

INRS-Institut Armand-Frappier

**Étude cinétique de l'éthanol inhalé et rôle du polymorphisme de l'acétaldéhyde
déshydrogénase de type 2 (ALDH2) dans la toxicité des vapeurs d'éthanol chez le rat**

par

Gianni Del Zoppo

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences expérimentales de la santé

Décembre, 2003

©droits réservés de Gianni Del Zoppo, 2003

RÉSUMÉ

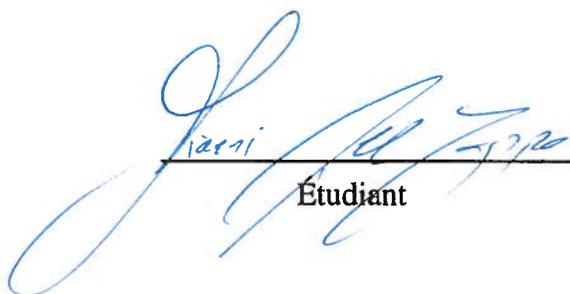
La dépendance des pays industrialisés envers le pétrole est sous une croissance constante ce qui conduira inévitablement à des difficultés majeures en approvisionnement. Des statistiques démontrent qu'au niveau mondial le nombre de personnes possédant un véhicule est prévu pour connaître une croissance constante jusqu'en 2020 où il y aura alors 144 véhicules par mille habitants comparativement à 122 en 1999. La crainte d'une augmentation de la pollution atmosphérique, ainsi qu'une dépendance accrue envers les pays étrangers, a poussé les gouvernements canadien et américain à ajouter de l'éthanol à l'essence à moteur afin d'alléger ces problèmes. L'utilisation d'éthanol comme combustible alternatif risque cependant de hausser ses niveaux atmosphériques en plus d'augmenter les émissions primaires et secondaires d'acétaldéhyde, un produit de transformation de l'éthanol. Or, une problématique importante se soulève puisque le gouvernement canadien a placé l'acétaldéhyde sur sa liste des substances toxiques prioritaires (LPS2). En effet, l'acétaldéhyde est reconnu comme étant capable de se lier aux protéines de l'organisme. Cette liaison acétaldéhyde-protéines peut avoir comme conséquence d'interférer avec la fonction des protéines liées, d'inhiber les enzymes lysine-dépendