyl) guanine (6HEG) et la N3 (2 hydroxyethyl) adénine (3HEA).

xi) **Exposition d'ADN standards *in vitro* à l'EO (ULg)**

Les échantillons d'ADN de thymus de veau sont préparés par dilutions 1 : 1 dans de l'eau désionisée. L'exposition à l'oxyde d'éthylène est effectuée par adjonction des quantités nécessaires d'une solution stock d'EO 1 M, obtenue par dilution de 500 µl d'EO liquide dans 10 ml de tampon 1.

Les échantillons d'ADN sont exposés durant 3 heures à 37 ° C à des 10 concentrations d'EO comprises dans l'intervalle de doses (10⁻⁴ M - 100 mM).

La réaction est arrêtée par précipitation de l'ADN à l'acétate de sodium 0.1 M ds l'éthanol absolu (1:2 en volume) pdt 1 h à -20°C. L'ADN en solution est alors chauffé à 100°C pendant 15 minutes pour isoler les bases puriques modifiées (adduits sur base puriques en position 7 et 3) (hydrolyse thermique en milieu neutre).

L'ADN est refroidi à 4°C et une isolation de l'adduit et d'un faible pourcentage de bases puriques non modifiées est réalisée par microcentrifugation à 3000.g pdt 3 heures (passage des purines modifiées (et d'un faible pourcentage de purines restées intactes après exposition) au travers d'une membrane micropore).

xii) **Exposition d'échantillons de sang humains *in vitro* à l'EO (ULg)**

Les échantillons sanguins, prélevés sur EDTA, sont exposés - sous agitation continue - pendant 3 heures à 37 ° C à des 9 concentrations d'EO comprises dans l'intervalle de doses (10⁻⁴ M - 50 mM). L'exposition à l'oxyde d'éthylène est effectuée par adjonction des quantités nécessaires d'une solution stock d'EO 1 M conservée sous carboglace.

III.2 METINGEN

a) Kobalt en zijn verbindingen

i) Big Blue (UCL)

Il s'agissait de vérifier si l'activité clastogène des particules de cobalt métal et de métaux durs, mise en évidence dans les tests *in vitro*, se traduit par une induction de mutations géniques *in vivo*, plus particulièrement au sein de l'organe-cible, le poumon.

Le Big Blue Mutagenesis Assay System™ est un test recherchant les mutations géniques *in vivo* chez la souris ou le rat. Dans ce système, le génome de l'animal transgénique comporte environ 30 copies d'un bactériophage λ . Ce vecteur, d'approximativement 43 kb, contient le gène-cible *lacI* (codant pour une protéine réprimant le gène *α lacZ*) ainsi que le gène rapporteur *α lacZ* (codant pour l' α -peptide de la β -galactosidase).

Après exposition aux agents dont on recherche l'activité génotoxique, l'ADN génomique des tissus étudiés est isolé et, à l'aide d'enzymes de restriction appropriés, les vecteurs de phages bactériens λ sont excisés de l'ADN eucaryote. Ensuite, ils sont encapsidés à l'aide de protéines phagiques pour produire des particules phagiques viables. Ces bactériophages sont alors mis en contact avec des bactéries *E. coli* SCS-8 (souche ne possédant pas le gène *lacI* et dont le gène *lacZ* possède une séquence *α lacZ* inopérante). Celles-ci se développent en formant un tapis bactérien opaque sur une boîte de Pétri. Chaque phage peut infecter une bactérie et s'y multiplier. Plusieurs cycles d'infection vont s'enchaîner et entraîner la lyse de la bactérie avec libération de phages. Ceux-ci pourront alors coloniser les bactéries avoisinantes et le cycle d'infection se poursuivra. Des zones translucides apparaîtront alors sur les boîtes de Pétri, à l'endroit où les phages ont lysé les bactéries (plages de lyse).

Le vecteur de phage λ contient 3 portions utiles pour comprendre le principe du test : le gène cible *lacI*, l'opérateur *lacO* et le gène *α lacZ* (figure 3). Le gène *α lacZ* code pour une portion de l'enzyme β -galactosidase, l' α -peptide. Cette enzyme lorsqu'elle est complètement fonctionnelle métabolise le X-gal (substrat synthétique incolore) en un produit bleu.

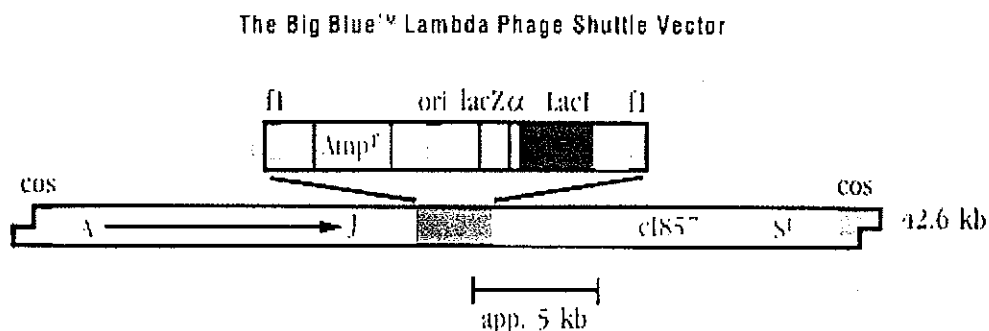


Figure 3 (d'après la documentation Stratagene™)

Les mutations survenant au niveau du gène *lacI* rendent éventuellement ce gène non-fonctionnel et permettent alors l'expression du gène *αlacZ* exogène (phagique). Ceci se traduit par l'expression de l'α-peptide et d'une β-galactosidase fonctionnelle et donc des plages de lyse bleues apparaissent sur l'agar des boîtes de Pétri. En revanche, en l'absence de mutation, le gène *lacI* code pour un répresseur fonctionnel de *αlacZ*, l'expression de ce gène est inhibée, la β-galactosidase bactérienne reste incompetente et les plages de lyse demeurent incolores.

Le rapport entre le nombre de plages bleues et le nombre total de plages de lyse est utilisé pour quantifier le nombre de mutations induites *in vivo*.
Le principe global du test est résumé à la figure 4 :

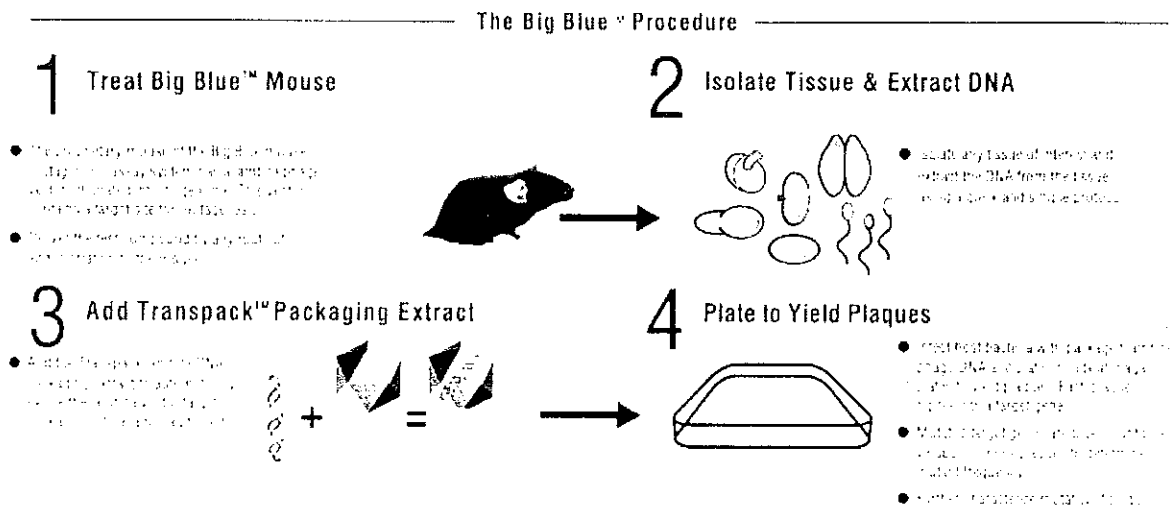


Figure 4 (d'après la documentation Stratagene™)

ii) Formes activées de l'oxygène (UCL)

L'utilisation de techniques de spin trapping (ESR) nous a permis d'étudier la production de radicaux hydroxyles. Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec le service de Physicochimie des Matériaux de l'Université de Turin (Prof. Fubini) qui maîtrise parfaitement cette technique.

iii) Cassures de l'ADN (UCL)

Nous nous sommes d'abord attachés à rechercher les méthodes expérimentales les plus appropriées pour étudier l'effet génotoxique de particules insolubles. Les premiers essais ont été réalisés avec la technique d'élution alcaline sur ADN isolé de cellules murines (3T3) préalablement marquées à la thymidine tritiée. Nous avons pu vérifier que cette technique est à même de détecter les cassures de l'ADN produites par les radiations ionisantes, choisies comme témoin positif (Leroy et al. 1996). Ceci nous permettait donc de valider notre technique, nous autorisant à l'appliquer aux différentes particules contenant du cobalt. L'équipe de l'UCL a donc utilisé la technique d'élution alcaline pour étudier l'effet des différentes particules sur l'intégrité de l'ADN, ceci sur lymphocytes humains et sur ADN isolé (obtenu à partir de cellules 3T3).

iv) **Autres biomarqueurs (UCL)**

Parmi les paramètres mesurés dans l'étude humaine, nous avons retenu :

- le dosage du cobalt urinaire est pratiqué chez les travailleurs exposés et contrôles afin d'apprécier l'intensité de l'exposition durant la semaine écoulée (Lison et al. 1994). Etant donné que la plupart de ces travailleurs sont également en partie exposés à des poussières de nickel (facteur confondant possible pour un effet génotoxique), nous mesurons également ce métal dans l'urine afin de pouvoir en tenir compte dans l'analyse statistique et l'interprétation des résultats.
- le dosage de la cotinine urinaire servira à quantifier le tabagisme récent des sujets, permettant ainsi de prendre en compte cet important facteur de confusion dans les études de génotoxicité.
- un dosage de la vitamine E sérique sera réalisé pour tenter d'apprécier un éventuel facteur de susceptibilité individuelle au stress oxydatif qui est probablement impliqué dans le mécanisme de l'action génotoxique de certains des composés étudiés (WC-Co plus particulièrement),
- enfin, le dosage de la 8-hydroxydéoxyguanosine urinaire devrait nous permettre d'appréhender la contribution d'un stress oxydatif au niveau de l'ADN. Etant donné le rôle important que semble jouer le radical hydroxyle dans la toxicité de ces particules, nous avons souhaité inclure dans le protocole ce marqueur supplémentaire. Le développement analytique (HPLC) pour cette détermination qui n'était pas prévue dans le projet initial a été réalisé au cours d'un mémoire de Toxicologie analytique (voir annexe).

v) **Celtoxiciteit (KUL2)**

1/ Vrijzetting van LDH

Lactaat dehydrogenase (LDH) dat aanwezig is in het cytosol, catalyseert de reactie lactaat + $\text{NAD}^+ \leftrightarrow \text{pyruvaat} + \text{NADH} + \text{H}^+$. Het is een vrij groot molecule met een moleculair gewicht van $\pm 140\,000$ dat als dusdanig enkel uit de cel vrijkomt wanneer de celmembraan ernstig beschadigd is.

2/ Vrijzetting van vooraf ingebouwd radioactief adenine

Wanneer radioactief adenine aan een cultuur van cellen toegevoegd wordt, zullen de cellen dit inbouwen in het DNA. Vrijzetting van deze radioactiviteit bij DNA- en membraanschade kan gebruikt worden als maat voor celtoxiciteit.

3/ MTT-analyse

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-difenyltetrazoliumbromide) is een tetrazoliumzout dat door de cel kan opgenomen worden en vervolgens in de (actieve) mitochondriën omgevormd wordt tot een formazan. Meting van het gevormde formazan geeft de activiteit van de mitochondriën weer, en dus de mate waarin de cellen al dan niet beschadigd zijn.

vi) **Oxidatieve stress (KUL2)**

1/ Activatie van NF- κ B

Nuclear factor kappa B (NF- κ B) is een transcriptiefactor die specifieke DNA-sequenties herkent, bindt, en zo transcriptie van bepaalde genen (bvb protooncogenen) kan induceren. De passieve vorm komt voor in het cytoplasma, terwijl de geactiveerde vorm zich in de kern bevindt. NF- κ B kan o.a. geactiveerd worden door oxidatieve stress (Schreck *et al*, 1992).

2/ Upregulatie van MnSOD en HSP

Mangaan superoxide dismutase (MnSOD) catalyseert de reactie $O_2^{\cdot -} + O_2^{\cdot -} + 2H^+ = O_2 + H_2O_2$. Wanneer cellen aangevallen worden door actieve zuurstofradicalen kan het zijn dat ze hierop reageren door bepaalde antioxidans-enzymen, zoals MnSOD, te induceren (Shull *et al*, 1991).

Heat shock proteins (HSP) binden ontvouwde of slecht gevouwde proteïnen en zorgen er aldus voor dat de proteïnen hun normale structuur kunnen herwinnen. Hun expressie kan verhoogd worden door verscheidene soorten celschade, doch één van de belangrijkste i.v.m. longziekten is oxidatieve stress (Barazzone *et al.*, 1996).

3/ Activiteit van de PPP

De pentose phosphate pathway (PPP) is de belangrijkste weg om reducerend vermogen (NADPH) te produceren voor de cel. Oxidatieve celschade kan deze PPP stimuleren (Rose *et al*, 1976).

vii) DNA-breuken (VUB)

DNA-breuken kunnen rechtstreeks ontstaan door verbreking van de suiker-fosfaat backbone van het DNA (bijvoorbeeld door ioniserende straling) of kunnen optreden als intermediaire stappen in cellulaire DNA-herstelmechanismen. Ze worden beschouwd als een marker van recente schade, die hersteld wordt. Er bestaan verschillende methoden voor de detectie van DNA-breuken.

viii) Chromosomale afwijkingen (VUB)

Structurele en numerieke chromosoomafwijkingen vormen een belangrijke groep van aberraties. De structurele afwijkingen hebben een bewezen predictieve waarde voor kankerrisico. Ze kunnen opgespoord worden via de micronucleus test maar slechts volledig geïdentificeerd worden met de chromosoomaberratie test.

b) Epoxide-vormende carcinogenen

Onderzoek verricht door de KUL :

Voor een meer gedetailleerde beschrijving van de methodologie en resultaten wordt verwezen naar de doctoraatsthesis van Pauwels, W, (1998) Adducts on haemoglobin and DNA by the epoxides of ethylene, propylene and styrene. PhD-thesis. KU-Leuven, pp 168 en Severi, M. (1995)

Ontwikkeling en validatie van een analytische methode ter bepaling van styreen-7,8-oxide-addukten aan hemoglobine. PhD-thesis. KU-Leuven, pp 164. En in de in het kader van het project 1994-1998 gepubliceerde artikels: Pauwels, W., Vodicka, P., Severi, M., Plna K., Veulemans H., and Hemminki, K., Adduct formation on DNA and haemoglobin in mice intraperitoneally administered with styrene. *Carcinogenesis*, 1996, 17(12), 2673-2680. Pauwels, W., Farmer, P.B., Osterman-Golkar, S., Severi, M., Cordero, R., Bailey, E., and Veulemans, H., Ring test for the determination of N-terminal valine adducts of styrene-7,8-oxide on hemoglobin by the modified Edman degradation technique, *Journal of Chromatography B*, 1997, 702,77-83. Yeowell-O'Connell, K., Pauwels, W., Severi, M., Jin, Z., Walker, M.R., Rappaport, S.M., and Veulemans, H. Comparison of styrene-7,8-oxide adducts formed via reaction with cysteine, N-terminal valine and carboxylic acid residues in human, mouse and rat Hb, *Chem.-Biol. Interact.*, 1997,106, 67-85.

i) **Arbeiders blootgesteld aan ethyleenoxide (EO) (KUL1)**

De bloedstaalname en de behandeling van de stalen van de 18 arbeiders voor de bepaling van N-terminaal valine-adducten gebeurde op identiek dezelfde manier als voor de 36 polypropyleenarbeiders (III.2.2).

De EO-concentratie in de werkplaats werd tweemaal gemeten. De eerste meting gebeurde ongeveer 1 maand voor de bloedstaalname. De tweede meting gebeurde 4 maanden na de bloedstaalname. Er werden telkens 8 metingen uitgevoerd. Intussen werden echter geen extra veiligheidsmaatregelen getroffen. De metingen gebeurden de tweede maal bij 3 werknemers, die reeds eerder bemonsterd waren, zodat in totaal voor 13 van de 18 arbeiders een persoonlijk luchtstaal beschikbaar was. Een van de dubbelmetingen werd uitgevoerd omwille van een outlier bij de eerste meting. De outlier was te wijten aan het openen van pakken met hoge EO-residu's (kwaliteitscontrole). De geobserveerde waarde was niet representatief voor het gewone werk van deze werknemer en werd weggelaten.

De luchtstalen werden genomen op 3M 3551 dosismonitors (3M-Belgium) die gecoat waren met waterstofbromide. EO wordt hierdoor omgezet naar 2-bromoethanol, wat kan gedesorbeerd worden met 10% methyleenchloride in methanol (30 min). Het desorbens (1.5 ml) bevat 0.01% 2-chloroethanol als interne standaard. De stalen werden dan geïnjecteerd op een HP 5890 series II gaschromatograaf uitgerust met een AT-wax kolom (25 m x 0.32 mm, filmdikte van de polyethyleenglycolfase : 0.3 μ m), vlamionisatiedetector en een automatische injector (2 μ l) met een inlet splitter (1:10). Het draaggas was helium. Na 2 minuten op de begintemperatuur van 60°C werd de oven geprogrammeerd tot 120°C aan 10°C per minuut. Ijckurves werden opgesteld door het injecteren van gekende hoeveelheden 2-bromoethanol relatief ten opzichte van de interne standaard. De desorptieëfficiëntie was 88%, zoals opgegeven door de verdeler.

ii) **Bloedstaalname bij arbeiders blootgesteld aan propyleenoxide (PO) (KUL1)**

De bloedstalen voor N-terminaal valine-adduct analyse werden verzameld op Vacutainer[®] tubes met natriumcitraat als anticoagulans. Het hemoglobine werd onmiddellijk uit het bloed geïsoleerd om artefacten te vermijden zoals beschreven in Törnqvist (1990). N-terminal valine-adducten werden gederivatiseerd zoals beschreven in III.3.1.

De adducten werden dan bepaald met GC-MS in de Selected Ion Monitoring (SIM) modus. Hierbij werden de ionen m/z 308 en 325 voor EO en voor PO respectievelijk, bepaald ten opzichte van de gedeutereerde interne standaard (ion m/z 326). Ijkcourves werden opgesteld uitgaande van oplossingen van de dipeptidestandaarden N-(2-hydroxyethyl)Val-Leu-anilide (EOstandaard) en N-DL-(2-hydroxypropyl)Val-Leu-anilide (POstandaard), gemengd met een gekende hoeveelheid interne standaard.

iii) **Microsomaal epoxide hydrolasegroep (KUL1)**

Mononucleaire leukocyten werden uit vers getrokken bloed van de 64 arbeiders geïsoleerd door een scheiding met de VACUTAINER CPTTM Tube methode. De mononucleaire leukocyten en de bloedplaatjes hebben een lagere densiteit dan rode bloedcellen en granulocyten. De scheiding gebeurt door middel van centrifugatie op een dichtheitsgradiënt. Na sonicatie van de mononucleaire laag wordt door centrifugatie op 9000 g de S9-fractie bekomen. De hoeveelheid proteïne wordt bepaald met de BIORAD - methode (Bradford 1976).

Onderzoek verricht door ULg :

Spectrometrie de masse classique et en tandem couplée à la chromatographie en phase gazeuse et Spectrometrie de masse classique (GC/MS(/MS)et en tandem à ionisation electrospray couplée à la chromatographie liquide à haute performance (HPLC/ESMS/MS)

L'emploi de la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse et à la spectrométrie de masse en tandem (GC/MS et GC/MS/MS, avec ionisation par impact électronique) a montré des résultats qualitativement excellents, avec une identification très précise de l'adduit (ion moléculaire intense, fragmentation importante au niveau de la liaison covalente entre la guanine et l'oxyde d'éthylène et perte du groupement hydroxyethyl) aussi bien en full-scan (spectrométrie de masse classique) qu'en perte de neutres et en Multiple Reaction Monitoring (MRM) (les 2 techniques principales de MS/MS). Le passage au dosage (aspect quantitatif) a cependant révélé les lacunes de la méthode, avec une limite de détection assez nettement insuffisante eut égard au taux de base modifié jugé limitant pour la prédiction d'un risque cancérigène (de l'ordre d'une base modifiée sur dix millions de bases intactes). Ce problème de quantification est, outre le manque de sensibilité inhérent à la méthode, sans doute du à la réaction de dérivation préalable de l'échantillon (triméthyl silylation - TMS) dont la cinétique est extrêmement difficile à contrôler pour des concentrations aussi faibles que celles envisagées (106-107M). La possibilité de travailler avec un nouveau spectromètre de masse à ionisation electrospray a permis d'enregistrer de gros progrès pour notre étude. Outre une sensibilité supérieure à celle de la GC/MS à impact électronique, nous pouvons ici travailler en phase liquide ce qui permet d'éviter la réaction de dérivation source d'ennuis en GC/MS. La séparation préalable des entités provenant de la dégradation de l'ADN modifié est assurée par une colonne HPLC (LC/ESMS, ions positifs).

III.3 ANALYSEPROCEDURE

a) Kobalt en zijn verbindingen

i) Big Blue (UCL)

Une première phase préliminaire a consisté à déterminer dans la souche de souris utilisée, les doses de Co et de WC-Co à mettre en œuvre. Nous avons choisi de rechercher la plus haute dose de WC-Co causant une inflammation pulmonaire franche mais sans mortalité, et d'en déduire les doses équivalentes de Co et WC. Un objectif en temps de 15 jours après traitement par instillation intratrachéale d'une dose unique de particules était envisagé sur base de la littérature qui recommandait cette période comme optimale en termes de sensibilité du test Big Blue (fixation des mutations). Pour des raisons économiques, nous avons utilisé pour ces expériences préliminaires des souris C57BL/6 qui constituent la souche originale dont sont issues les souris Big Blue.

Ces animaux ont été instillés avec des doses croissantes de WC-Co, qui nous ont permis de définir une dose maximale tolérable de 0.25 mg/animal.

Ensuite, des groupes de 15 animaux ont été instillés avec :

- WC-Co (94:6), 0.25 mg dans 40 µl de solution saline
- Co, 0.015 mg (6% de 0.25 mg) dans 40 µl de solution saline
- WC, 0.25 mg dans 40 µl de solution saline
- 40 µl de solution saline (animaux contrôles).

Après 1, 7 et 14 jours, un lavage broncho-alvéolaire a été réalisé après sacrifice des animaux. Les paramètres cellulaires et biochimiques du liquide de lavage (BAL) ont été déterminés par les méthodes décrites précédemment (Lasfargues et al. 1992).

Les doses mentionnées ci-dessus ayant été validées, nous avons alors réalisé l'expérience sur de souris Big Blue. Après anesthésie (pentobarbital 9 mg/ml; 80 µl en i.p.), les particules ont été instillées directement dans la trachée au moyen d'une canule en Teflon via les voies naturelles (installation oro-pharyngée).

Les souris ont été réparties aléatoirement en 4 groupes de 5 individus :

- WC-Co (94:6), 0.25 mg dans 40 µl de solution saline
- Co, 0.015 mg (6% de 0.25 mg) dans 40 µl de solution saline
- WC, 0.25 mg dans 40 µl de solution saline
- 40 µl de solution saline (animaux contrôles).

Après 15 jours, les animaux ont été sacrifiés par surdosage de pentobarbital. Les poumons ont été récupérés et directement congelés à -80°C.

Purification de l'ADN des poumons et réalisation du test.

La préparation des échantillons a été réalisée avec les réactifs et selon les recommandations de la firme Stratagene après adaptation dans notre laboratoire. Le protocole détaillé de ces opérations est repris en annexe 1.

ii) Formes activées de l'oxygène (UCL)

La procédure mise en œuvre a été adaptée de celle décrite par Zalma et al (1987). Le 5,5-diméthyl-1-pyrroline-1-oxyde (DMPO) a été utilisé pour fixer les radicaux carboxyl générés par l'abstraction d'un atome d'hydrogène suite à la réaction des radicaux hydroxyles ou d'autres espèces hautement électrophiles avec le formate. Quarante-cinq mg de particules (WC-Co ou WC) ou 3 mg de Co (6 % de 45 mg) sont pesés dans un récipient en verre contenant 2 ml de tampon phosphate (0.5 M) traité sur une résine Chelex et contenant du formate de Na (1 M) et du DMPO (0.05 M). Le mélange est alors incubé dans le noir durant 60 min sous agitation vigoureuse, 1 ml de la phase liquide est ensuite prélevé, filtré (0.65 µm) et transféré dans une cuvette spéciale en quartz. Le spectre est enregistré sur un spectromètre Varian E109 avec un niveau de puissance de microondes de 10 mW, une gamme de balayage de 100 G et une modulation d'amplitude de 1 G. L'intensité du signal DMPO/CO₂ est exprimée en unités arbitraires calculées en divisant la hauteur du signal par le facteur d'amplification.

Les détails de cette procédure peuvent être consultés dans la publication résumant les résultats de ces travaux (Lison et al. 1995).

iii) Elution alcaline (UCL)

La méthode décrite par Kohn et al. (1976) a été transposée et adaptée pour être mise en œuvre sur un Millipore Multiscreen Assay SystemTM (Millipore). Cet appareil permet l'utilisation de plaques de 96 puits dont le fond est pourvu d'une membrane microporeuse hydrophile en fluorure de polyvinylidène (taille de pores, 0.65 µm) couplée à une pompe à vide de type manifold. Avec ce système, les solutions déposées sur le filtre peuvent être aspirées rapidement et récupérées individuellement dans une plaque de 96 puits placée dessous.

L'ADN a été isolé de fibroblastes 3T3 cultivés dans un milieu DMEM additionné de 10 % de sérum et d'antibiotiques. Les expériences ont été menées avec l'ADN obtenu de cellules pré-confluentes marquées durant 18 h avec de la thymidine tritiée (1 µCi/ml) et récoltées après exposition à la trypsine.

Les lymphocytes ont été isolés sur gradient de Ficoll-Paque à partir d'un échantillon veineux héparinisé prélevé chez des volontaires sains du laboratoire. Les cellules sont ensuite lavées dans une solution de PBS et cultivées durant 72 heures dans un milieu HamF10 contenant 15 % de sérum et 8 µg de PHA/ml. Les cellules sont marquées radioactivement à l'aide de thymidine tritiée (1 µCi/ml) avant d'être exposées aux différentes poussières.

Cinq à six 10^4 lymphocytes sont utilisés par puits et exposés aux différentes poussières suspendues dans un milieu Ham F10.

Après un temps donné, du formate de Na est ajouté à une concentration finale de 1 M afin de mettre fin à l'action des radicaux produits; les cellules sont alors lysées dans un tampon à pH 9.0 (EDTA, NaCl, laurylsarcosine, formate et protéinase K). L'ADN restant sur le filtre est ensuite lavé avec une solution d'EDTA et élué dans un tampon pH12.1 (EDTA, hydroxyde de tetrapropylammonium). Les cassures de l'ADN sont alors quantifiées en mesurant la radioactivité récupérée des différents puits.

Pour mesurer l'effet des poudres sur l'ADN isolé, la même procédure a été appliquée excepté que l'étape de lyse précédait l'exposition aux poudres.

Les détails de la procédure peuvent être consultés dans la publication décrivant les résultats de ces expériences (Anard et al. 1997).

La comparaison statistique des résultats a été réalisée à l'aide du test de Tukey-Kramer pour comparaisons multiples.

iv) Autres biomarqueurs (UCL)

Le dosage du cobalt urinaire est réalisé par spectrométrie d'absorption atomique (Lison et al. 1994). La cotinine urinaire est mesurée par chromatographie gazeuse (Haufried et Lison, 1998). Le taux de vitamine E sérique est mesuré par le laboratoire de chimie médicale des Cliniques universitaires St Luc et la 8-hydroxydéoxyguanosine urinaire est déterminée par HPLC (Tageson et al 1995). Les concentrations mesurées dans l'urine sont corrigées pour la dilution des urines en divisant par la concentration de créatinine urinaire (p.ex. µg cobalt/g créatinine).

v) Isolatie van alveolaire type II cellen (AT-II) en alveolaire macrofagen (AM) van de rat (Richards et al, 1987) (KUL2)

De dieren worden verdoofd met pentobarbital; na het uitbloeden worden de longen geperfuseerd met NaCl en uit het dier gehaald. Om de AM te isoleren worden de longen gespoeld met NaCl en het bronchoalveolair lavagevocht (BAL) wordt gecentrifugeerd. De celpellet wordt geresuspendeerd in cultuur medium, de cellen worden lichtmicroscopisch geteld en uitgeplaat in de gepaste cultuurplaten. Na ongeveer 2 uur worden de cellen gespoeld en voorzien van vers medium.

Om de type II pneumocyten te isoleren, worden de longen getrypsiniseerd gedurende 30 minuten. De trypsine-activiteit wordt dan gestopt door toevoeging van foetaal kalf serum (FCS) en vervolgens worden de longen fijn geknipt, geschud, en gefilterd. De celsuspensie die dan bekomen wordt, wordt nog verder opgezuiverd door ze op een discontinue Percoll-gradient te leggen. Na centrifugatie zijn de cellen gescheiden volgens de dichtheid en kan de juiste laag (deze met type II pneumocyten) afgepipetteerd worden. Na centrifugatie en resuspensie van de celpellet in cultuurmedium worden de cellen uitgeplaat in een petrischaal gedurende een uur.

Binnen deze tijd zal een groot deel van de nog aanwezige contaminanten (vnl. AM) aan het plastic blijven plakken, terwijl de AT-II langere tijd nodig hebben om te kleven en dus vrij in het medium blijven zitten. Na deze opzuiveringsstap wordt een celmengsel bekomen van ongeveer 80% alveolaire type II cellen. De cellen worden vervolgens geteld en uitgeplaat in de gepaste cultuurplaten. De zuiverheid wordt nog verhoogd wanneer de AT-II na 48 uur in cultuur gespoeld worden.

vi) **Blootstelling (KUL2)**

Na 48 uur wordt het medium boven de cellen verversen en de oplossingen (suspensies) net voor gebruik bereid. De cellen worden blootgesteld aan een bepaalde concentratie van het te testen agens gedurende een bepaalde tijd, afhankelijk van het experiment.

Na de blootstelling worden de hoger vermelde parameters (in de cellen en/of het medium) bepaald.

vii) **Methodiek voor bepaling van de parameters (KUL2)**

1/ LDH (*Vassault, 1983*)

Na de blootstellingstijd wordt het medium verwijderd en de cellen gelyseerd met Triton-X. De LDH-activiteit in het medium (LDH_{sup}) en de cellen (LDH_{cell}) wordt vervolgens bepaald door spectrofotometrisch de reductie van pyruvaat te volgen. Cytotoxiciteit wordt uitgedrukt als percentage LDH-release door de cellen volgens de volgende formule:

$$\frac{\text{LDH}_{\text{sup}} \text{ treated} - \text{LDH}_{\text{sup}} \text{ control}}{(\text{LDH}_{\text{sup}} \text{ treated} - \text{LDH}_{\text{sup}} \text{ control}) + \text{LDH}_{\text{cells}} \text{ treated}} \times 100$$

2/ Adenine (*Van Der Wal et al., 1990*)

De cellen worden overnacht geïncubeerd met radioactief gemerkt adenine (³H). Juist vooraleer de cellen worden blootgesteld, wordt de radioactiviteit afgespoeld en vers medium in de well gebracht. Na de blootstellingstijd wordt de hoeveelheid radioactiviteit in het medium en in de cellen bepaald m.b.v. een β-counter. De cytotoxiciteit wordt uitgedrukt zoals bij de LDH-methode.

3/ MTT (*Mosmann, 1983*)

Na de blootstellingstijd wordt het medium verwijderd en worden de cellen gedurende 1 uur geïncubeerd met MTT. Gedurende deze tijd kunnen de cellen MTT opnemen die dan in de mitochondriën omgevormd kan worden tot een onoplosbaar formazan-derivaat. Na oplossen hiervan in DMSO kan de kleurintensiteit spectrofotometrisch bepaald worden. De absorptie bij de bepaalde golflengte (550nm) is een maat voor de mitochondriale activiteit, en dus voor de nog aanwezige (actieve) cellen.

4/ Electromobility Shift Assay (EMSA)

Activatie van NF-κB wordt bepaald m.b.v. een EMSA. Hierbij wordt actief NF-κB gebonden aan de radioactief gemerkte DNA-sequentie van enkele nucleotiden (oligo) die het herkent.

De cellen worden gestimuleerd gedurende een uur. Het medium wordt verwijderd en de cellen worden verzameld in PBS-buffer. Alle handelingen gebeuren zoveel mogelijk bij 4°C. Uit de celkernen worden de proteïnen geëxtraheerd volgens de methode van Osborn *et al.* (1989). Deze proteïnen worden vervolgens gebruikt in de bindingsreactie. Hiervoor wordt 5-10µg nucleair proteïne geïncubeerd met 5µl 5x incubatie-buffer (50mM Tris pH 7.5, 500mM NaCl, 5mM dtt, 5mM EDTA, 20% glycerol, 0.4mg/ml sonicated salmon sperm) in een totaal volume van 25µl. Er wordt 20 000 cpm ³²P gemerkt NF-κB oligo toegevoegd. De reactie wordt gestopt na een uur en de proteïnen worden volgens grootte gescheiden in een 6% niet-denaturerende polyacrylamide gel elektroforese (PAGE).

Op deze manier worden de geactiveerde NF- κ B -proteïnen die gebonden zijn aan het radioactief DNA (oligo) gescheiden van kernproteïnen die deze oligo niet herkennen, en van vrij oligo. De radioactieve band wordt gedetecteerd door autoradiografie, en is een maat voor de hoeveelheid geactiveerd NF- κ B.

5/ Northern Blot analyse

Stimulatie van RNA-productie of RNA-survival wordt bepaald a.d.h.v. Northern Blot analyse. Hierbij wordt het te bepalen RNA gebonden aan radioactief gemerkt cDNA.

De cellen worden gestimuleerd gedurende een bepaald aantal uren. Het medium wordt verwijderd en de cellen worden gelyseerd d.m.v. guanidiniumthiocyanaat (GTC). Het RNA wordt uit de cellen geëxtraheerd volgens de methode van Chomczynski en Sacchi (1987) en vervolgens gescheiden volgens grootte op een 1% denaturerende agarose-gel. Het RNA kan dan geblot worden op een membraan. Het complementaire cDNA van het RNA dat men wil bepalen, wordt radioactief (32 P) gemerkt en geïncubeerd met de membraan.

Zo kan het cDNA binden aan het te bepalen RNA. Na autoradiografie kan de densiteit van de bandjes bepaald worden met een laser-densitometer en geeft aldus weer hoeveel van het bepaald RNA in de cellen aanwezig was.

6/ Pentose phosphate pathway (PPP)

Stimulatie van de PPP wordt bepaald door te meten hoeveel radioactief CO₂ vrijkomt uit de cellen na incubatie met glucose dat differentieel gemerkt is op de C₁ of C₆ positie.

De cellen worden gekweekt in potjes die volledig gesloten kunnen worden. Ze worden geïncubeerd met 14 C-glucose die gemerkt is op C₁ of op C₆. De cellen kunnen de glucose inbouwen en verbranden. Na een bepaalde tijd worden de cellen gestimuleerd (met Co). Er wordt een filterpapier geplaatst in een reservoir dat in het potje aanwezig is. Dit filterpapier, dat gedrenkt is in KOH, zal de CO₂ vangen, en de hoeveelheid radioactiviteit die evenredig is met de activatie van de citroenzuur-cyclus en de PPP kan gemeten worden in een scintillatie-counter. C₁ komt vrij via de citroenzuur-cyclus en de PPP, C₆ komt enkel vrij via de citroenzuur-cyclus. Elke 30 minuten wordt de radioactiviteit bepaald; er wordt telkens een nieuw filterpapier in het reservoir gebracht.

Deze techniek is nieuw voor het bepalen van de activiteit van de PPP in celculturen; hij is wel reeds gebruikt met weefselschijfjes (Cardenas & Nemery, 1991).

viii) Comet assay (VUB)

De comet assay of single cell gel electrophoresis assay (SCGE) is een vrij recent ontwikkelde techniek voor de detectie van DNA-schade (enkelstrengige breuken en alkali-labele sites in de alkaliene versie) op celniveau. Deze techniek, in de alkaline versie geïntroduceerd door Singh et al. (1988), heeft zich bewezen als een belangrijke methode voor genotoxiciteitstesting, ecogenotoxicologie en biomonitoring (voor review zie McKelvey-Martin et al., 1993; Fairbairn et al., 1995; Tice, 1995; Anderson et al., 1998). Bovendien verbetert de specificiteit en gevoeligheid van de methode opmerkelijk door combinatie van de comet assay met lesie-specifieke bacteriële enzymen (Collins et al., 1993; Collins et al., 1997).

Het principe van de techniek berust op de migratie in agarose van DNA-fragmenten onder invloed van een elektrisch veld. Geïsoleerde cellen in suspensie worden vermengd met agarose en op een microscoopglasje gebracht. De cellen worden vervolgens gelyseerd in aanwezigheid van hoge zoutconcentraties en detergenten. De membranen worden opgelost en het cytoplasma verwijderd. Op die manier blijft enkel het nucleaire DNA over. De slides worden overgeplaatst naar een elektroforese-eenheid gevuld met denaturatiebuffer (pH > 13). Deze zorgt voor de ontbinding van het DNA en het omzetten van alkali-labele sites in enkelstrengige breuken.

Fragmenten, ontstaan in deze kernen door rechtstreekse breukvorming of na herstelmechanismen, kunnen uit de kern migreren in de richting van de anode. De migratie door het agarosenetwerk gebeurt afhankelijk van de grootte van de fragmenten. Met behulp van een fluorescentiemicroscop en een beeldanalysesysteem met specifieke software komen de typische komeetachtige structuren te voorschijn en kunnen verschillende schadeparameters opgemeten worden. De meest gebruikte zijn de staartlengte (TL, gemeten van het centrum van de kern tot het verst gemigreerde fragment), het staart DNA (TD, het percentage van DNA in de staart) en het staartmoment ($TM = TL \times TD$). De lengte van migratie en de hoeveelheid DNA in de staart (gemeten door fluorescentie) zijn een maat voor de geïnduceerde schade.

De comet assay werd uitgevoerd volgens het alkaline protocol ontwikkeld door Singh et al. (1988), maar met de modificaties, zoals beschreven in De Boeck et al. (1998).

ix) **Alkaline unwinding (VUB)**

Via een samenwerking met Prof. Dr. A. Hartwig (Universiteit van Karlsruhe) werd een andere techniek voor de detectie van DNA-breken aangeleerd, de alkaline unwinding. De techniek is gebaseerd op de vergemakkelijkt ontbinding van DNA vanaf breuksites in alkalische omstandigheden. De techniek werd ontwikkeld door Ahnström and Erixon (1981) en reeds vele jaren door Prof. Hartwig aangewend voor studies van metaalgenotoxiciteit en repairinhibitie (Hartwig et al., 1993; Hartwig et al., 1996; Hartwig et al., 1997). Vertrekkende van een celsuspensie worden de celmembranen en proteïnen verwijderd en het DNA gedenateerd door toevoeging van een alkalische oplossing. Het genomisch DNA wordt opgebroken door ultrageluid om renaturatie te voorkomen en gestabiliseerd door SDS. Het opgebroken materiaal, dat nu zowel dubbel- als enkelstrengig DNA bevat, wordt op hydroxyapatiet kolommen gebracht. Door additie van stijgende fosfaatconcentraties kunnen beide DNA-fracties chromatografisch gescheiden worden. Het eluaat wordt geïncubeerd met Hoechst 33258 en de relatieve fluorescentie van het staal wordt gemeten met een spectrofluorometer (excitatie 360 nm, emissie 450 nm). Het percentage dubbelstrengig DNA en het aantal DNA-breken kan berekend worden, doordat een calibratie van de techniek met X-stralen werd uitgevoerd.

x) **In vitro micronucleus test (VUB)**

De *in vitro* micronucleus test is een klassieke cytogenetische techniek die toelaat op een relatief eenvoudige manier om chromosomale afwijkingen op te sporen (Fenech & Moreley, 1985; Kirsch-Volders, 1997; Albertini & Kirsch-Volders, 1997). Een micronucleus ontstaat tijdens de mitose, wanneer een geheel of gedeeltelijk chromosoom niet verpakt wordt in de dochterkern, maar achterblijft en als afzonderlijke kleinere kern blijft bestaan.

Geheel bloed wordt in cultuur gebracht in F10 medium voorzien van foetaal kalfsserum (FCS) en een delingsstimulator (fytohemagglutinin, PHA). Na 24 uur stimulatie bij 37°C wordt de te onderzoeken stof toegevoegd (kobaltpartikels), gedurende een bepaalde behandelingsduur. De testsubstantie wordt vervolgens verwijderd en de cellen worden verder gecultiveerd. Bij 44 uur wordt een stof toegevoegd, cytochalasine B, een inhibitor van actine. Hierdoor kan de kerndeling normaal gebeuren maar wordt de cytokinese verhinderd. Het resultaat, na spreiding van de cellen, fixatie en kleuring, is een tweekernige cel. Hierdoor kan onderscheid gemaakt worden tussen cellen die niet (éénkernig), 1 maal (tweekernig) of meerdere malen (meerdere kernen) gedeeld hebben.

Voor de biomonitoringstudie wordt dezelfde procedure toegepast, maar uiteraard zonder toevoeging van een extern mutagen.

xi) In vitro chromosoom-aberratie-test (VUB)

De chromosoom aberratie test laat toe structurele en numerieke chromosoomafwijkingen te detecteren. Hiertoe worden bloedcellen in cultuur gebracht op dezelfde wijze als voor de micronucleus test. Hier wordt echter na 46.5 uur colcemide toegevoegd, een inhibitor van de tubulines (spoelfiguur). Hierdoor worden de cellen geblokkeerd in een pre-metafasestadium. Na fixatie, spreiding en kleuring worden deze metafasen microscopisch bestudeerd en kunnen de chromosomale afwijkingen geobserveerd worden. Dit vraagt een zekere ervaring en is zeer tijdrovend.

b) **Epoxide-vormende carcinogenen**

i) In vitro experimenten (KUL1)

1. Eliminatie van styreen-7,8-oxide uit bloed (k_e) :

Bloed van 2 donoren, van ratten of van NMRI-muizen (Charles River, Germany) werd maximum 24 h gestockeerd op 4°C. De verschillende epoxides in isotonisch saline werden in voldoende hoeveelheden toegevoegd aan bloed om te komen tot startconcentraties van 328 μM voor EO, 30 μM voor PO en 40 μM en 30 mM voor SO. Deze laatste hoge concentratie was noodzakelijk aangezien de bepaling van DNA-adducten van SO adducten bij dergelijke hoge concentraties verliep. Het incubatiemedium werd goed geschud en in een oliebad op 37°C gebracht. Op geregelde tijdstippen (0,10,20,30,60,90 en 120 minuten) werd 1 ml staal genomen. Na de staalname werd het bloed onmiddellijk geëxtraheerd met ethylacetaat voor EO en PO. Voor SO werd het bloed geëxtraheerd met een oplossing van 10^{-5} M gedeutereerd SO-dg, als interne standaard, in hexaan. De epoxideconcentratie werd dan bepaald met GC-FID voor EO en PO. SO werd bepaald met GC-MS. Meer specifieke details omtrent deze analyses worden gegeven in bijlagen I en II.

2. *In vitro* adductvorming van de epoxides (k_{Epoxy})

Bloed van een menselijke donor, ratten en NMRI-muizen (Charles River, Duitsland) op citraat werd geïncubeerd met verschillende concentraties epoxide (0-1000 μM voor hemoglobine-adducten; 0-10 mM voor N-7-guanine adducten van EO en PO; 0-240 mM voor SO). Het bloed met de verschillende concentraties epoxide werd gedurende 2 h op 37°C gehouden en intussen af en toe geschud. Na de incubatie werd ofwel hemoglobine ofwel DNA geïsoleerd. De N-terminaal valine-adducten aan hemoglobine werden bepaald zoals beschreven in III.3.2. 150 - 200 mg hemoglobine werd opgestuurd naar Prof Dr Stephen Rappaport, University of North Carolina voor de bepaling van cysteine adducten met de Raney-nikkel-techniek en van carboxyladducten met een techniek gebaseerd op een hydrolyse van het adduct. N-7-guanine-adducten werden bepaald zoals beschreven in III.b.iii.

ii) N-terminaal valine-adducten (Hemoglobine-adducten) (KUL1)

De bepaling van hemoglobine-adducten van alkyliserende agentia als EO, PO en SO gebeurt door een gaschromatografisch - massaspectrometrische bepaling van het N-terminaal gealkyleerd valine afgesplitst door een gemodificeerde Edmandegradatie. De klassieke Edmandegradatie berust op de eigenschap van fenylisothiocyanaten om N-eindstandige aminozuren van een peptideketen af te splitsen. Mits enkele modificaties kan deze methode gebruikt worden voor de determinatie van N-terminaal valine-adducten in hemoglobine (Törnqvist, 1986):

- Het conventioneel Edmanreagens, fenylisothiocyanaat, wordt vervangen door pentafluorofenylisothiocyanaat.
- Via een controle van de pH kunnen de N-terminaal gealkyleerde valines dankzij het inductief gevend effect van de alkylgroepen selectief afgesplitst worden.

Daarna gebeurt een omleggingsreactie tot het 1-alkyl-3-pentafluorofenyl-2-thioxo-4-imidazolidinonen, producten die geschikt zijn voor een GC-MS analyse. De detectielimiet van de methode werd bepaald op 10 pmol/g hemoglobine. Deze methode werd ontwikkeld en uitvoerig beschreven in het kader van het DWTC-impulsprogramma "Gezondheidsrisico's" 1990-1994. Ten opzichte van de daarin beschreven methode werden slechts enkele mineure wijzigingen aangebracht. Voor de bepaling van PO-adducten werden grotere hoeveelheden hemoglobine (200-250 mg) gebruikt om de detectielimiet te verbeteren. In tegenstelling tot vroeger werden ijkcurves opgesteld door middel van gealkyleerde dipeptides (Bachem Biochemica, Heidelberg, Germany). Voor de bepaling van het EO en PO-adduct werd respectievelijk N-(2-hydroxyethyl)Val-Leu-anilide en N-DL-(2-hydroxypropyl)Val-Leu-anilide gebruikt als standaard. Deze techniek is uitgebreid beschreven in bijlage II.

iii) N-7-guanine-adducten (DNA-adducten) (KUL1)

DNA werd uit proefdierweefsel (lever, long, milt) geïsoleerd met het DNAzolTM reagens (GibcoBRL, Life Technologies, Merelbeke, Belgium) volgens het opgegeven protocol. Een deel van de uiteindelijk bekomen oplossing werd gebruikt voor de spectrofotometrische bepaling van de hoeveelheid geïsoleerd DNA. Bij deze meting komt één A₂₆₀ eenheid overeen met 50 µg dubbelstrengig DNA per ml. De A₂₆₀/A₂₈₀ werd routinematig bepaald om te zien of er geen RNA en proteïnes meer aanwezig waren.

De DNA stalen werden onderworpen aan een neutrale thermische hydrolyse (100°C - 30 min) om de N-7-guanine-adducten vrij te zetten. Na het drogen van de stalen door lyofilisatie, werd het residu terug opgelost in 100 ml water. 25 µl van deze oplossing werd zonder verdere derivatisatie geïnjecteerd in een HP 1090 Series II Liquid Chromatograph gekoppeld met een HP 1040 Diode Array Detector. De producten werden gescheiden op een 4 x 25 mm reverse phase C₁₈-column, gevuld met Nucleosil-100 met 5 µm partikels (Macherey-Nagel, Germany). Het gebruikte eluens voor HPLC was een 0.1 M ammoniumacetaat buffer (pH=5.2). De beste scheiding werd bekomen met een methanol gradient van 6 % tot 10 % in 12 minuten voor het EO-adduct, 6 % tot 10 % in 14 minuten voor het PO-adduct en van 6 % tot 30 % in 18 minuten voor beide SO-adducten. Daar waar de reactie van EO (symmetrisch molecule) en PO (enkel het β-adduct) met N-7-guanine slechts 1 adduct oplevert, resulteert de reactie met SO in de vorming van 2 regioisomeren i.e. N-7-(2-hydroxy-1-phenyl)ethylguanine en N-7-(2-hydroxy-2-phenyl)ethylguanine. De hoeveelheid adduct werd dan bepaald als de som van beide isomeren. Het debiet was 1 ml/min. Voor kwantitatieve determinaties werd het UV signaal gemeten op 2 golflengtes : λ = 254 nm en 282 nm, met een bandbreedte van 4 nm. De determinatie van de hoeveelheid adduct werd uitgevoerd door middel van vooraf opgestelde calibratiecurves.

iv) Bepaling van de microsomaal epoxide hydrolase-activiteit (KUL1)

1. Opzet :

In eerste instantie werd gedacht aan de bepaling van de vorming van styreenglycol, na toevoeging van een bepaalde hoeveelheid SO aan een medium met epoxide hydrolase. De uiteindelijke doelstelling, namelijk het toepassen van de bepalingen van enzyme-activiteit op mononucleaire leukocyten in menselijke bloedstalen, vereist een lage detectielimiet. De te verwachten activiteit in menselijke mononucleaire leukocyten ligt in de buurt van 1 pmol min⁻¹ mg⁻¹ proteïne.

Deze lage detectielimiet was onverenigbaar met het feit dat alle solventen steeds in kleine mate gecontamineerd zijn met styreenglycol. Dit resulteerde in hoge achtergrondconcentraties van styreenglycol, die bovendien vrij grote schommelingen vertoonden.

Omwille hiervan werd besloten SO als substraat voor het epoxide hydrolase te vervangen door zijn gedeutereerd analoog SO-dg (hierbij zijn de 8 waterstoffen vervangen door deuteriums). Niet-gedeutereerd styreenglycol werd in een vrij hoge concentratie toegevoegd aan het incubatiemedium als interne standaard.

Het gebruik van een interne standaard met vrijwel gelijke chemische en fysische eigenschappen, laat toe om variaties in de incubatie, opwerking en de analyse op te vangen.

2. Beschrijving van de methode

De enzyme-activiteit in de S9-fractie werd bepaald door het meten van de hoeveelheid gevormd styreenglycol-dg na 30 minuten incubatie op 37°C. De reactie werd gestart door toevoeging van SO-dg met een bepaalde hoeveelheid styreenglycol als interne standaard. De incubatiereactie werd beëindigd door toevoeging van cyclohexeenoxide, een gekend inhibitor van het microsomaal epoxide hydrolase. Aan het incubatiemedium werd ethylacetaat toegevoegd, waarbij het gevormd styreenglycol-dg en het toegevoegde styreenglycol uit het incubatiemedium geëxtraheerd worden. Gelijktijdig werd steeds een blanco-bepaling uitgevoerd. In waterig midden hydrolyseert een gedeelte van het SO-dg immers spontaan naar styreenglycol-dg. De blancobepaling werd uitgevoerd in dezelfde buffer als deze waarin de gesoniceerde mononucleaire leukocyten gebracht worden. Na derivatisatie met een silyleringsagens van beide hydroxylgroepen zijn styreenglycol en zijn gedeutereerd analoog geschikt voor analyse met GC-MS. Omwille van moeilijkheden (contaminatie) bij on-column injectie moest worden overgeschakeld naar het gebruik van een *solid injector*. De kwantitatieve bepaling gebeurde in de SIM-modus (Selected Ion Monitoring).

v) GST-groep : adductbepalingen en GST-genotypes (KUL1)

1. Isolatie van hemoglobine

Door het laboratorium van Medische Scheikunde van Dr. P. Kremers (Ulg) werd hemoglobine op een iets andere manier geïsoleerd dan in ons laboratorium. Het belangrijkste verschil is het feit dat de rode bloedcellen na isolatie en wassen 1 nacht gestockeerd werden op -20°C. Daarna pas worden de cellen pas gelyseerd met gedestilleerd water. Na verwijdering van de celmembranen (15000 rpm gedurende 30 min) wordt het hemoglobine neergeslagen met aangezuurd aceton. Klassiek wordt doorn ons hemoglobine uit een aangezuurde 2-propanoloplossing neergeslagen met ethylacetaat.

2. Bepaling van N-terminaal valine-adducten

Ons laboratorium werd aangezocht voor de bepaling, met de door ons op punt gestelde gemodificeerde Edmandegradatietechniek, van de N-terminaal valine adducten van ethyleenoxide (EO), propyleenoxide (PO) en styreen 7,8-oxide (SO). De methodes voor de bepaling van deze adducten werden ontwikkeld en uitgebreid beschreven in de vorige DWTC-projecten. Bij 333 van deze werknemers konden de gehalten aan EO-, PO- en SO-adduct bepaald worden.

3. Bepaling van GSTM1 en GSTT1-genotypes

Voor de bepaling van deze genotypes werden de methodes gevolgd zoals beschreven door Pemble *et al.* (1993) en Brockmöller *et al.* (1993).

Deze bepalingen zijn gebaseerd op de vermenigvuldiging (Polymerase Chain Reaction; PCR) van een DNA-fragment gelegen binnen de respectievelijke genen. Tegelijk met de primers voor deze fragmenten worden ook primers voor het cytochroom P450 1A1 toegevoegd. Het aldus gevormde DNA-fragment fungeert dan als interne standaard. De fragmenten worden gescheiden door gelelectroforese en daarna gekleurd met ethidiumbromide. Het al dan niet aanwezig zijn onder UV van fragmenten van 273 en 650 baseparen (GSTM1) en 480 baseparen (GSTT1) maakt de genotypering voor de respectievelijke genen mogelijk.

vi) Mesures des adduits à l'ADN (ULg)

L'identification des adduits à l'ADN et leur utilisation en temps que biomarqueurs d'exposition est un problème analytique délicat eut égard à la quantité extrêmement faible de substance à détecter. Dans nos expériences, le taux d'adduit formé se situe très souvent proche du seuil de sensibilité de la méthode (limite de détection) et parfois même inférieur à celui-ci.

Cette situation implique une grande précision au niveau de l'analyse des spectres de masse (afin d'éviter les faux positifs ou négatifs) et au niveau de l'étude de reproductibilité des résultats.

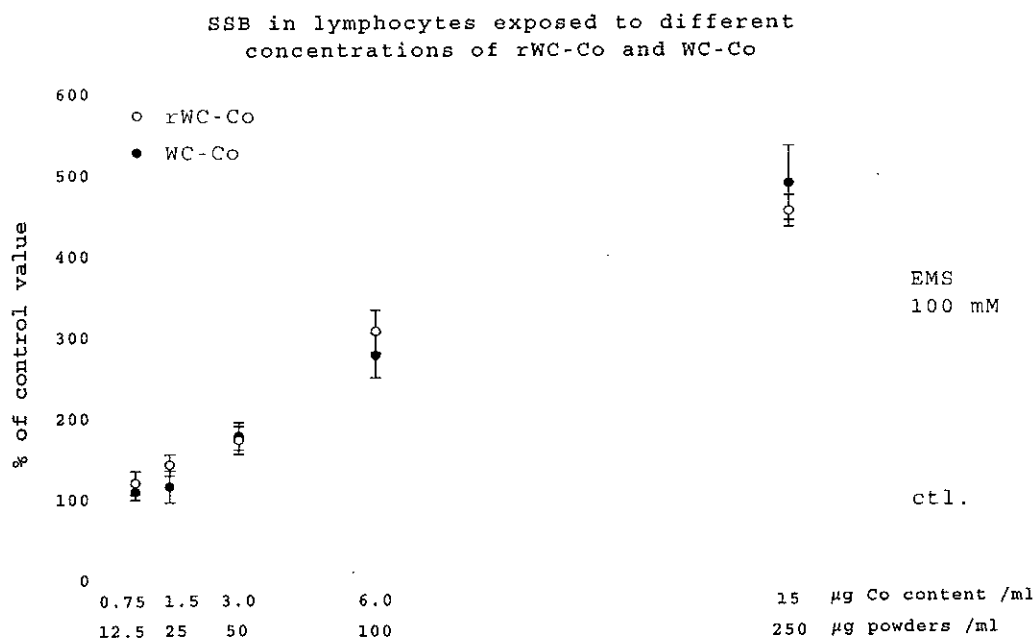
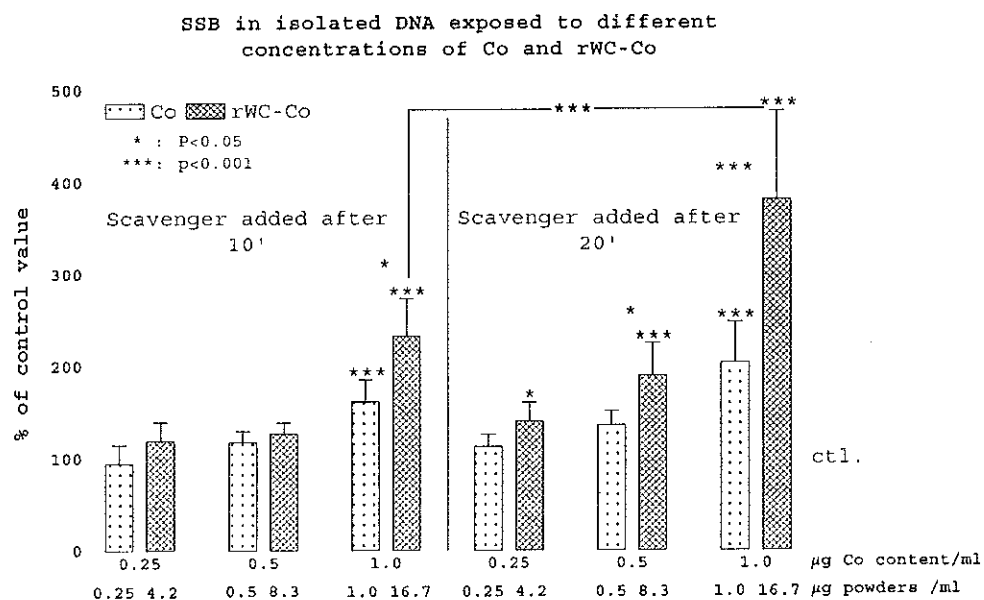
Préalablement à l'application de la méthodologie de détection des adduits dans une étude d'épidémiologie moléculaire sur des sujets exposés à des époxydes, nous avons effectués une série d'étapes successives de mise au point et de validation de la méthode.

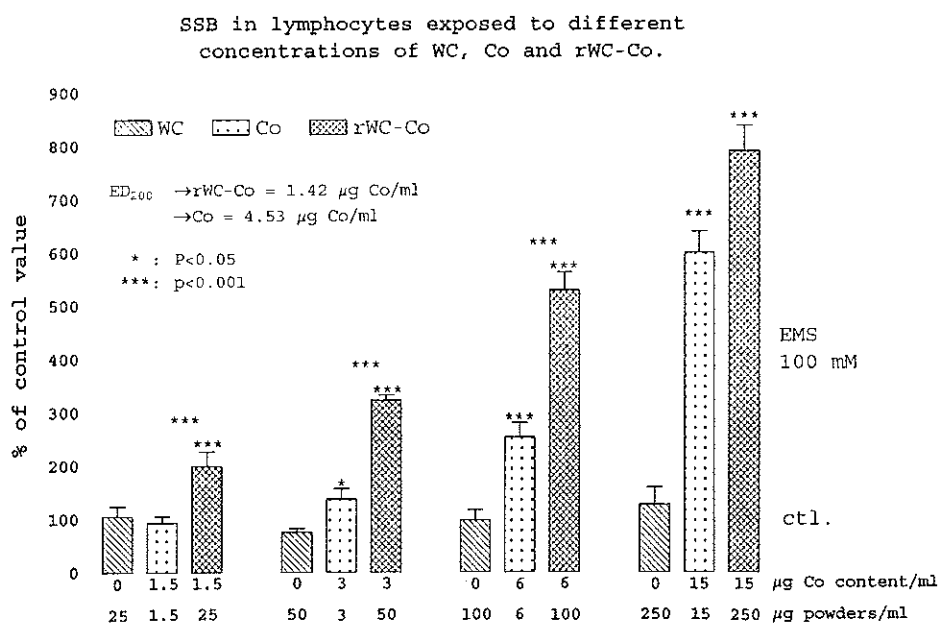
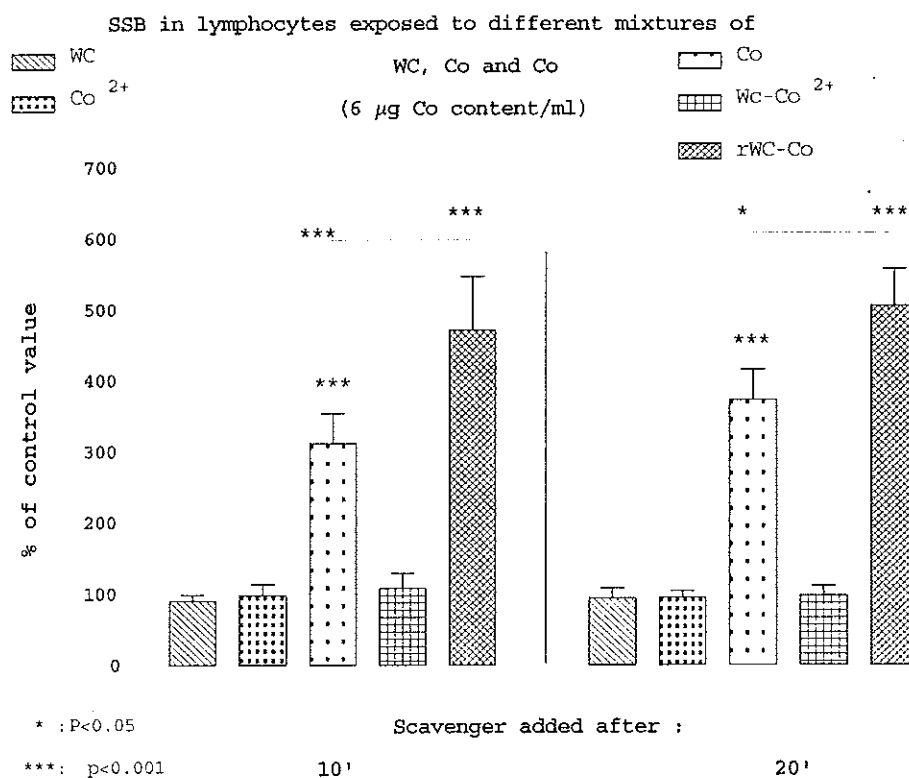
- Identification et dosage sur la molécule d'adduit standard (mise au point des différentes conditions en HPLC et en spectrométrie de masse).
- Dosage des adduits après exposition *in vitro* d'ADN de thymus de veau à différentes doses d'époxydes.
- Dosage des adduits après exposition *in vitro* de sang à différentes doses d'époxydes avec isolation préalable de l'ADN des lymphocytes.
- Dosage des adduits dans des échantillons de sang de sujets exposés professionnellement exposés à l'oxyde d'éthylène.

IV RESULTATEN

a) Kobalt en zijn verbindingen

i) Alkaline elutie (UCL)





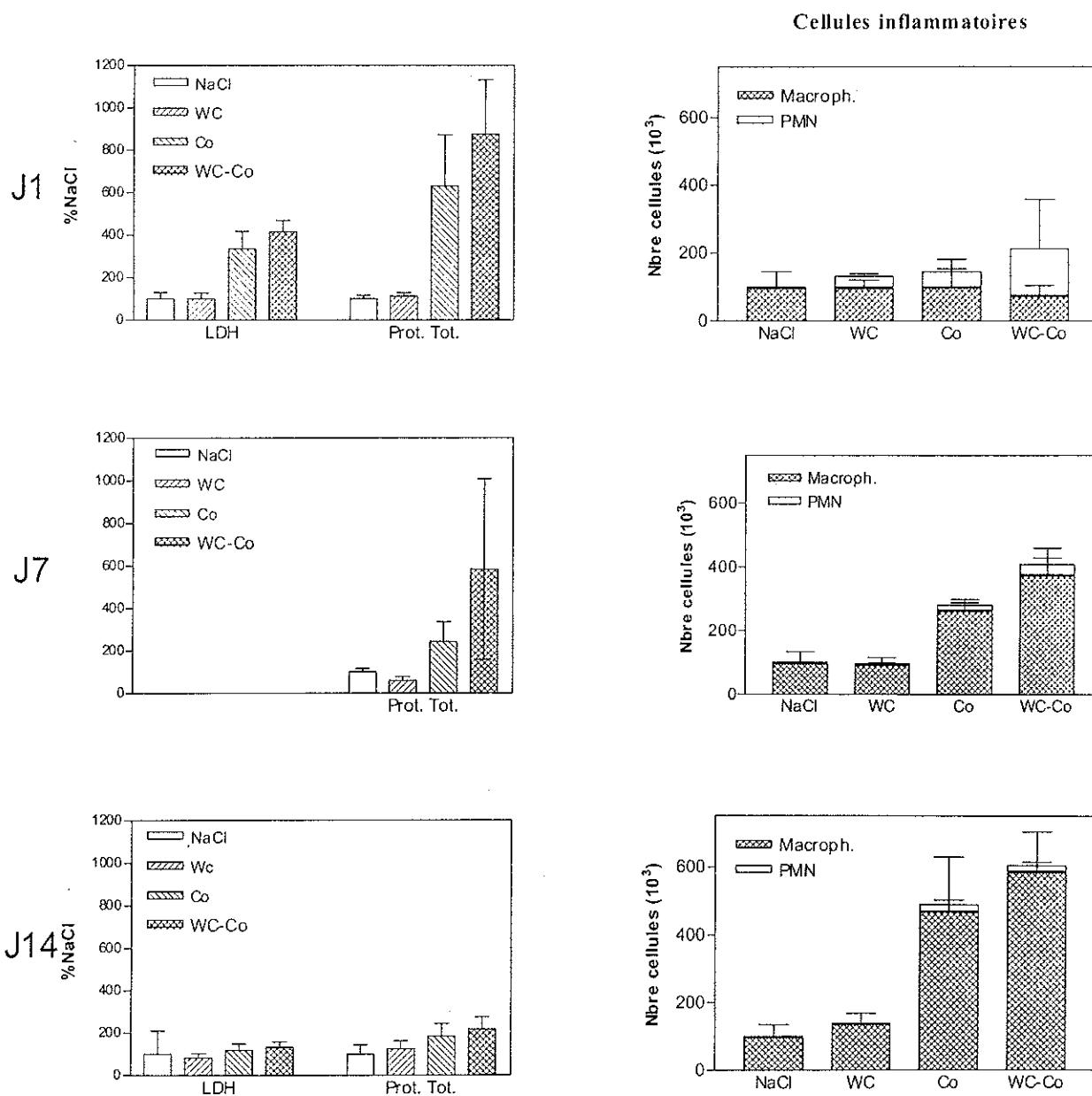
ii) Mutations géniques chez la souris Big Blue (UCL)

1. Inflammation pulmonaire.

Les paramètres mesurés ont été sélectionnés sur base de leur capacité à indiquer la présence d'une inflammation pulmonaire. Ainsi les lésions cellulaires sont appréciées par le dosage de la lactate déshydrogénase (LDH), la perméabilité vasculo-alvéolaire et la cytotoxicité par le taux de protéines totales, la numération des cellules inflammatoires permet d'évaluer l'inflammation. Les valeurs moyennes des paramètres biochimiques dosés dans le BAL des différents groupes sont résumées dans la Figure 5.

Etude des paramètres inflammatoires

- souris C57BL/6 -



D'une manière générale, quel que soit le temps écoulé depuis le traitement ou le paramètre étudié, les souris traitées au WC ne présentent pas de différence marquante avec les animaux contrôles. Ceci nous indique qu'à la dose utilisée, le WC ne présente pas de toxicité.

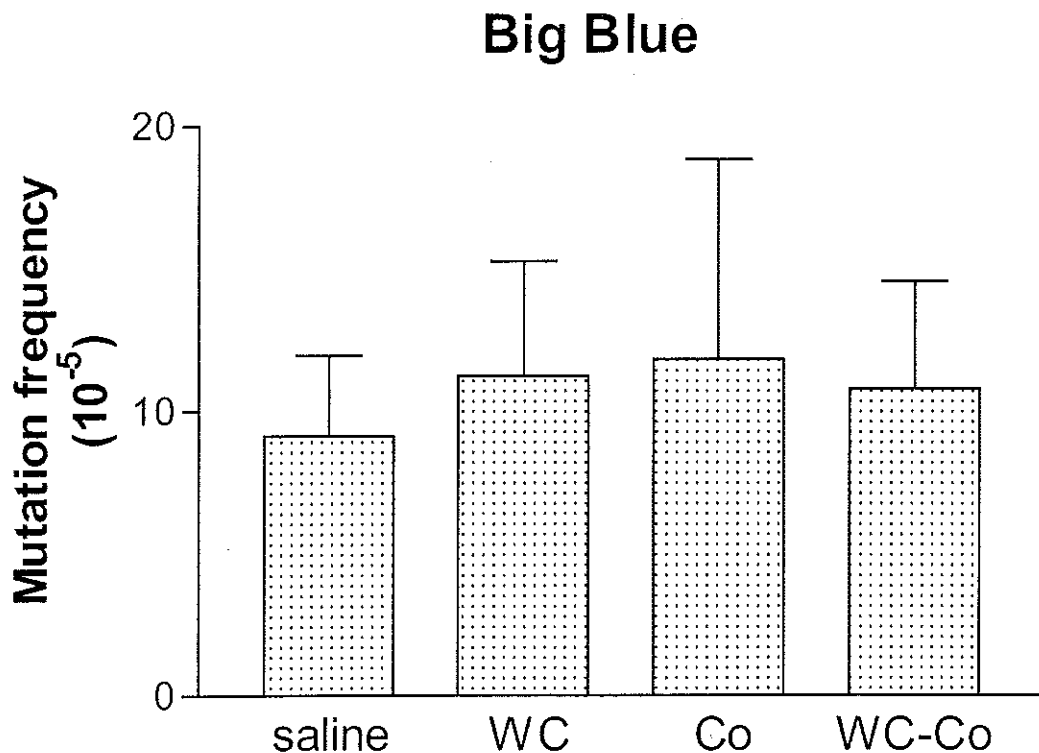
Conformément à ce qui était attendu, nous observons un recrutement de polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) et de macrophages au sein de l'espace alvéolaire des animaux traités avec Co et WC-Co. Pour ces deux groupes nous observons après 24 h, une accumulation massive de PMN qui diminue ensuite au profit des cellules macrophagiques.

Quel que soit le jour ou le paramètre analysé, l'administration de Co ou de WC-Co engendre une inflammation alvéolaire. La différence entre les deux groupes est cependant peu marquée. D'un point de vue clinique, il existe toutefois une différence très marquée entre les 2 groupes, les souris traitées au WC-Co restant léthargiques durant plusieurs jours après l'administration des particules. Les souris traitées au Co reprenaient vigueur après quelques heures.

2. Taux de mutations du gène *lacI*.

Un total de 5 animaux a été examiné dans chaque groupe expérimental 15 jours après administration des particules (Co, WC-Co, WC et contrôles). Ces manipulations ont représenté un travail extrêmement lourd : pour le nombre limité d'animaux examinés, les analyses représentent plus de 1200 boîtes de Pétri, plus de 350 litres de gélose pour les cultures bactériennes, environ 7.000.000 de phages produits et exactement 6.115.118 phages analysés.

Les résultats sont résumés au tableau IV.a.2.1 et à la Figure 6.



Srs Traitm.			Packaging						Total	Freq. mut.	Global :
1	NaCl	Nbr lyse Tot. Nbr mutant	91600 22	231000 11					322600 33	10,23 E-5	9,15 E-5 ±2,83 E-5
3	NaCl	Nbr lyse Tot. Nbr mutant	82656 0	71760 8	81600 4	103800 5	100300 7		440116 24	5,45 E-5	
16	NaCl	Nbr lyse Tot. Nbr mutant	25850 1	80557 11	51120 2	151760 8			309287 22	7,11 E-5	
17	NaCl	Nbr lyse Tot. Nbr mutant	34440 1	105787 16	111315 18	30232 3	60480 5		342254 43	12,56 E-5	
18	NaCl	Nbr lyse Tot. Nbr mutant	125000 10	9840 2	76640 8	96900 12			308380 32	10,38 E-5	
4	WC	Nbr lyse Tot. Nbr mutant	101800 1	66200 22	22240 9	52780 5	68150 13		311170 50	16,07 E-5	11,25 E-5 ±4,03 E-5
5	WC	Nbr lyse Tot. Nbr mutant	42066 6	84000 12	338000 8				464066 26	5,60 E-5	
7	WC	Nbr lyse Tot. Nbr mutant	47724 1	115615 9	62244 8	47460 3	47000 8		320043 29	9,06 E-5	
19	WC	Nbr lyse Tot. Nbr mutant	206000 25	44520 5	5720 0	55370 11			311610 41	13,16 E-5	
20	WC	Nbr lyse Tot. Nbr mutant	86940 10	169680 21	42200 6				298820 37	12,38 E-5	
8	Co	Nbr lyse Tot. Nbr mutant	9660 0	70000 9	92300 15	129800 16			301760 40	13,26 E-5	11,84 E-5 ±7,00 E-5
10	Co	Nbr lyse Tot. Nbr mutant	127100 1	99176 7	231380 6				457656 14	3,06 E-5	
11	Co	Nbr lyse Tot. Nbr mutant	124800 38	244344 36					369144 74	20,05 E-5	
21	Co	Nbr lyse Tot. Nbr mutant	79375 6	184240 20	73200 11				336815 37	10,99 E-5	
22	Co	Nbr lyse Tot. Nbr mutant	7050 1	16480 0	33675 2	65786 5			122991 8	6,50 E-5	
14	WC-Co	Nbr lyse Tot. Nbr mutant	49560 2	84800 22	72160 12	209000 11	102400 12		517920 59	11,39 E-5	10,81 E-5 ±3,76 E-5
15	WC-Co	Nbr lyse Tot. Nbr mutant	103976 4	206755 12					310731 16	5,15 E-5	
23	WC-Co	Nbr lyse Tot. Nbr mutant	293000 46						293000 46	15,70 E-5	
24	WC-Co	Nbr lyse Tot. Nbr mutant	140000 13	301200 34					441200 47	10,65 E-5	
25	WC-Co	Nbr lyse Tot. Nbr mutant	150120 11	146160 22					296280 33	11,14 E-5	

tableau IV.a.2.1.

iii) Biomonitoring (UCL+VUB)

La problématique des effets génotoxiques et de la cancérogénicité est évidemment un sujet délicat en milieu du travail. L'enthousiasme initial des employeurs qui avaient marqué leur accord pour la réalisation de cette étude s'est considérablement réduit lorsqu'il s'est agit de commencer effectivement la collecte des échantillons. Cette attitude a en particulier été influencée par la publication récente de deux études confirmant le potentiel cancérogène des dérivés du cobalt. La première étude a été menée en France au sein de plusieurs entreprises fabriquant des métaux durs et a démontré un excès de décès par cancer du poumon (Moulin et al. 1998); la seconde étude, qui est de nature expérimentale, provient des Etats-Unis (National Toxicology Program 1996) et démontre de manière relativement fracassante la cancérogénicité du sulfate de cobalt chez le rat et la souris. Suite à la publication de ces travaux, les employeurs ont, dans un premier temps, estimé, puisque le potentiel semblait démontré, qu'il n'était donc plus nécessaire de poursuivre d'autres investigations qui risqueraient d'avoir un écho difficile à gérer au sein de leurs entreprises. Nous avons alors développé de multiples contacts pour expliquer que ces travaux récents démontrent un danger (hazard anglo-saxon) dont l'expression (risque) mesurée en termes de mortalité dans l'étude épidémiologique française est liée aux conditions d'exposition passées, et qu'il convient d'évaluer dans les situations actuelles quel est le risque auquel les travailleurs sont éventuellement soumis. Suite à de multiples démarches au niveau international, nous avons pu obtenir l'appui de la plus importante association industrielle de producteurs de cobalt (Cobalt Development Institute à Londres). Les responsables scientifiques de cet institut sont sensibilisés à notre étude de génotoxicité et nous ont apporté un soutien pour rechercher la participation de leurs membres. Outre une grosse entreprise belge, deux raffineries de cobalt européennes ont été contactées pour participer à l'étude; celles-ci ont marqué leur accord en octobre 1997. Les collectes d'échantillon n'ont finalement pu démarrer qu'en 1998. Le recrutement des sujets participant à cette étude n'est donc pas encore terminé; la situation actuelle est reprise au tableau IV.a.3.1 ci-dessous :

	type	total (exposés + contrôles
usine 1 (Belgique)	Co	25
usine 2 (Norvège)	Co	21
usine 3 (Finlande)	Co	14
usine 4 (Suède)	WC-Co	26
usine 5 (UK)	WC-Co	en cours

L'état d'avancement des analyses réalisées sur ces échantillons est résumé ci-dessous :

	usine 1	usine 2	usine 3	usine 4
cobalt urinaire				
nickel urinaire				
créatinine urinaire				
8-hydroxydéoxyguanosine urinaire				
vitamine E sérique				
SCGE				
micronoyaux				
aberrations chromosomiques				
dépouillement questionnaire				
statistiques				

	achevé
	en cours
	à analyser

Les tubes de sérum pour le dosage de la vitamine E sont stockés et seront analysés ensemble lorsque tous les échantillons seront collectés (usine 5).

Les échantillons pour la détermination des aberrations chromosomiques sont techniquement achevés mais n'ont volontairement pas encore été analysés.

Interne standaard voor comet assay (VUB)

Voor de verwerking van biomonitoringstalen in de Comet assay wordt aangeraden te werken met eenzelfde interne standaard voor alle experimenten. Dit is bedoeld om over een referentiesysteem te beschikken voor de elektroforesestap, die cruciaal is in het protocol, maar waarvan de resultaten kunnen variëren volgens de externe condities (omgevingstemperatuur, temperatuur van de buffer, pH van de buffer). Er werden experimenten uitgevoerd om het effect van het invriezen van bloed in verschillende omstandigheden na te gaan. Geen enkele van de geteste methoden gaf echter een bevredigend resultaat; het invriezen en vervolgens ontdooien van het bloed veroorzaakte opmerkelijk veel DNA-schade in de cellen. De bewaring van preparaten, gemaakt met controle cellen en MMS-behandelde cellen, in de lysebuffer leverde eveneens verhoogde DNA-schade op. Bewaring van de slides gedurende een korte periode (4 weken) was nog aanvaardbaar. Maar verdere bewaring (tot 7 weken), die gebruikelijk is bij de verwerking van de biomonitoringstalen, veroorzaakte een sterke toename van de DNA-schade.

Er werd besloten om te werken met een cellijn (K562 = humane leukemie cellijn) die permanent in cultuur wordt gehouden. Er werden een aantal experimenten uitgevoerd om de beste behandelingstijd voor EMS en de aangewezen celconcentratie te bepalen. Zodoende kunnen bij iedere gelegenheid controlecellen en EMS-behandelde cellen dezelfde procedures ondergaan als de cellen van de biomonitoringstalen.

Er werden twee mathematische modellen opgesteld om een calibratie van de bekomen resultaten te kunnen uitvoeren. In het eerste model wordt rekening gehouden met zowel de negatieve als de positieve controle van een bepaalde elektroforese voor de berekening van de nieuwe waarde van de meting. In het tweede model wordt enkel de negatieve controle in rekening gebracht. Dit tweede model werd opgesteld nadat bleek dat de positieve controle belangrijke verschillen vertoonde in opeenvolgende elektroforese-sessies.

De standaardisatie werd toegepast voor de drie schadeparameters (staartlengte, staart-DNA en staartmoment). De verschillende toepassingen van deze interne standaard in drie studies van het laboratorium worden ter publicatie voorbereid.

iv) Celschade door kobalt (Co) en Co-houdende verbindingen in primaire culturen van alveolaire type II cellen (AT-II) en alveolaire macrofagen (AM) van de rat, *in vitro* (KUL2)

(zie ook in bijlage: Roesems *et al*, 1997: *In vitro* toxicity of Co and hard metal dust in rat and human type II pneumocytes – Pharmacology and Toxicology, 81, 74-80)

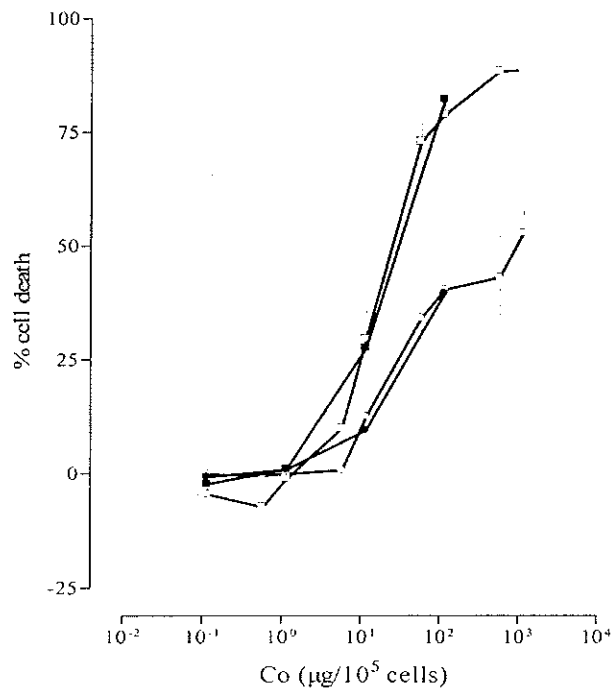
1/ Invloed van FCS op de toxiciteit van Co en Co-houdende verbindingen voor AT-II en AM.

Het medium van celculturen wordt vaak aangerijkt met FCS (10%).

We zijn nagegaan of FCS een invloed uitoefent op de toxiciteit van Co en Co-houdende verbindingen voor AT-II en AM.

De cellen werden gedurende 18 uur blootgesteld aan Co of Co-houdende verbindingen in de aanwezigheid van 10% FCS of 0.1% lactalbumine (als proteïne-bron). LDH-vrijzetting werd bepaald als index voor celtotoxiciteit.

→ FCS beïnvloedt de toxiciteit van Co en Co-houdende verbindingen niet, t.o.v. dezelfde incubaties in de aanwezigheid van 0.1% lactalbumine.



Cel toxiciteit, bepaald a.d.h.v. LDH vrijzetting, in rat alveolaire type II pneumocytes (cirkels) en rat alveolaire macrofagen (vierkantjes) na incubatie met Co in de aanwezigheid van 10% FCS (gesloten) of 0.1% lactalbumine (open). Gemiddelde $\pm$ SD, n=2-7.

2/ Invloed van de well-grootte op de toxiciteit van Co en Co-houdende verbindingen voor AT-II en AM.

Cellen kunnen in cultuurplaten met verschillende well-grootten gekweekt worden. De cellen en partikels die in de well gebracht worden, zouden, afhankelijk van de well-grootte, zich anders kunnen verdelen over de well.

We hebben de mogelijke invloed van de well-grootte nagegaan op de toxiciteit van Co en Co-houdende verbindingen voor AT-II en AM.

De cellen werden gedurende 18 uur blootgesteld aan Co en Co-houdende verbindingen in 96-well cultuurplaten en 24-well cultuurplaten, waarbij de hoeveelheid partikels per cel hetzelfde was in beide typen platen. LDH-vrijzetting werd bepaald als index voor celschade.

→ De grootte van de wells heeft geen invloed op de toxische effecten van Co en Co-houdende verbindingen.

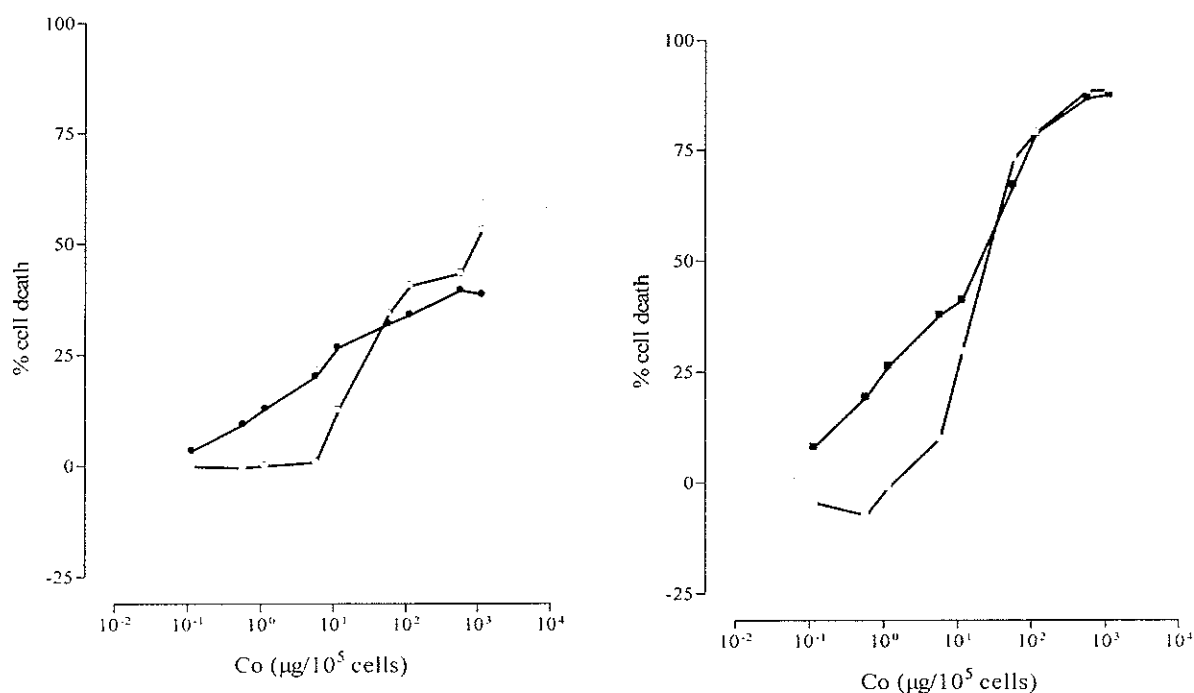
3/ Andere methode voor de bepaling van celschade: adenine-vrijzetting

In tegenstelling tot de groep van Lison (1990), ondervonden wij dat Co zelf enige invloed uitoefende op de LDH-gecatalyseerde reactie.

We hebben onze resultaten gecontroleerd door dezelfde experimenten te herhalen, maar een andere index voor celschade te bepalen, nl. vrijzetting van vooraf ingebouwd radioactief adenine.

De cellen (AT-II en AM) werden geïncubeerd in 96-well platen, in een FCS-rijk medium, gedurende 18 uur, in de aanwezigheid van hoger vernoemde partikels. Als toxiciteitsindex werd de vrijzetting van radioactief adenine bepaald.

→ Voor de lagere doses partikels bleek de adenine-vrijzetting gevoeliger te zijn dan de LDH-vrijzetting. De TD_{50} -waarden zijn echter voor beide methoden gelijk.



Cel toxiciteit, bepaald a.d.h.v. LDH vrijzetting (open) of [³H] adenine vrijzetting (gesloten) in rat alveolaire type II pneumocyten (cirkels) en rat alveolaire macrofagen (vierkantjes) na incubatie met Co partikels. Gemiddelde $\pm$ SD, n=2-7.

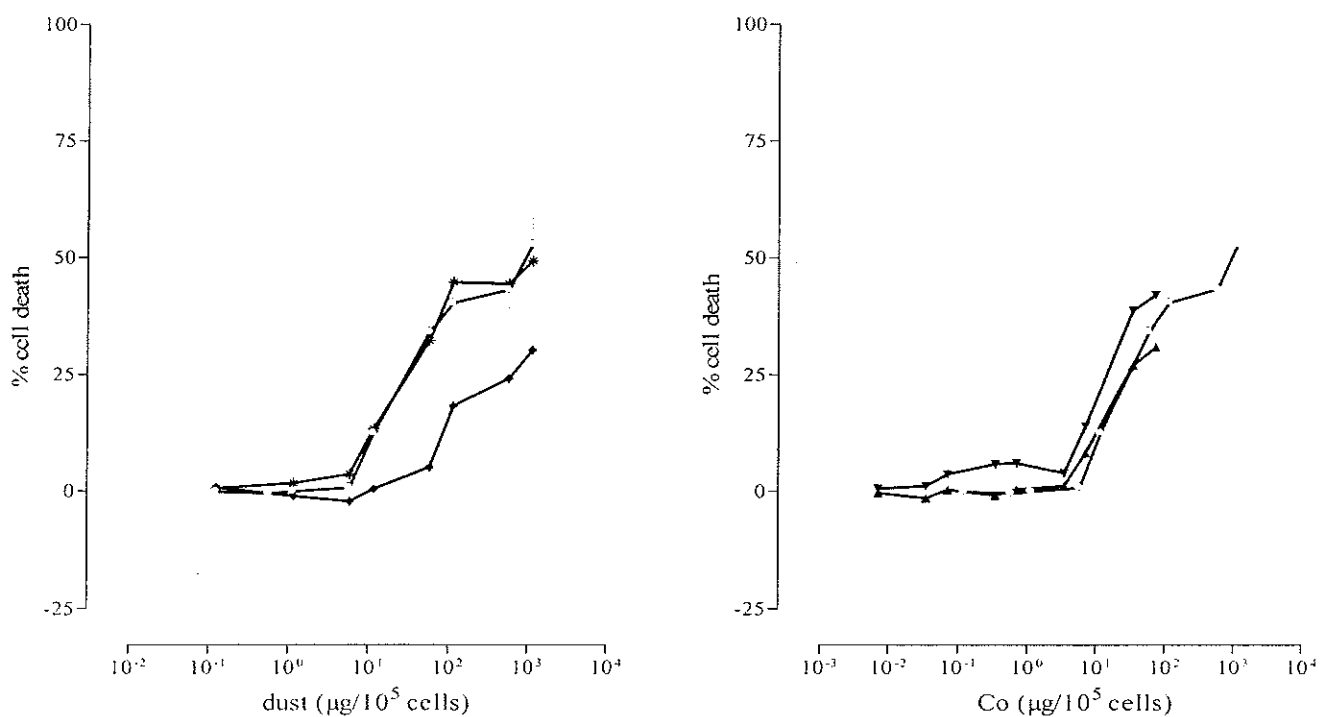
4. Toxiciteit van Co, CoWC, Co+WC, WC en DQ12 voor AT-II en AM.

In vitro toxiciteit van Co, CoWC, Co+WC, WC en DQ12 en de synergie van Co en WC werd reeds aangetoond voor alveolaire en peritoneale macrofagen (Lison & Lauwerys, 1990).

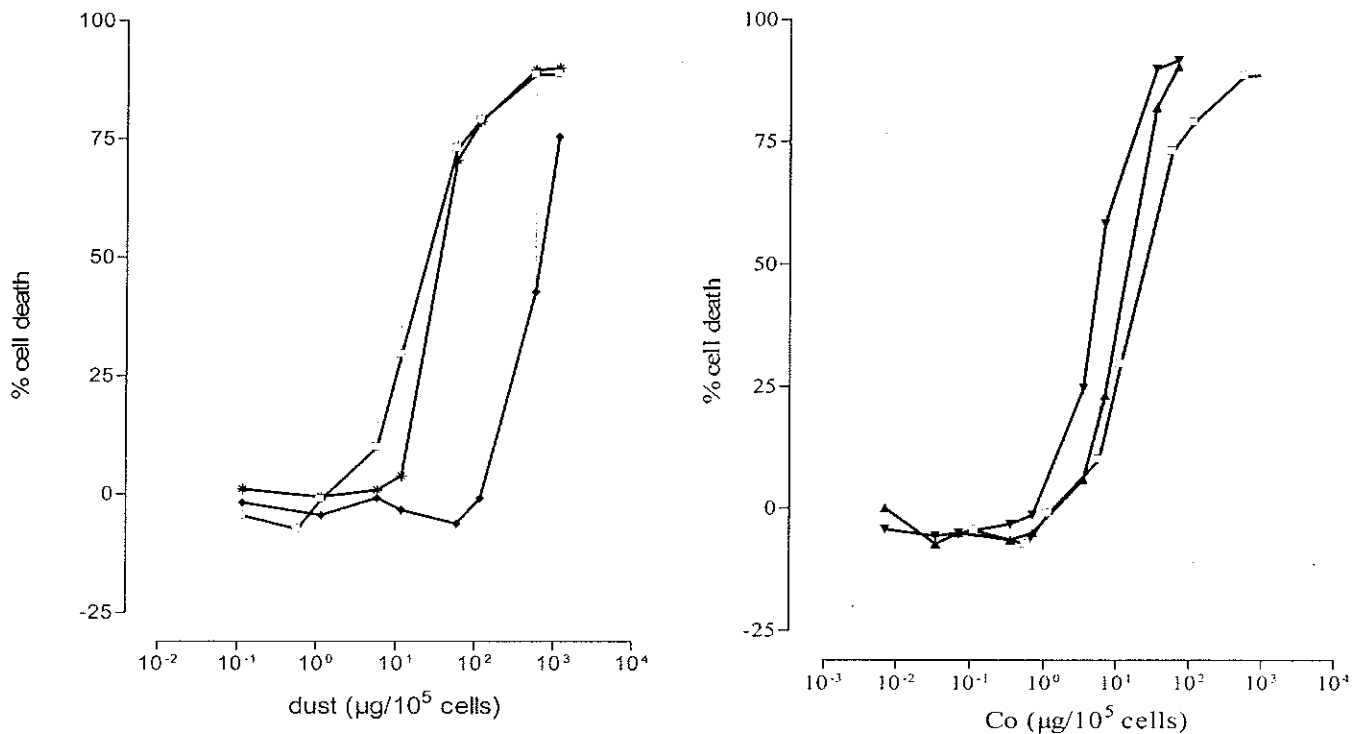
We hebben de toxiciteit van deze partikels nagegaan voor andere relevante cellen i.v.m. longkanker en longfibrose, nl. AT-II.

De cellen (AT-II en AM) werden geïncubeerd in 96-well platen, in een FCS-rijk medium, gedurende 18 uur, in de aanwezigheid van hoger vernoemde partikels. Als toxiciteitsindex werd de vrijzetting van LDH bepaald.

→ Co en DQ12 veroorzaken een gelijkaardige toxiciteit voor AT-II die zelfs bij de hoogste concentraties slechts ongeveer 50% celdood veroorzaakt. WC resulteert slechts bij de hoogste concentraties in een laag percentage celdood. Zuivere Co-partikels en diezelfde hoeveelheid Co-partikels in de aanwezigheid van WC veroorzaken nagenoeg dezelfde toxiciteit. Er is wel een trend tot een iets hogere graad van celschade wanneer WC aanwezig is. CoWC afkomstig uit een hard metaal-producerende fabriek lijkt iets toxischer dan wanneer Co en WC in het labo samengebracht werden. De AM zijn gevoeliger voor alle partikels dan de AT-II. Bij deze cellen werd de toxiciteit van Co duidelijk verhoogd door de aanwezigheid van WC (synergistisch effect).



Cell toxiciteit, bepaald a.d.h.v. LDH vrijzetting, in rat alveolaire type II pneumocyten na incubatie gedurende 18 uur met partikels Co (O), WC (◆), of DQ12 (*) en met partikels Co (O), Co/WC (▼) of Co+WC (▲). Gemiddelde $\pm$ SD, n= 2-7.



Cel toxiciteit, bepaald a.d.h.v. LDH vrijzetting, in rat alveolaire macrofagen na incubatie gedurende 18 uur met partikels Co (○), WC (◆), of DQ12 (*) en met partikels Co (○), Co/WC (▼) of Co+WC (▲). Gemiddelde $\pm$ SD, n=2-7.

v) Mechanisme voor celtoxiciteit van Co en Co-houdende verbindingen voor AT-II en AM – rol van oxidatieve stress ? (KUL2)

1/ *Activatie van NF-κB door Co en Co-houdende verbindingen*

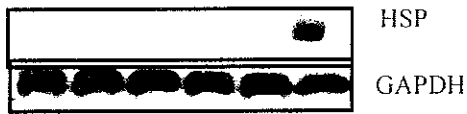
Tot op heden hebben we geen activatie van NF-κB kunnen aantonen door Co of Co-houdende verbindingen. Er is echter meestal ook een grote activiteit in de controlecellen waar te nemen.

2/ *Upregulatie van MnSOD en HSP door Co en Co-houdende verbindingen*

Tot op heden hebben we geen activatie van MnSOD- of HSP-RNA kunnen aantonen door Co of Co-houdende verbindingen. Positieve controles zoals CdCl₂ (HSP) en cytomix (= IFN γ + IL-1 β + TNF α) (MnSOD) waren wel in staat de RNA-productie of –survival op te drijven.

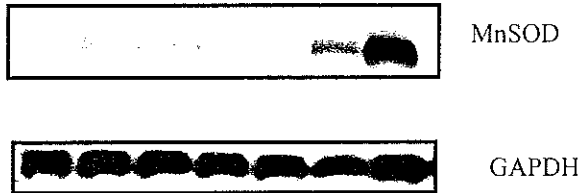
Ter illustratie wordt een Northern Blot weergegeven voor HSP, MnSOD en GAPDH (housekeeping gene):

HSP in AT-II na 4 uur incubatie



- Laan 1. controle
 2. Co 25µg/700µl/1.88cm²
 3. CoWC 417µg/700µl/1.88cm²
 4. CoCl₂ 6x10⁻⁴M
 5. Cytomix 10ng/ml elk

MnSOD in A549 (tumor-celijn gedefinieerd als AT-II) na 4 uur incubatie



- Laan 1. controle
 2. H₂O₂ 200µM
 3. H₂O₂ 200µM + Co 47µg/2ml/9.4cm²
 4. H₂O₂ 200µM + WC 470µg/2ml/9.4cm²
 5. H₂O₂ 200µM + CoWC 470µg/2ml/9.4cm²
 6. PMA 100nM
 7. cytomix 10ng/ml elk

3/ Activatie van de PPP

Recente studies wijzen op een mogelijke activatie van de PPP door Co en Co-houdende verbindingen.

vi) Rol van Co-partikel en Co-ion in de toxiciteit van Co en Co-houdende verbindingen voor AT-II en AM (KUL2)

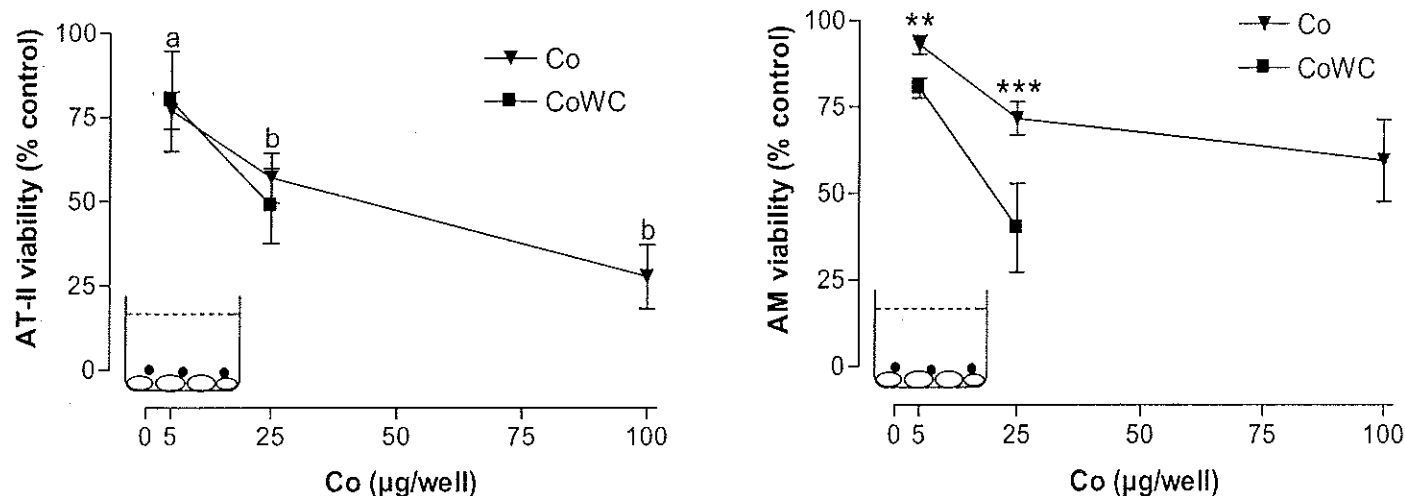
(zie ook in bijlage: Roesems *et al.*: *In vitro* cytotoxicity of various forms of Co for rat alveolar macrophages and type II pneumocytes – opgezonden naar Toxicology and Applied Pharmacology)

1/ Andere index voor cytotoxiciteit: MTT-analyse

Omdat onze resultaten erop hadden gewezen dat Co een zekere invloed heeft op de LDH-reactie en omdat methoden met radioactief materiaal liefst vermeden worden, zijn we overgeschakeld naar een derde methode voor het bepalen van celtoxiciteit, nl. de MTT-analyse.

De cellen werden gedurende 20 uur blootgesteld aan Co of CoWC, in de afwezigheid van FCS.

→ AT-II lijken in deze tests gevoeliger voor Co dan AM. Bij de AM is de synergie tussen Co en WC duidelijk waar te nemen.



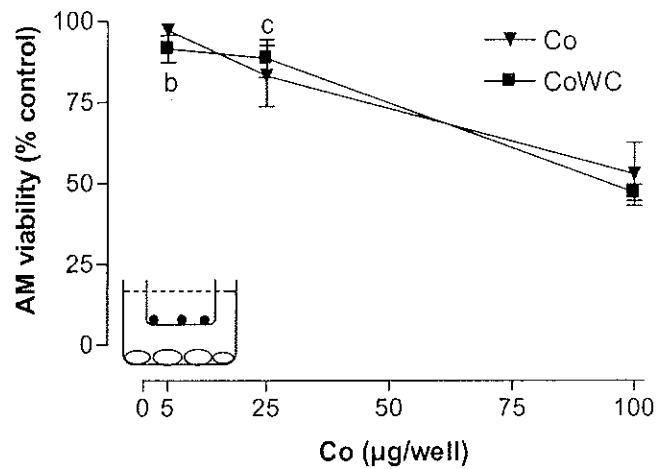
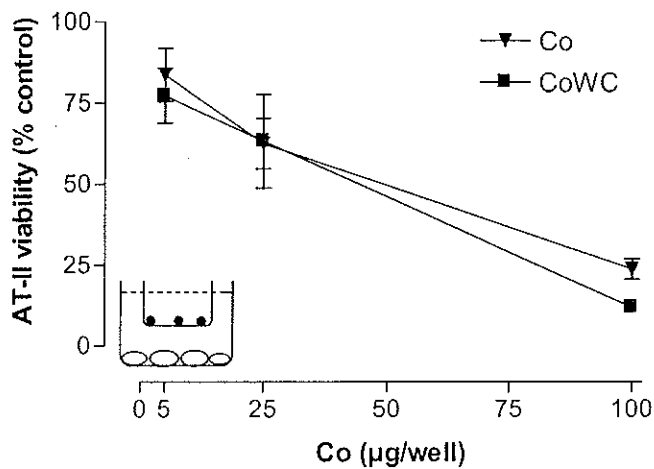
Cel viabiliteit (bepaald a.d.h.v. MTT-analyse) van type II pneumocyten en alveolaire macrofagen na 24 uur blootstelling aan 5-25-100µg/well Co partikels (▼) of 83-417µg/well CoWC partikels (■), in contact met de cellen. Gemiddelden $\pm$ SD, $n = 3-6$. Statistische analyse toont dat AT-II significant gevoeliger zijn voor Co partikels dan AM (a, $p < 0.05$ or b, $p < 0.01$) en dat CoWC significant toxischer is voor AM dan puur Co (**, $p < 0.01$ or ****, $p < 0.001$).

2/ Belang van contact tussen partikels en cellen

De groep van Lison (1992) veronderstelt dat rechtstreeks contact tussen CoWC en AM noodzakelijk is om enig toxisch effect te kunnen waarnemen.

Om het belang van het contact tussen partikels (Co en CoWC) en cellen (AT-II en AM) na te gaan, hebben we de partikels van de cellen gescheiden door de partikels te plaatsen in een insert (porie-grootte 0.4µm).

→ Co en CoWC die in contact komen met AT-II of die in een insert geplaatst zijn, veroorzaken evenveel celschade. Daarentegen is CoWC duidelijk minder toxisch voor AM wanneer er geen contact is met de cellen.



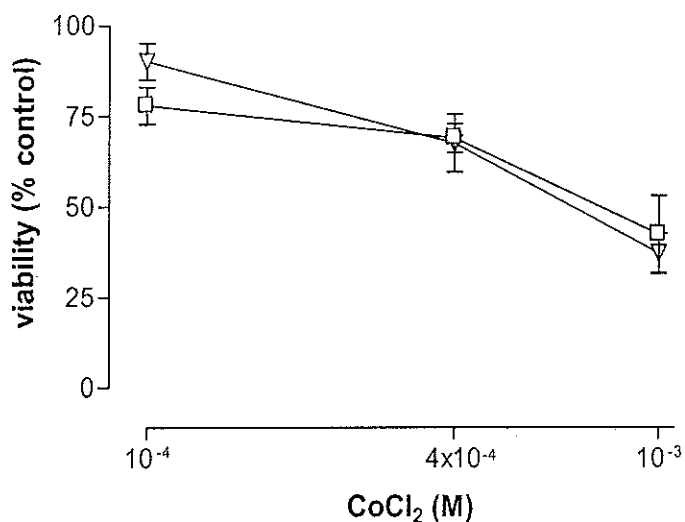
Cel viabiliteit (bepaald a.d.h.v. MTT-analyse) van type II pneumocyten en alveolaire macrofagen na 24 uur blootstelling aan 5-25-100µg/well Co partikels (▼) of 83-417µg/well CoWC partikels (■), die geplaatst werden in een insert. Gemiddelden $\pm$ SD, $n = 3-5$. Voor de AM, is CoWC in een insert significant minder toxisch dan CoWC dat in contact komt met de cellen (b, $p < 0.01$ or c, $p < 0.001$ – vergeleken met de overeenkomstige data in de vorige figuur).

3/ Effect van Co-ionen op AT-II en AM

Studies van de groep van Lison (1992) toonden geen schade van de AM na blootstelling aan CoCl_2 . Onze experimenten waarbij de partikels in inserts geplaatst werden suggereren echter een rol voor de Co-ionen in het veroorzaken van celschade door Co en CoWC voor AT-II en AM.

AT-II en AM werden geïncubeerd gedurende 20 uur in de aanwezigheid van CoCl_2 .

→ Beide celtypen zijn even gevoelig voor CoCl_2 , d.w.z. voor Co-ionen.



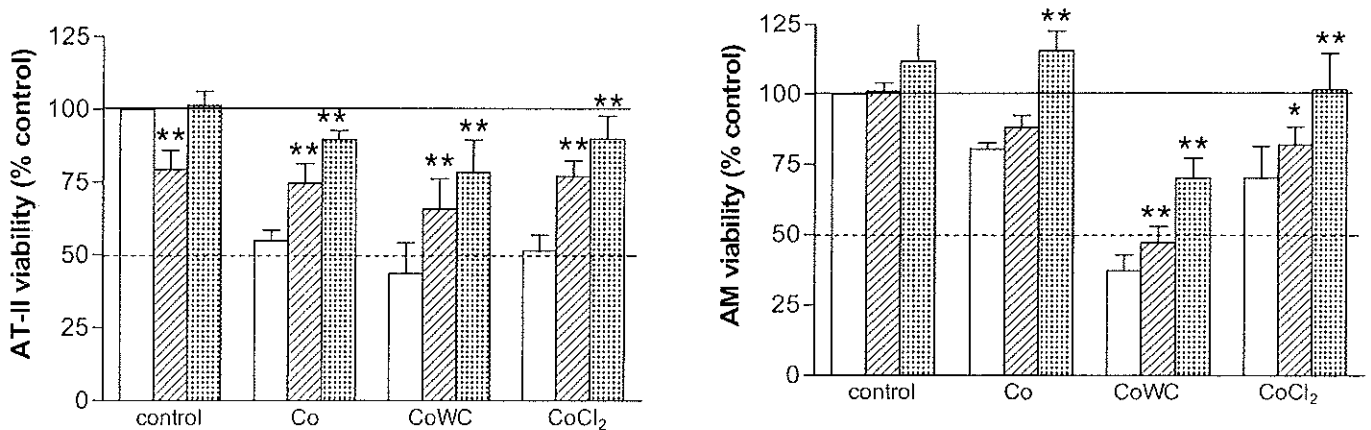
Cel viabiliteit (bepaald a.d.h.v. MTT-analyse) van type II pneumocyten (Y) en alveolaire macrofagen (V) na 24 uur blootstelling aan CoCl_2 . Gemiddelde waarden $\pm$ SD, $n = 3-5$.

4/ Effect van EDTA en lactalbumine op de toxiciteit van Co, CoWC en CoCl₂ voor AT-II en AM

AT-II en AM zijn gevoelig voor de effecten van CoCl₂.

Om verder het belang van de Co-ionen in de toxische effecten van Co-partikels na te gaan, werden de cellen blootgesteld aan Co, CoWC of CoCl₂ in de aan- of afwezigheid van de ionen-scavengers EDTA en lactalbumine.

→ EDTA en lactalbumine zijn beide in staat om de toxiciteit van Co, CoWC en CoCl₂ voor AT-II en AM te verminderen en zelfs te niet te doen.

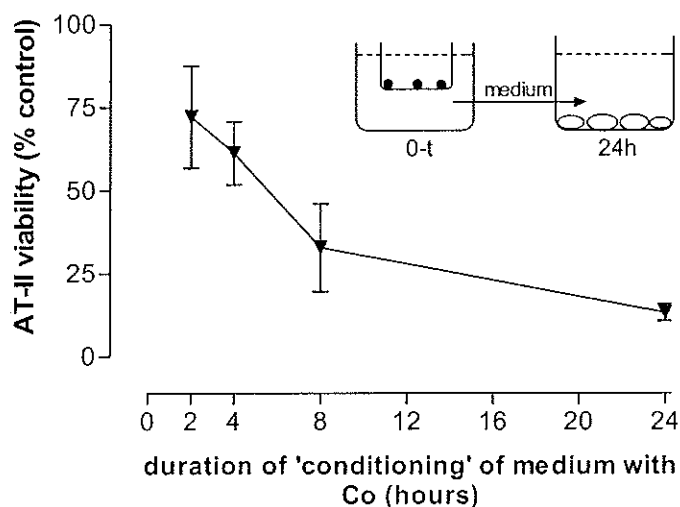


Cel viabiliteit (bepaald a.d.h.v. MTT-analyse) van type II pneumocyten en alveolaire macrofagen na 24 uur blootstelling aan 25µg/well Co, 417µg/well CoWC of 6x10⁻⁴M CoCl₂ zonder (open), of met 6x10⁻⁴M EDTA (gestreept) of 1% lactalbumine (gespikkeld). Gemiddelde waarden ± SD, n = 3. ★, p < 0.05; ★★, p < 0.01 – vergeleken met de overeenkomstige 'zonder' waarde. De SD van lactalbumine-controle voor AM bereikt een waarde van 133 op de Y-as.

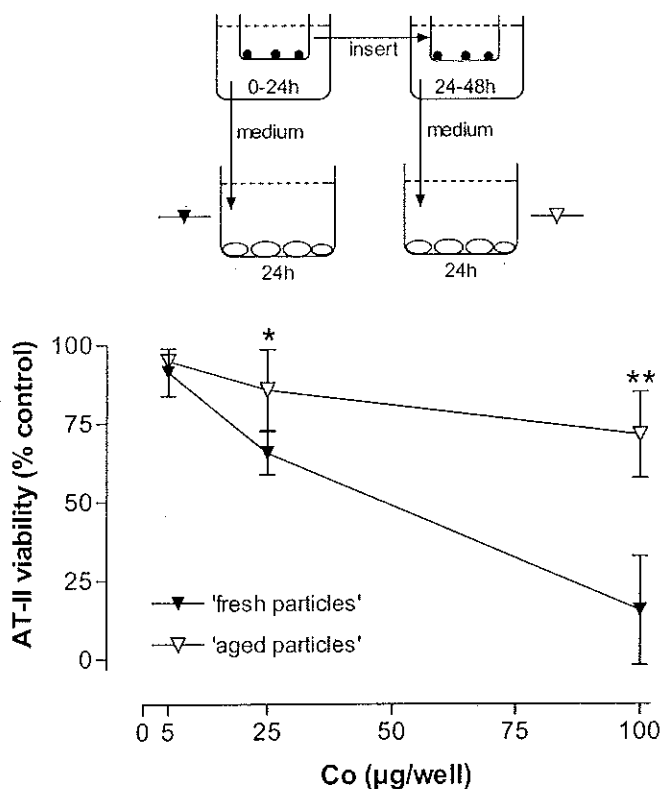
5/ Is 'Co-geconditioneerd medium' in staat celschade te veroorzaken ?

Door Co-partikels in medium in inserts te plaatsen, in de afwezigheid van cellen, werd 'Co-geconditioneerd' medium in de well geproduceerd. Het geconditioneerd medium werd geïncubeerd na verschillende tijdstippen en werd op -20°C bewaard tot gebruik. Na 24 uur werd onder de partikels vers medium gebracht gedurende 24 uur. De cellen (AT-II) werden dan gedurende 24 uur in dit medium geïncubeerd.

→ Binnen de eerste 24 uur is er een verhoging van de toxiciteit met verlenging van de tijdsduur waarin de Co-partikels in het medium aanwezig waren. Medium dat gedurende 24 uur geconditioneerd werd met Co-partikels die reeds 24 uur in ander medium gezeten hadden, was niet meer in staat ernstige celschade te veroorzaken.



Cell viability (bepaald a.d.h.v. MTT-analyse) van type II pneumocyten na 24 uur blootstelling aan medium, verkregen door Co partikels (100µg/well) te incuberen in een insert gedurende 2, 4, 8 of 24 uur. Gemiddelde waarden $\pm$ SD, n = 3.

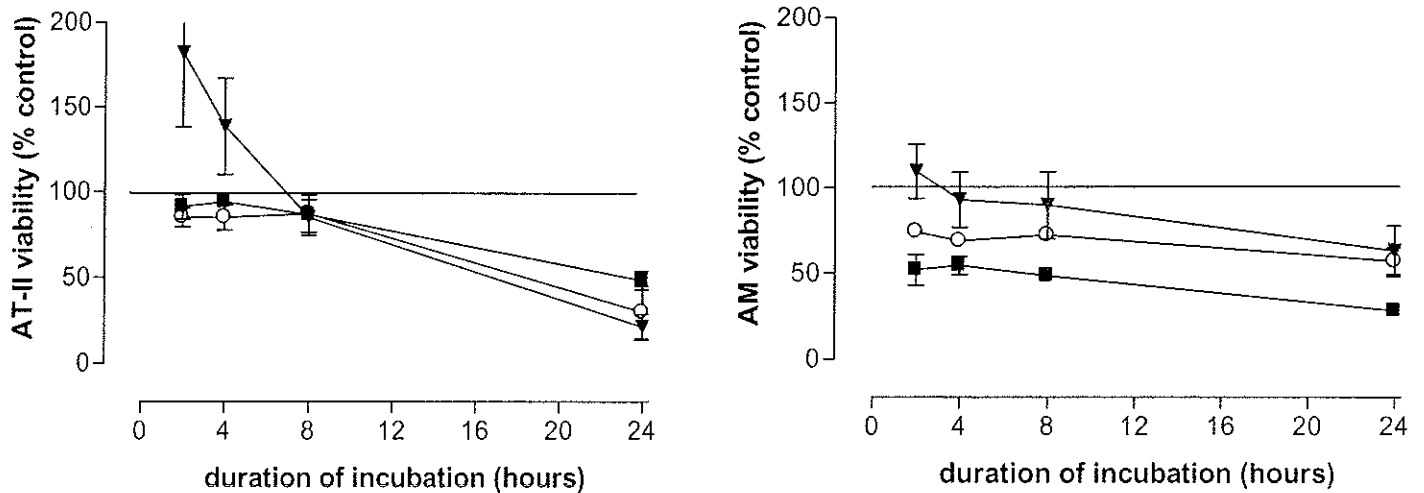


Cell viability (bepaald a.d.h.v. MTT-analyse) van type II pneumocyten na 24 uur blootstelling aan medium, verkregen door verschillende concentraties Co partikels te incuberen in een insert gedurende 24 uur ($\blacktriangledown$) of nadat dezelfde partikels opnieuw geïncubeerd werden gedurende 24 uur (∇). Het medium werd verzameld en bewaard bij -20°C tot gebruik. Gemiddelde waarden $\pm$ SD, n = 3. $\star$, $p < 0.05$

6/ Toxiciteit van Co, CoWC en CoCl_2 voor AT-II en AM in de loop van de tijd

Om verder te zoeken volgens welk mechanisme Co en CoWC hun toxiciteit uitoefenen op AT-II en AM, werden de cellen geïncubeerd met een bepaalde concentratie Co, CoWC of CoCl_2 gedurende een bepaalde tijd (2-4-8-24 uur).

→ Voor AT-II is er een initiële activatie van de mitochondriale activiteit na blootstelling aan Co. Voor CoWC en CoCl₂ treedt celschade pas op vanaf 8 uur incubatie. Voor AM kunnen we geen uitgesproken activatie vinden na incubatie met Co, althans niet bij de gebruikte concentratie. CoWC en CoCl₂ resulteren vrijwel onmiddellijk in mitochondriale schade.

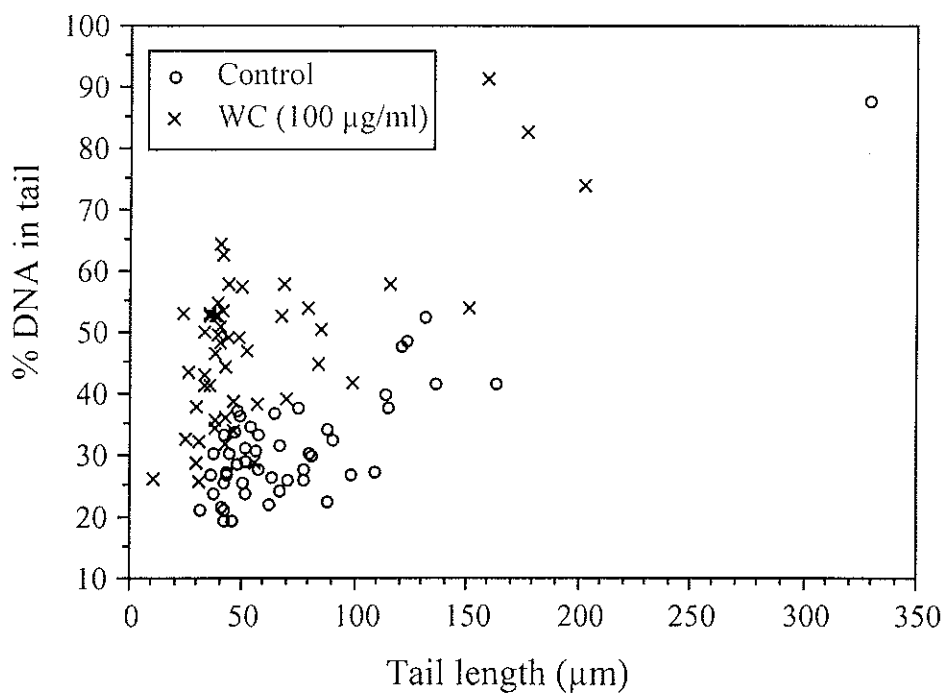
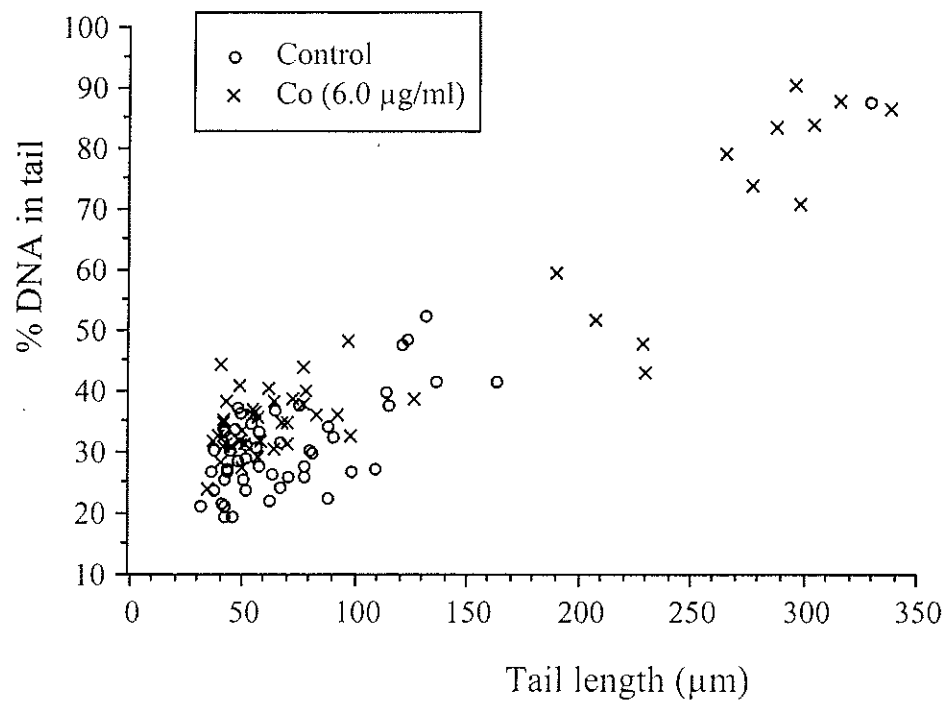


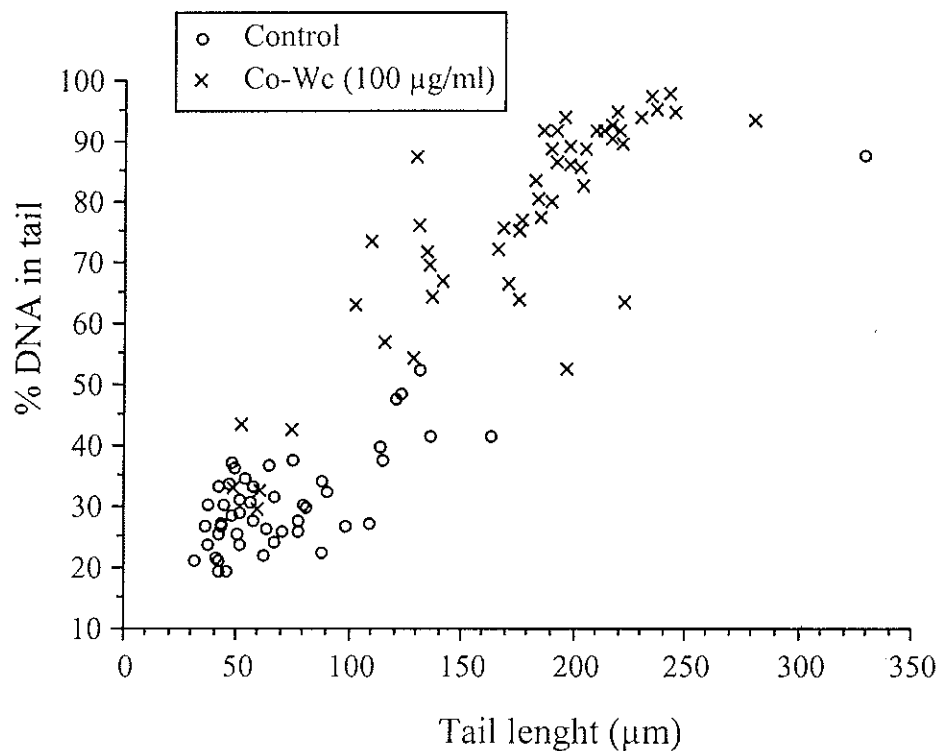
Cel viabiliteit (bepaald a.d.h.v. MTT-analyse) van type II pneumocyten en alveolaire macrofagen na blootstelling aan 100µg/well Co (▼), 417µg/well CoWC (■) of 10⁻³M CoCl₂ (○) gedurende 2, 4, 8 of 24 uur. Gemiddelde waarden ± SD, n = 3-4.

vii) Inductie van DNA-schade door kobalt *in vitro* in menselijke lymphocyten (VUB)

In een eerste fase werd een vergelijkende studie ondernomen om het DNA-beschadigend effect van de verschillende kobaltverbindingen te evalueren. Hiertoe werd gebruik gemaakt van de alkaline comet assay en de alkaline elution assay (AE). Menselijke lymfocyten, geïncubeerd gedurende maximum 20 minuten met Co, WC en WC-Co, vertoonden een dosis- en tijdsafhankelijke inductie van enkelstrengige DNA-breuken. Op basis van een equivalente kobaltinhoud produceerde WC-Co meer DNA-breuken dan Co. WC alleen veroorzaakte geen detecteerbare DNA-schade met de AE. Deze studie, gepubliceerd door Anard et al. (1997), was de eerste demonstratie van het clastogene vermogen van kobalt-bevattende metaalstof.

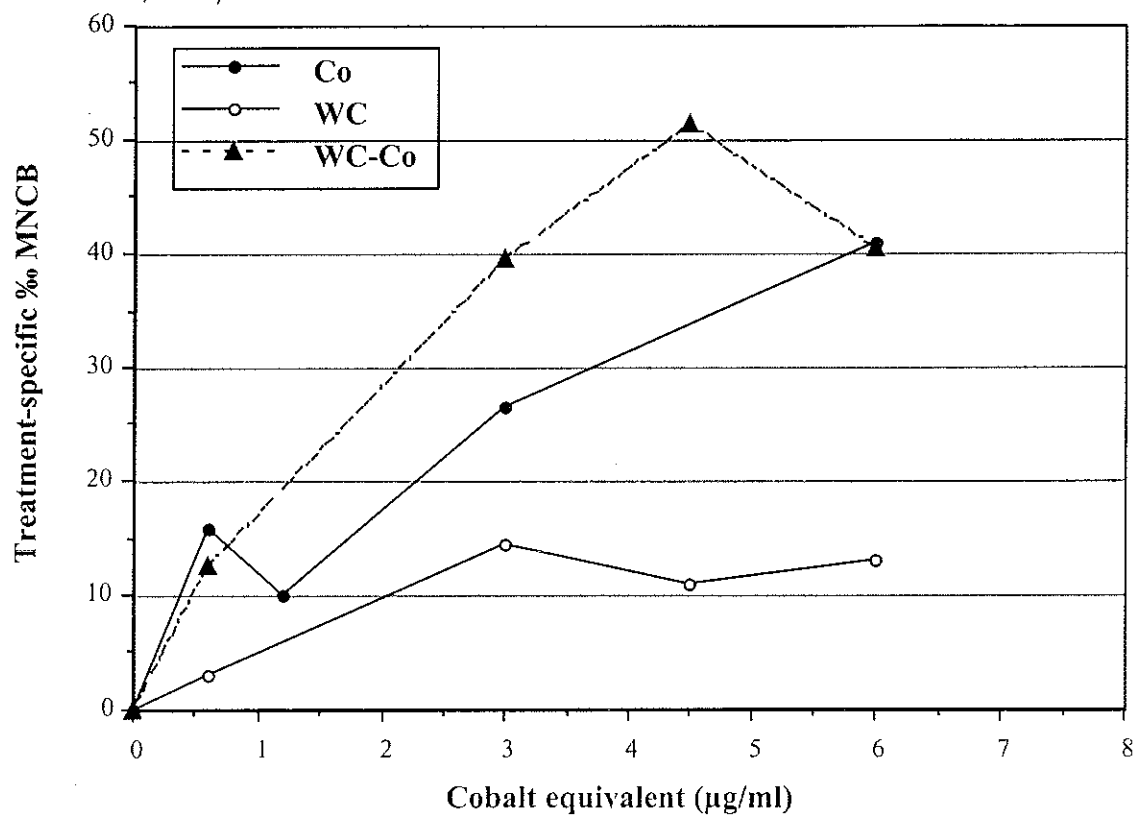
Figuur 7: SCGE: Correlatie tussen DNA-inhoud van de staart (%TD) en de staartlengte in geïsoleerde lymfocyten blootgesteld aan Co, WC en WC-Co (Anard et al., 1997).

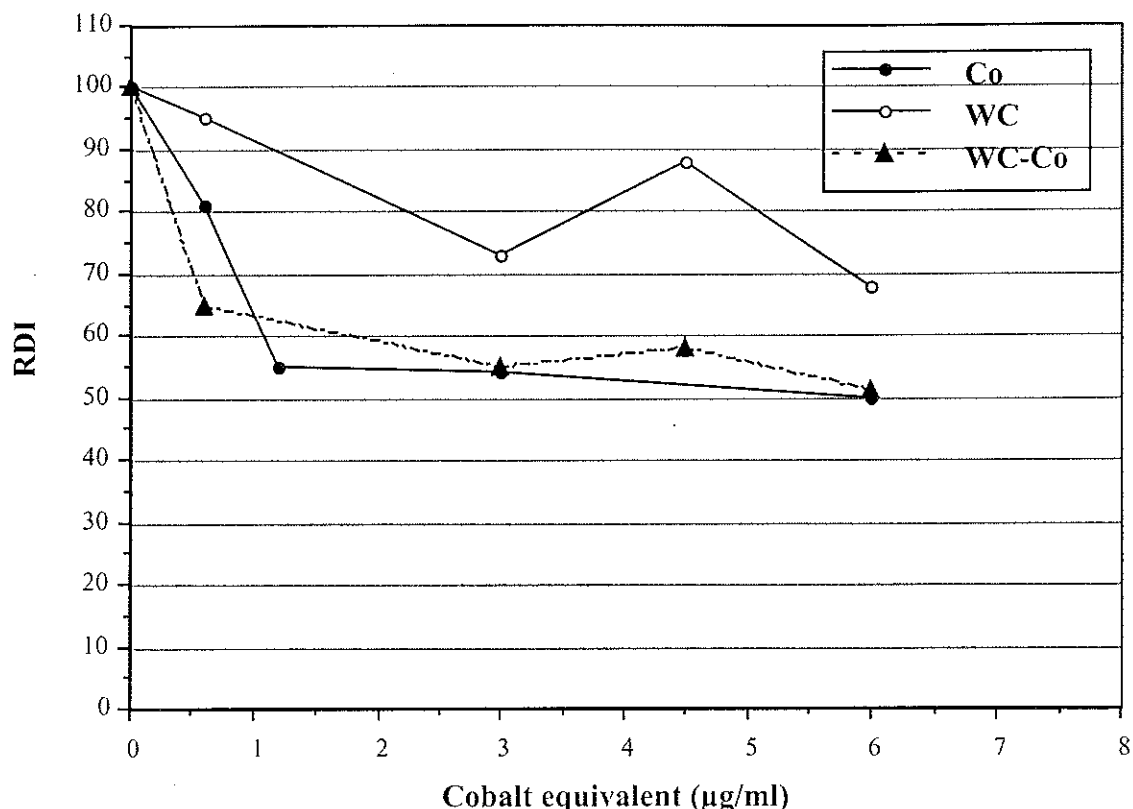




In een tweede fase werd het genotoxische potentieel van Co, WC en WC-Co in parallel vergeleken met de alkaline comet assay en de *in vitro* micronucleus test (Van Goethem et al., 1997). De comet assay confirmeerde eerder bekomen resultaten dat het WC-Co mengsel meer DNA-schade produceert dan Co alleen; WC alleen was niet in staat een dosisafhankelijk DNA-brekend effect te veroorzaken, zoals wel was waargenomen voor Co en WC-Co. Resultaten van de MN-test bevestigden deze observaties: significante toename van micronuclei frequenties werden waargenomen in cytochalasine B geblokkeerde lymfocyten na blootstelling aan Co en WC-Co. Het percentage binucleairen verminderde echter na behandeling met Co en WC-Co, bij alle geteste concentratie en na behandeling met WC enkel bij de hoogste concentratie.

Figuur 8: MN-test: Behandelingsspecifieke micronucleusinductie en relatieve delingsindex bepaald in geïsoleerde menselijke lymfocyten blootgesteld aan Co, WC en WC-Co. Kobaltequivalent geeft de hoeveelheid zuivere Co aan in het WC-Co mengsel (Van Goethem et al., 1997).





In een derde fase werd met behulp van de alkaline comet assay de dosis-effectrelatie verder uitgewerkt, met de nadruk op interdonor en interexperimentele variatie. Bovendien werd nagegaan of er oxidatieve schade werd geïnduceerd na 15 minuten blootstelling en of er zoals voordien aangetoond voor cobalt(II) sprake is van een interactie met DNA-herstelmechanismen. Deze studie werd gepubliceerd door De Boeck et al. (1998).

Het DNA-brekende vermogen van drie kobaltverbindingen (Co: kobalt metaal, WC-Co: legering van kobalt met wolframcarbide en CoCl_2 : kobaltchloride) werd vergeleken. Hiertoe werd de alkaline comet assay toegepast op geïsoleerde lymfocyten afkomstig van drie donoren. De cellen werden na 24 uur stimulatie met fytohemagglutinine blootgesteld aan de kobaltverbindingen in de volgende concentraties: 0, 0.3, 0.6, 1.2, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 en 6.0 µg/ml Co-equivalent opgelost in water. De behandeling duurde 15 minuten. In totaal werden de resultaten van 15 experimenten geanalyseerd. Steeds werd het bloed van één van drie donoren gebruikt (niet-rokers, vrouwelijk, leeftijd < 30). Hoewel eenzelfde experiment meermaals herhaald werd, gebruikmakende van dezelfde of een andere donor, werd toch een relatief grote variabiliteit in de respons waargenomen. Deze kan onderverdeeld worden in intrastaal, interexperimentele en interdonor variatie.

Wat de dosis-effectrelatie betreft, toonde regressie-analyse aan dat binnen één donor de hoeveelheid geïnduceerde schade toenam met de concentratie van Co, WC-Co en CoCl_2 . Deze dosis-responsrelatie was niet lineair maar binomiaal, gezien de r-waarde voor dit laatste model steeds hoger was.

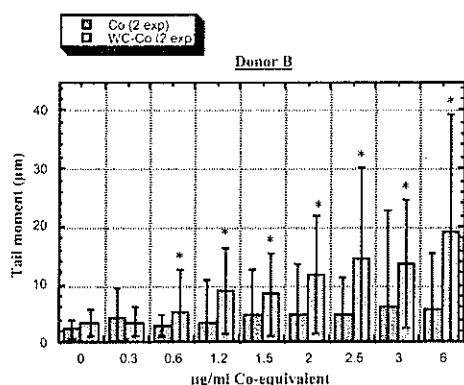
Na berekening van de variatiecoëfficiënt ($CV = \text{standaard deviatie} / \text{gemiddelde} \times 100$) voor gecombineerde data van verschillende experimenten, werd het duidelijk dat de grootste interexperimentele variabiliteit voor TM geobserveerd werd in twee van de drie donoren na behandeling van de cellen met Co (zie ook error bars op Fig. 9). Voor lymfocyten van donor M, verschilden de experimenten met CoCl_2 het meest. In controle en EMS-behandelde cellen was de variatie meestal laag.

Om het DNA-beschadigende potentieel van metallisch Co te vergelijken met dat van WC-Co en CoCl_2 werden de gepoolde data van elke behandeling (binnen een donor) geanalyseerd met de niet-parametrische Mann-Whitney U-test. WC-Co induceerde meer migratie in vergelijking met metallisch Co en CoCl_2 , in twee van de drie donoren (donor B en S). In deze donoren, induceerden Co en CoCl_2 ongeveer dezelfde migratie. In donor M, induceerden de drie verbindingen ongeveer hetzelfde niveau van schade.

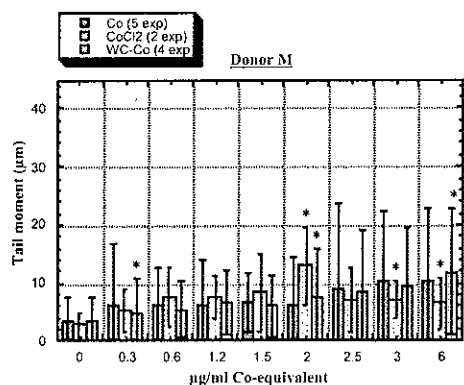
De interdonor variabiliteit in de respons van geïsoleerde lymfocyten na behandeling met Co, CoCl_2 en WC-Co gedurende 15 minuten wordt weergegeven in Figuur 9. Bij bijna alle geteste concentraties is er een statistisch significant verschil tussen de donoren. Voor Co en CoCl_2 vertoonden de cellen van donor M de hoogste respons, terwijl zij voor WC-Co de laagste respons gaven. De variatie van achtergrond DNA-schadeniveaus (negatieve controle cellen) was niet significant.

Het dient vermeld te worden dat geen perfecte inschatting van de interdonor variatie kon uitgevoerd worden, aangezien elke elektroforese (experiment) uitgevoerd werd met één enkele donor.

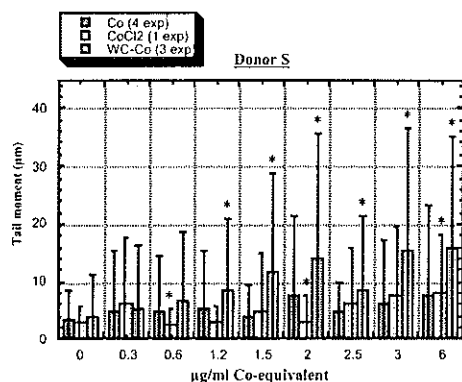
Figuur 9: SCGE: Directe genotoxische effecten van kobaltverbindingen: interexperimentele en interdonor variabiliteit van dosis-effectrelatie in geïsoleerde menselijke lymfocyten *in vitro* blootgesteld aan Co, WC-Co en CoCl_2 (De Boeck et al., 1998).



a



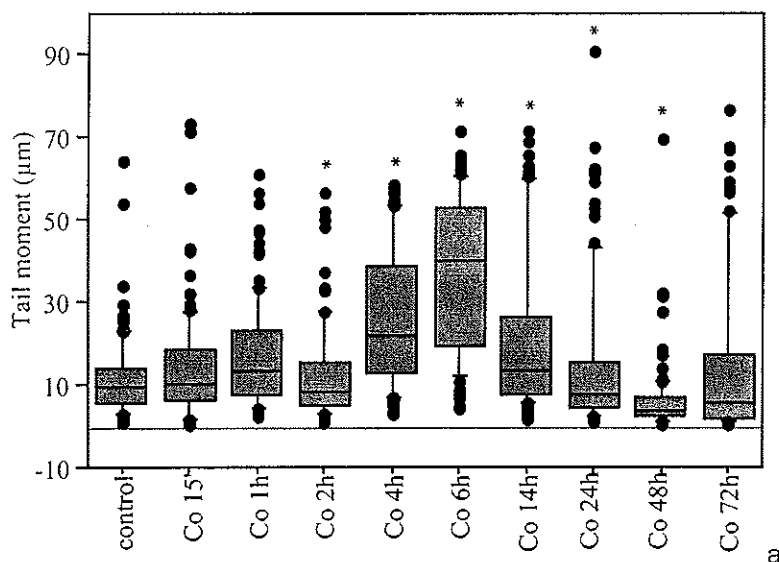
b

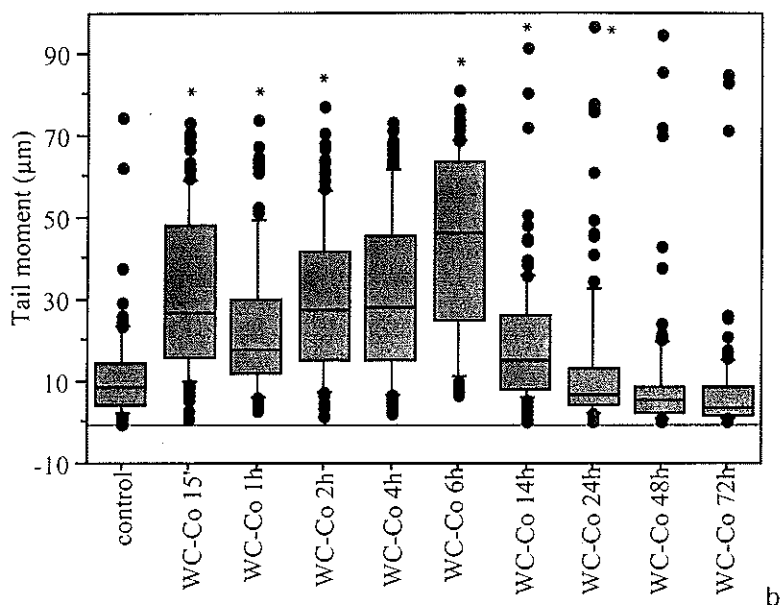


C

Een kinetiekstudie werd uitgevoerd om de tijdsafhankelijkheid van de inductie van DNA-schade te bestuderen. Hiervoor werden lymfocyten (donor S) behandeld met Co en WC-Co gedurende 15 minuten, 1, 2, 4, 6, 14, 24, 48 en 72 uur. Een tijdsafhankelijke toename van de DNA-migratie werd waargenomen tot 6 uur blootstelling. Bij 15 minuten blootstelling werd er een groot verschil in DNA-migratie waargenomen tussen Co en WC-Co. Dit verschil nam af naarmate de behandelingstijd toenam. Voor de langere blootstellingen (14, 24, 48 en 72 uur) werd een relatief groot aantal extreem beschadigde nucleï vastgesteld. Deze kernen konden niet correct gemeten worden aangezien zij zeer diffuus waren en komen vermoedelijk overeen met dode cellen zoals vastgesteld kon worden door de Trypan Blue exclusie test. De overige, meetbare kernen, hadden lage schadeniveau's zoals weergegeven wordt in Figuur 10, met een toenemende intrastaal variatie.

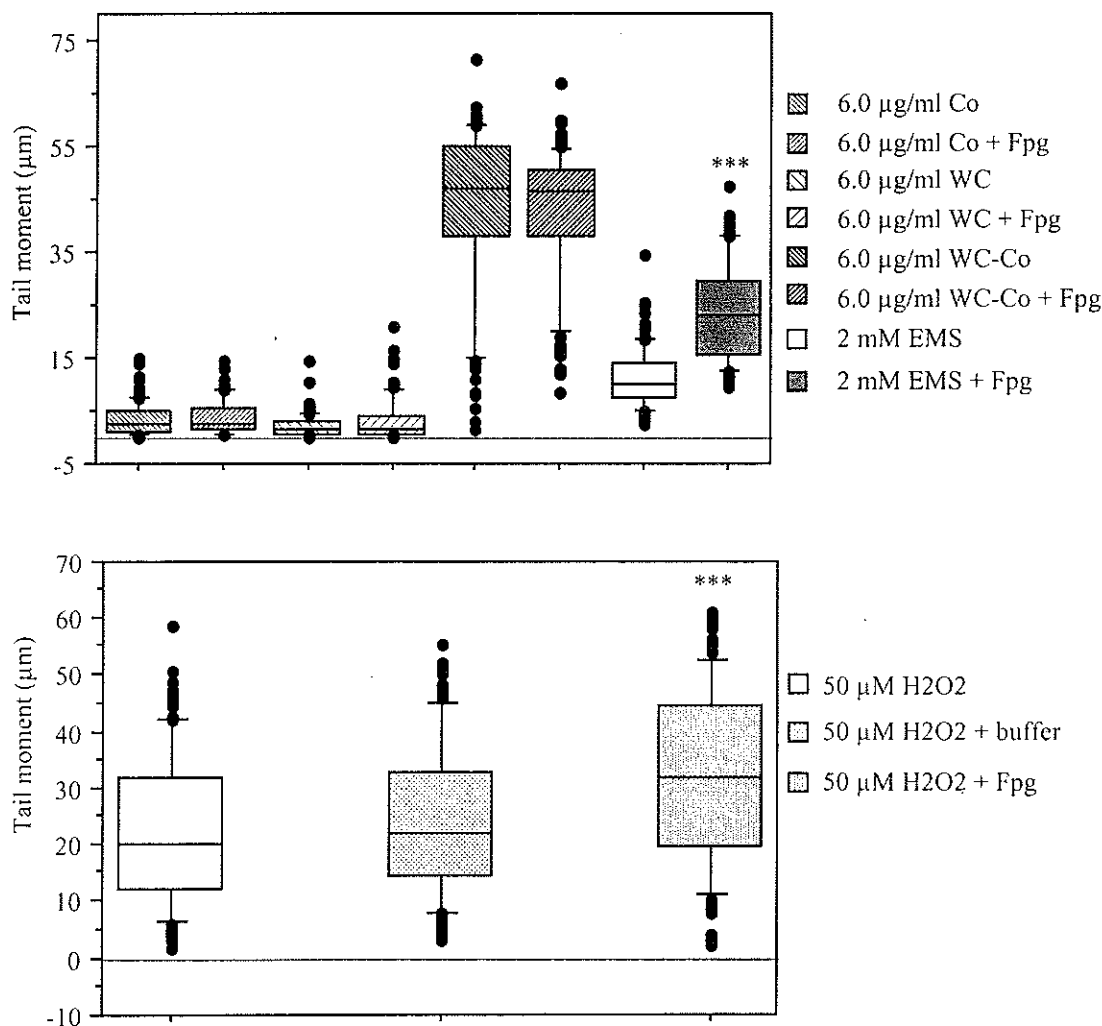
Figuur 10: SCGE: Directe genotoxische effecten van kobaltverbindingen: kinetiekstudie van de respons van geïsoleerde menselijke lymfocyten *in vitro* blootgesteld aan Co en WC-Co (6.0 µg/ml Co-equivalent) (De Boeck et al., 1998).





Voor de detectie van oxidatieve DNA-schade werden, na behandeling van geïsoleerde lymfocyten (donor B) met Co, WC, WC-Co, EMS en H₂O₂, de gelyseerde cellen gedurende 30 minuten bij 37°C geïncubeerd met het lesie-specifieke enzyme Fpg. Dit enzyme herkent 8-OH-guanine, het voornaamste product van oxidatieve aanval op DNA en andere beschadigingen, de zogenaamde Fapy-sites. Figuur 11 toont voor TM de schade-analyse van elk behandelingspunt, met en zonder Fpg-incubatie. Behandeling met 6.0 μg/ml Co, WC en WC-Co gedurende 15 minuten veroorzaakte geen statistisch significante toename van Fpg-gevoelige lesies (gemeten als TL, TD en TM in 100 nucleï). In dit experiment was de respons na WC-Co-behandeling uitzonderlijk hoog en voor TL werd een statistisch significante afname waargenomen wanneer Fpg werd toegediend (TD en TM vertoonden geen significant verschil). EMS-blootstelling (2 mM voor 2 uur) leidde tot een significante toename van de DNA-schade wanneer de cellen geïncubeerd werden met het enzyme. Cellen van dezelfde donor werden blootgesteld aan 50 μM H₂O₂ op ijs, gedurende 5 minuten. Incubatie met de enzymebuffer alleen veranderde het niveau van DNA-schade niet. Niet-behandelde cellen van donor B vertoonden in verschillende experimenten ofwel geen endogene oxidatieve DNA-schade ofwel een kleine stijging na enzymedigestie (zowel voor TL, TD als TM).

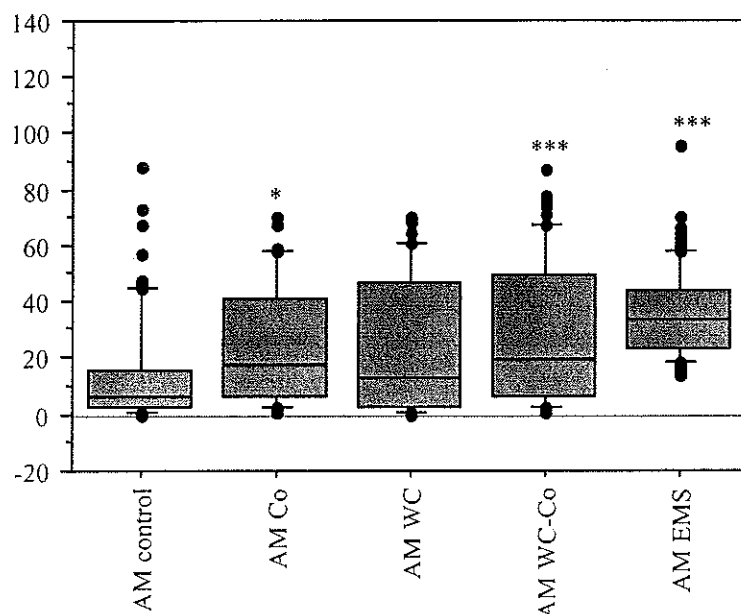
Figuur 11: SCGE: Oxidatieve DNA-schade in humane lymfocyten (donor B) blootgesteld aan Co, WC, WC-Co, EMS en H₂O₂ met en zonder verdere incubatie met het bacterieel repar enzym Fpg.



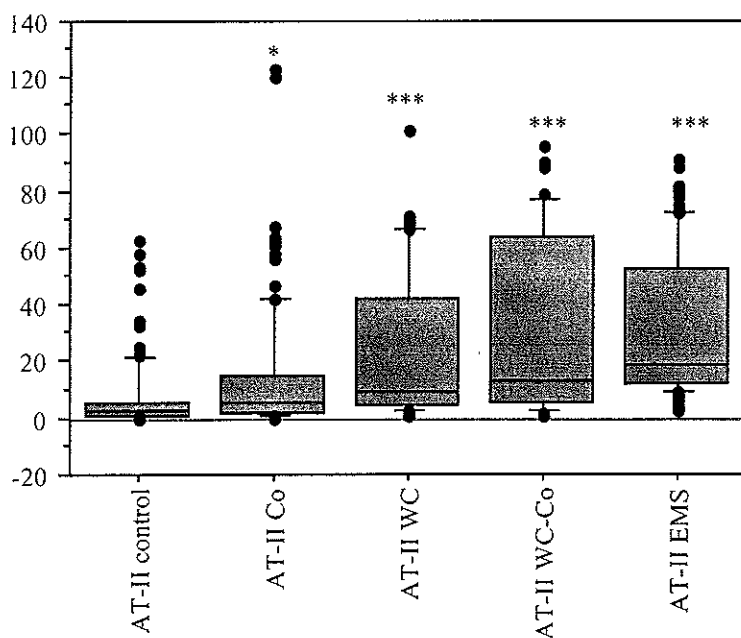
viii) Inductie van DNA schade door kobalt *in vitro* in primaire longcellen van de rat (VUB en KUL2)

Het DNA-brekende vermogen van Co, WC en WC-Co werd vergeleken in primaire longcellen van de rat, alveolaire macrofagen (AM) en type II epitheliale cellen (AT-II) met behulp van de alkaline comet assay. Gecultiveerde cellen werden blootgesteld aan de hard metaalpartikels in een concentratie van 6.0 µg/ml gedurende 15 minuten en aan het gekende clastogen EMS (ethylmethaansulfonaat) gedurende 2 uur, als positieve controle. WC-Co veroorzaakte de meeste schade in beide celtypes, zoals ook vastgesteld in menselijke lymfocyten. Opmerkelijk was dat WC alleen in de AT-II cellen een significante toename van DNA-migratie veroorzaakte en dit in tegenstelling tot de bevindingen van de menselijke lymfocyten. Bovendien werd voor alle verbindingen en in de twee celtypes een belangrijke intrastaal variatie opgemerkt.

Figuur 12: SCGE: Box plots voor tail moment (TM) bepaald in AM blootgesteld aan Co, WC en WC-Co (6.0 µg/ml Co-equivalent).
(***: $p \leq 0.0001$; *: $p \leq 0.01$, in vergelijking met controle).



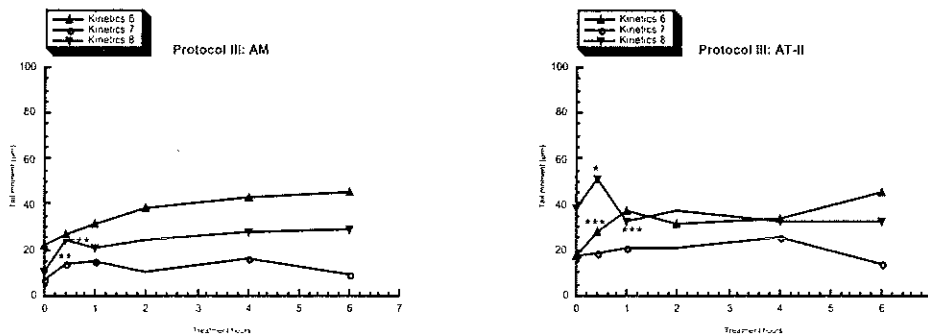
Figuur 13: SCGE: Box plots voor tail moment (TM) bepaald in AT-II blootgesteld aan Co, WC en WC-Co (6.0 µg/ml Co-equivalent).
(***: $p \leq 0.0001$; *: $p \leq 0.01$, in vergelijking met controle).



Om het tijdsafhankelijke karakter van de schade-inductie te analyseren werd een kinetiekstudie uitgevoerd. Celculturen werden behandeld met 6.0 µg/ml Co-equivalent van Co, WC en WC-Co gedurende 15 minuten, 1, 2, 4, 6 uur en met EMS (2 mM) gedurende 2 uur, als positieve controle. De celviabiliteit werd gecontroleerd door de Trypan Blue exclusie test en verminderde opmerkelijk met de tijd. In beide celtypes kon een kleine toename van DNA-schade vastgesteld worden van 15 minuten tot 1 uur, maar het schadeniveau bleef nadien nagenoeg constant. Het grootste verschil in respons tussen Co en WC-Co werd geobserveerd na 15 minuten blootstelling.

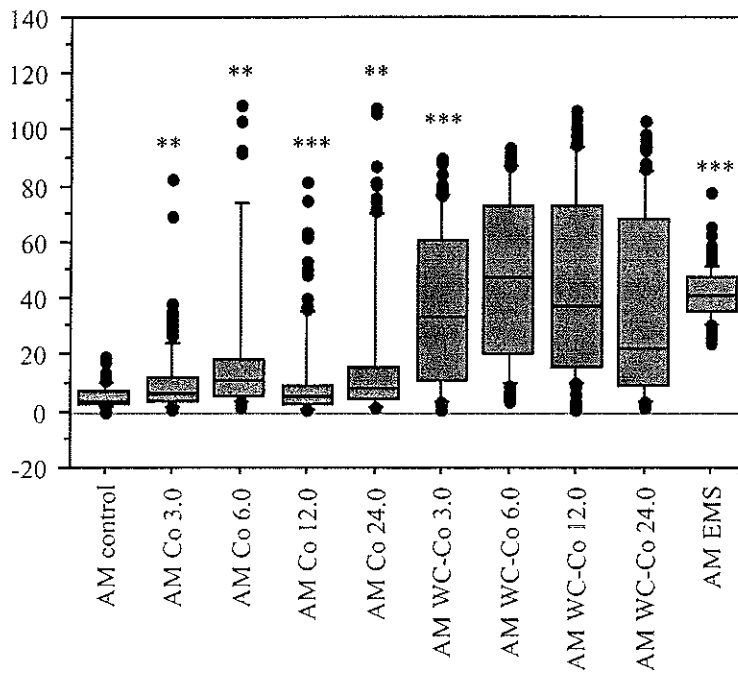
Figuur 14: SCGE: Tijdsafhankelijke inductie van DNA-schade in in AM en AT-II (kinetic 6: Co; kinetic 7: WC; kinetic 8: WC-Co).

***: $p \leq .0001$; **: $p \leq 0.001$; *: $p \leq 0.01$, in vergelijking met voorgaande behandelingstijd.

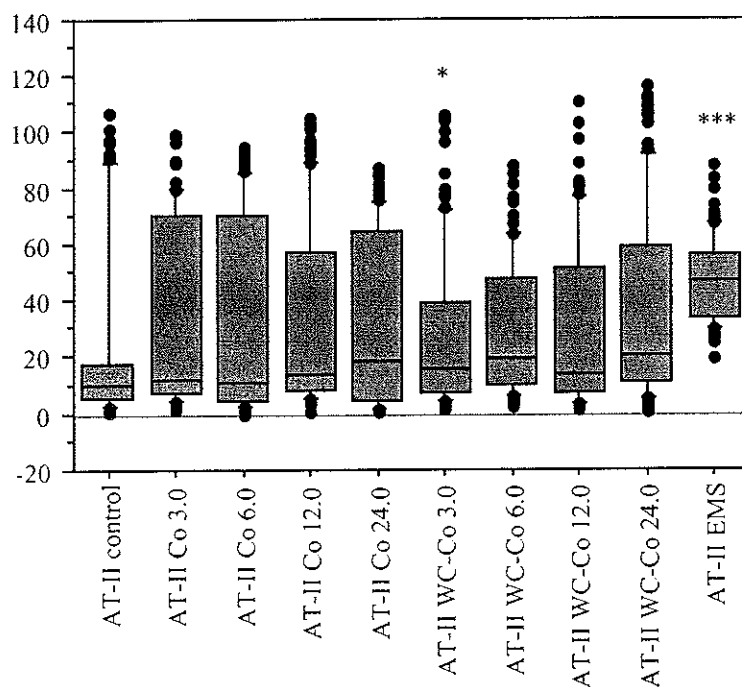


Vervolgens werd de dosisafhankelijkheid van de schade-inductie van Co en WC-Co nagegaan. Celculturen werden hiertoe blootgesteld aan Co en WC-Co in een concentratie van 3.0, 6.0, 12.0 en 24.0 µg/ml Co-equivalent gedurende 4 uur en aan EMS (2 mM) gedurende 2 uur. Zowel in de AM als in de AT-II cellen kon geen duidelijke dosis-responsrelatie waargenomen worden. Bovendien verhoogde de celsterfte opmerkelijk bij de hogere concentraties.

Figuur 15: SCGE: Dosis- respons: Box plots voor tail moment (TM) bepaald in AM na behandeling met Co en WC-Co.
(***: $p \leq 0.0001$; **: $p \leq 0.001$, in vergelijking met voorgaande dosis).

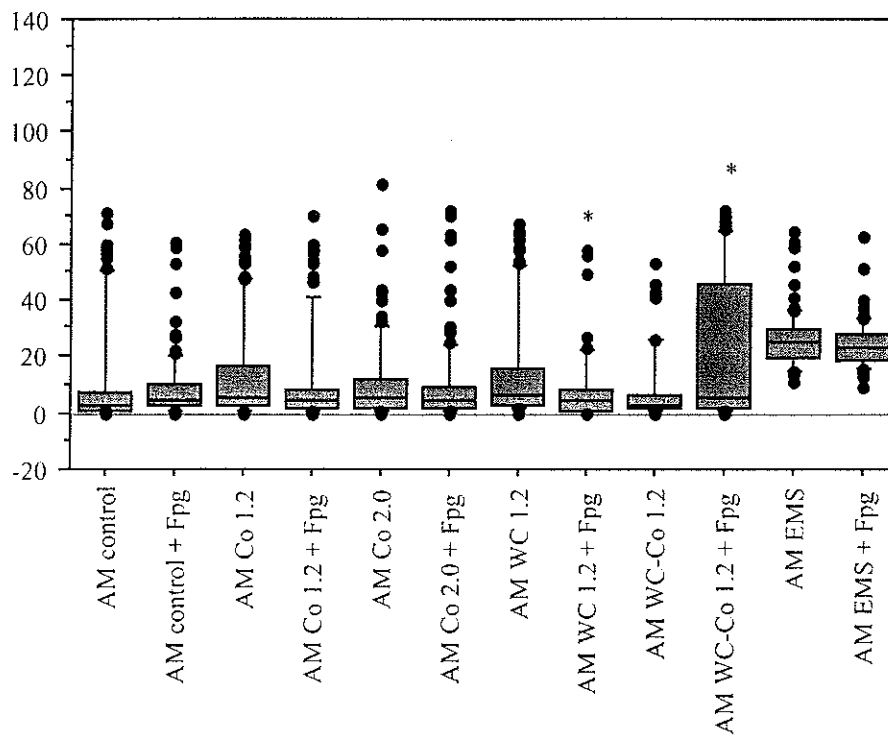


Figuur 16: SCGE: Dosis- respons: Box plots voor tail moment (TM) bepaald in AT-II na behandeling met Co en WC-Co.
(***: $p \leq 0.0001$; **: $p \leq 0.001$, in vergelijking met voorgaande dosis).

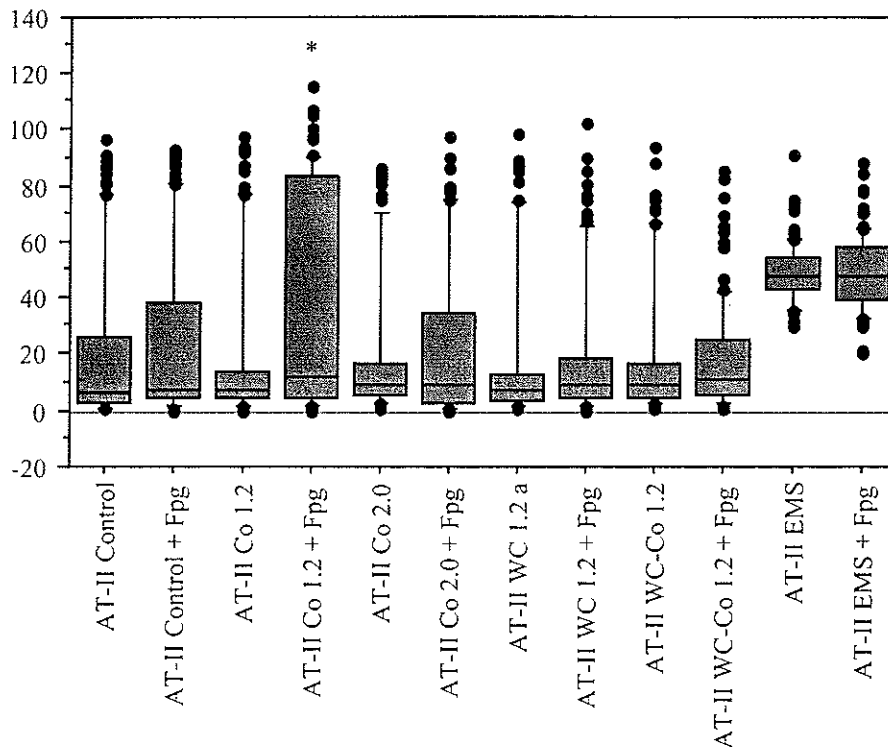


Om het aandeel van oxidatieve DNA-schade in de genotoxiciteit van kobaltverbindingen tegenover longcellen in te schatten werd gebruik gemaakt van de combinatie van de alkaline comet assay en het oxidatieve lesie-specifieke enzyme Fpg. Na behandeling van de cellen gedurende 20 uur met een lage concentratie van Co (1.2 en 2.0 $\mu\text{g/ml}$), WC (1.2 $\mu\text{g/ml}$) en WC-Co (1.2 $\mu\text{g/ml}$) werden de gelyseerde cellen geïncubeerd gedurende 30 minuten met Fpg dat onder andere 8-OHguanine herkent. Enkel in de AT-II cellen met 1.2 $\mu\text{g/ml}$ Co en in de AM met 1.2 $\mu\text{g/ml}$ WC-Co kon er oxidatieve DNA-schade gedetecteerd worden.

Figuur 17: SCGE: Oxidatieve schade: Box plots voor tail moments (TM) bepaald in AM na behandeling met Co en WC-Co.
(*: $p \leq 0.01$, in vergelijking met geen Fpg digestie).



Figuur 18: SCGE: Oxidatieve schade: Box plots voor tail moments (TM) bepaald in AT-II na behandeling met Co en WC-Co.
(*: $p \leq 0.01$, in vergelijking met geen Fpg digestie).



ix) Inhibitie van DNA-repair door kobalt *in vitro* in menselijke lymfocyten (VUB)

Co(II), in niet-cytotoxische dosissen, inhibeert de incisie- en polymerisatiestap van het herstel van UV-geïnduceerde DNA-schade, gemeten door de "alkaline unwinding" techniek in humane fibroblasten (Kasten et al., 1997).

Om de interferentie van metallisch kobalt met het herstel van primair geïnduceerde DNA-schade te evalueren in de comet assay, werden geïsoleerde en gestimuleerde lymfocyten (donor S) behandeld met methylmethaansulfonaat (MMS) in twee dosissen (2.2 en 5.5 $\mu\text{g/ml}$) gedurende 2 uur. MMS is een monofunctioneel alkylender agens dat gekend is om zijn clastogene eigenschappen. De behandelde cellen werden verder geïncubeerd gedurende 2 uur na wegwassen van de MMS, in afwezigheid (postincubatie) of aanwezigheid (postbehandeling) van 1.2 $\mu\text{g/ml}$ Co. Cellen die simultaan blootgesteld werden aan MMS en Co en Co-behandelde cellen werden eveneens inbegrepen. De Co-concentratie werd gekozen op basis van de dosis-respons experimenten, als zijnde een dosis die geen significante toename van de DNA-schade veroorzaakte. De resultaten van drie vergelijkbare experimenten worden samengevat in Tabel 1. MMS alleen heeft in de comet assay een duidelijk beschadigend effect op het DNA van humane lymfocyten; zowel de staartlengte, het percentage van DNA in de staart als het staartmoment nemen statistisch significant toe in vergelijking met de negatieve controle. Deze schade verminderde, maar was nog aanwezig wanneer MMS-behandelde cellen verder geïncubeerd werden gedurende 2 uur, na verwijdering van de MMS (postincubatie). Voor de laagste concentratie is de afname van geïnduceerde schade duidelijk behalve in experiment 3. Voor de hoogste concentratie is de afname van DNA-schade meer uitgesproken.

Postbehandeling met een niet-genotoxische concentratie Co van MMS-behandelde cellen induceerde verhoogde DNA-schadeniveau's in vergelijking met postincubatie. Ook hier was er een verschil in de respons tussen de hoogste en de laagste MMS-concentratie. Bij 2.2 µg/ml MMS waren de resultaten van de drie experimenten contradictorisch. Bij 5.5 µg/ml MMS was er een statistisch significante toename voor alle schadeparameters. De simultane blootstelling van lymfocyten aan 5.5 µg/ml MMS en 1.2 µg/ml Co veroorzaakte een significante toename van het % DNA in de staart en een significante afname van TL in vergelijking met MMS alleen. De gebruikte dosis van Co (1.2 µg/ml) veroorzaakte geen toename van de DNA-schade na 2 uur blootstelling, in vergelijking met de controle, in experiment 2. In experiment 3 waren de schadeniveau's significant hoger na Co-blootstelling.

Tabel : SCGE: Indirecte genotoxische effecten van kobaltverbindingen: Tail moment na MMS-behandeling (2.2 en 5.5 µg/ml) alleen en in combinatie met kobaltpartikels (1.2 µg/ml), postincubatie en postbehandeling met kobaltpartikels (1.2 µg/ml) en kobaltpartikels alleen in de alkaline comet assay met geïsoleerde humane lymfocyten.

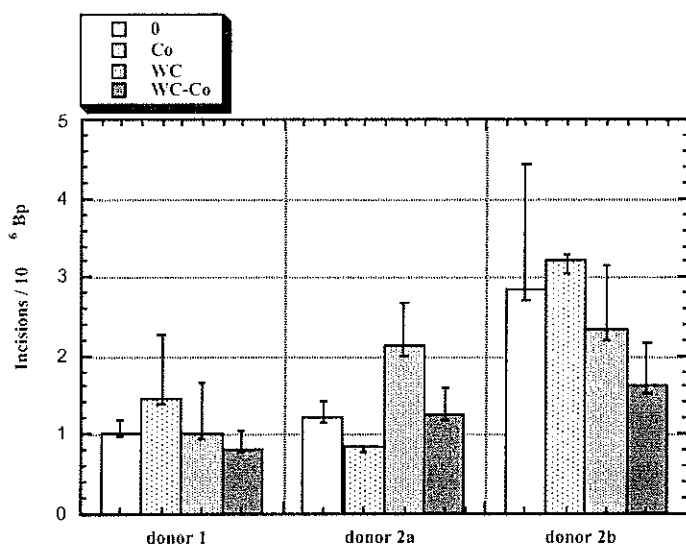
ND: not determined, SD: standaard deviatie, +: schadetoename, -: schade-afname, *: $P < 0.05$.

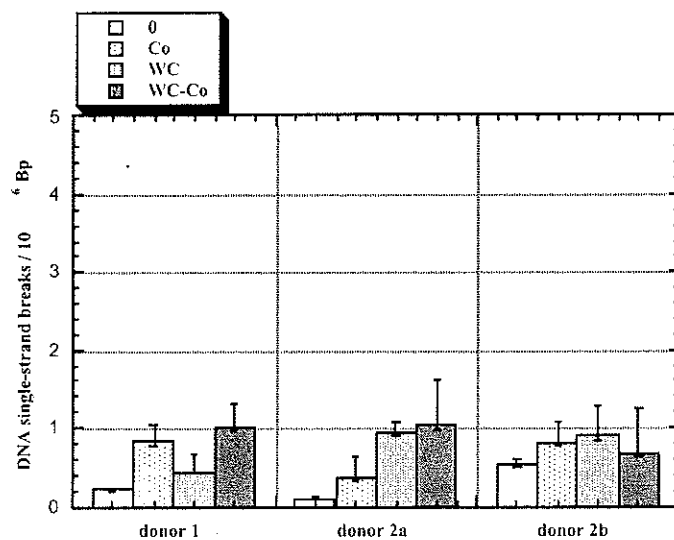
	Experimen t 1 (donor S)	Experimen t 2 (donor S)	Experimen t 3 (donor M)
Mean values ± SD	Tail moment (µm) ± SD	Tail moment (µm) ± SD	Tail moment (µm) ± SD
control	2.2 ± 3.3	6.3 ± 15.2	2.3 ± 2.3
1.2 µg/ml Co	ND	1.8 ± 2.0	4.3 ± 5.8
2.2 µg/ml MMS	12.5 ± 7.0	22.1 ± 19.6	4.5 ± 5.9
2.2 µg/ml MMS + postincubation	5.2 ± 5.0	13.9 ± 11.9	5.5 ± 10.0
2.2 µg/ml MMS + posttreatment 1.2 µg/ml Co	7.7 ± 5.5	12.9 ± 11.2	5.2 ± 6.2
2.2 µg/ml MMS + 1.2 µg/ml Co	ND	14.5 ± 8.5	3.7 ± 2.6
5.5 µg/ml MMS	23.4 ± 9.0	48.0 ± 16.6	6.1 ± 5.8
5.5 µg/ml MMS + postincubation	10.4 ± 6.8	34.3 ± 11.4	5.1 ± 6.3
5.5 µg/ml MMS + posttreatment 1.2 µg/ml Co	13.2 ± 6.0	51.0 ± 16.3	8.4 ± 11.6
5.5 µg/ml MMS + 1.2 µg/ml Co	ND	50.2 ± 8.5	7.1 ± 4.5
1.2 µg/ml Co vs control	ND	- *	+ *
2.2 µg/ml MMS vs control	+ *	+ *	+ *
2.2 µg/ml MMS + postincubation vs 2.2 µg/ml MMS	- *	- *	+
2.2 µg/ml MMS + posttreatment 1.2 µg/ml Co vs 2.2 µg/ml MMS + postincubation	+ *	- *	- *
2.2 µg/ml MMS + 1.2 µg/ml Co vs 2.2 µg/ml MMS	ND	-	-
5.5 µg/ml MMS vs control	+ *	+ *	+ *
5.5 µg/ml MMS + postincubation vs 5.5 µg/ml MMS	- *	- *	- *
5.5 µg/ml MMS + posttreatment 1.2 µg/ml Co vs 5.5 µg/ml MMS + postincubation	+ *	+ *	+ *
5.5 µg/ml MMS + 1.2 µg/ml Co vs 5.5 µg/ml MMS	ND	+	+ *

Om de studie van de interactie van kobaltverbindingen met DNA-herstelmechanismen verder te evalueren werden experimenten uitgevoerd met de alkaline unwinding techniek, onder begeleiding van Prof. Dr. Hartwig (Universiteit van Karlsruhe), een experte op gebied van metaalmutagenese. De bedoeling was te komen tot een stap voor stap analyse van de mogelijke inhibitie van nucleotide incisie repair (NER) door kobaltverbindingen in een niet-toxische concentratie. Hiertoe werden geïsoleerde lymfocyten gedurende 20 uur voorgeïncubeerd in de aan- of afwezigheid van kobaltverbindingen, UVC-bestraald en verder gecultiveerd in de aan- of afwezigheid van specifieke repairinhibitoren. De DNA-schade werd geanalyseerd door twee complementaire technieken, de alkaline comet en unwinding methoden. Het gebruik van de inhibitoren hydroxyureum en aphidicoline laat toe na te gaan welke stappen van NER geïnhibeerd worden. Hydroxyureum veroorzaakt een daling van de voorhandige nucleotidenpool en aphidicoline blokkeert DNA-polymerase. Zodoende wordt de polymerisatiestap van DNA-repair geïnhibeerd en treedt er accumulatie van open repair patches op. Het aantal breuken op een bepaald moment reflecteert dan het aantal incisies die plaatsvonden.

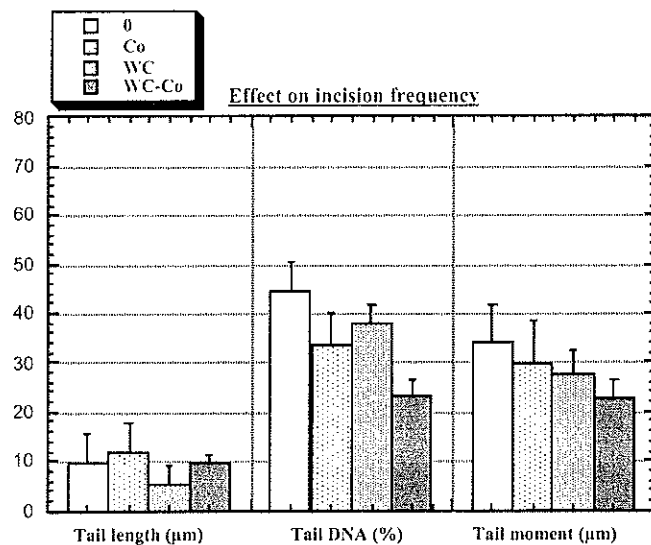
Wanneer de DNA beschadigende effecten en de repairinhibitie door kobaltverbindingen vergeleken worden voor beide technieken, werden volgende overeenkomsten bekomen: i) WC-Co heeft een sterker inhiberend effect op de incisiestap dan Co en WC alleen; ii) WC heeft een laag inhiberend effect op de incisiestap, maar sterker dan Co alleen. Tegenstrijdigheden werden echter vastgesteld op niveau van de bestudeerde repairstappen: Co heeft een inhiberend effect (Comet) of niet (AU) op de incisiestap; alle verbindingen inhiberen (AU) of niet (Comet) ter hoogte van de polymerisatie van NER.

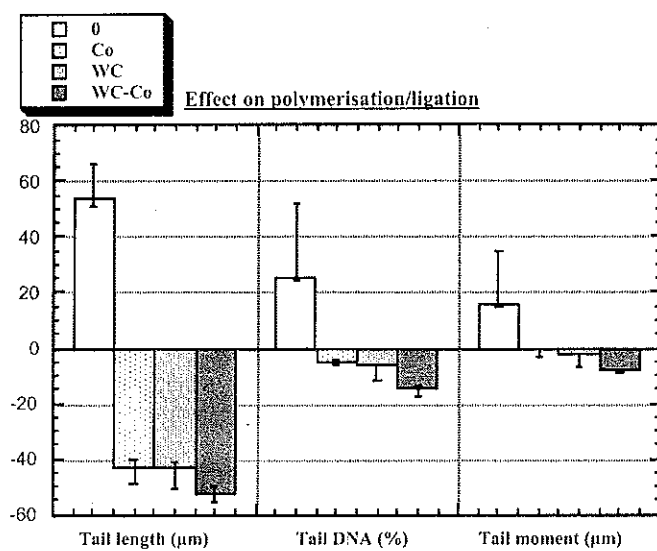
Figuur 19: AU: Effect van Co, WC en WC-Co op nucleotide excisie repair na UV-behandeling van geïsoleerde menselijke lymfocyten.





Figuur 20: SCGE: Effect van Co, WC en WC-Co op nucleotide excisie repair na UV-behandeling van geïsoleerde menselijke lymfocyten.





b) Epoxide-vormende carcinogenen

i) In vitro experimenten (KUL1)

1. Eliminatieconstanten

De snelheidsconstanten voor de eliminatie van de 3 epoxides en de corresponderende halfwaardetijden in bloed op 37°C zijn gegeven in tabel 1. De halfwaardetijden voor SO in bloed van muizen en ratten zijn gelijkaardig (20-22 min). De eliminatie uit menselijk bloed gebeurt echter tweemaal trager en was bovendien duidelijk afhankelijk van de startconcentratie. De eliminatieconstanten worden ook meer in detail besproken in bijlage I en III.

Tabel 1 : Eliminatieconstanten en halfwaardetijden voor de 3 epoxides

agens	species	startconcentratie (μM)	k_e (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
EO	mens	328	0.20	3.5
PO	mens	30	0.05	13.6
SO	mens	30-40	0.99	0.70
	mens	30000	0.11	6.4
	muis	30	2.13	0.33
	rat	30	1.90	0.36

2. Tweede-orde snelheidsconstanten voor de 3 epoxides met N-terminaal valine en N-7-guanine

Na bepaling van de regressie (γ) van de adductvorming in functie van de startconcentratie epoxide en na invulling van de concentraties hemoglobine en DNA (uit de literatuur) in de vergelijking gegeven in punt III.1.1 kunnen de tweede-orde snelheidsconstanten berekend worden. Deze constanten voor de reacties van de 3 epoxides met N-terminaal valine en N-7-guanine zijn gegeven in tabel 2.

Tabel 2 : Tweede-orde reactiesnelheidsconstanten $[(\text{M Hb})^{-1} \text{ of } (\text{DNA nucleotide})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}]$ voor de 3 epoxides in menselijk bloed

agens	β_{Hb}^a	$k_{\text{EpoX-Hb}}$	β_{DNA}^b	$k_{\text{EpoX-DNA}}$
EO	$12 \cdot 10^{-3}$	2.7	$2.6 \cdot 10^{-6}$	$16 \cdot 10^{-3}$
PO	$4.5 \cdot 10^{-3}$	1.0	$0.60 \cdot 10^{-6}$	$5.1 \cdot 10^{-3}$
SO	$3.5 \cdot 10^{-3}$	1.5^c	$0.13 \cdot 10^{-6}$	$0.71 \cdot 10^{-3d}$

^a β_{Hb} is de richtingscoëfficiënt (μM adduct/ μM epoxide) van de dosis-adduct relatie (lineair tussen 0 en 1000 μM epoxide en door de oorsprong)

^b β_{DNA} is de richtingscoëfficiënt (μM adduct/ M epoxide) van de dosis-adduct relatie (lineair tussen 0-10 mM voor EO, tussen 0-11 mM voor PO en tussen 0-240 mM voor SO ; door de oorsprong)

^cAls eliminatieconstante werd $k_e=0.78\text{h}^{-1}$, gebruikt voor een initiële concentratie SO van 40 μM

^dAls eliminatieconstante werd $k_e=0.11\text{h}^{-1}$, gebruikt voor een initiële concentratie SO van 30 mM

Zowel N-terminaal valine en N-7-guanine vertoonden de hoogste reactiviteit t.o.v. EO. De laagste reactiviteit voor N-terminaal valine werd gezien voor PO, terwijl N-7-guanine de laagste reactiviteit vertoonde ten opzichte van SO.

3. Tweede-orde snelheidscontanten voor de reactie van cysteïne, N-terminaal valine en de carboxyluiteinden in hemoglobine met SO

Schattingen van deze tweede-orde snelheidsconstanten zijn gegeven in tabel 3. De snelheidsconstanten voor de vorming van cysteïne-adducten (α of β -adduct naargelang de reactie optreedt met de α of β -koolstof van SO) vertoonden grote interspeciesverschillen. De reactie met N-terminaal valine en de carboxylresidu's, daarentegen waren meer vergelijkbaar. Desondanks waren alle interspeciesverschillen statistisch significant, met uitzondering van het verschil in carboxyladduct in muis versus rat ($p = 0.14$). Ook de intraspeciesverschillen waren significant met uitzondering van β -cysteïne versus carboxyl in de muis ($p = 0.35$) en α -cysteïne versus N-terminaal valine bij de mens ($p = 0.19$).

Tabel 3 : Tweede-orde snelheidsconstante voor de reactie van SO met cysteïne, N-terminaal valine en de carboxylresidu's in hemoglobine uit bloed van de mens, de muis en de rat.

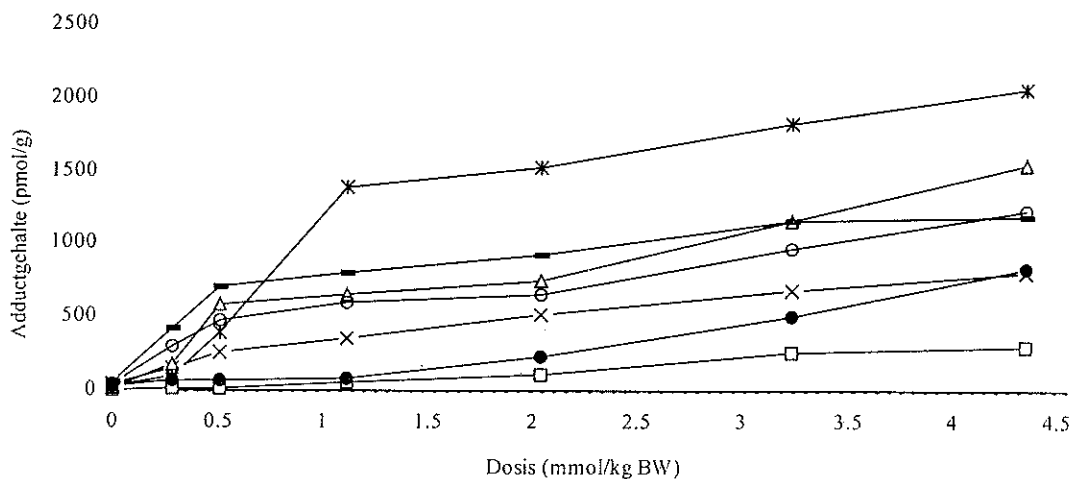
	geschatte snelheidsconstante [(M Hb·h) ⁻¹]			
	$k_{SO-\alpha-cys}^a$ (SE)	$k_{SO-\beta-cys}^a$ (SE)	k_{SO-val} (SE)	$k_{SO-COOH}^a$ (SE)
mens	2.04 (0.19)	0.078 (0.010)	1.82 (0.16)	3.55 (0.32)
muis	10.7 (2.0)	2.16 (0.39)	0.80 (0.13)	1.94 (0.39)
rat	133 (5.8)	20.4 (1.3)	0.29 (0.017)	2.37 (0.094)

^a De cysteïne en COOH-adductbepaling werd uitgevoerd door de onderzoeksgroep van Stephen Rappaport, School for Public Health, University of North Carolina, USA

ii) Dierexperimenten (KUL1)

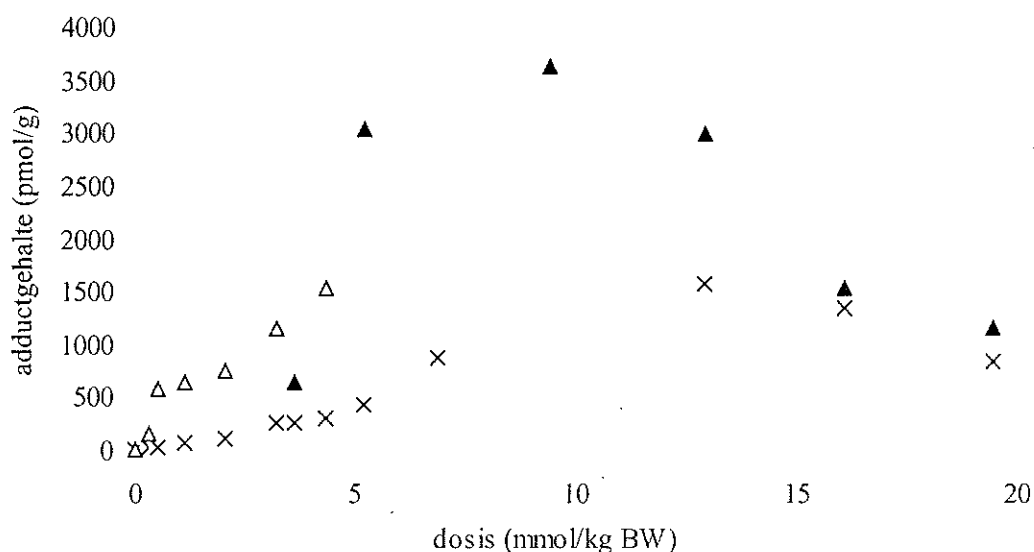
1. Adductvorming in muizen geïnjecteerd met styreen

In de lage dosis-range werd voor alle adducten een duidelijke dosis-adduct relatie geobserveerd (figuur 21).



Figuur 21 : Dosis -adduct curve voor hemoglobine (), 7-alkylguanine/O⁶ guanine adductvorming door SO in long (+)/(o), lever (Δ)/(x) en milt (-)/(●) in muizen 3 h na i.p. injectie van styreendosissen tussen 0 en 4.35 mmol styreen /kg lichaamsgewicht (BW).

In deze dosis-range is de adductvorming aan N-terminaal valine en O⁶-guanine lineair gecorreleerd met de toegediende dosis. De vorming van O⁶-adducten in lever en long en van alle N-7-guanine-adducten vertoont een verzadiging bij hogere dosissen. Dit wordt reeds opgemerkt vanaf 0.5 mmol/kg lichaamsgewicht, met uitzondering van N-7-adducten in de long, waarvoor de verzadiging pas gezien wordt vanaf 1 mmol/kg lichaamsgewicht.



Figuur 22 : Dosis-respons curve voor adductvorming aan hemoglobine (x) en N-7-guanine bepaald met ^{32}P -postlabelling (Δ) of met HPLC-UV ($\blacktriangle$) in de lever van muizen 3 h na i.p. injectie met styreen.

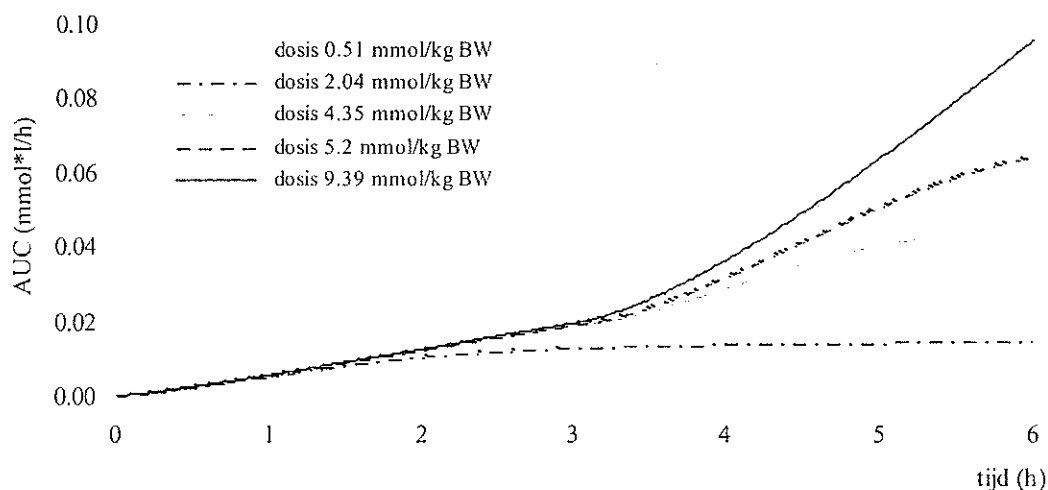
Een vergelijking van de adductvorming ter hoogte van N-terminaal valine en N-7-guanine in de lever over de volledige dosis-range wordt gegeven in figuur 22. De dosis-respons relatie voor de adductvorming aan hemoglobine vertoont slechts kleine afwijkingen ten opzichte van de lineariteit voor geïnjecteerde hoeveelheden tot 3.61 mmol/kg lichaamsgewicht. Zowel de adductvorming ter hoogte van N-terminaal valine als van N-7-guanine bereikt een maximum op ongeveer 10 mmol/kg lichaamsgewicht. Het verloop van de dosis-adduct relatie voor N-7-guanine is echter lichtjes verschillend. Voor hemoglobine-adducten is de dosis-respons relatie lineair tot een geïnjecteerde dosis van 3.61 mmol/kg lichaamsgewicht. De adductvorming aan N-7-guanine lijkt tussen 0.51 en 1.12 mmol/kg lichaamsgewicht (of tot 3.61 mmol/kg lichaamsgewicht als de HPLC-UV waarde in rekening wordt gebracht) te stagneren. Zowel voor de adductvorming aan N-terminaal valine als aan N-7-guanine werd een exponentiële toename van de hoeveelheid adduct gezien ongeveer tussen de 3.5 en de 10 mmol/kg lichaamsgewicht.

Bij zeer hoge dosissen, i.e. boven 10 mmol/kg lichaamsgewicht, werd geen verdere toename van de adductvorming aan hemoglobine en DNA geobserveerd. Dit kan verklaard worden door het feit dat bij muizen, geïnjecteerd met dergelijke dosissen, al snel na de ip injectie een circulatory collaps optrad.

Bij de 3 hoogste concentraties werd zelfs een afname in de hoeveelheid gevormd adduct gezien. Het bijna onmiddellijke verlies van het bewustzijn bij injectie van 19.45 mmol/kg lichaamsgewicht kan de verdere daling van het adductgehalte bij de hoogste dosis verklaren.

2. Toepassing van het PBPK model

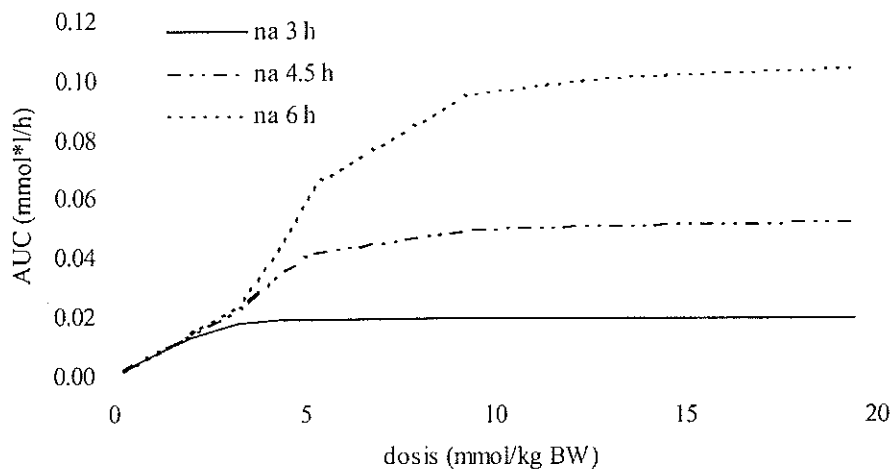
De toepassing van het Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) model zoals beschreven door Csanady *et al.* (1994) op de hoeveelheden i.p. geïnjecteerd styreen in dit experiment, toont aan dat alleen voor de allerlaagste dosissen (0 - 0.51 mmol/kg lichaamsgewicht) in dit experiment na 3 h alle styreen was omgezet in SO (figuur 23). Daaruit volgt dat het collecteren van bloed en lever na 3 h, zoals het gedaan werd in dit experiment, resulteert in een niet-lineaire stijging van de Area Under the Curve (AUC) voor SO (figuur 24).



Figuur 23: Area under the curve (AUC) voor de vorming van SO in functie van de tijd na i.p. toediening van verschillende dosissen styreen. Deze resultaten werden bekomen door toepassing van het PBPK-model van Csanady *et al.* (1994).

Een andere interessante observatie die kan afgeleid worden uit figuur 23 is de plotse verandering in de vorm van de dosis-AUC-curve tussen 3 en 4 h na ip injectie. Deze stijging van de AUC op dit punt wordt verklaard door depletie van glutathion, noodzakelijk voor de detoxificatie van het epoxide via de glutathion S-transferase pathway.

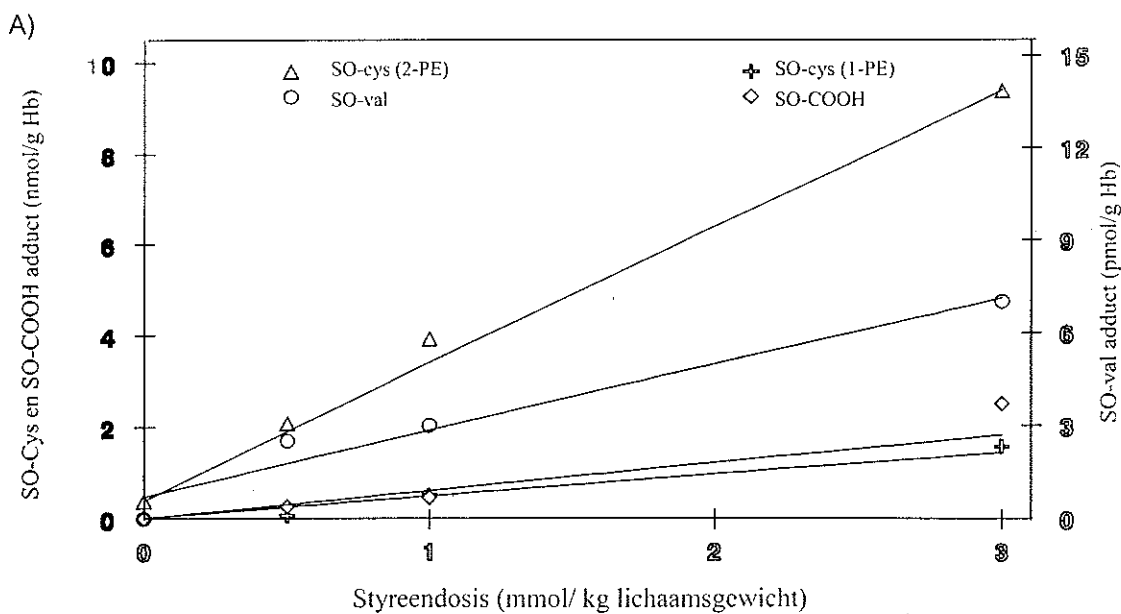
De invloed van dit fenomeen op de dosis-AUC curve op verschillende tijdstippen na ip injectie wordt voorgesteld in figuur 24. De afvlakking van de dosis-AUC relatie, vanaf 4 mmol/kg lichaamsgewicht, bij stijgende dosis komt overeen met de dosis-adduct relatie voor de meeste DNA adducten in de lage dosis range (figuur 21).

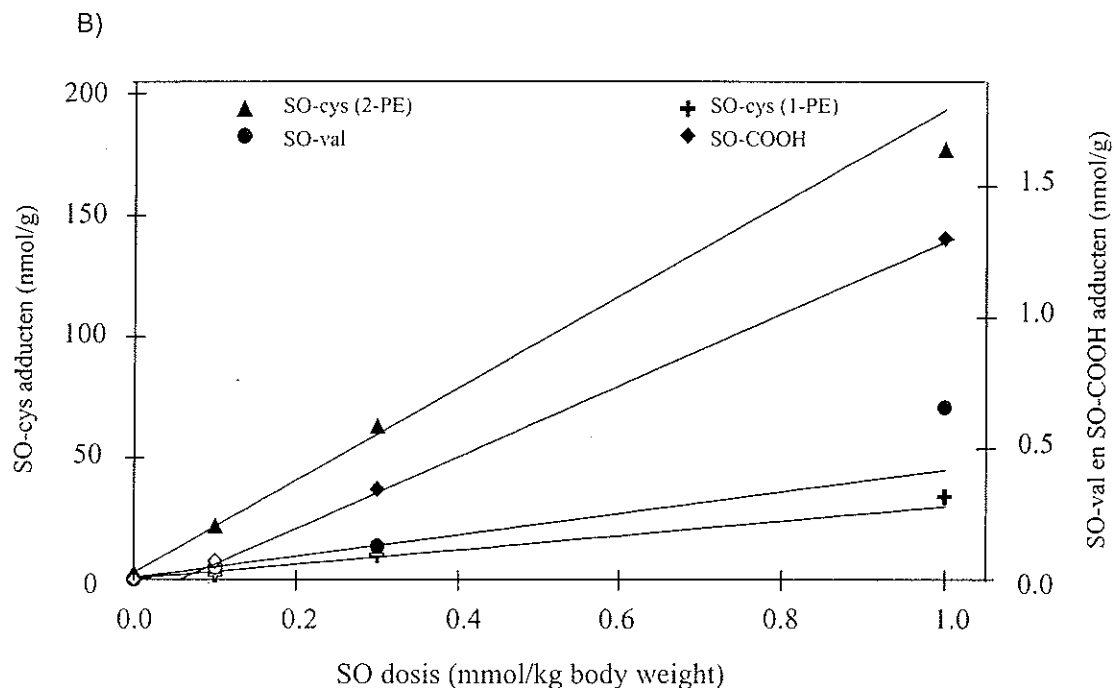


Figuur 24 : Relatie tussen de area under the curve (AUC) voor SO-vorming en de geïnjecteerde dosis op verschillende tijdstippen na ip injectie. De resultaten werden bekomen door toepassing van het PBPK-model van Csanady et al. (1994).

De vorming van plaatsspecifieke hemoglobine-adducten werd ook onderzocht in Sprague-Dawley ratten waaraan intraperitoneaal 0.5 - 3.0 mmol styreen/kg lichaamsgewicht of 0.1 - 1.0 mmol SO/kg lichaamsgewicht toegediend werd. De adductvorming is weergegeven in figuur 25.

3. Adductvorming in ratten geïnjecteerd met styreen en SO





Figuur 25: Vorming van hemoglobine-adducten na intraperitoneale toediening van (A) styreen en (B) SO aan Sprague-Dawley ratten. Analyse van SO-adducten aan cysteine (2-PE; α -adduct en 1-PE; β -adduct) N-terminaal valine en carboxylresidu's. Bloed werd geïncubeerd 24 h na injectie. Bemerkt de verschillende assen. De N-terminaal valine adductvorming in ratten waaraan styreen toegediend werd, moeten met de nodige voorzichtigheid geïnterpreteerd worden. De meeste punten liggen immers op of onder de detectielimiet (10 pmol/g).

iii) N-terminaal valine-adducten door ethyleenoxide (EO) bij arbeiders (KUL1)

In tabel 4 zijn de leeftijd, het rookgedrag, de jobcategorie, de blootstelling aan EO en de adductgehalten van de 18 werknemers uit het sterilisatiebedrijf weergegeven.

Tabel 4 : Leeftijd, rookgedrag, jobcategorie (operator/niet-operator), blootstelling aan EO en adductgehalten van de sterilisatie-arbeiders.

leeftijd	rookgedrag (sigaretten/dag)	jobcategorie	blootstelling aan EO (ppm)	N-(2-hydroxyethyl) valine (pmol/g Hb)	N-(2- hydroxypropyl) valine (pmol/g Hb)
28	neen	niet-operator	1.7	1475	1.7
37	neen	niet-operator	0.4	7397	1.0
31	ja (2)	operator	2.4	14934	1.4
33	ja (10)	operator	0.8	7916	1.5
44	neen	niet-operator	0.6	5316	1.2
41	neen	operator	n.d. ^a	5259	1.2
25	ja (6)	operator	-	10663	2.3
25	neen	operator	0.9	5691	1.4
25	ja (8)	niet-operator	0.8	786	2.5
37	neen	operator	0.5 ^b	4997	1.8
33	neen	niet-operator	1.3 ^b	3198	1.9
30	ja (17)	niet-operator	-	3817	2.7
26	neen	operator	-	7443	2.0
24	neen	niet-operator	0.7 ^c	888	1.0
27	neen	niet-operator	-	1495	2.3
42	ja (6)	operator	1.2	12521	2.0
27	ja (3)	niet-operator	0.7	2449	2.2
28	neen	operator	-	9825	1.2

- : niet bepaald

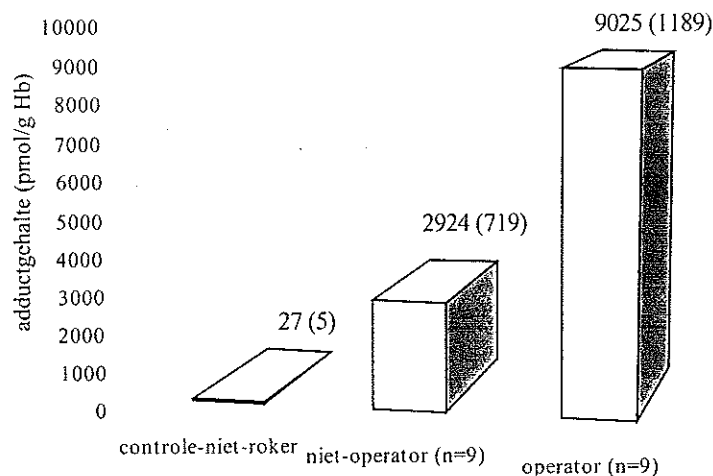
^an.d. : niet detecteerbaar

^bgemiddelde van 2 metingen

^cde eerste meting was een outlier, alleen de tweede meting werd behouden

De toename in N-terminaal valine adduct ten gevolge van blootstelling aan 1 ppm EO (Time Weighted Average, TWA), 8h/dag, kan via een statistisch model geschat worden op 3163 pmol/g Hb (SE : 1926 pmol/g Hb). In dit model werden de woonplaats ($p = 0.065$) als effect en de blootstelling ($p = 0.042$) als covariabele opgenomen. De variatie verbonden zowel aan het passief als het actief rookgedrag was te laag om significant te zijn in deze studiegroep. De gemiddelde adductgehalten in beide jobcategorieën worden vergeleken met een controle-niet-roker uit de polypropyleenfabriek (figuur 26).

De arbeiders uit de polypropyleenfabriek hadden een achtergrondwaarde voor EO-adduct van 27 pmol/g Hb (SE : 5 pmol/g Hb) voor de niet-rokers ($n=24$). Het roken van 10 sigaretten per dag resulteerde in een toename met 100 pmol/g Hb (SE : 20 pmol/g Hb). De invloed van de woonplaats (+17 pmol/g Hb voor mensen die in de stad wonen) en passief roken (+ 5 pmol/g Hb) waren te klein om significant te zijn in deze ($n=36$) studiegroep.



Figuur 26 : Gemiddeld N-(2-hydroxyethyl)valine gehalte (SE) in beide jobcategorieën van de sterilisatiefabriek vergeleken met het achtergrondniveau (gecorrigeerd voor roken) in de polypropyleenfabriek.

Het verschil tussen de 3 groepen was zeer significant ($p < 0.001$).

iv) N-terminaal valine-adducten door propyleenoxide (PO) bij arbeiders (KUL1)

Voor de analyse van N-terminaal valine-adducten van PO werden de arbeiders ($n=18$) van het bedrijf waar medisch materiaal gesteriliseerd werd opgenomen in de analyse. De verdeling van N-(2-hydroxypropyl)valine gehaltes over de 2 groepen week niet af van de normale verdeling (Kolmogorov-Smirnov-test niet significant). De invloed van verschillende parameters op het adductgehalte is weergegeven in tabel 5.

De arbeiders in de polypropyleenfabriek hadden significant hogere PO-adduct gehaltes dan die in het sterilisatiebedrijf (2.4 vs 1.8 pmol/g Hb). Ook het aantal sigaretten dat per dag gerookt werd had een significante invloed op de adductvorming ($p=0.004$; 0.04 pmol/g Hb per 10 sigaretten/dag). De invloed van de leeftijd (-0.017 pmol/g Hb/jaar) was ook significant ($p=0.05$), terwijl woonplaats en passief roken geen significante invloed vertoonden. Ook de invloed van de biometrische parameters, lengte en gewicht op het adductgehalte was niet significant.

Tabel 5 : Invloed van het bedrijf, woonplaats en het al dan niet passief roken op het gehalte N-(2-hydroxypropyl)valine. Het aantal sigaretten/dag werd in het model opgenomen als covariabele en was zeer significant ($p=0.004$)

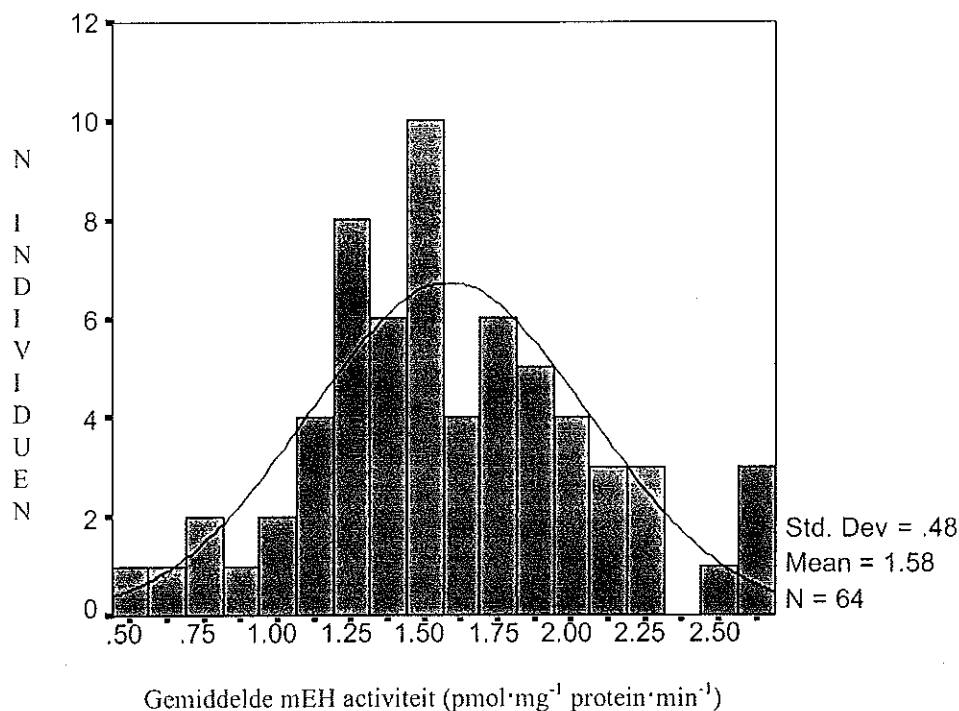
variabele	beschrijving	aantal	adductgehalte ($\pm$ SE) (pmol/g Hb)	p-waarde
bedrijf	sterilisatie	n=18	1.8 ($\pm$ 0.1)	$p < 0.001$
	polypropyleen	n=36	2.4 ($\pm$ 0.1)	
woonplaats	stad	n=11	2.0 ($\pm$ 0.2)	$p=0.7$
	platteland	n=43	2.2 ($\pm$ 0.1)	
passief roken	ja	n=10	2.3 ($\pm$ 0.2)	$p=0.6$
	nee	n=44	2.1 ($\pm$ 0.1)	

v) **Microsomaal epoxide hydrolase-arbeidersgroep (KUL1)**

De verdeling van de microsomaal epoxide hydrolase-activiteit is weergegeven in figuur 27. Als gemiddelde epoxide hydrolase activiteit voor de 64 onderzochte bloedstalen werd een waarde van $1.58 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteïne}$ (range $0.54 - 2.68 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteïne}$) bekomen. De variatiecoëfficiënt tussen 3 onafhankelijke bepalingen bedraagt 13.6 %. De interindividuele variatie blijft beperkt tot een factor 5, daar waar in de literatuur gesproken wordt van een 40 tot 70-voudige variatie in activiteit van het epoxide hydrolase enzyme. De microsomaal epoxide hydrolase-activiteit was normaal verdeeld in de studiegroep. De Kolmogorov-Smirnov test was niet significant ($p=0.200$).

De Pearson correlatie tussen microsomaal epoxide hydrolase-activiteit en zowel de vroegere styreenblootstelling als de alcoholconsumptie waren niet significant.

Alhoewel ook de correlatie met de leeftijd niet significant was ($p=0.166$), werd toch een trend gezien naar een lagere activiteit bij oudere personen ($r=-0.18$). Uit een covariantiemodel met de leeftijd als covariabele bleek de rokers een significant lagere activiteit hadden dan niet-rokers ($p=0.019$). Er werd geen relatie gevonden tussen de enzyme-activiteit en neurologische klachten, maar er werd wel een significant verlaagde visuomotor performantie gezien bij een grotere microsomaal epoxide hydrolase-activiteit (Viaene, 1998).



Figuur 27 : Frequentieverdeling van de microsomaal epoxide hydrolase-activiteit (mEH) ($\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteïne} \cdot \text{min}^{-1}$) in een groep van 64 ex-styreen arbeiders.

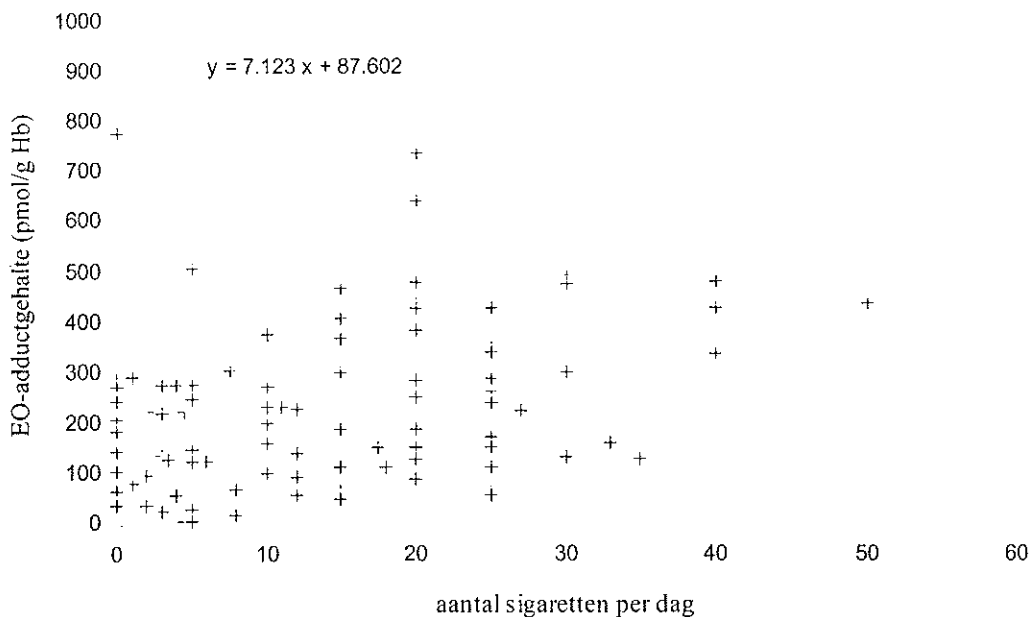
iv) GST-arbeidersgroep (KUL1)

1. N-terminaal valine-adducten

In totaal konden bij 337 van de werknemers adductgehalten door EO (gemiddelde 139 pmol/g Hb; range 0-1249 pmol/g Hb), PO (gemiddelde 3 pmol/g Hb; range 0.3-32 pmol/g Hb) en SO (<10 pmol/g Hb = detectielimiet) bepaald worden. In de subgroep van de nagekomen stalen werden iets lagere adductgehalten voor EO (gemiddelde 108 pmol/g Hb; range 0-475 pmol/g Hb) en PO (gemiddelde 2.5 pmol/g Hb; range 0.5-4.7 pmol/g Hb) opgetekend.

Om de relatie tussen het aantal gerookte sigaretten per dag en de EO-adductvorming te bestuderen werden een aantal outliers van analyse uitgesloten. Het betrof hier enerzijds 3 extreem hoge waarden (1012 pmol/g Hb en 1017 pmol/g Hb voor 2 rokers van 20 sigaretten per dag en 1249 pmol/g Hb voor een roker 15 sigaretten per dag), mogelijk ten gevolge van andere blootstellingen dan roken. Eventuele beroepsblootstellingen zijn niet uitgesloten, maar konden zoals aangegeven niet afgeleid worden uit de (vage) jobomschrijving.

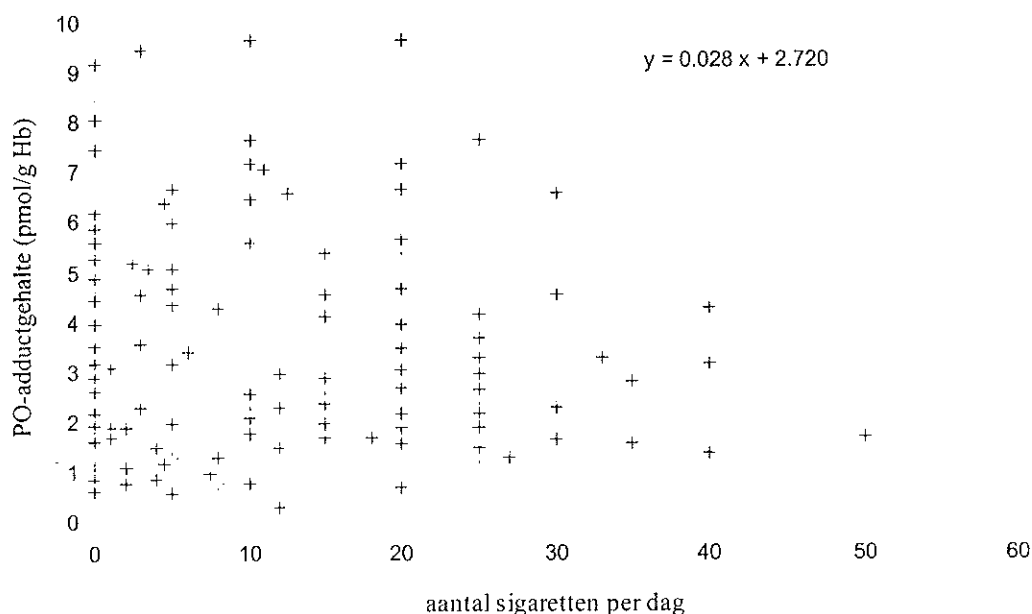
Anderzijds werden ook 2 extreem lage waarden geobserveerd in relatie tot het gerookte aantal sigaretten (157 pmol/g Hb voor een roker van 75 sigaretten/dag en 272 pmol/g Hb voor iemand die volgens de enquête 80 cigarillos per dag rookte). Mogelijk zijn deze het gevolg van onzorgvuldigheden bij het invullen van de enquête.



Figuur 28 : Relatie tussen het per dag gerookte aantal sigaretten en de vorming van ethyleenoxide adducten aan N-terminaal valine in hemoglobine (n=314).

In figuur 28 wordt dan de relatie weergegeven tussen het roken van sigaretten en de vorming van N-terminaal valine-adducten door EO weergegeven bij 314 arbeiders. Er werd een achtergrondwaarde van 88 pmol/g Hb gemeten, terwijl de toename 71 pmol/g Hb per 10 sigaretten ($P < 0.001$) per dag bedroeg.

Bij PO-adducten werd slechts een outlier (13 pmol/g Hb) van verdere analyse uitgesloten. Het resultaat van de regressieanalyse in functie van het gerookte aantal sigaretten per dag wordt weergegeven in figuur 29. De toename voor het roken van 10 sigaretten per dag bedroeg 0.3 pmol/g Hb ($P=0.003$).



Figuur 29 : Relatie tussen het per dag gerookte aantal sigaretten en de vorming van propyleenoxide adducten aan N-terminaal valine in hemoglobine (n=317). Alle waarden voor N-terminaal valine adducten door SO lagen onder de detectielimiet van 10 pmol/g Hb. De detectielimiet ligt relatief hoog ten opzichte van de andere adducten door de noodzakelijke correctie, door te voeren omwille van interferentie met de interne standaard.

2. GSTM1 en GSTT1-genotype op de adductvorming

Bij 301 werknemers werd het GSTM1-genotype bepaald. Hiervan bleken 174 (58 %) deficiënt te zijn voor dit allel. Het GSTT1-genotype kon bij 309 arbeiders bepaald worden. 138 (45%) onder hen bleken GSTT1-negatief te zijn.

Uiteindelijk waren 264 datasets bruikbaar om de invloed van de GST-genotypes op de N-terminaal valine-adductvorming (veroorzaakt door het roken van sigaretten) te bestuderen. De invloed van de GST-genotypes werd geëvalueerd in een General Linear Model (GLM) waarin het gerookte aantal sigaretten als covariabele meegenomen werd. In eerste instantie werden ook het bedrijf en het alcoholgebruik als mogelijke bronnen van variatie opgenomen. Deze waren echter niet significant en werden daarom in de uiteindelijke analyse weggelaten. In het bijzonder de interactie tussen het aantal gerookte sigaretten per dag en het genotype zijn van groot belang aangezien zij een indicatie geven van in welke mate het genotype de hoeveelheid gevormd adduct beïnvloedt.

Uit de analyse bleek dat de toename van het EO-adduct door roken inderdaad beïnvloed werd door de GST-genotypes. Deficiëntie in GSTM1 zorgt voor een langzamere toename in EO-adduct i.f.v. het aantal gerookte sigaretten per dag (56 pmol/g Hb i.p.v. 69 pmol/g Hb voor het roken van 10 sigaretten per dag). Het verschil was echter niet statistisch significant ($p=0.29$). De invloed van het GSTT1-genotype was wel significant ($p<0.05$). Deficiëntie in GSTT1 zorgt voor een 30% snellere toename in EO-adduct door roken (87 pmol/g Hb per 10 sigaretten/dag i.p.v. 69 pmol/g Hb). Een herhaling van deze analyse op de subgroep nagekomen stalen ($n=41$) toont zelfs nog een meer uitgesproken invloed van de GST-genotypes.

Deficiëntie in GSTM1 zorgt opnieuw voor een afname van de adductvorming (26 pmol/g Hb per 10 sig/dag i.p.v. 66 pmol/g Hb; $p=0.054$), terwijl deficiëntie in GSTT1 zorgt voor een toename in de adductvorming (113 pmol/g Hb per 10 sig/dag i.p.v. 66 pmol/g Hb; $p=0.07$).

Dezelfde analyse werd uitgevoerd voor PO-adductvorming. Enkel roken (0.3 pmol/g Hb per 10 sigaretten per dag; $p=0.024$) had een significante invloed op de gevormde hoeveelheid adduct. De interactie met de verschillende genotype-combinaties was niet significant ($P>0.15$). De spreiding op de achtergrondwaarde 2.7 pmol/g Hb (SE 0.12) is echter relatief klein wat het moeilijk maakt om eventuele verschillen aan te tonen.

v) Identification et dosage sur la molécule d'adduit standard (ULg)

Analyse GC/MS de l'adduit 7-(2-hydroxyethyl) guanine 7HEG.

Le passage des constituants de l'ADN (bases, nucléosides, nucléotides modifiés ou non) en chromatographie gazeuse nécessite une dérivation préalable du composé (remplacement des hydrogènes du composés par un groupement chimique caractéristique). Cette dérivation permet de rendre le composé plus volatil, ce qui améliore le comportement sur colonne et permet d'obtenir des schémas de fragmentations caractéristiques en spectrométrie de masse. Le meilleur mode de dérivation pour notre étude était la triméthyl silylation (TMS) (Figure 30).

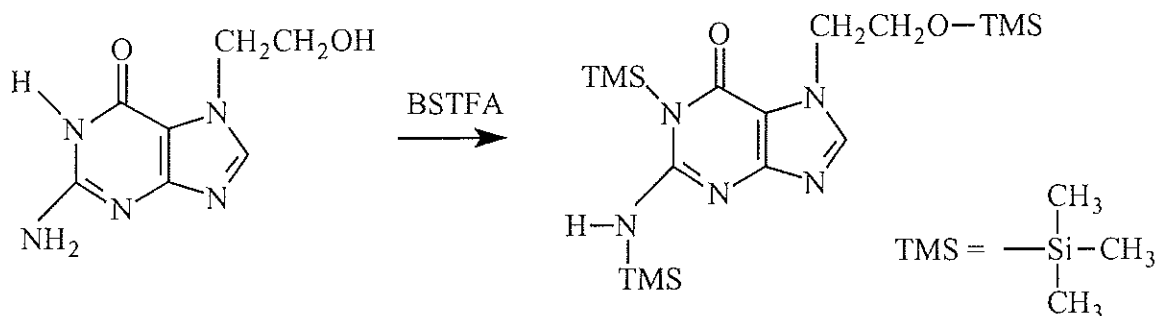


Figure 30: schéma de la réaction de triméthylsilylation.

Le schéma traditionnel d'un dérivé TMS en spectrométrie de masse est une perte d'un groupement méthyl (CH_3 - 15 unités de masse).

Le passage en GC/MS de l'adduit 7HEG montre une bonne séparation sur colonne par rapport aux bases non modifiées. Le spectre de masse de l'adduit dérivé (impact électronique, ions positifs - EI^+), montre un schéma de fragmentation très spécifique (Figure 31) avec

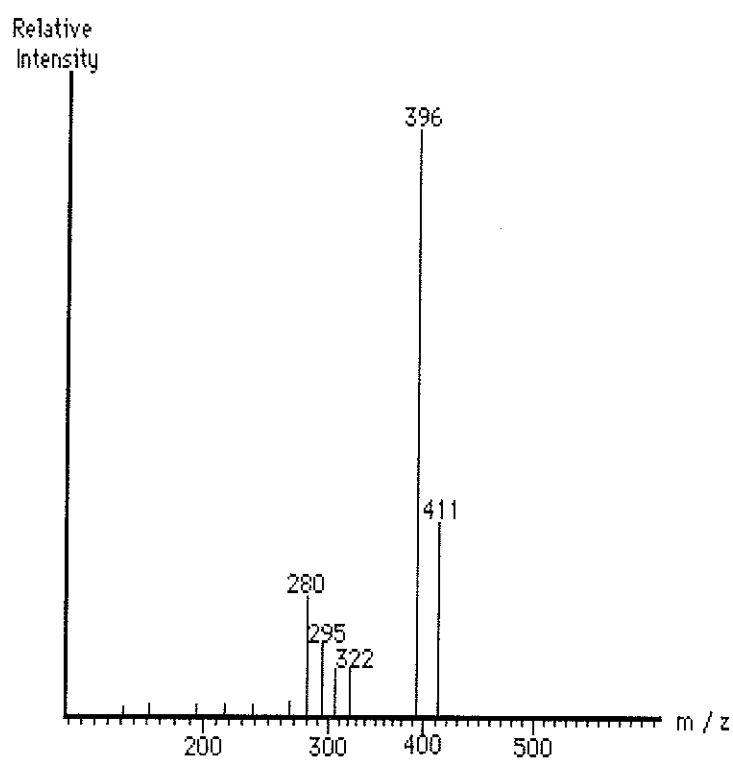


Figure 31: spectre full-scan de l'adduit 7HEG-3TMS

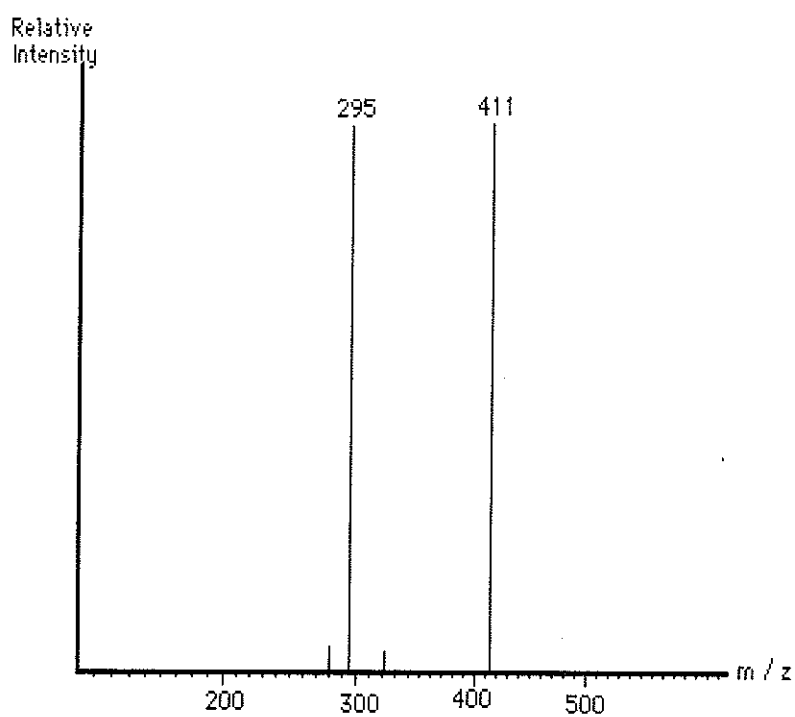


Figure 32 : spectre de perte de neutre de l'adduit 7HEG-3TMS.

Entre autres la perte intense d'un groupement méthyl par l'ion moléculaire (transition 411 - 296) et également la perte du groupement adduit hydroxyethyl par ce même ion moléculaire (411 - 280).

La GC/MS, malgré une analyse moléculaire non-ambigüe, n'a cependant pas permis de détecter l'adduit 7HEG à une concentration concordant avec le risque cancérigène équivalent à une base modifiée sur 10 millions de base intactes

Outre un manque de sensibilité inhérent à la méthode, l'explication peut être fournie par la réaction de dérivation, dont la cinétique est difficile à contrôler avec précision à des concentrations aussi faibles que celles envisagées. Il en résulte un manque de reproductibilité et donc souvent des lacunes au niveau de la sensibilité de la méthode.

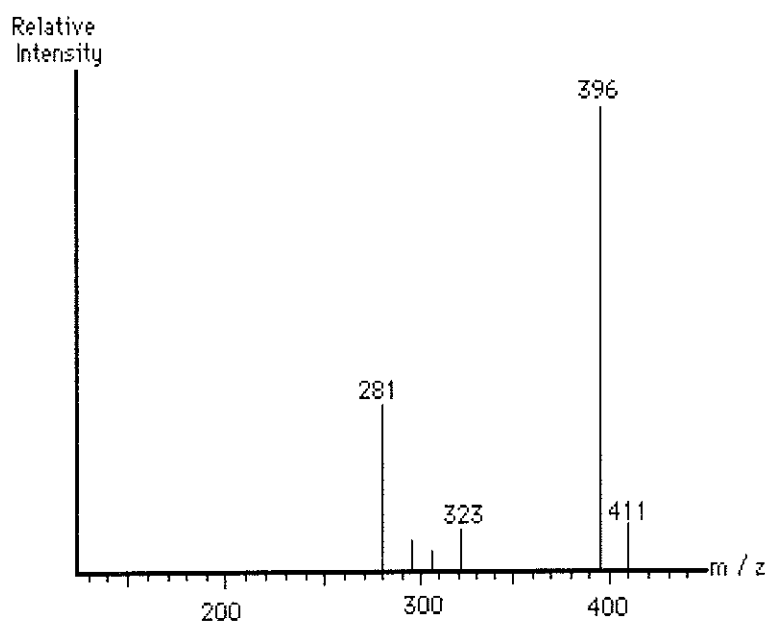


Figure 33 : spectre d'ions filles de l'adduit 7HEG-3TMS.

L'emploi de la spectrométrie de masse en tandem (GC/MS/MS) permet usuellement d'améliorer la sensibilité d'un facteur 10 à 100 par rapport à la GC/MS conventionnelle. Nous avons envisagé les 2 méthodes accessibles sur l'appareil dont nous disposons: la perte de neutre (Figure 32) et le multiple reaction monitoring (précédé de l'enregistrement d'un spectre d'ions filles) (Figure 33). Malgré un gain évident de sensibilité, nous n'avons toujours pas réussi à atteindre la limite de détection souhaitée, et ce pour les raisons mentionnées plus haut.

Analyse HPLC/MS de l'adduit 7-(2-hydroxyethyl) guanine 7HEG.

L'emploi de la spectrométrie de masse à ionisation electrospray couplée à une colonne HPLC nous a permis d'améliorer sensiblement les conditions d'analyse de l'adduit 7HEG. L'ionisation electrospray permet en effet de travailler en phase liquide pour n'importe quel type de composé (à condition qu'il soit soluble dans un solvant adéquat pour l'appareil). Cette propriété élimine les désagréments rencontrés en GC/MS (problèmes de volatilité, dérivation préalable) et rend l'analyse beaucoup plus rapide et reproductible.

Les meilleures conditions HPLC ont été trouvées pour un mélange eau : méthanol (20:80 v:v) comme éluant et un débit de 100 µl / minute. En electrospray, les ions sont enregistrés en mode positif (ES⁺) avec le détecteur focalisé sur le signal relatif à l'ion moléculaire de l'adduit 7HEG (196 uma) (Single Ion Recording - SIR) (Figures 34 et 35).

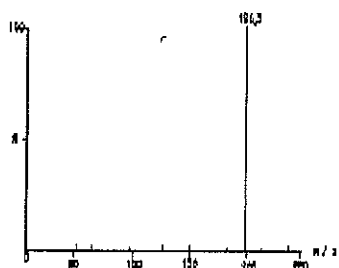


Figure 34 : spectre electrospray de l'adduit 7HEG.

On obtient ainsi un chromatogramme relatif au seul adduit 7HEG, dont le signal est soumis à une intégration. De cette manière, nous avons obtenu une courbe de calibration remarquablement linéaire jusqu'à 100 femtomoles d'adduit ($1 \cdot 10^{-13}$ moles) (Figure g).

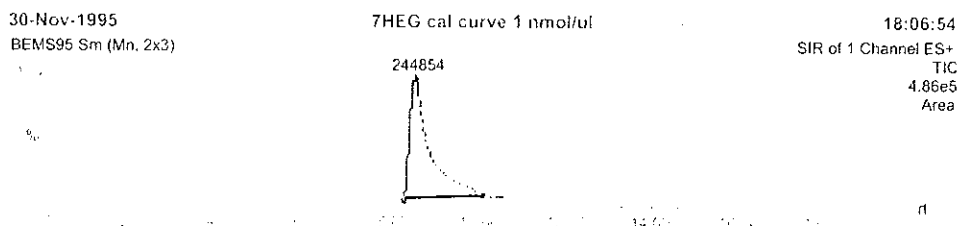
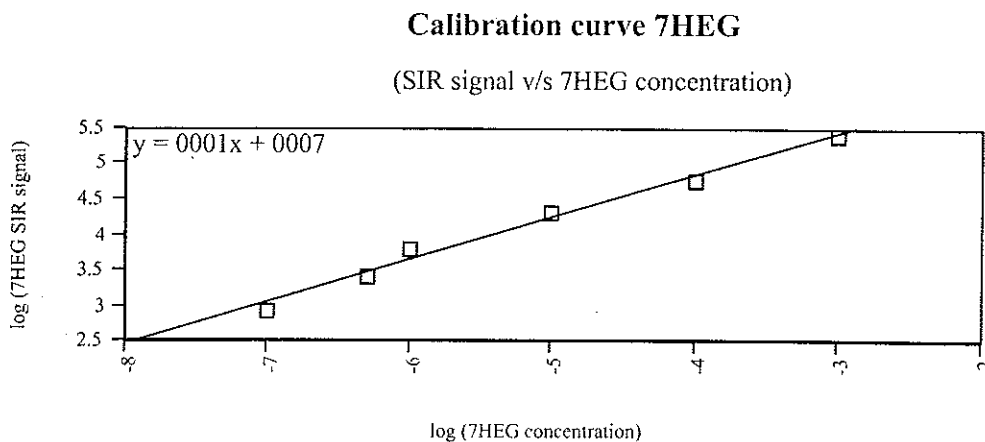


Figure 35: chromatogramme SIR (196 uma) relatif au signal de l'ion moléculaire de l'adduit 7HEG.

Cette limite de détection concorde avec la détection d'un risque cancérigène de 1 base modifiée sur 1 million de bases intactes ($1:10^6$) à partir d'un prélèvement sanguin de 10 ml.

Figure 36 : courbe de calibration de la 7HEG.



vi) Exposition d'échantillons d'ADN Standard *in vitro* à l'EO (ULg)

Les expositions *in vitro* d'ADN de thymus de veau à l'oxyde d'éthylène ont été réalisées à titre d'expériences préliminaires à l'exposition *in vitro* de lymphocytes humains provenant d'un prélèvement sanguin.

Le but est de mettre au point une méthode d'isolement efficace de l'adduit 7HEG par rapport au squelette d'ADN et de mettre en évidence une relation dose-réponse dans une large gamme de concentration en EO.

La méthode d'isolation que nous avons choisie est une hydrolyse thermique en milieu neutre (NTH) de l'ADN (chauffage de la solution d'ADN - 1 mg/ml - à 100°C pdt 15 minutes) qui permet le départ quantitatif des adduits en N7 de la guanine ainsi que d'un faible pourcentage de purines non modifiées (environ 2% de guanine et d'adénine). Le mélange est alors soumis à une étape de microconcentration par centrifugation (passage de l'adduit au travers d'une membrane micropore qui retient le squelette d'ADN (Centricon)). Le mélange résultant est alors analysé en HPLC/MS.

La figure 37 est un chromatogramme montrant les signaux SIR relatifs au passage de guanine (SIR m/z=152), de l'adduit 7HEG (SIR m/z=196) et de l'adénine (SIR m/z=136) enregistrés au cours de la expérience. Le taux de purines non modifiées est en bonne concordance avec les résultats de Van Delft et al. (départ d'environ 2% de purines non modifiées lors de la NTH).

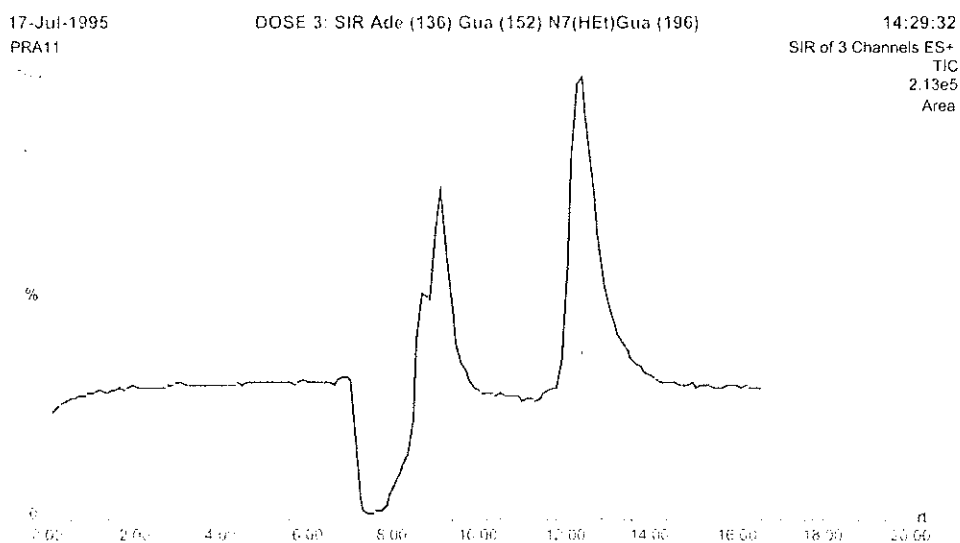
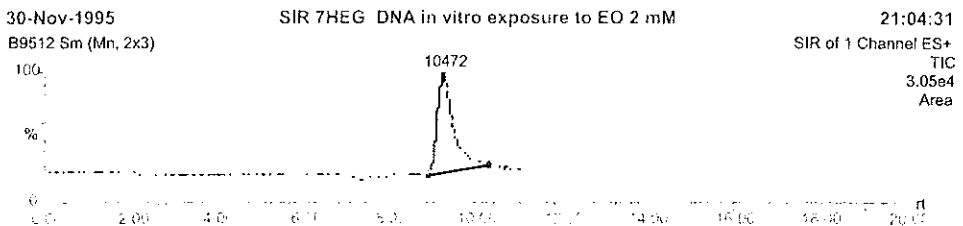
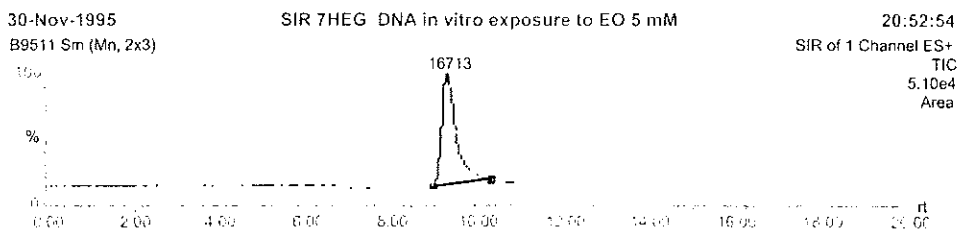
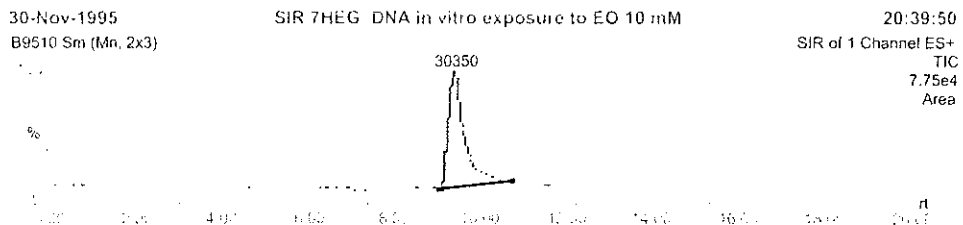
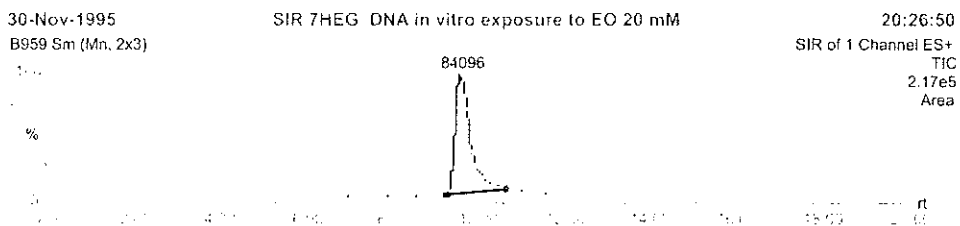
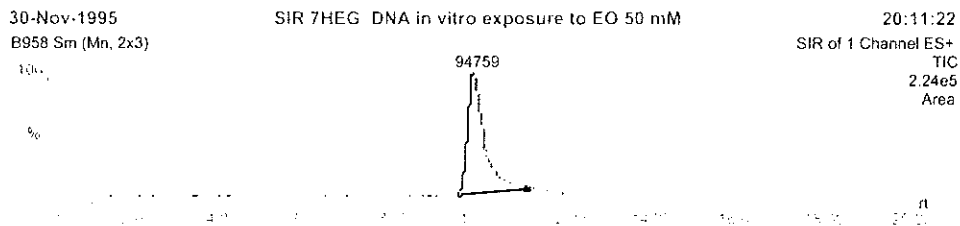
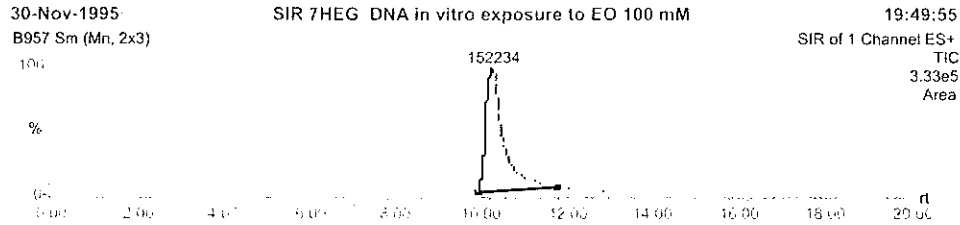


Figure 37: chromatogramme des signaux SIR de la guanine, la 7HEG et l'adénine (de gauche à droite) au cours d'une même expérience.

La figure 38 montre les chromatogrammes SIR de la 7HEG (m/z = 196) après exposition *in vitro* d'ADN de thymus de veau à des doses d'EO allant de 100 mM à 10⁻⁴ M. La courbe dose - réponse de la figure 39 est linéaire en échelle logarithmique (ce qui traduit une relation exponentielle en échelle normale). L'évolution du taux d'hydroxyethylation est en parfaite proportionnalité avec la dose d'EO administrée.

Le nombre d'adduit 7HEG va de $6 \cdot 10^4$ adduits sur 10^6 pour une dose d'EO 100 mM à environ 7 adduits sur 10^6 pour une dose d'EO 10^{-4} M, soit dix mille fois moins d'adduit pour une dose dix mille fois inférieure. La linéarité de la courbe dose - réponse pour 9 doses différentes montre une évolution proportionnelle du taux d'adduit en fonction de la dose sur toute la gamme de concentration envisagée.



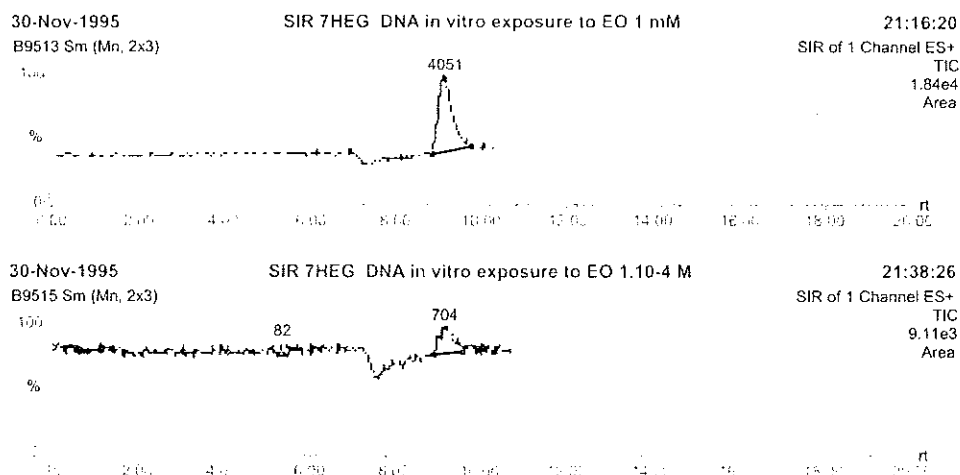


Figure 38: chromatogrammes SIR (m/z 196) de l'adduit 7HEG après exposition d'ADN à différentes doses d'EO.

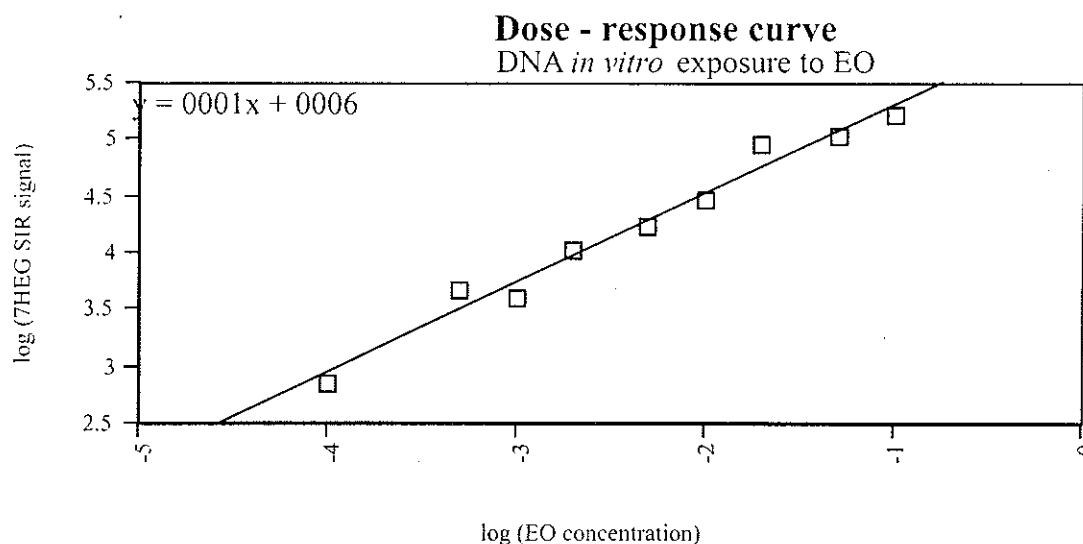


Figure 39 : courbe dose - réponse après exposition d'ADN de thymus de veau à différentes concentrations en EO.

Discussion.

Dans notre étude des adduits à l'ADN (focalisée dans un premier temps sur les adduits à l'oxyde d'éthylène), la première étape a consisté en la mise au point d'une méthode d'identification et de dosage fiable et reproductible de l'adduit principal (90%) la N7 (2 hydroxyethyl) guanine (7HEG) basée sur la spectrométrie de masse. La sensibilité de la méthode, sur base d'un prélèvement sanguin de 10 ml, doit concorder avec la détection d'un risque cancérigène équivalent à une base d'ADN modifiée sur dix millions de bases intactes.

Les premiers essais réalisés en GC/MS ont montré une identification non ambiguë de l'adduit (avec entre autre une transition montrant la perte du groupement hydroxyethyl par l'ion moléculaire). La sensibilité de la méthode ne concorde cependant pas avec le risque cancérigène mentionné plus avant. Ce manque de sensibilité et de reproductibilité peut être attribué, outre aux lacunes propres à la GC/MS, à un problème lié à la réaction de dérivation préalable à l'introduction du composé sur la colonne de chromatographie. La cinétique de dérivation apparaît en effet extrêmement difficile à contrôler lorsque l'on atteint des concentrations aussi faibles que celles envisagées ici (de l'ordre de 10 femtomoles d'adduit par μl de solution).

L'emploi de la spectrométrie de masse en tandem toujours couplée à un chromatographe en phase gazeuse (GC/MS/MS) a permis d'améliorer la limite de détection d'un facteur 10 à 100 par rapport à la GC/MS conventionnelle. Les spectres de perte de neutre et d'ions filles ont en outre confirmé la perte intense du groupement hydroxyethyl adduit par l'ion moléculaire. Malgré cet aspect qualitatif excellent, la sensibilité et la reproductibilité de la méthode se sont avérées insuffisantes en regard des exigences auxquelles nous devons répondre.

L'emploi d'un spectromètre de masse à ionisation électrospray couplé à une colonne HPLC nous a permis d'améliorer sensiblement notre analyse de la 7HEG. Le fait de travailler en phase liquide nous a permis de supprimer l'étape de dérivation préalable, ce qui nous a apporté un gain important de reproductibilité et de sensibilité. Une courbe de calibration linéaire de la 7HEG a été obtenue jusqu'à 100 femtomoles d'adduit injectées.

L'exposition *in vitro* d'ADN de thymus de veau à l'oxyde d'éthylène a pour but d'étudier la relation dose - réponse entre la concentration en oxyde d'éthylène et le taux d'adduit formé. A ce niveau, une méthode efficace d'isolation de l'adduit par rapport aux entités non modifiées de l'ADN a été mise au point. Le choix s'est porté sur une hydrolyse thermique de l'ADN (NTH) permettant un départ sélectif de l'adduit en 7 de la guanine; cette hydrolyse est suivie d'une étape de microconcentration de l'adduit 7HEG par centrifugation au travers d'une membrane micropore perméable à l'adduit et retenant le squelette d'ADN dénaturé. Les paramètres relatifs à cette étape d'enrichissement en 7HEG (température et temps de NTH) ont été optimisés séparément afin d'obtenir le meilleur rendement en 7HEG (chauffage de la solution à 100°C pdt 15 minutes).

Les résultats relatifs à l'exposition *in vitro* mettent en évidence une relation dose - réponse sur une très large gamme de concentration en EO (de 100 mM à 10^{-4} M). Une proportionnalité quasi parfaite a été observée entre la dose administrée et le taux d'adduit formé sur toute la gamme de concentration envisagée. Le taux d'hydroxyethylation va de $6 \cdot 10^4$ bases modifiées sur 10^6 (EO 100 mM) à environ 7 bases modifiées sur 10^6 (EO 10^{-4} M).

vii) Exposition d'échantillons de sang humains *in vitro* à l'EO (ULg)

Le but de ces expositions est d'établir une comparaison avec les résultats enregistrés lors des essais *in vitro* sur l'ADN, et ce afin de mettre en évidence l'importance des différents paramètres biologiques intervenant au niveau du sang (cinétique de fixation à l'ADN, cinétique de réparation de la lésion).

Outre cet aspect comparatif, nous désirons également étudier la persistance de la lésion après le premier et le deuxième stade de division cellulaire. A cet effet, le sang est mis en culture à des temps de 52h (première division) et 72h (deuxième division). Une comparaison devrait donc être effectuée entre le taux d'adduit enregistré après ces deux stades et le taux d'adduit de départ en l'absence de mise en culture et de division cellulaire.

L'étude est réalisée au niveau des lymphocytes sanguins rappel, en pratique, l'ADN est obtenu par la démarche suivante

- prélèvement sanguin (10 ml)
- exposition du sang à l'EO
- isolation des lymphocytes par Leucoprep
- mise en culture des lymphocytes (éventuelle)
- lyse et homogénéisation des cellules par DNAzol (GIBCO)
- précipitation et lavage à l'éthanol

L'ADN subit alors le même traitement que lors de l'exposition *in vitro* d'ADN de thymus de veau (hydrolyse thermique en milieu neutre, microconcentration et analyse de l'adduit 7HEG par HPLC/MS).

Pour les intervalles de doses des expériences réalisées avec l'EO, la fraction contenant les lymphocytes apparaît nettement moins abondant que celle obtenue dans des échantillons de sang non exposés. Cela se traduit par l'obtention de taux d'ADN compris entre 100 et 150 µg; taux inférieur d'environ 75 % à celui généralement obtenus dans des échantillons non traités. (200 – 260 µg d'ADN pour 10 ml de sang périphérique.

Sur base de ces observations, les concentrations d'EO aboutissant à des quantités d'ADN exploitables pour la détection des adduits formés à été réduite à des concentrations de 1 mM, 2 mM, 5mM & 10 mM.

La figure 40, ci-après représente la courbe dose-réponse obtenue après exposition de sang à différentes concentrations d'EO, et le taux de formation d'adduits N-7-HOEtGua. A nouveau, une bonne linéarité peut être observée. Les concentrations plus élevées n'ont pu être analysées par suite de manque d'ADN en suffisante.

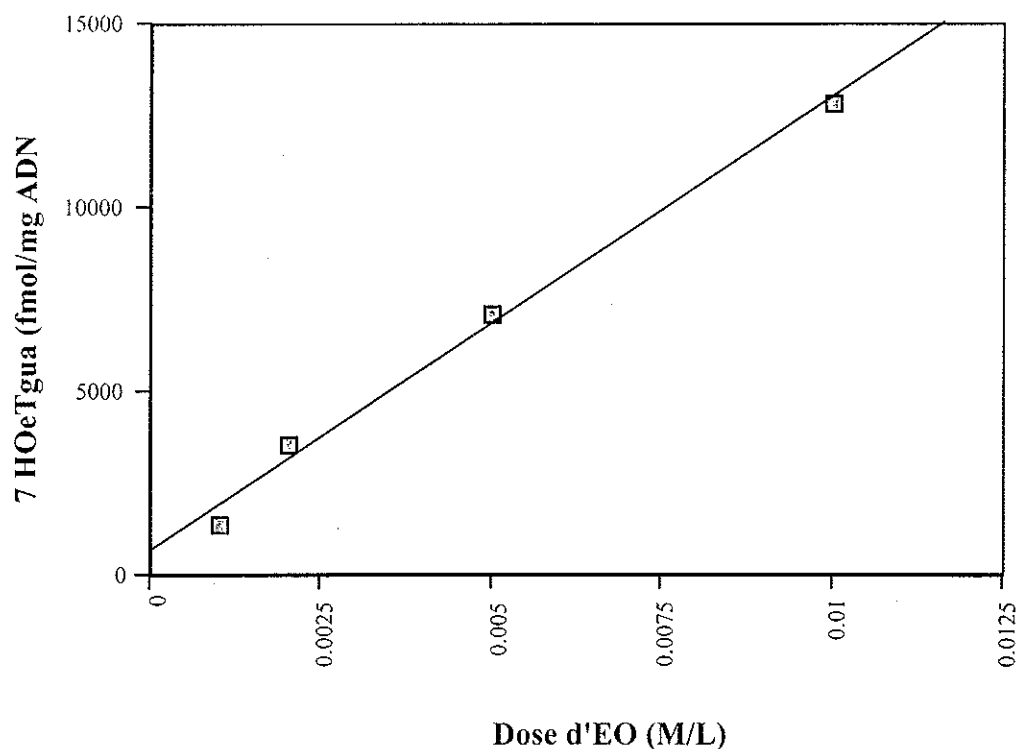


Figure 40 : courbe dose-réponse de la formation d'adduits N-7-HOEtGua en fonction de l'exposition de sang humain à différentes concentrations d'EO (1 mM, 2 mM, 5mM & 10 mM).

Seuls 4 adduits N-7-HOEtGua sur 10 millions de nucléotides ont été observés pour la concentration de l'EO de 1mM (Leclercq L, 1998). Cette valeur est largement inférieure à celles publiées dans la littérature et résumé ci après. Ces résultats sont cependant en accord avec ceux de Young (1990) ayant utilisé des conditions d'exposition à l'EO avec la technologie d'immuno-assay.

Technologie Utilisée	Taux de d'adduits (N-7-HOEtGua) Par 10^7 nucléotides
GC/MS (dérivés TMS)	27 ± 15
Immuno-assay	1.1 – 0.65
32 P psot labeling (Combinaison TLC/HPLC)	0.7 - 12
GC/MS (dérivés PFBz)	30 ± 10

Détection d'adduits majoritaires (N-7-HOEtGua) *in vivo* chez l'homme
(Föst, 1989; Van Delft, 1994; Kumar, 1996; Wu, 1996)

Un paramètre important est le temps de rétention de l'adduit (N-7-HOEtGua). D'origine liée à l'approche méthodologique (stabilité de la colonne de pression en tête de colonne HPLC), l'impact de ce facteur d'influence ne s'est pas révélé lors d'analyses répétées au cours de la même journée. Une solution serait d'utiliser fréquemment et de manière simultanée un standard interne préalablement marqué (deutérium ou 14 C) de l'adduit étudié.

Des adaptations technologiques LC/ESMSMS (Leclercq L., 1998), ont permis de détecter l'adduit O6-HoetGua après exposition d'ADN *in vitro*.

Les rapports relatifs des deux adduits détectés, après exposition *in vitro* figurent ci-après. Dans ce tableau, Les taux d'adduits minoritaires ont été exprimés en pourcentage par rapport à ceux relatifs à l'adduit principal le **N-7-HOEtGua**.

Sur base de nos expériences et des résultats publiés dans la littérature, la détection des adduits minoritaires (O6 – HOEtGua, N-3-HOEtade) induit par l'oxyde d'éthylène reste extrêmement délicate et nécessite une approche technologique lourde et contraignante. A l'heure actuelle, il semble que seul l'adduit majoritaire, le N-7-HOEtGua, puisse faire l'objet d'une détection lors d'études de biosurveillance.

O6 - HOEtGua	(N-3-HOEtade)	Référence
0.5	4	Segeberäck, 1983
< 0.2	12	Li, 1992
0.28	6.5	Leclercq, 1998

Pourcentage d'adduits minoritaires (O6-HOEtGua et N-3-HOEtade) après exposition d'ADN *in vitro* à de l'oxyde d'éthylène. Ces % sont relatifs au taux d'adduit majoritaire, le N-7-HOEtGua d'adduit formés dans les mêmes conditions.

viii) Echantillons de sang humains *non exposés* (ULg)

Les travaux de Leclercq L., 1997 font mention de la possibilité d'utiliser l'adduit minoritaire N-3-HOEtade pour la détection d'exposition humaines à des agents alkylants. Les sensibilités et sélectivités développées permettraient de détecter cet adduit représentant 5 –10 % de l'adduit majoritaire N-7-HOEtGua.

Résultats non donnés *in extenso*. Un échantillon de sang de 8 sujets dont 4 fumeurs a été analysée et les pourcentages de N-3-HOEtade par rapport à l'adduit majoritaire N-7-HOEtGua établis.. Sur ce petit échantillonnage, les % entre les deux types d'adduits ont été déterminé se situer entre 3.5 – 13 %. La taille de l'échantillon analysé ainsi que les variabilités inter-individuelle observées ne permettent cependant pas d'établir avec précision l'influence des habitudes tabagiques sur les taux d'adduits à l'ADN.

V **BESPREKINGEN**

a) **Kobalt en zijn verbindingen**

i) **Alkaline elutie (UCL)**

La méthode d'élution alcaline telle qu'elle a été adaptée pour cette étude s'est révélée rapide et permet d'analyser un nombre important d'échantillons dans une seule expérience. Ce point est particulièrement important si l'on tient compte des variations inter-individuelles et inter-expérience qui ont été rapportées comme étant une faiblesse de la technique classique d'élution alcaline. En utilisant une plaque de 96 puits, il a été possible de comparer l'effet de 6 préparations au sein d'une seule expérience avec 6 à 8 réplicats pour chaque situation (coefficient de variation moyen de 13 %).

Les expériences d'élution alcaline sur lymphocytes humains ont été menées avec des particules de Co qui expriment une activité clastogène qui est toutefois significativement moins importante que lorsque ces particules sont mélangées à des particules de WC. Cette différence d'activité était particulièrement évidente pour des concentrations de cobalt équivalentes à 1.5 - 6 mg/ml et moins marquée pour des concentrations plus élevées, probablement parce que l'effet clastogène maximal que l'on soit à même de détecter avec cette technique était atteint. La poudre WC-Co industrielle et la poudre reconstituée rWC-Co ont produit des résultats superposables, indiquant que l'activité de WC-Co peut être attribué à une interaction entre les deux composants principaux Co e WC et n'est pas due à un contaminant éventuel.

L'absence d'activité clastogène des ions cobalt (II) dans ce système démontre que les formes toxiques responsables de l'effet clastogène ne sont pas dépendantes de la solubilisation du métal, mais produites à la surface des particules.

En incubant de l'ADN isolé avec les différentes particules, il a été montré que Co et WC-Co sont capables de causer directement des cassures de brins et/ou des sites alkali-labiles. Le fait que dans les lymphocytes humains les lésions à l'ADN sont observées pour des concentrations non-cytotoxiques de WC-Co, peut donc être interprété comme une indication que l'effet clastogène observé n'est pas secondaire à un phénomène consécutif à la mort des cellules.

La protection offerte en incubant les cellules durant un certain temps avec du formate démontre l'intervention de radicaux libres, probablement de type hydroxyl.

ii) **Big Blue (UCL)**

Lors de son introduction, le système Big Blue a suscité beaucoup d'intérêt parce que la gamme de tests disponibles pour détecter *in vivo* des mutations géniques est extrêmement limitée. En outre, l'ingéniosité du système mis en œuvre et la possibilité de mesurer l'effet distinctement dans chaque organe offrait de brillantes perspectives. Ce test a au cours de 5 dernières années surtout été appliqué pour des agents génotoxiques solubles (N-nitroso-N-méthylurée, benzo[a]pyrène, 2-acétylamino-fluorène, ...). La plupart de ces composés, qui sont des agents génotoxiques puissants, ont en général montré au plus un doublement de la fréquence de mutations spontanées, indiquant que ce test est relativement peu sensible. Ceci est en particulier attribué au taux de mutations spontanées relativement élevé du gène *lacI* (de l'ordre de $5-10 \times 10^{-5}$).

Il n'existe à notre connaissance qu'une autre équipe ayant utilisé ce test avec des particules (Rihn et al. 1997). Ces chercheurs français ont mis en œuvre le test pour analyser l'effet génotoxique dans les poumons de souris Big Blue exposées à des fibres d'amiante (crocidolite, 2000 fibres/ml; 6 h par jour durant 5 jours). Des groupes d'animaux (n=3) ont été sacrifiés immédiatement, 4 et 12 semaines après arrêt de l'exposition. Les taux de mutation observés ($\times 10^{-5}$) sont repris au tableau ci-dessous:

	immédiatement	4 semaines	12 semaines
contrôles	8.72	6.93	8.54
exposés	8.07	15.01	11.02

Ces valeurs sont du même ordre de grandeur que les nôtres, ce qui valide nos résultats et tend à confirmer que ce test n'est pas très sensible. En effet, ces auteurs ont utilisé des doses extrêmement élevées de crocidolite, et l'effet mesuré reste douteux. Il est utile de rappeler que la crocidolite, comme les poussières de WC-Co, exercerait son effet génotoxique par un mécanisme de production radicalaire. Les chercheurs français ont également séquencé les gènes *lacI* mutés dans les groupes contrôles et exposés; aucune différence n'a été trouvée, ce qui tend également à suggérer que l'augmentation observée après 4 semaines n'est probablement pas liée au traitement.

L'interaction du cobalt avec l'ADN induit la formation de cassures simple brin et de bases oxydées. Ces dernières peuvent être à l'origine de mutations géniques. Dans les conditions expérimentales décrites ci-dessus, nous devons conclure que le test Big Blue n'a pas permis de démontrer *in vivo* de potentiel mutagène des particules de Co et/ou de WC-Co dans les poumons de souris. Plusieurs possibilités peuvent être avancées pour tenter d'expliquer ces résultats :

- les lésions génotoxiques (cassures d'ADN et bases oxydées *in vitro*) causées par ces particules ne se traduisent pas par la formation de mutations géniques,
- les lésions génotoxiques (cassures d'ADN et bases oxydées *in vitro*) causées par ces particules se traduisent par la formation de mutations géniques mais le test mis en œuvre n'est pas suffisamment sensible pour les détecter.

Dans l'état actuel, il n'est pas possible de préciser mieux la question.

Un aspect supplémentaire à considérer réside dans la lourdeur extrême (et le coût) de cette technique qui, outre le caractère peu sensible du test, nous invite pour l'instant à ne plus explorer plus avant cette direction de recherche.

Cet axe de recherche n'a donc pas vérifié l'hypothèse initiale et étant donné les arguments explicités ci-dessus, il sera difficile de valoriser ce travail par une publication scientifique.

iii) Etudes épidémiologiques (UCL+VUB)

L'ensemble des résultats n'étant pas encore disponible, il n'est pas possible d'apporter une interprétation. Ce rapport doit donc être considéré comme provisoire, et les résultats finaux seront transmis dès que possible.

iv) Onderzoek verricht door KUL2

De aanwezigheid van FCS in het cultuurmedium en de grootte van de wells waarin de cellen gekweekt worden, hebben geen invloed op de mogelijke toxische effecten van Co en Co-houdende verbindingen. Een eerste reeks experimenten werd dan ook uitgevoerd in 96-well cultuurplaten in de aanwezigheid van 10% FCS.

Als toxiciteitsindex werd de LDH-activiteit in de cellen en het medium bepaald. We hebben echter ondervonden, in tegenstelling tot Lison *et al.* (1990), dat Co zelf de LDH-reactie beïnvloedt. 'Controle' van de resultaten m.b.v. adenine-vrijzetting toonde dat de methode met adenine iets gevoeliger was dan deze met LDH, maar dat de berekende TD_{50} -waarden dezelfde waren.

AT-II zijn minder gevoelig voor Co en Co-houdende verbindingen dan AM. Voor AM wordt de toxiciteit van Co duidelijk verhoogd door de aanwezigheid van WC. Dit synergistisch effect was meer uitgesproken wanneer CoWC afkomstig uit een hard metaal-producerende fabriek werd gebruikt, vergeleken met in het labo bereid Co+WC. Dit zou kunnen betekenen dat nog andere factoren dan enkel het contact tussen Co en WC van belang zijn.

Er werd een hypothese opgesteld (Lison *et al.*, 1995) voor het mechanisme dat de toxiciteit van CoWC voor AM zou verklaren. Hierbij zou WC de oxidatie van Co catalyseren, waarbij de elektronen overgedragen worden naar O_2 , en waarbij bijgevolg superoxide anionen ($O_2^{\cdot -}$) gevormd worden. Er worden Co-ionen gevormd, maar deze zouden geen celschade veroorzaken. Wij hebben de rol van oxidatieve stress bij de toxiciteit van Co en CoWC verder onderzocht.

Tot op heden zijn we er echter niet in geslaagd de betrokkenheid van NF- κ B, MnSOD of HSP, die normaal geactiveerd zouden moeten zijn bij oxidatieve stress, aan te tonen in het actiemechanisme van Co en CoWC. Recente studies suggereren wel activatie van de PPP door de partikels.

Verscheidene studies hebben de toxiciteit van $CoCl_2$ aangetoond, evenals de inductie van oxidatieve stress door $CoCl_2$. In een volgende reeks experimenten zijn we dieper ingegaan op de mogelijke rol van Co-ionen in het veroorzaken van celschade door Co en CoWC. We hebben besloten een andere methode voor bepaling van celschade te gebruiken, aangezien Co een invloed had op de LDH-reactie, en werken met radioactiviteit liefst zoveel mogelijk vermeden wordt. De experimenten werden uitgevoerd in FCS-arm medium, ook zonder de aanwezigheid van lactalbumine, waaraan metaalionen vrij gemakkelijk kunnen binden.

Wanneer de MTT-test gebruikt werd om de celschade te bepalen na blootstelling van AT-II en AM aan Co en CoWC, stelden we vast dat AT-II gevoeliger zijn dan AM. Dit is in tegenstelling tot de eerste reeks experimenten, waar LDH-vrijzetting gebruikt werd als toxiciteitsindex en waar AM duidelijk gevoeliger waren voor Co dan AT-II. Wanneer we de cellen lichtmicroscopisch volgen, merken we op dat de MTT-resultaten beter overeenkomen met deze microscopische waarnemingen dan de LDH-resultaten. Dit zou toch kunnen wijzen op de invloed van Co op de LDH-reactie. Anderzijds zou het verschil in gevoeligheid van de cellen bij de twee methoden een weerspiegeling kunnen zijn van verschillende mechanismen volgens dewelke Co zijn toxiciteit uitoefent in AT-II en AM. Het is in elk geval van belang bij toxiciteitsstudies de mogelijke invloed van het te testen product op de assay na te gaan, en het is aan te raden meerdere eindpunten van cytotoxiciteit te bepalen.

De verminderde toxiciteit van CoWC voor AM wanneer de partikels in een insert geplaatst worden, toont dat het contact met de cellen van belang is bij het uitoefenen van de toxiciteit. Aangezien de toxische effecten van Co voor AT-II en AM, en van CoWC voor AT-II gelijk zijn wanneer de partikels in een insert geplaatst worden, of wanneer ze in contact met de cellen komen, wijst op het belang van het Co-ion. Ook de verminderde toxiciteit van de Co-partikels en de Co-ionen in aanwezigheid van EDTA of lactalbumine wijst op een rol voor de Co-ionen. Lactalbumine lijkt de ionen beter te 'scavengen' dan EDTA, doch dit verschil is waarschijnlijk te wijten aan een niet optimale concentratie EDTA. Een derde aanwijzing voor het belang van het Co-ion is dat Co-geconditioneerd medium in staat is celschade te veroorzaken, terwijl in dit medium geen Co-partikels aanwezig zijn. De Co-partikels zouden na 24 uur in zekere mate zodanig 'veranderd' (geoxideerd ?) zijn, dat ze niet meer verder in staat zijn enige celschade te veroorzaken. Aangezien AT-II en AM eenzelfde gevoeligheid vertonen voor CoCl_2 , kan het verschil in toxiciteit van Co voor deze celtypen toch niet enkel verklaard worden door de effecten van de ionen.

Het verschillend verloop in de tijd van de invloed van Co, CoWC en CoCl_2 op AT-II en AM, en zeker ook de initiële activatie van AT-II door Co, zou ook kunnen wijzen op verschillende actiemechanismen in de twee celtypen.

v) Inductie van DNA-schade door kobalt in menselijke lymfocyten (VUB)

Uit de drie studies die werden uitgevoerd, met drie complementaire technieken (alkaline elutie, alkaline comet assay en *in vitro* micronucleus test) in het kader van dit programma kan besloten worden dat het DNA beschadigende vermogen van metallisch Co versterkt wordt door de aanwezigheid van WC partikels. WC alleen induceerde geen breuken detecteerbaar met de alkaline unwinding. De resultaten van de comet assay van Anard et al. (1997) kunnen doen veronderstellen dat WC een bepaalde ontwindings van de chromatine loops toelaat of dat het traag migrerende fragmenten induceert. De alkaline comet assay bleek aldus iets gevoeliger te zijn dan de elutie techniek.

In de vergelijking van de comet assay en de *in vitro* micronucleus test (Van Goethem et al., 1997) bleek deze laatste minder gevoelig te zijn om het synergistische DNA-beschadigend effect van het kobalt-wolframcarbide mengsel te evalueren. De MN test detecteert echter chromosoomaberraties (chromosoom- / genoommutaties) en niet enkel herstelbare DNA-breuken of alkali labiele sites zoals de comet assay. De combinatie van de comet assay en de *in vitro* MN-test zou daarom aangeraden kunnen worden voor het testen van genotoxines en het begrijpen van onderliggende mechanismen in mutageniciteit en het schatten van de laagste efficiënte dosis.

Uit de derde studie (De Boeck et al., 1998) is het belang gebleken om genotoxiciteitstesten uit te voeren in meerdere donoren en deze experimenten te herhalen om de verschillende niveau's van variabiliteit te controleren. De comet assay is zeer gevoelig; maar juist door deze gevoeligheid is hij in staat geringe variaties in respons te detecteren.

vi) Inductie van DNA-schade door kobalt in primaire longcellen van de rat (VUB+KUL2)

De resultaten bekomen met humane lymfocyten konden gedeeltelijk bevestigd worden in de alveolaire cellen van de rat, die een belangrijke target vormen in kobalt-geïnduceerde longaandoeningen. Het genotoxische effect van Co en WC-Co was weliswaar minder sterk dan in de lymfocyten en bovendien kon een zekere activiteit van WC partikels alleen niet uitgesloten worden (in AT-II cellen). Opmerkelijk was de overeenkomst bij de kinetiekstudie; het grootste verschil in respons tussen Co en WC-Co manifesteerde zich steeds reeds na 15 minuten blootstelling. Dit zou kunnen te wijten zijn aan de initiële grootschalige productie van vrije zuurstofradicalen bij de aanvang van de solubilisatie van kobalt vanaf de partikels. Het feit dat geen oxidatieve schade gedetecteerd kon worden na 20 u blootstelling is vermoedelijk gerelateerd aan

het feit dat op dat moment alle kobalt opgelost is en er dus geen productie van reactieve zuurstofradicalen meer plaatsvindt.

Globaal gezien vertoonden de alveolaire cellen een kleinere gevoeligheid / grotere resistentie tegenover de harde metaalpartikels dan de lymfocyten.

vii) Inhibitie van repair door kobalt *in vitro* in menselijke lymfocyten (VUB)

In de studie gepubliceerd door De Boeck et al. (1998) werd nagegaan of kobalt metaalpartikels in staat zijn te interfereren met het herstel van methylmethaansulfonaat-geïnduceerde DNA-schade door gebruik te maken van de alkaline comet assay in human lymfocyten. Het nut van het gebruik van de comet assay in repairstudies is goed gekend. De resultaten toonden aan dat metallisch kobalt inderdaad de repair van MMS-geïnduceerde DNA-schade inhibeert. Welke stap er precies beïnvloed wordt, kon niet bepaald worden op dat moment.

In een volgende studie werd gebruik gemaakt van specifieke repairinhibitoren. Dit laat toe wel een identificatie uit te voeren van de betreffende repairstap. De comet assay toonde hoofdzakelijk een inhibitie ter hoogte van de incisie, en dit sterker voor WC-Co dan voor Co. De alkaline unwinding daarentegen, toonde een meer uitgesproken remming ter hoogte van de polymerisatiestap, eveneens meer uitgesproken voor WC-Co. De verschillende detectielimiet van de twee gebruikte technieken is waarschijnlijk te wijten aan het feit dat op een andere pH gewerkt wordt (comet assay bij pH > 13 en alkaline unwinding bij pH 12.4). Op die manier zullen verschillende pH-afhankelijke lesies gedetecteerd worden. Het verschil in remmingsactiviteit van Co en WC-Co is enigszins vreemd aangezien na de 20 uur voorincubatie vermoedelijk alle kobalt gesolubiliseerd is en dus eenzelfde hoeveelheid kobaltionen aanwezig zal zijn. WC, hoewel verondersteld niet actief te zijn, zou alsnog een beslissende rol hierin kunnen spelen.

b) **Epoxide-vormende carcinogenen**

i) *In vitro* experimenten (KUL1)

1. Eliminatieconstanten

De tragere eliminatie bij een hogere startconcentratie van styreenoxide (SO) kan waarschijnlijk toegeschreven worden aan het relatief minder wegreageren van dit molecule via enzymereacties of reacties met nucleofielen. Wanneer de eliminatie van de 3 epoxides met elkaar vergeleken wordt, wordt de snelste eliminatie gezien voor SO. Alhoewel EO duidelijk het meest reactieve epoxide is, wordt dit niet gereflecteerd in zijn halfwaardetijd. Dit stemt overeen met de relatief lange halfwaardetijd in zout water van 4 dagen voor EO en 4.1 dagen voor PO (IARC, 1994). De snelle eliminatie van SO is mogelijk te wijten aan het feit dat SO een goed substraat is voor zowel epoxide hydrolase als glutathion S-transferase, wat minder het geval is (zeker voor epoxide hydrolase) voor EO en PO.

2. Tweede-orde snelheidsconstanten voor de 3 epoxides met N-terminaal valine en N-7-guanine

De tweede-orde snelheidsconstanten voor de reactie met N-terminaal valine en N-7-guanine werden reeds beschreven voor EO en PO. De constante voor de reactie tussen N-terminaal valine in menselijk bloed en EO werd geschat op $2.97 \text{ (M Hb}\cdot\text{h)}^{-1}$ (Segerbäck, 1990), zeer dicht bij onze $2.7 \text{ (M Hb}\cdot\text{h)}^{-1}$. Voor de reactie met PO kwam Segerbäck (1994) tot $k_{\text{PO-Hb}} = 1.01 \text{ (M Hb}\cdot\text{h)}^{-1}$, vrijwel gelijk aan onze geschatte waarde.

De manier waarop de tweede-orde reactiesnelheidsconstanten t.o.v. DNA bepaald werden in deze studie was verschillend van vroegere studies. De incubaties gebeurden in deze studie in volledig bloed, daar waar in vroegere studies met geïsoleerd DNA gewerkt werd. De verminderde toegankelijkheid van het DNA in volledig bloed kan dan een verklaring inhouden van het feit dat onze constante voor EO ongeveer de helft is van de literatuurwaarde van $30 \times 10^{-3} \text{ (M DNA nucleotide}\cdot\text{h)}^{-1}$ (Segerbäck, 1983). Voor PO, werd een kleiner verschil gezien tussen onze waarde van $5.1 \times 10^{-3} \text{ (M DNA nucleotide}\cdot\text{h)}^{-1}$ en de literatuurwaarde van $7.7 \times 10^{-3} \text{ (M DNA nucleotide}\cdot\text{h)}^{-1}$ bekomen door Segerbäck (1994).

3. Tweede-orde snelheidsconstanten voor de reactie van cysteïne, N-terminaal valine en de carboxyluiteinden in hemoglobine met SO

De plaatsspecifieke reactiesnelheidsconstanten voor de reactie van SO met hemoglobine is afhankelijk van de intrinsieke reactiviteit, maar ook van het aantal reactieve plaatsen en hun toegankelijkheid. De snelheidsconstanten in tabel 3 tonen relatief gelijklopende waarden voor de drie reactieve plaatsen [2.12, 1.82, and 3.55 $\text{(M Hb}\cdot\text{h)}^{-1}$ voor cysteïne ($\alpha + \beta$ -adduct), valine, en de carboxylresidu's, respectievelijk]. Deze waarden komen goed overeen met vroegere resultaten bekomen met radioactieve technieken. Zo werd er vastgesteld dat ~6% van het totale aan hemoglobine SO gereageerd had met cysteïne (Rappaport *et al.*, 1993), ~3-5% met N-terminaal valine (Byfält Nordqvist *et al.*, 1985; Tang *et al.*, 1991) en ~15% met de carboxylresidu's (Sepai *et al.*, 1993).

Het feit dat in ratten meer cysteïne-adduct gevormd wordt dan in mensen kan verklaard worden door de aanwezigheid van een bijkomend cysteïne op β -125 in rathemoglobine (Hamboek *et al.*, 1981). Ook bij sommige muizen (BALB/c en wild type) werd een extra cysteïne vastgesteld op positie β -13. Bij andere lijnen (C57B1, SWR en NB) was dit echter niet het geval (McDonald *et al.*, 1994). Omdat de reactiesnelheidsconstante $10.7 \text{ (M Hb}\cdot\text{h)}^{-1}$ voor NMRI-muizen in dit experiment relatief groot is ten opzichte van de waarde bij mensen ($2.04 \text{ (M Hb}\cdot\text{h)}^{-1}$), kan dit een aanwijzing inhouden van een extra cysteïne-residu of een ander substantieel verschil in de hemoglobinestructuur.

Voor de reactiesnelheidsconstanten ten opzichte van valine en carboxyl werden geen substantiële interspeciesverschillen verwacht. Er werd dan ook slechts een 5-voudige variatie opgetekend voor de vorming van N-terminaal valine-adducten ($1.82, 0.80, 0.29 \text{ (M Hb}\cdot\text{h)}^{-1}$, bij mens, muis en rat) en nog minder voor de vorming van carboxyladducten ($3.55, 1.94, 2.37 \text{ (M Hb}\cdot\text{h)}^{-1}$, respectievelijk). Alhoewel de variatie kleiner is dan voor cysteïne, kan ze toch wijzen op interspeciesverschillen in de hemoglobinestructuur die nog verder onderzocht moeten worden.

ii) Dierexperimenten (KUL1)

1. Vergelijking met de literatuurgegevens

De gehalten aan N-terminaal valine-adducten door SO kunnen vergeleken worden met deze in de studie van Osterman-Golkar *et al.* (1995). Bij ip injectie van 1 mmol styreen/kg lichaamsgewicht in NMRI muizen rapporteerden Osterman-Golkar *et al.* (1995) 75 pmol SO-val/g Hb, wat in de lijn ligt van onze observaties [60 ± 2.4 (SE) pmol/g (mmol/kg)⁻¹].

Bij toediening van styreen of SO aan Sprague Dawley ratten echter, werd door Osterman-Golkar *et al.* (1995) echter een toename aan adduct van 20 pmol/g (mmol styreen/kg)⁻¹ en 130 pmol/g (mmol SO/kg)⁻¹, respectievelijk, vastgesteld. In deze studie werd daarentegen een toename van 2.1 ± 0.70 pmol/g (mmol styreen/kg)⁻¹ and 437 ± 56 pmol/g (mmol SO/kg)⁻¹ gezien. De richtingscoëfficiënten in de studie van Osterman-Golkar *et al.* (1995) werden echter op het zicht bepaald en waren zeer afhankelijk van de gekozen dosis-range. Bovendien waren de ratten in hun experiment veel kleiner (200-280 g) en jonger dan deze in onze studierend. Mogelijk verklaart het verschil in capaciteit om styreen en SO te metaboliseren dan ook het verschil in de geschatte richtingscoëfficiënten (Kato *et al.*, 1964; McMartin *et al.*, 1980; Kamataki *et al.*, 1985).

De gehalten aan cysteïne-adducten konden niet vergeleken worden met vroegere studies, maar de carboxyl-adductgehalten waren zeer goed vergelijkbaar met deze van Sepai *et al.* (1993). Ook zij gebruikten een basische hydolyse om styreenglycol vrij te zetten van het carboxylresidu. Bij Sprague-Dawley ratten waaraan ip tussen 0.083-0.83 mmol SO/kg lichaamsgewicht werd toegediend, vonden zij 1070 pmol/g per mmol SO/kg lichaamsgewicht, wat niet significant verschillend is van de 1240 ± 240 pmol/g per mmol SO/kg lichaamsgewicht in deze studie.

2. Bespreking van de dosis-adduct relatie (muisexperiment)

Het PBPK-model toont een niet-lineaire toename van de AUC in functie van de dosis aan voor een experiment van 3 uur. Dit lijkt in overeenkomst te zijn met de dosis-adduct relatie zoals ze voor de meeste DNA adducten geobserveerd wordt tussen 0.5 and 4.5 mmol/kg BW. Osterman-Golkar *et al.* (1995) stelden daarentegen in muizen en ratten een sneller dan proportionele toename van de N-terminaal valine-adduct vorming vast, 6 en 24 h na toediening van styreen. Dit fenomeen werd verklaard door de saturatie van de detoxificatie van SO, wat hoogst waarschijnlijk te wijten is aan glutathion depletie. In muizen werd dit fenomeen reeds geobserveerd bij injectie van 1 mmol styrene/kg BW.

In onze studie werd eveneens een exponentiële stijging van de curve gezien, maar wel slechts bij hogere dosissen, te wijten aan de kortere duur van het experiment. Alhoewel simulatie van de AUC met het PBPK-model niet naar glutathion depletie wijst als reden voor de exponentiële toename voor dit experiment doet het dat wel voor langere experimenten. De verlenging van het experiment tot 4.5 of 6h, resulteert in een vorm van de curve die goed overeenkomt met de geobserveerde dosis-adduct relatie. Dit leidt tot de conclusie dat glutathion depletie waarschijnlijk gebeurt bij lagere concentraties dan door het model voorspeld wordt. Dit is in overeenkomst met de soms grote afwijkingen (meer dan één orde-grootte) tussen de voorspelde en de *in vivo* gemeten SO concentratie in het bloed in het bijzonder bij lage concentraties (Csanady *et al.*, 1994). Bovendien wees sensitiviteitsanalyse uit dat de voorspelling van de SO concentratie in het bloed van muizen sterk afhankelijk was van de ingevoerde beginconcentratie cytosolisch glutathion.

De verschillen in de vorm van de dosis-respons curves voor de verschillende adducten geeft aan dat de subcellulaire distributie in het lichaam van SO, glutathion en de betrokken enzymen waarschijnlijk niet uniform is. Bovendien maakt de mogelijke aanwezigheid van mechanismen ter voorkoming van adductvorming dat voorzichtigheid geboden is bij de extrapolatie van het ene adduct naar het ander.

3. HPLC-UV versus ³²P-postlabelling

Tenslotte kan het op basis van deze studie niet uitgesloten worden dat de bepaling van de adductgehalten met HPLC-UV en ³²P-postlabelling kan leiden tot verschillen in de absolute adductgehalten. In het bijzonder de meetwaarde bekomen met HPLC-UV bij 3.61 mmol/kg BW, geeft echter aan dat het verschil tussen beide technieken waarschijnlijk lager ligt dan één orde van grootte. Door de behoefte aan kleinere hoeveelheden DNA, de kleinere standaardafwijkingen en de hogere gevoeligheid blijft de ³²P-postlabelling de aangewezen techniek voor de *in vivo* bepaling van DNA adducten veroorzaakt door styreen.

viii) N-terminaal valine-adducten door ethyleenoxide (EO) bij arbeiders (KUL1)

Onze schatting van het steady state adductgehalte [3163 pmol/g Hb (SE 1926)] bij een blootstelling aan EO van 1 ppm TWA, 8 h/dag, was in overeenstemming met eerder gepubliceerde resultaten. Deze waarde komt overeen met een toename van 9 pmol/g Hb per ppm·h (steady state adductgehalte = adducttoename per tijdseenheid * totale levensduur van de erythrocyt/2). Deze waarde ligt binnen de range 2- 15 pmol/g Hb per ppm·h (8 studies) zoals opgegeven in de review van Ehrenberg en Törnqvist (1995). Deze waarde ligt ook dicht bij het steady state gehalte van 3400 pmol/g Hb zoals gerapporteerd door Törnqvist en Hindsø Landin (1995).

Binnen de subgroep van sterilizatiearbeiders kan de invloed van de woonplaats waarschijnlijk verklaard worden door het feit dat de meeste operators in de stad wonen ($p=0.12$; Odds Ratio = 3.5, 95%CI 0.7-16.8). De operators die meestal hoogst blootgesteld waren, zijn lager geschoold en mogelijk volgen zij minder secuur de voorgeschreven veiligheidsmaatregelen. Dezelfde argumentatie kan waarschijnlijk herhaald worden voor de invloed van de leeftijd. De jongere (hoger geschoolde) arbeiders zijn waarschijnlijk meer vertrouwd met de nieuwe veiligheidsmaatregelen.

Het effect van het rookgedrag op het EO-adductgehalte van de sterilizatiearbeiders werd waarschijnlijk gemaskeerd door de grote variatie in de beroepsblootstelling. Om het achtergrondgehalte en de toename van het adductgehalte door het rookgedrag in te schatten werden dan ook enkel de EO-adductgehalten van de polypropyleenarbeiders beschouwd.

Het achtergrondniveau van N-(2-hydroxyethyl)valine in niet-rokers (27 pmol/g Hb) was in overeenkomst met de waarde van 20 pmol/g Hb (5-25 pmol/g Hb) in de review van Ehrenberg en Törnqvist (1995).

Mogelijke bronnen van endogeen EO die verantwoordelijk kunnen zijn voor dit achtergrondniveau werden aangehaald door Bolt (1996). Peroxidatie van lipiden, oxidatie van vrij methionine, oxidatie van hemine in hemoglobine en het metabolisme van darmbacteriën zijn 4 mogelijke processen die EO kunnen produceren.

Ook de toename ten gevolge van het roken van 10 sigaretten/dag (85 pmol/g Hb), zoals geschat door Ehrenberg en Törnqvist (1995) ligt dichtbij onze 100 pmol/g Hb. De invloed van de woonplaats en passief roken waren niet significant en klein, maar niet inconsistent met de verwachtingen.

iv) **N-terminaal valine-adducten door propyleenoxide (PO) bij arbeiders (KUL1)**

Het gebruik van grotere hoeveelheden hemoglobine (tot 250 mg) liet een accurate bepaling toe van de hoeveelheid N-(2-hydroxypropyl)valine bij mensen. De achtergrondwaarden die in deze studie geobserveerd werden, zijn consistent met de geschatte adductgehalten in niet-rokers (2 pmol/g Hb; Kautiainen and Törnqvist, 1991). Onze schatting van de toename in adduct door het roken van 10 sigaretten per dag (0.4 pmol/10 sigaretten per dag) was echter lager dan de literatuurwaarde (2 pmol/10 sigaretten). Kautiainen en Törnqvist (1991) stelden echter dat hun schattingen van het propyleenoxide-adductgehalte onzeker waren door een gebrek aan betrouwbare data.

Het klein, maar significant verschil tussen het adductgehalte in de sterilisatiefabriek (1.8 pmol/g Hb) en de polypropyleenfabriek (2.4 pmol/g Hb) kan wijzen op lage blootstellingen aan propyleen in deze laatste fabriek. Het verschil in adductgehalte kan echter ook een artefact zijn. Het soort blootstelling, i.e. occasionele blootstelling ten gevolge van lekken doen immers een scheve verdeling van het PO-adductgehalte verwachten. De geobserveerde normale verdeling rond de normale achtergrondwaarde (~2 pmol/g Hb) is daarom niet consistent met de verwachting dat sommige arbeiders, zoals onderhoudsarbeiders, verhoogde adductgehalten zouden vertonen. Een mogelijke verklaring voor dit artefact ligt in het hoog gehalte aan EO-adduct bij de sterilisatie-arbeiders. De PO-adductvorming kan immers in competitie treden met de vorming van N-(2-hydroxyethyl)valine op dezelfde plaats. Ook de ratio van de efficiënties van de Edmandegradatie van adduct en interne standaard kan lichtjes gewijzigd zijn in hoog gealkyleerd hemoglobine. Dit kan op zijn beurt leiden tot lichte veranderingen in het gemeten adductgehalte.

v) **Microsomaal epoxide hydrolase-arbeidersgroep (KUL1)**

Deze studie leverde een 5-voudige interindividuele variatie in microsomaal epoxide hydrolase activiteit. De geobserveerde variatie is vergelijkbaar met die vastgesteld in vroegere studies (factor 9, Glatt et al. 1985; factor 1.6, Kroetz et al. 1993, factor 5, Nakajima et al. 1993). De microsomaal epoxide hydrolase activiteit bleek geen invloed te hebben op het aantal klachten gedurende de blootstelling en ook niet op de reversibiliteit van de klachten. De visuomotor performantie daarentegen was het sterkst verlaagd in snelle metabolisatoren, maar enkel wanneer de blootstellingsduur in het multiple regressiemodel opgenomen werd. Alhoewel blootstelling aan styreen de belangrijkste factor blijft in het ontwikkelen van neurologische effecten, kunnen deze blijkbaar bijkomend beïnvloed worden door de fenotypische microsomaal epoxide hydrolase activiteit.

vi) **GST-arbeidersgroep (KUL1)**

1. GSTM1 en GSTT1-genotypes

58 % GSTM1-deficiënte individuen komt vrij goed overeen met een schatting van een 50/50 verdeling tussen deficiënte en niet-deficiënte personen bij Noord-Amerikanen van het Kaukasische type (reviewed by Nelson et al., 1995).

Onze waarde van 45% deficiënte individuen voor GSTT1 ligt daarentegen iets hoger dan de literatuurwaarde van 24 % deficiënte personen bij Noord-Amerikanen van de Kaukasische etnie. Grote variaties kunnen echter optreden tussen verschillende populaties, wat aangetoond wordt door de meer dan 60% GSTT1-deficiënte individuen in Chinese en Koreaanse populaties (Nelson et al., 1995).

2. Invloed op de EO-adductvorming

Het geobserveerde achtergrondniveau van N-(2-hydroxyethyl)valine in niet-rokers (88 pmol/g Hb) was zeer hoog vergeleken met de waarde van 20 pmol/g Hb (5-25 pmol/g Hb) in de review van Ehrenberg en Törnqvist (1995). Zelfs in de subgroep van de nagekomen stalen, waaruit het hemoglobine zo snel mogelijk geïsoleerd werd lag de achtergrondwaarde nog hoog (60 pmol/g Hb). Een eerste mogelijke verklaring ligt in relatief hoge en regelmatige blootstelling (vb: uitlaatgassen, passief roken) aan de respectievelijke alkenen en/of hun epoxides. Op basis van de beschikbare gegevens kon deze eventuele blootstelling echter niet gekwantificeerd worden. Een tweede mogelijkheid is het optreden van mogelijke artefacten ten gevolge de stockage als gelyseerd bloed. Ten gevolge van de manier van hemoglobine isoleren is immers altijd een periode van stockage op 20°C ingebouwd (minimum 1 nacht). Törnqvist (1990) rapporteerde dat dit mogelijk aanleiding gaf tot verhoogde adductgehalten. Het feit dat de resultaten iets beter zijn in de subgroep van de nagekomen stalen is dan ook naar alle waarschijnlijkheid te danken aan de snellere isolatie van het hemoglobine wat het aantal artefacten toch enigszins verminderde. In contrast met de afwijkende achtergrondwaarde, lag de toename ten gevolge van het roken van 10 sigaretten/dag (85 pmol/g Hb), zoals geschat door Ehrenberg en Törnqvist (1995) dichtbij onze gemiddelde waarde van 71 pmol/g Hb.

Wat betreft de invloed van de GSTgenotypes, kan gesteld worden dat de aanwezigheid van het GSTT1-gen en dus ook het corresponderende erytrocytisch enzyme resulteert in verlaagde N-terminaal valine adducten door EO ten gevolge van roken. Bovendien lijkt de afwezigheid van het GSTM1, een vermindering van adductvorming te veroorzaken. Mogelijk kan dit verklaard worden door een compensatoire stijging van de activiteit van andere GSTs (o.a. GSTT1) in geval van afwezigheid van GSTM1. Omgekeerd gesteld is het mogelijk dat in het geval van aanwezigheid van het GSTM1-enzyme een deel van het beschikbare glutathion door dit enzyme gebruikt wordt zodat het niet meer beschikbaar is voor bijvoorbeeld het GSTT1-enzyme.

3. PO-en SO-adductvorming

De achtergrondwaarden die in deze grote groep geobserveerd werden waren opnieuw consistent met de geschatte adductgehalten in niet-rokers (2 pmol/g Hb ; Kautiainen and Törnqvist, 1991). Ook de schatting van de toename in adduct door het roken van 10 sigaretten per dag (0.3 pmol/10 sigaretten per dag) ligt eerder in de buurt van de waarde bekomen in onze vorige studies (0.4 pmol/10 sigaretten per dag) dan in de buurt van de literatuurwaarde (2 pmol/10 sigaretten per dag).

Het feit dat alle SO-adductmetingen onder de detectielimiet liggen voldoet aan de verwachting dat deze adducten met de gegeven techniek slechts meetbaar zijn bij hoge blootstellingen. Severi et al. (1994) concludeerden immers reeds dat opdat de adductvorming meetbaar zou zijn met deze techniek een gemiddelde blootstelling van ongeveer 70 ppm TWA vereist was.

vii) Mesures des adduits à l'ADN (ULg)

L'identification des adduits à l'ADN et leur utilisation - en temps que biomarqueurs d'exposition - est un problème analytique délicat eut égard à la quantité extrêmement faible de substance à détecter. Dans nos expériences, le taux d'adduit formé se situe très souvent proche du seuil de sensibilité de la méthode (limite de détection) et parfois même inférieur à celui-ci. Cette situation implique une grande précision au niveau de l'analyse des spectres de masse (afin d'éviter les faux positifs ou négatifs) et au niveau de l'étude de reproductibilité des résultats. Préalablement à l'application de la méthodologie de détection des adduits dans une étude d'épidémiologie moléculaire sur des sujets exposés à des époxydes, nous avons effectués une série d'étapes successives de mise au point et de validation de la méthode.

Au cours de notre étude des adduits à l'ADN (restreinte dans un premier temps aux adduits à l'ADN induit par un époxyde puissant : l'oxyde d'éthylène), la première étape a consisté en la mise au point d'une méthode d'identification et de dosage fiable et reproductible de l'adduit principal (90%) la N7 (2 hydroxyethyl) guanine (7HEG) basée sur la spectrométrie de masse.

La méthodologie utilisant la spectrométrie de masse à ionisation par impact électronique couplée à la chromatographie gazeuse présente des problèmes technologiques inhérents aux réactions de dérivation préalable des échantillons à analyser ainsi qu'au comportement des dérivés formés en spectrométrie.

Ce type de technique requiert, préalablement à l'analyse de l'échantillon par spectrométrie de masse, une dérivation de cet échantillon correspondant à l'ajout de groupements triméthylsilyl (TMS). Ces dérivés TMS sont de nature instable et nécessitent d'être injectés dans un laps de temps très court après leur synthèse.

Cet instabilité constitue inévitablement un handicap pour son utilisation en routine quoique des solutions alternatives puissent être envisagées (stockage de l'adduit non dérivés et/ou utilisation de dérivés plus stables comme le TBDMS (tertbutyldimethylsilyl)).

Un problème qui s'est avéré être majeur est le manque de reproductibilité dans l'identification quantitative des adduits avec le mélange de dérivation lorsque ces adduits étaient présents à de faibles concentrations. Des difficultés de reproductibilité dans l'établissement des courbes doses-effet sont également apparues. L'influence de ces paramètres en tant que facteurs confondants sont relatés à de nombreuses reprises dans la littérature.

Malgré l'emploi de la spectrométrie de masse en tandem (MS/MS) en mode MRM (multiple reaction monitoring, technique la plus sensible en spectrométrie de masse), nous n'avons pu détecter l'adduit 7HEG en échantillon standard de manière reproductible à une concentration concordant avec le risque cancérigène susmentionné. Les raisons sont, outre une sensibilité trop peu élevée de l'appareil, des problèmes liés à la réaction de dérivation de l'échantillon lorsque celui-ci atteint des concentrations aussi basses que celles utilisées pour nos investigations.

La sensibilité de la méthode, sur base d'un prélèvement sanguin de 10 ml, doit concorder avec la détection d'un risque cancérigène équivalent à une base d'ADN modifiée sur dix millions de bases intactes.

Les premiers essais réalisés en GC/MS ont montré une identification non ambiguë de l'adduit (avec entre autre une transition montrant la perte du groupement hydroxyethyl par l'ion moléculaire). La sensibilité de la méthode ne concorde cependant pas avec le risque cancérigène mentionné plus avant.

Ce manque de sensibilité et de reproductibilité peut être attribué, outre aux lacunes propres à la GC/MS, à un problème lié à la réaction de dérivation préalable à l'introduction du composé sur la colonne de chromatographie. La cinétique de dérivation apparaît en effet extrêmement difficile à contrôler lorsque l'on atteint des concentrations aussi faibles que celles envisagées ici (de l'ordre de 10 femtomoles d'adduit par μl de solution).

L'emploi de la spectrométrie de masse en tandem toujours couplée à un chromatographe en phase gazeuse (GC/MS/MS) a permis d'améliorer la limite de détection d'un facteur 10 à 100 par rapport à la GC/MS conventionnelle. Les spectres de perte de neutre et d'ions filles ont en outre confirmé la perte intense du groupement hydroxyethyl adduit par l'ion moléculaire. Malgré cet aspect qualitatif excellent, la sensibilité et la reproductibilité de la méthode se sont avérées insuffisantes en regard des exigences auxquelles nous devons répondre.

L'emploi d'un spectromètre de masse à ionisation électrospray couplé à une colonne HPLC nous a permis d'améliorer sensiblement notre analyse de la 7HEG. Le fait de travailler en phase liquide nous a permis de supprimer l'étape de dérivation préalable, ce qui nous a apporté un gain important de reproductibilité et de sensibilité (une augmentation de la fraction d'adduits détecté par rapport au taux d'adduits initialement présent sur l'ADN, une très faible fraction étant perdue lors des dérivations). Une courbe de calibration linéaire de la 7HEG a été obtenue jusqu'à 100 femtomoles d'adduit injectées.

L'amélioration essentielle est liée à l'augmentation de sensibilité présentée par la méthode HPLC/ESMS développée dans ce but. Des adduits isomères induits par l'EO: les N-7-HOEtGua et O6 -HOEtGua, ont pu être finalement détectés à des concentrations de 10^{-10} moles/L, ce qui se rapproche de la sensibilité des techniques de ^{32}P post labeling.

L'approche consistant à purifier les adduits préalablement à leur injection diminue la survenue de faux positifs et autorise une très bonne reproductibilité des mesures effectuées au cours de la même journée.

Au vu de l'expérience acquise au cours de ce programme, il semble que l'approche méthodologique idéale serait la spectrométrie de masse à ionisation électrospray en tandem couplée à la HPLC.

Sur base des expériences utilisant l'oxyde d'éthylène, l'analyse des adduits à l'ADN chez des sujets potentiellement exposés à des agents génotoxiques pourrait être envisagée pour 3 raisons majeures (Leclercq, 1998). a) L'hydrolyse thermique en milieu neutre permet la récolte des adduits en N_7 de la guanine et en N_3 de l'adénine; b) l'analyse par multiple reaction monitoring offre une sélectivité élevée et c) les temps de rétention des pics observés dans les échantillons humains exposés *in vitro* correspondent à ceux obtenus avec ceux obtenus pour les standards de référence.

La détection des adduits sur base de cette méthodologie serait de l'ordre d'une base modifiée sur 10^8 nucléotides.

Ces techniques utilisant l'hydrolyse thermique en milieu neutre s'avère extrêmement contributive pour les adduits formés par les composés de faible masse, mais sont incapables de détecter des adduits induits par les HaP ou les amine aromatiques.

Sur base des expériences réalisées après exposition d'ADN isolé ou de cellules sanguines dont l'ADN est ensuite extrait, il apparaît, en première évaluation, que les taux d'adduits formés pour des doses les plus faibles d'EO sont équivalents voire inférieurs à ceux de sujets non exposés. Etant donné le rendement très différent pour ce qui concerne l'extraction d'ADN dans les 2 situations, il est possible que l'exposition se traduise par une dégradation cellulaire en rapport avec la dose d'EO.

Cette diminution sélective des cellules endommagées aurait pour conséquence que seules les cellules les moins endommagées et dès lors présentant un taux d'adduits à l'ADN moindre seraient disponibles pour l'examen. Cette hypothèse pourrait apporter un élément de réponse à cette observation inattendue.

Par son degré élevé de sensibilité et de sélectivité, les résultats obtenus dans ce travail montrent sans ambiguïté les avantages de la technique de HPLC/ES MSMS comme approche technologique de détection des adduits à l'ADN

VI. BIJLAGEN

a) KUL1

1. Publicaties in internationale tijdschriften

Severi M, Pauwels W, Van Hummelen P, Roosels D, Kirsch-Volders M, Veulemans H. Urinary mandelic acid and hemoglobin adducts in fiberglass-reinforced plastics workers exposed to styrene. *Scand. J. Work. Environ. Health* 1994;20:387-394.

Van Hummelen P, Severi M, Pauwels W, Roosels D, Veulemans H, Kirsch-Volders M. Cytogenetic analysis of lymphocytes from fiberglass-reinforced plastics workers occupationally exposed to styrene. *Mutat. Res.* 1994;310:157-165.

Pauwels, W., Vodicka, P., Severi, M., Plna K., Veulemans H., and Hemminki, K., Adduct formation on DNA and haemoglobin in mice intraperitoneally administered with styrene. *Carcinogenesis*, 1996, 17(12), 2673-2680.

Pauwels, W., Farmer, P.B., Osterman-Golkar, S., Severi, M., Cordero, R., Bailey, E., and Veulemans, H., Ring test for the determination of N-terminal valine adducts of styrene-7,8-oxide on hemoglobin by the modified Edman degradation technique, *Journal of Chromatography B*, 1997, 702,77-83.

Yeowell-O'Connell, K., Pauwels, W., Severi, M., Jin, Z., Walker, M.R., Rappaport, S.M., and Veulemans, H. Comparison of styrene-7,8-oxide adducts formed via reaction with cysteine, N-terminal valine and carboxylic acid residues in human, mouse and rat Hb, *Chem.-Biol. Interact.*, 1997,106, 67-85.

Pauwels, W., and Veulemans, H. Comparison of ethylene, propylene and styrene 7,8-oxide adduct formation *in vitro* on N-terminal valine in human haemoglobin and on N-7-guanine in human DNA. *Mutat. Res.*, accepted.

b) KUL2

1. Publicaties in internationale tijdschriften

Roesems G., Hoet P.H.M., Demedts M., Nemery B.
Toxicity of cobalt and cobalt chloride in primary cultures of rat and human type II pneumocytes
(Conference Abstract).
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 1996, 153, A643

Roesems G., Hoet P.H.M., Demedts M., Nemery B.
In vitro toxicity of cobalt and hard metal dust in rat and human alveolar type II pneumocytes
(Conference Abstract).
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 1997, 155, A827

Roesems G., Hoet P.H.M., Demedts M., Nemery B.
In vitro toxicity of cobalt and hard metal dust in rat and human type II pneumocytes
Pharmacology and Toxicology, 1997, 81, 74-80

Roesems G., Hoet P.H.M., Demedts M., Nemery B.
In vitro cytotoxicity of various forms of Co for rat alveolar macrophages and type II pneumocytes
Opgezonden naar Toxicology and Applied Pharmacology

2. Bijgewoonde congressen

Joint BIOMED/British Association for Lung Research workshop in Leicester, U.K., van 1 tot 3 april 1995 over '*in vitro* toxicologisch onderzoek in de long'.

V.U.B., Laboratorium voor Anthropogenetica, 6 juni 1995, seminarie over o.a. celproliferatie *in vitro*.

BIOMED meeting, Leuven, 31 maart en 1 april 1996 over '*in vitro* toxicologisch onderzoek in de long'.

American Thoracic Society, International Conference, New Orleans, U.S.A., van 10 tot 15 mei 1996, met poster-mededeling over 'Toxicity of cobalt and cobalt chloride in primary cultures of rat and human type II pneumocytes'

30 oktober 1996, Brussel, Paleis voor congressen: Studiedag. Gezondheidsrisico's i.v.m. beroepsblootstellingen.

American Thoracic Society, International Conference, San Fransisco, U.S.A., van 16 tot 21 mei 1997, met poster-mededeling over '*In vitro* toxicity of cobalt and hard metal dust in rat and human type II pneumocytes'

American Thoracic Society, International Conference, Chicago, U.S.A., van 24-29 april 1998.

c) UCL

1. Publications dans des revues nationales

Lison D (1997). Evaluation des risques : apports de l'épidémiologie moléculaire. *Louvain Médical* 116:S123-S131.

2. Publications dans des revues internationales

Lison D., Carbonnelle Ph., Mollo L., Lauwerys R. and Fubini B.- Physicochemical mechanism of the interaction between cobalt metal and carbide particles to generate toxic activated oxygen species. *Chem Res Toxicol* 8:600-606 (1995)

Lasfargues G., Lardot C., Delos M., Lauwerys R. and Lison D.- The delayed lung responses to single and repeated intratracheal administration of pure cobalt and hard metal powder in the rat. *Environ Res* 69:108-121 (1996).

Leroy Th., Van Hummelen P., Anard D., Castelain Ph., Kirsch-Volders M., Lauwerys R. and Lison D.- Evaluation of three methods for the detection of DNA single strand breaks in human lymphocytes: alkaline elution, nick translation and single cell gel electrophoresis. *J Toxicol Environ Health* 47:409-422 (1996).

Lison D., Lauwerys R., Demedts M, Nemery B (1996) Experimental research into the pathogenesis of cobalt/hard metal lung disease. *Eur Respir J* 9:1024-1028

Lison D (1996) Human toxicity of cobalt-containing dust and experimental studies on the mechanism of interstitial lung disease (hard metal disease). *Crit Rev Toxicol* 26:261-307.

Lison D, Buchet J-P, Hoet P (1997). Toxicity of tungsten (letter) *Lancet* 349:58.

Anard D, Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Belpaeme K and Lison D (1997). *In vitro* genotoxic effects of hard metal particles assessed by the alkaline single cell gel and elution assays. *Carcinogenesis* 18:177-184.

Van Goethem F, Lison D, Kirsch-Volders M. (1997) Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the single cell electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. *Mutation Res* 392:31-44.

De Boeck M., Lison D, Kirsch-Volders M (1998) Evaluation of the *in vitro* direct genotoxic effects of cobalt compounds using the alkaline comet assay. Influence of interdonor and interexperimental variability. *Carcinogenesis* 19:2021-2029.

Lison D. (1998) Hard metal disease. in : *Environmental and Occupational Medicine*. 3rd Edition W.N. Rom (Ed) Little Brown and Co, pp. 1037-1044..

3. Présentations comme orateur invité

Lison D. Mechanisms in hard metal and cobalt-related lung toxicity. Symposium on the Respiratory effects of metals: toxic and immunologic mechanisms. American Thoracic Society Seattle, May 23, 1995.

Lison D. Health and safety in the hard metal industry: The varying biological effects of cobalt metal and hard metal particles. European Particle Metallurgy Association (EPMA) short course, Grenoble 29-31 May 1995.

Lison D. The role of activated oxygen species in the respiratory toxicity of cobalt-containing particles. FNRS contact group "Free radicals", Louvain-en-Woluwe 26 octobre 1995.

D. Lison. Update on the toxicology of cobalt : carcinogenesis. Cobalt Development Institute, Environmental Health Symposium, Firenze, September 1997.

D. Lison. Evaluation expérimentale de la toxicité des différentes formes de cobalt rencontrées en milieu industriel. Colloque "Les risques chimiques liés aux métaux" organisé par l'Institut national de Recherche en Sécurité (INRS) à Nancy, le 3 mars 1998.

D. Lison. Mechanisms of the respiratory toxicity of cobalt-containing particles. Workshop on "Metals in Medicine - Industrial Perspectives" held at the Bio-Industry Park in Ivrea (Italy)- 6-7 December 1998 under the EU-COST Scheme.

4. Assistance congrès

Zanetti G., Lison D., Mollo L, Lauwerys R and Fubini B. The role of free radicals in hard metal disease, 2nd international workshop on *in vivo* ESR and ESR imaging., L'aquila, Italie, 10-14 September 95.

Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Belpaeme K, Anard D, Lison D and Lauwerys R. Induction of single strand-breakage (comet assay) by pure cobalt powder and a cobalt-tungsten carbide mixture *in vitro* in human lymphocytes. Belgian Environmental Mutagenesis Society, Gent 8 December 1995.

Anard D, Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Belpaeme K, Lison D. *In vitro* genotoxic effects of hard metal particles assessed by alkaline elution assay. Belgian Environmental Mutagenesis Society, Gent 8 December 1995.

D. Anard, M. Kirsch-Volders, A. Elhajouji, K. Belpaeme and D. Lison. Effets génotoxiques *in vitro* de particules de métaux durs évalués par les techniques d'alkaline single cell gel electrophoresis et d'élution alcaline. Symposium "Health and Environment" , Louvain en Woluwé, 14 mars 1997.

5. Prix scientifiques

Prix Santé et Entreprise du Club européen de la Santé à D. Lison pour un travail intitulé " Etudes du mécanisme de la toxicité pulmonaire des poussières contenant du cobalt et implications en hygiène industrielle. (Luxembourg 1995).

Prix Melsens de l'Académie royale de Médecine à D. Lison pour un travail intitulé "Mécanisme de la toxicité pulmonaire des poussières de métaux durs" (Bruxelles, 1997)

6. Mémoires et thèses de doctorat

Natasa Mlakar - Mise au point du dosage de la 8-hydroxydéoxyguanosine par HPLC. Mémoire présenté pour l'obtention du DES en Toxicologie analytique, UCL, année académique 1995-1998.

Hoang Vinh-Thinh - Evaluation *in vivo* du potentiel génotoxique de particules inhalables contenant du cobalt. Mémoire présenté pour l'obtention du titre de gradué en Chimie - Institut Paul Lambin, Section Chimie, orientation Biotechnologie. année académique 1997-1998.

D. Lison a fait partie du jury de la thèse de doctorat de W. Pauwels (laboratoire membre du réseau SSTC, K.U. Leuven) défendue en mai 1998. Titre de la thèse : "Adducts on haemoglobin and DNA by the epoxides of ethylene, propylene and styrene. Method development and the study of kinetic and metabolic parameters affecting the amount of adduct formed".

7. Autres

Le Cobalt Development Institute a demandé à D. Lison de produire plusieurs documents scientifiques concernant la toxicité du cobalt :

- NTP study with Co sulfate (mars 1997)
- Update on the toxicology of cobalt (septembre 1997)
- Carcinogenic potential and EC classification of cobalt compounds (octobre 1997), for discussion at the EC Ispra meeting (DG XII working group)
- Update on the carcinogenicity of cobalt and its compounds - Importance of speciation (mars 1998).

D. Lison a été invité par l'Institut National de Recherche et de Sécurité (France) à faire partie du Comité de pilotage coordonnant les efforts de recherche de cet institut en France. Une première réunion de ce comité a eu lieu à Paris au mois de mars 1998.

d) ULg

1. Publications

Unexpected decrease in cytogenetic biomarker frequencies observed after increased exposure to organophosphorus pesticides in a production plant. Ch. Laurent, P. Jadot, Dr. Ch. Cabut. International Archives of Occupational and Environmental Health, Vol 68 - 6, 399-404, 1996.

Estimating the proportion of lymphoblastoid cells affected by exposure to ethylene oxide through micronuclei count J.K. Lindsey and Ch. Laurent. The Statistician, 45-2, 223-229, 1996.

Spontaneous complete remission and recovery of donor hematopoiesis without GVHD after relapse and apparent marrow graft rejection in poor prognosis myelodysplastic syndrome Yves Beguin, Joelle Collignon, Christian Laurent, Georges Fillet. British Journal of Haematology. 1996.

Quantitative analysis of N7(2 Hydroxyethyl) guanine, the major adduct formed after exposure to ethylene oxide, by gas chromatography/mass spectrometry and high performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry
Leclercq L., Laurent Ch., De Pauw E., Ghitti G. And Foidart J.M. Arch. Public Health 1995, 53, 123-137.

Correlation between P450 CYP1A1 inducibility, MspI genotype and lung cancer incidence. Jacquet, M., Lambert, V., Baudoux, E., Kremers, P. & Gielen, J. European Journal of Cancer, 32A : 1701-1706, 1996.

Mitogen-activated lymphocytes : a good model for characterising lung CYP1A1 inducibility. Jacquet, M., Lambert, V., Todaro, A. & Kremers, P. European Journal of Epidemiology, 13 : 1-7, 1997.

Interlaboratory comparison of different cytogenetic endpoints for scoring of radiation damage in peripheral blood lymphocytes after *in vitro* low dose gamma exposure. H. Thierens, A. Vral, L. de Ridder, M. Kirsch Volders, N. Touil, Ch. Laurent, V. Lambert. Mutat Res. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 1997, 379, S 138.

Occupational biomonitoring with cytological or molecular biomarkers : competition or collaboration ? Ch. Laurent, L. Leclercq, V. Lambert, M. Forst. Mutat Res. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 1997, 379, S 138.

High performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry for the analysis of modified bases in DNA: 7-(2-hydroxyethyl)guanine, the major ethylene oxide-DNA adduct. Leclercq L., Laurent Ch. And De Pauw E. Anal. Chem. 1997, 69, 1952-1955.

Simultaneous detection of 7-(2-hydroxyethyl) guanine and 3-(2-hydroxyethyl)adenine on a human population by high performance liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry
Leclercq L., De Pauw E., Laurent Ch., Kremers P., and De Graeve J Anal. Chem. 1998. Submitted.

Inter-laboratory comparison of cytogenetic endpoints for the biomonitoring of radiological workers.
Thierens H., Vral A., De Ridder L., Touil N., Kirsch-Volders M., Lambert V. & Laurent C. Int. J. Radiat. Biol 1998, *in press*.

Interlocking biological and political uncertainties in public decision making: a case study at Mellery (Belgium).

Fallon C. and Laurent Ch. *in* « Risk Analysis - Opening the process" *in press*. 1998.

Utilisation de la spectrométrie de masse dans l'analyse d'adduits à l'ADN et à l'Hémoglobine. Laurent Leclercq. Thèse présentée en vue de l'obtention du titre de Docteur en Sciences Chimiques. Université de Liège, année académique 1997-1998, 254 pages. Mention Obtenue : La plus grande distinction.

2. Conférencier invité et missions scientifiques

Effects of low radiations on the chromosomes damages, an application of the FISH method. Ch Laurent & V. Lambert. FISH Biodosimeter Meeting, National Radiological Protection Board; Chilton, United-Kingdom. february 1997.

Assessment of environmental or occupational exposure to genotoxic chemicals using cellular biomarkers : When and Which one ?

Ch. Laurent. Gordon Research Conference on genetic Toxicology : Boston june 1997.

Annual meeting of the American Association on cancer research : April 1997.

Topical Day on Biological Effects of Radiation. SCK-CEN ; Mol may 1997.

Low doses radiation induced chromosomal aberrations.

V. Lambert, Ch. Laurent, M. Forst. Second meeting of the EEC concerted action : The Use of F.I.S.H. technique for Biological Dosimetry Greece, september 1997.

Occupational biomonitoring with cytological or molecular biomarkers : competition or collaboration ?

Ch. Laurent, L. leclercq, V. Lambert, M. Forst. International Conference on environmental Mutagens, Toulouse 7- 12 september 1997.

Biomonitoring As A Tool In Exposure Assessment.

Ch. Laurent. Second EEC Workshop on Risk Assessment : Theory and Practice on Human Health, Copenhagen 27 - 29 october 1997.

Biomonitoring potentially exposed people to environmental genotoxic chemicals as part of health prevention programs. Ch. Laurent. Invited by the National Institute of Health, SantaFe de Bogota, Colombie., mai 1998.

Mutagenèse & Cancérogenèse en relation avec les pesticides.

Ch. Laurent. Indoor Pollution Conference organisé par la faculté de Médecine de l'Université de Liège. juin 1998.

A usefull tool for biodosimetry in case of radioiodine treatment : the FISH method V. Lambert. Third meeting of the EEC concerted action : The Use of F.I.S.H. technique for Biological Dosimetry

Interlocking biological and political uncertainties in public decision making: a case study at Mellery (Belgium).

Fallon C. and Laurent Ch. 1998 annual conference of the Society of Risk Analysis - Opening the process" Paris, October 11-14, 1998.

e) VUB

1. Publicaties in internationale tijdschriften

Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors *in vitro* in human lymphocytes.

A. Elhajouji, F. Tibaldi and M. Kirsch-Volders
Mutagenesis 1997, 12, 3, 133-140

Numerical aberrations of chromosome 1 and 17 in tumor cell lines of the exocrine pancreas as determined by fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

B. Verdoodt, I. Charletta, E. Maillet and M. Kirsch-Volders
Cancer Genetics and Cytogenetics, 1997, 94, 125-130

Nereis virens (Annelida : Polychaeta) is not an adequate sentinel species to assess the genotoxic risk (Comet assay) of PAH exposure to the environment.

M. De Boeck and M. Kirsch-Volders
Environmental and Molecular Mutagenesis, 1997, 30, 82-90

Towards a validation of the micronucleus test.

M. Kirsch-Volders
Mutation Res., 1998, 392, 1-4

The *in vitro* micronucleus test : a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction.

M. Kirsch-Volders, A. Elhajouji, E. Cundari, P. Van Hummelen
Mutation Res., 1997, 392, 19-30

Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents : genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide.

F. Van Goethem, D. Lison and M. Kirsch-Volders
Mutation Res., 1997, 392, 31-43

Conclusions of the Special Issue on the *in vitro* micronucleus test.

S. Albertini and M. Kirsch-Volders
Mutation Res., 1997, 392, 183-185

Cell cycle dependent aneuploidy induction on the MNT *in vitro* in human lymphocytes.

I. Tallon, L. Verschaeve and M. Kirsch-Volders
Microscopy Research and Technique, 1997, 1-10

In vitro mutagenicity and genotoxicity study of a number of short-chain chlorinated hydrocarbons using the micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (Comet assay) in human lymphocytes : a structure-activity relationship (QSAR) analysis of the genotoxic and cytotoxic potential.

M. Tafazoli, A. Baeten, P. Geerlings and M. Kirsch-Volders
Mutagenesis, 1998, 13, 2, 115-126

Spindle poisons can induce polyploidy by mitotic slippage and micronucleates in the cytokinesis-block assay.

A. Elhajouji, M. Cunha and M. Kirsch-Volders
Mutagenesis, 1998, 13, 2, 193-198

Aneuploidy : a report of an ECETOC task force
M.J. Aardema, S. Albertini, P. Arni, L.M. Henderson, M. Kirsch-Volders, J.M. MacKay, A.M. Sarraf, D.A. Stringer and R.D.F. Talman
Mutation Research, 1998, 410, 3-79

Towards a unifying model for the metaphase/anaphase transition.
M. Kirsch-Volders, E. Cundari and B. Verdoodt
Mutagenesis, 1998, 13, 4, 321-335

Scoring of different cytogenetic endpoints after *in vitro* low dose g-exposure : interlaboratory comparison for biomonitoring of radiological workers.
H. Thierens, A. Vral, L. De Ridder, N. Touil, M. Kirsch-Volders, V. Lambert and C. Laurent
International Journal for Radiation Biology, in press

Evaluation of the *in vitro* direct and indirect genotoxic effects of cobalt compounds using the alkaline Comet assay. Influence of interdonor and interexperimental variability.
M. De Boeck, D. Lison and M. Kirsch-Volders
Carcinogenesis, 1998, 19, 11, 2021-2029

The use of the HSAB principle in quantitative structure-activity relationships in toxicological research : an application to the genotoxicity of chlorinated hydrocarbons.
A. Baeten, M. Tafazoli, M. Kirsch-Volders and P. Geerlings
International Journal of Quantum Chemistry, in press, 1998

Concepts of thresholds in mutagenesis and carcinogenesis.
M. Kirsch-Volders, M. Aardema and A. Alhajouji
Mutation Research, submitted

2. Uitgaven van boeken

IARC Monograph, volume 60 : Some Industrial Chemicals.
1994

IARC Monograph, volume 66 : Some Pharmaceutical Drugs
1996

IARC Monograph, volume 73 : Evaluation of Some Chemicals
1998

3. Voordrachten als uitgenodigde spreker

Threshold for aneuploidy by chemicals EMS, St. Louis, USA, March 1995

Threshold for aneuploidy by chemicals Aneuploidy Workshop, Sorrento, April 1995

Identification of aneugenic events *in vitro* in human lymphocytes, *in vivo* during rat hepatocarcinogenesis and human preneoplastic cervical lesions. Laurence Livermore
National Laboratory San Francisco, March 1995

Test for aneuploidy : somatic cells.
27th Annual Meeting of the American Mutagen Society, Victoria, Canada, March 1996

Relationship between DNA lesions, Mutations and Cancer.
Joined meeting of the Belgian Environmental Mutagen Society and the Belgian Society for Cell Biology, Brussels, March 1996

Existence d'une dose seuil dans l'induction de l'aneuploidie.
Réunion Annuelle de la Société GFR Française de Mutagenèse, Paris, May 1996

Use of cytogenetic tests for Environmental Biomonitoring, University of Liaoning.
Shenyang, Liaoning Province, China, November 1996

Test du Micronoyau *in vitro* comme méthode d'évaluation de l'aneuploidie.
Club de Mutagenèse Pratique, Paris, May 1997

Use of Image Analysis combined with Fluorescence *in situ* hybridisation (FISCH) for the study of subcellular structures.
Faculty of Applied Sciences, VUB, May 1997

The value of new methods in genetic toxicology compared to classical methods : conclusion.
Belgian Environmental Mutagen Society, June 1998

Doses seuil: concepts en mutagenèse et cancerogenèse
Club de Mutagenèse, Paris 1998

Aneuploidy detection in vitro and in vivo
EU-contact meeting, Athens, april 1998

Towards a unifying model for the metaphase/anaphase transition
Aneuploidy Workshop, Porto, july 1998

Concepts for thresholds in mutagenesis and carcinogenesis
EEMS Meeting, Salzburg, september 1998

In vitro Micronucleus Test : EMS Environmental Mutagen Society, Washington D.C., March 1999

M. De Boeck: 09/05/1997: "Mutagenic and co-mutagenic effects of cobalt compounds in human blood cells measured by the Comet assay" (M. De Boeck, M. Saaristo, F. Van Goethem and M. Kirsch-Volders) - BIBRA International: "Comet Workshop" - Croydon, Surrey (UK).

M. De Boeck: 06/06/1997: "Cobalt mutagenicity and DNA repair studies using the Comet assay" (M. De Boeck and M. Kirsch-Volders) - Annual Meeting of the Belgian Environmental Mutagen Society - Geel (B).

M. De Boeck: 09/09/1997: "Comparative study of the *in vitro* genotoxic and co-genotoxic effects (Comet assay) of hard metal particles in human lymphocytes and rat alveolar cells" (M. De Boeck, C. Costa, G. Roesems, B. Nemery and M. Kirsch-Volders) - 28th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS), Salzburg (A).

4. Contibuties als expert aan internationale werkgroepen

IARC for three Monograph programmes
ECETOC for aneuploidy task force 1993-1996

ECETOC for workshop on thresholds 1997-1998

NIEHS – Research Triangle Parc – North Carolina, USA, Aneuploidy workshop, 1995

WHO-Genève: Evaluation of new antiparasitic drugs, 1996

Fumonisine, 1999

5. Bijgewoonde congressen

08/12/1995: *Belgian Environmental Mutagen Society (BEMS)* - "From Occupational to Environmental Exposure: Use of Biomarkers" - Gent (B).

09/03/1996: *Belgian Society for Cell Biology & Belgian Environmental Mutagen Society* - "Chemically and Radiation-induced DNA Lesions" - Brussel (B).

09/05/1996: *Section Genetic Toxicology & Belgian Environmental Mutagen Society* - "Modern Techniques in Chromosome Analysis; Applications in Biomedical Research" - Etten-Leur (NL).

30/11/1996: *Federale Diensten voor Wetenschappelijke, Technische en Culturele Aangelegenheden (D.W.T.C.)* - "Gezondheidsrisico's i.v.m. beroepsblootstellingen: Onderzoek naar nieuwe strategieën voor de detectie en evaluatie ervan, formulering van aanbevelingen" - Brussel (B).

European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals (ECETOC) - Workshop on Genetic Polymorphisms - Brussel (B).

08/05-10/05/1997: *BIBRA International* - "Comet Workshop" - Croydon, Surrey (UK).

06/06/1997: *Belgian Environmental Mutagen Society (BEMS)* - "The value of new methods in genetic toxicology" - Geel (B).

07/09-12/09/1997: *ICEM 97* - "7th International Conference on Environmental Mutagens" - Toulouse (F). **Posterpresentatie:** "Mutagenic and co-mutagenic effects of cobalt compounds measured by the comet assay" (M. De Boeck, M. Saaristo, F. Van Goethem and M. Kirsch-Volders).

- 25/05/1998: *Belgian Environmental Mutagen Society (BEMS)* - "Molecular Aspects of Development" - Janssen Research Foundation, Beerse (B).

- 07/09-11/09/1998: *28th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS)* - Salzburg (A).

6. Wetenschappelijke prijzen

M. De Boeck: European Environmental Mutagen Society (EEMS) Young Scientist Travel Award (1000 Gulden) voor deelname aan de 28th Annual Meeting, 7-11/09/1998, Salzburg (A) en het geven van een mondelinge presentatie: "Comparative study of the *in vitro* genotoxic and co-genotoxic effects (Comet assay) of hard metal particles in human lymphocytes and rat alveolar cells" (M. De Boeck, C. Costa, G. Roesems, B. Nemery and M. Kirsch-Volders).

M. De Boeck: Environmental Mutagen Society (EMS, Amerikaanse sectie) Student Travel Award (600 US\$) voor deelname aan de 30th Annual Meeting, 27/03 - 01/04/1999, Washington D.C. (USA) en het presenteren van een poster: "Comparison of the *in vitro*

alkaline unwinding and comet assays to detect nucleotide excision repair inhibition by hard metal dust in human lymphocytes" (M. De Boeck, A. Hartwig and M. Kirsch-Volders).

VII. ANNEXE DE L'UCL

- Préparer de la glace et de la carboglace
 - Refroidir le tampon de lyse dans la glace
 - Mettre le bain-marie à 50°C
 - Mettre les échantillons de poumon dans la carboglace
 - Mettre 5 ml tampon de lyse dans chaque Wheaton et refroidir dans la glace.
 - Une fois le Wheaton et son contenu refroidi, introduire le poumon.
 - Désagréger le tissu avec le piston A (espace large) **jusqu'à homogénéisation complète** (nécessite plus de 10 coups).
 - Ensuite, homogénéiser **8 fois** avec le piston B (espace étroit). **Eviter tout mouvement circulaire du piston !**
 - Verser l'homogénat à travers un " sterile cell strainer " (jaune) dans un tube 50 ml. Si le cell strainer se bouche, mélanger en surface avec un tip jaune stérile à bout large.
 - Ajouter 3 ml de tampon de lyse glacé dans le Wheaton et verser à travers le cell strainer dans le tube 50 ml. Enlever le cell strainer et fermer le tube.
 - Conserver le tube dans la glace et procéder de même pour les autres échantillons.
 - Centrifuger le tube à 4 °C à 2400 rpm pendant 12 minutes.
 - Eliminer le surnageant délicatement, et ensuite inverser le tube sur du papier absorbant pendant ~1 minutes pour sécher l'excès de liquide du culot.
 - Sécher toutes les gouttes résiduelles à l'intérieure du tube avec un applicateur stérile. **Ne pas toucher le culot !**
 - Réchauffer (/écht.) une aliquote de protéinase K (70 µl) dans un bain-marie à 50°C pendant 2-5 minutes.
 - Préparer la tampon de digestion : ajouter 20 µl de RNase-It cocktail par ml de tampon de digestion (-> **400 µl de tampon de digestion + 8 µl de RNase-It cocktail**)
 - Ajouter 70 µl de tampon de digestion au culot et secouer gentiment le tube pour décoller le culot (le culot doit flotter dans la solution, si pas : utiliser un tip jaune standard pour le décoller)
 - Placer le tube au bain-marie à 50°C et ajouter 70 µl de sol. de prot. K chaude. Mélanger délicatement le tube.
 - Capuchonner le tube et incubé à 50°C pendant **45 minutes en mélangeant gentiment toutes les 10-15 minutes.**
 - Verser 500 ml de tampon TE dans un réservoir à dialyse et déposer en surface une " dialysis cup " (bleue) numérotée (une par écht.). Vérifier l'absence de bulle d'air importante en dessous de la membrane (sinon pencher la dialysis cup pour les éliminer).
 - Transférer délicatement l'ADN génomique visqueux dans la dialysis cup avec un tip jaune stérile à bout large.
 - Mélanger doucement le tampon avec un barreau magnétique.
-
- Régler le bain-marie à 30°C
 - Pour chaque réaction de packaging à réaliser, préchauffer 2 petites Petri NZY agar à l'incubateur
 - Dans un tube 50 ml:

10 ml de NZY media (pas d'ajout de tétracycline)

125 µl sol. maltose/MgSO₄
Quelques colonies de SCS-8
Incuber à 37°C pendant 4-5 h

- Après dialyse, transférer l'ADN dans un eppendorf stérile avec un tip jaune stérile à bout large.
- Ajouter de l'éthanol absolu (ml par ml) afin de précipiter l'ADN.
- Une fois l'ADN précipité, éliminer l'éthanol et sécher l'ADN à l'azote.
- Réhydrater l'ADN dans du tampon TE (50 – 200 µl)
- Prendre de la carboglace
- Prendre un tube transpack **bleu** (pour chaque 5 réactions de packaging) et le placer dans la carboglace
- Pour chaque réaction de packaging à réaliser, prendre un tube transpack **orange** et le placer dans de la carboglace
- Décongeler (**un seul à la fois**) un transpack orange au 3/4 entre les doigts et ajouter ≥ 8 µl d'ADN génomique (pour le contrôle λ DNA, ajouter seulement 1 µl) **avec un tip à bord large**
- Mélanger gentiment 3 x avec le tip (! **par rotation, pas par pipettage!**) et incuber à 30°C pendant 90 min.
- Conserver l'ADN génomique au frigo dans l'éventualité d'une utilisation ultérieure
- Après incubation complète:
Faire fondre un tube bleu entre les doigts (pour chaque 5 réactions de packaging) et ajouter 12 µl de son contenu dans chaque tube orange
Mélanger gentiment 3 x avec le tip (! **par rotation - Changer de tips entre chaque t. orange !**) et incuber à 30°C pendant 90 min.
- Avant la fin de l'incubation :
 - Mettre le grand bain-marie à 49°C, et le petit à 37°C
 - Faire dégeler 4 ml (+pertes) de top agarose (/échantillon de poulmon) dans l'eau bouillante (10 min.) et ensuite laisser refroidir à 50°C dans le bain-marie. Prendre de la glace.
- Quand la réaction est complète, ajouter dans chaque tube orange :
 - 972 µl (979 µl si contrôle λ DNA) de SM - vortexer pendant 10 sec.
 - Stocker à 4°C - dans la glace
- **Quand l'incubation des bactérie est complète :**
 - Centrifuger les cultures à 4°C pendant 10' à 2300 trs/min.
 - Allumer et réserver le spectro.
 - Prendre de la glace
 - Resuspendre les bactéries dans la sol. MgSO₄ 10 mM à une OD₆₀₀ = 0.5 (dilution d'approche = 7 ml)
 - Conserver les bactéries dans la glace jusqu'à utilisation
- **Prétitrage du packaged DNA**

Dans 1 tube 50 ml :
 - 200 µl de SCS-8
 - 1 µl du package DNAIncuber à 37 °C pendant 15 min. (le tube doit être chaud, sinon continuer l'incubation)
Ajouter 4 ml de top agarose à 48-50°C et couler sur une petite pétri NZY agar
Incuber toute la nuit à 37°C
Conserver le "packaging DNA" dans le frigo !
- Ajouter dans chaque tube orange (package DNA):

50 µl de chloroforme - vortexer brièvement
Stocker à 4°C - dans la glace

- Récupérer les petites Pétri préparées la veille et compter le Nombre de *Lyse* (=NL)
!!
- Préparer 40 ml (+pertes) de top agarose par grande Pétri NZY agar
- Préparer au moins 2.15 ml de NZY média (+ 10 ml pour les pertes) par grande Pétri NZY agar
- Si le plating de color mutant (CM1 - CM2 - CM3) est envisagé, préparer en plus :
3 grandes Pétri NZY agar
3 x 40 ml de top agarose
3 x 2.15 ml de NZY média
- Si le plating du ctrl λ DNA est envisagé, préparer en plus :
1 petite Pétri NZY agar
8 ml de top agarose
10 ml de NZY média dans un récipient séparé (pour VCS-257)
- Réserver les 2 incubateurs pour le jour du "plating" des "packaged" DNA
- Ajouter dans le NZY medium (préparé le J3 de la Part.I) :
12.5 μ l sol. maltose/MgSO₄ / ml de milieu
Quelques colonies de SCS-8 (ou VCS-257 pour le plaquage du ctrl λ DNA)
Incuber à 37°C pendant 4-5 h.
- Centrifuger les cultures à 4°C pendant 10' à 2300 trs/min.
- Allumer et réserver le spectro.
- Prendre de la glace
- Resuspendre les bactéries dans la sol. MgSO₄ 10 mM à une OD₆₀₀ = 0.5 (dilution d'approche = 7 ml)
- Conserver les bactéries dans la glace jusqu'à utilisation
- Après-midi régler la température de l'incubateur du local 9 à 37°C
- Le soir avant de quitter le labo: disposer les Pétri (petit et grand) dans les incubateurs
- Faire fondre le top agarose à l'autoclave
- Mettre le grand bain-marie à 49°C, et le petit à 37°C
- Laisser refroidir le top agarose à 48-50°C au bain-marie
- Calculer la quantité de X-gal à peser (1.5 g / litre top agarose préparé le J3 de la part.1)
- Préparer le volume exact de N,N-diméthylformamide (3.5 ml/ g de X-gal)
- Pour chaque tube orange de "packaged DNA" (sauf pour le packaged ctrl λ DNA) :
Si le NGP pour le "packaged" DNA est < 27
alors mettre tout le "packaged" DNA dans
(2 x NGP) ml de suspension de SCS-8/MgSO₄ (+1-2 ml pour les pertes)
Si le NGP > 26
alors calculer le nombre de μ l de "packaged" DNA (= 27000/NGP) à ajouter à 54 ml de suspension SCS-8/MgSO₄
Mélanger bien
Incuber à 37°C pendant 15 min. (les tube doivent être chauds au toucher !! ; sinon incuber encore 5-10 min.) = **sol. cell/phage**

- Durant cette incubation, peser la quantité de X-gal, le dissoudre dans le N,N-diméthylformamide et ajouter au top agarose (impérativement à 48-50°C)

- Pour chaque "packaged DNA" (sauf pour le packaged ctrl λ DNA) faire 2 fois ce qui suit (dans 1 tube 50) :

2 ml SCS-8
50 μ l sol. cell/phage
35 ml top agarose 48-50°C
mélanger bien et vite
Verser vite et **bien** le contenu du tube sur une grande Petri NZY préchauffée
--> = dilution I et II

- Pour chaque "packaged DNA" (sauf pour le packaged ctrl λ DNA) faire autant de fois que possible (=NGP - 2 ; max. 24) ce qui suit (dans 1 tube 50) :

2 ml de sol. cell/phage
35 ml top agarose 48-50°C
mélanger bien et vite
Verser vite et **bien** le contenu du tube sur une grande Petri NZY préchauffée

- Quand l'agarose est solidifié, retourner les plaques et les mettre à l'incubateur à 37°C pendant 16 à 24h

- **Plating color mutant** (protocole pour un seul mutant) → **FACULTATIF SAUF POUR CM1**

Dans un tube 50 :
2 ml SCS-8
50 μ l color mutant
Incuber à 37°C pendant 15 min. (les tube doivent être chauds au toucher !! ; sinon incuber encore 5-10 min.)
Ajouter 35 ml de top agarose, bien mélanger et couler sur une grande Petri NZY préchauffée
Quand l'agarose est solidifié, retourner les plaques et les mettre à l'incubateur à 37°C pendant 16 à 24 h.

- **Plating packaged control λ DNA** → **FACULTATIF**

- Dans un eppendorf:

10 μ l sol. de phage
990 μ l tampon SM
Vortexer → **tube 1**

- Dans un eppendorf :

10 μ l du tube 1
990 μ l tampon SM
Vortexer → **tube 2** (dilution final = 1/10 000)

- Dans un tube 15 ml:

200 μ l VCS-257
10 μ l Tube 2
Vortexer et incuber à 37°C pendant 15 min. (les tube doivent être chauds au toucher !! ; sinon incuber encore 5-10 min.)

- Ajouter 3 ml de top agarose contenant du X-gal
- Melanger
- Couler dans une petite Perti NZY préchauffée
- Incuber toute la nuit à 37°C

VIII. BIBLIOGRAFISCHE VERWIJZINGEN

Ahnström, G. and Erixon, K. (1981) Measurement of strand breaks by alkaline denaturation and hydroxyapatite chromatography. In: Friedberg, E.C. and Hanawalt, P.C. (Eds.) DNA repair - A Laboratory Manual of Research Procedures, Vol. 1, Part B, Marcel Dekker, New York, pp. 403-418.

Albertini, S. & M.Kirsch-Volders (1997) Summary and conclusion on the MNT *in vitro* and implication on testing strategies, Mutation Research, 392, 183-185.

Anard D, Kirsch-Volders M, Elhajouji A, Belpaeme K and Lison D (1997). *In vitro* genotoxic effects of hard metal particles assessed by the alkaline single cell gel and elution assays. Carcinogenesis 18:177-184.

Anard, D., Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Belpaeme, K. and Lison, D. (1997) *In vitro* genotoxic effects of hard metal particles assessed by alkaline single cell gel and elution assays. Carcinogenesis, 18, 177-184.

Anderson, D., Tian-Wei Yu en McGregor D.B. (1998), Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. Mutagenesis, 13,539-555.

Beyersmann, D. and Hartwig, A. (1992) The genetic toxicology of cobalt. Toxicol. Appl. Pharmacol., 115, 137-145.

Bolt, H.M (1996) Quantification of endogenous carcinogens; the ethylene oxide paradox. Biochem. Pharmacol., 52, 1-2.

Bolt, H.M. et al. (1988) Analysis of macromolecular ethylene oxide adducts. Int. Arch. Occup. Environ. Health, 141-144

Bradford, M.M.A (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254.

Brockmoller, J., Kerb, R., Drakoulis, N., Nitz, M., and Roots, I. (1993) Genotype and phenotype of glutathione S-transferase class mu isoenzymes mu and psi in lung cancer patients and controls. Cancer Research, 53(5), 1004-1011.

Brookes, P & Lawley P.D. (1960) The reaction of mustard gas with Nucleic Acids *in vitro* and *in vivo*, Biochem J. 77, 478-484

Brookes, P & Lawley P.D. (1964) Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin : relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to the desoxyribonucleic acid, Nature, 202, 781-784

Byfält Nordqvist, M., Löf, A., Osterman-Golkar, S. and Waller, S.A.S (1985) Covalent binding of styrene and styrene-7,8-oxide to plasma proteins, haemoglobin and DNA in the mouse, Chem.-Biol. Interact., 55, 63-73.

Cadet, J. (1994) DNA damage caused by oxidation, demination, ultraviolet radiation and photoexcited psoralens, IARC, 125, 245-276

Chaudhary, A.K. et al. (1996) Characterization of endogenous DNA adducts by liquid chromatography / electrospray ionization tandem spectrometry, Carcinogenesis, 17 (5), 1167-1170

Chiarelli M.P. & Lay J.O. (1992) Mass spectrometry for the analysis of carcinogen-DNA adducts, Mass Spectrom Rev, 11, 447-493

- Chiu C.S., et al. (1993) Chemical transformation/ derivatization of O⁶-methyl and O⁶ (hydroxyethyl) guanine for detection by GC-EC/MS, *Annal. Chem.*, 65, 3071-3075
- Collins, A., Dobson, V., Dusinská, M., Kennedy, G. and Stetina, R. (1997) The comet assay: what can it really tell us? *Mutat. Res.*, 375, 183-183.
- Collins, A.R., Duthie, S.J. and Dobson, V.L. (1993) Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, 14, 1733-1735.
- Crain, P.F. (1990) Preparation and enzymatic hydrolysis of DNA and RNA for mass spectrometry. *Meth. Enzymol.* 193, 782-790
- Csanady, G.A., Mendrala, A.L., Nolan, R.J. and Filser J.G. (1994) A physiologic pharmacokinetic model for styrene and styrene-7,8-oxide in mouse, rat and man. *Arch. Toxicol.*, 68, 143-157.
- De Boeck, M., Lison, D., and Kirsch-Volders, M. (1998) Evaluation of the *in vitro* direct and indirect genotoxic effects of cobalt compounds using the alkaline comet assay. Influence of interdonor and interexperimental variability. *Carcinogenesis*, 19(11), 2021-2029.
- Deforce, D. et al. (1996) Analysis of DNA adducts in DNA hydrolisates by capillary zone electrophoresis and capillary zone electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *Anal. Chem.* 68, 3575-3584
- Dizdaroglu, M & Gajewski, E. (1990) Selection-ion mass spectrometry : assay of oxidative DNA damage. *Meth Enzymol.* 186, 530-545
- Ehrenberg, L., and Hussain, S., (1981) Genetic toxicity of some important epoxides. *Mutat. Res.*, 86, 1-113.
- Ehrenberg, L., and Törnqvist, M. (1995) The research background for risk assessment of ethylene oxide : aspects of dose. *Mutat. Res.*, 330, 41-54.
- Ethylene oxide, IARC Monographs Volume 60, 73-159
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L. and O'Neill, K.L. (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.*, 339, 37-59.
- Farmer, P. B. (1995) Monitoring of human exposure to carcinogens through DNA and protein adduct determination. *Toxicol Lett.* 82/83, 757-762
- Fenech, M., and Morley, A. (1985) Solutions to the kinetic problem in the micronucleus test. *Cytobios.*, 43, 233-246.
- Fost, U et al. (1989) Determination of 7-2 (hydroxyethyl) guanine with gas chromatography / mass spectrometry as a parameter of genotoxicity of ethylene oxide. *Arch. Toxicol. Suppl.* 13, 250-253
- Föst, U, Hallier, E., Ottenwälder, H., Bolt, H.M., and Peter, H. (1991) Distribution of ethylene oxide in human blood and its implications for biomonitoring. *Hum. Exp. Toxicol.*, 10, 25-31.
- Giese, R.W. (1997) Detection of DNA adducts by electron capture mass spectrometry, *Chem. Res. Toxicol.* 10 (3), 255-270
- Glatt, H.R., Halfer-Wirkus, H., Herborn, J., Lehrbach, E., Löffler, S., Porn, W., Setiabudi, F., Wölfel, T., Gemperlain-Mertes, I., Doerjer, G., Oesch, F., (1985), Interindividual variations in epoxide detoxifying enzymes. In: Müller, Weber (eds.). *Familial Cancer. 1st Int Res Conf.* Krager Basel 242-247.

Halliwell, B and Dizdaroglu, M. (1992) The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques, *Free Radic Res Commun*, 16, 75-87

Hamboek, H., Fischer, R.W., Di Iorio, E.E., and Winterhalter, K.H. (1981) The binding of s-triazine metabolites to rodent hemoglobins appears irrelevant to other species. *Mol. Pharmacol.*, 20, 579-584.

Hartwig, A., Dally, H. and Schlepegrell, R. (1996) Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: Use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicol. Lett.*, 88, 85-90.

Hartwig, A., Gröblichhoff, U.D., Beyersmann, D., Natarajan, A.T., Filon, R. and Mullenders, L.H.F. (1997) Interaction of arsenic (III) with nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis*, 18, 399-405.

Hartwig, A., Klyszcz-Nasko, H., Schlepegrell, R. and Beyersmann, D. (1993) Cellular damage by ferric triloacetate and ferric citrate in V79 cells: interrelationship between lipid peroxidation, DNA strand breaks and sister-chromatid exchanges. *Carcinogenesis*, 14, 107-112.

Haufron V, Lison D (1998) Urinary cotinine as tobacco smoke exposure index : a minireview. *Int Arch Occup Environ Health* 71:162-168.

Hemminki, K et al. (1992) Significance of DNA and protein adducts. *IARC*, 525-534

IARC (1991) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Cobalt and cobalt compounds, Vol. 52, IARC, Lyon, France.

IARC (1994) IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 60, Some industrial chemicals. Lyon, pp 45-213 and pp 233-346.

Jelinsky, S.A. et al. (1995) The major N²-Gua adduct of the (+)-antibenzopyrene diol epoxide is capable of inducing G > A and G > C in addition to G > T mutations, *Biochemistry*, 34, 13545-13553

Kamataki, T., Maeda, K., Shimada, M., Kitani, K., Nagai, T., and Kato, R. (1985) Age-related alteration in the activities of drug-metabolizing enzymes and contents of sex-specific forms of cytochrome P-450 in liver microsomes from male and female rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 233 222-227.

Kasten, U., Mullenders, L.H.F. and Hartwig, A. (1997) Cobalt(II) inhibits the incision and the polymerization step of nucleotide excision repair in human fibroblasts. *Mutat. Res.*, 383, 81-89.

Kato, R, Vassanelli, P., Frontino, G., and Chiesara, E. (1964) Variation in the activity of liver microsomal drug metabolizing enzymes in rats in relation to age. *Biochem. Pharmacol.*, 13, 1037-1051.

Kautiainen, A. and Törnqvist, M. (1991) Monitoring exposure to simple epoxides and alkenes through gas chromatographic determination of haemoglobin adducts. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 63, 27-31.

Kirsch-Volders, M. (1997) Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research*, 392, 1-4

Kohn KW, Erickson LC, Ewig RA, Friedman CA (1976) Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry* 15: 4629-4637

Kolman, A. et al. (1986) Genotoxic effects of ethylene oxide and their relevance to human cancer, *Carcinogenesis*, 7 (8), 1245 – 1250

Kroetz, D.L., Kerr, B.M., McFarland, L.V., Loiseau, P., Wilensky, A.J., and Levy, R.H., (1993), Measurement of *in vivo* microsomal epoxide hydrolase activity in white subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1993, 53:306-315.

Kumar, R. & Hemminki, K. (1996) Separation of 7-methyl and 7-2 (hydroxyethyl) guanine adducts in human DNA sample using a combination of TLC and HPLC, *Carcinogenesis*, 16 (6), 1419-1424

Lasfargues G, Lison D, Maldague P, Lauwerys R (1992) Comparative study of the acute lung toxicity of pure cobalt powder and cobalt-tungsten carbide mixture in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 112:41-50.

Lawley, P.D. (1994) From fluorescence spectra to mutational spectra, a historical overview of DNA reactive compounds, *IARC*, 125, 3-22

Leclercq, L., et al. (1997) High performance liquid chromatography/electrospray mass spectrometry for the analysis of modified bases in DNA 7-2 (hydroxyethyl) guanine, the major ethylene oxide DNA adduct, *Anal Chem.*, 69, 1252 – 1255

Leclercq, L., et al. (1998a) Simultaneous detection of 7-2 (hydroxyethyl) guanine and 3-2 (hydroxyethyl) adenine on a human population by high performance liquid chromatography / electrospray tandem mass spectrometry, *Anal Chem.*, submitted

Leclercq, L., et al. (1998b) Unambiguous identification of N7-phenyl guanine in humans as a biomarker of benzene exposure by high performance liquid chromatography / electrospray tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrometry.*, submitted

Leroy T, Van Hummelen P, Anard D, Castelain Ph, Kirsh-Volders M, Lauwerys R and Lison D (1996) Evaluation of three methods for the detection of DNA single strand breaks in human lymphocytes: alkaline elution, nick translation and single cell gel electrophoresis. *J Toxicol Environ Health* 47:409-422.

Li, G. et al. (1992) *In vitro* reaction of ethylene oxide with DNA and characterization of DNA adducts. *Chem. Biol. Interactions*, 83, 35-54

Lison D, Buchet J-P, Swennen B, Molders J and Lauwerys R (1994) Biological monitoring of workers exposed to cobalt metal, salts, oxide and hard metal dust. *Occup Environ Med* 51:447-450.

Lison D, Carbonnelle Ph, Molloy L, Lauwerys R and Fubini B (1995) Physico-chemical mechanism of the interaction between cobalt metal and carbide particles to generate toxic activated oxygen species. *Chem Res Toxicol* 8:600-606.

Loechler, E. L. (1995) How are potent bulky carcinogens able to induce such a diverse array of mutations ? *Mol. Carcinogenesis*, 13, 213-219

Loechler, E. L. (1996) The role of adduct site specific mutagenesis in understanding how carcinogen-DNA adducts cause mutations : perspective, prospects and problems, *Carcinogenesis*, 17 (5), 895-902

McDonald, T.A., Yeowell-O'Connell, K., and Rappaport, S.M. (1994) Comparison of protein adducts of benzene oxide and benzoquinone in the blood and bone marrow of rats and mice exposed to [¹⁴C/¹³C₆]benzene. *Cancer Res.*, 54, 4907-4914.

- McKelvey-Martin, V.J., Green, M.H.L., Schmezer, P., Pool-Zobel, B.L., De Méo, M.P. and Collins, A. (1993) The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutat. Res.*, 288, 47-63.
- McMartin, D.N., O'Connor, J.A., Fasco, M.J., and Kaminsky, L.S. (1980) Influence of aging and induction on rat liver and kidney microsomal mixed function oxidase systems. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 54, 411-419.
- Moulin JJ, Wild P, Romazini S, Lasfargues G, Peltier A, Bozec C, Deguerry P, Pellet F, Perdrix A (1998). Lung cancer risk in hard-metal workers. *Am J Epidemiol.* 148: 241-248.
- Nakajima, T., Elovaara, E., Gonzalez, F.P., Gelboin, H.V., Vianio, H., and Aoyama, T., (1993), Characterization of human cytochrome P450 isozymes responsible for styrene metabolism. Abstract Book of the International Symposium on Health Hazards of Butadiene and Styrene. Finnish Institute of Occupational Health, Helsinki 1993: 27.
- Nelson, H.N., Wiencke, J.K., Christiani, D.C., Cheng, T.J., Zuo, Z., Schwartz, B.S., Lee, B., Spitz, M.R., Wang, M., Xu, X., Kelsey, K.T. (1995) Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis*, 16(5), 1243-1245.
- Ni, J. et al (1996). Interpretation of oligonucleotides mass spectra for determination of sequence using electrospray ionization and tandem mass
- Osterman-Golkar, S., Christakopoulos, A., Zorcec, V. and Svensson, K. (1995) Dosimetry of styrene-7,8-oxide in styrene- and styrene oxide - exposed mice and rats by quantification of haemoglobin adducts, *Chem.-Biol. Interact.*, 95, 79-87.
- Pemble, S., Schroeder, K.R., Spencer, S.R., Meyer, D.J., Hallier, E., Bolt, H.M., Ketterer, B., and Taylor, J.B. (1994) Human glutathione S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem. J.*, 300, 271-276.
- Randerath, K. et al. (1981) 32P-postlabeling test for DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 6126-6129
- Randerath, K. et al. (1985a) Postlabeling methods for carcinogen-DNA adducts analysis *Environ. Health Perspectiv.* 62, 57-65
- Rappaport, S. M., Ting, D., Jin, Z., Yeowell-O'Connell, K., Waidyanatha, S., and McDonald, T. (1993). Application of Raney nickel to measure adducts of styrene oxide with haemoglobin and albumin. *Chem. Res. Toxicol.* 6, 238-244.
- Rihn B, Coulais C, Black D, Packer L (1997) Mutation increase in lung DNA following crocidolite inhalation in lacI transgenic mice. *Oxygen*, San Francisco, 20-25 November 1997, p.117.
- Segerbäck, D. (1983) Alkylation of DNA and haemoglobin in the mouse following exposure to ethene and ethene oxide. *Chem.-Biol. Interactions*, 45, 139-151.
- Segerbäck, D. (1990) Reaction products in haemoglobin and DNA after *in vitro* treatment with ethylene oxide and N-(2-hydroxyethyl)-N-nitrosourea. *Carcinogenesis*, 11, 307-312.
- Segerbäck, D., Osterman-Golkar, S., Molholt, B., and Nilsson, R. (1994) *In vivo* tissue dosimetry as a basis for cross-species extrapolation in cancer risk assessment of propylene oxide. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 20, 1-14.
- Segerback, D. (1983) Alkylation of DNA and hemoglobin in the mouse following exposure to ethylene and ethylene oxide, *Chem. Biol. Interactions*, 45, 139-151

Segeberck, D. (1994) DNA Alkylation by ethylene oxide and some mono-substituted epoxide. IARC, 125,37-47

Sepai, O., Anderson, D., Street, B., Bird, I., Farmer, P.B. and Bailey, E. (1993) Monitoring of exposure to styrene oxide by GC-MS analysis of phenylhydroxyethyl esters in haemoglobin. Arch. Toxicol., 67, 28-33.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R. and Schneider, E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res., 175, 184-191.

Soni, M., Madurantakan, M., and Krishnaswamy, K. (1998) Glutathione S-transferase Mu (GST Mu) deficiency and DNA adduct in lymphocytes of smokers. Toxicology, 126(3), 155-162.

Swenberg, J.A. et al. (1985) Relationships between DNA adduct formation and carcinogenesis, Environ. Health Perspectiv. 62177-183

Swenberg, J.A. et al. (1995) Dose-response relationships for carcinogens, Toxicol. Lett., 82/83, 751-756

Tagesson C, Kallberg M, Klintenberg C, Starkhammar H. (1995) Determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by automated coupled-column high performance liquid chromatography: a powerful technique for assaying *in vivo* oxidative DNA damage in cancer patients. Eur-J-Cancer. 31A: 934-940.

Talaska, G., et al. (1993) Review 32P-postlabeling analysis of DNA adducts in humans : adducts distribution and method improvement. Mut. Res. 313, 269-276

Tang, Y.-S., Anderson, D., Sepai, O., Farmer, P.B., and Bailey, E. (1991) Approaches to the monitoring of haemoglobin adducts with styrene oxide. Hum. Exp. Toxicol., 11 402-403.

Tates, A.D. et al. (1991) Biological and chemical monitoring of occupational exposure to ethylene oxide, Mut Res, 250, 483-497

Tice, R.R. (1995) The single cell gel/ Comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In Phillips, D.H. and Venitt, S. (eds.) Environmental Mutagenesis, Bios Scientific Publishers, pp. 315-339.

Törnqvist, M (1988) Tissue doses of ethylene oxide in cigarette smokers determined from adduct levels in hemoglobin, Carcinogenesis, 7 (9), 1519-1521

Törnqvist, M. (1990) Formation of reactive species that lead to hemoglobin adducts during storage of blood samples. Carcinogenesis, 11, 51-54.

Törnqvist, M. and Hindsø Landin, H. (1995) Hemoglobin adducts for *in vivo* dose monitoring and cancer risk estimation. J. Occup. Environ. Med., 37(9), 1077-1085.

Törnqvist, M., Mowrer, J., Jensen, S., and Ehrenberg, L., (1986), Monitoring of environmental cancer initiators through haemoglobin adducts by a modified Edman degradation method, Anal. Biochem, 154, 255-266.

Van Delft, J.H. (1994) Comparison of various immunochemical assays for the detection of ethylene oxide-DNA adducts with monoclonal antibodies against imidazole ring opened N 7-2 (hydroxyethyl) guanine : application in a biological monitoring study. Carcinogenesis, 15 (9), 1867-1873

Van Goethem, F., Lison, D. and Kirsch-Volders, M. (1997) Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA

damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. *Mutat. Res.*, 392, 31-43.

Viaene, M.K. (1998) Acute en chronische neurotoxische effecten van styreen en hun reversibiliteit. Resultaten van een cross-sectioneel onderzoek bij werknemers tewerkgesteld in de glasvezelversterkte polyesterindustrie. PhD thesis. KU-Leuven, pp 175.

Walker, V.E. et al (1990) Macromolecular adducts of ethylene oxide. A literature review and a time course study on the formation of N 7-2 (hydroxyethyl) guanine following exposure of rats by inhalation. *Mut. Res.* 233, 151-164

Walker, V.E. et al (1992a) Molecular dosimetry of ethylene oxide : formation and persistence of N 7-2 (hydroxyethyl) guanine in DNA following exposure of rats and mice. *Cancer Res*, 52, 4328-4334

Walker, V.E. et al (1992b) Molecular dosimetry of ethylene oxide : formation and persistence of N 7-2 (hydroxyethyl) valine in hemoglobin following repeated exposure of rats and mice. *Cancer Res*, 52, 4320-4327

Wu, K.Y. et al (1996) Endogenous formation of the major DNA adduct of ethylene oxide in humans, rats and mice. *Proc. Am. Soc. Cancer Res.* 37,102

Young, T.L. et al. (1990) Development of monoclonal antibodies recognizing 7-2 (hydroxyethyl) guanine and imidazole ring open 7-2 (hydroxyethyl) guanine. *Carcinogenesis*, 11 (10),1685-1689

Zalma R, Bonneau L, Jaurand MC, Guignard J, Pezerat H (1987) Formation of oxy-radicals by oxygen reduction arising from the surface activity of asbestos. *Can J Chem* 65:2338-2341.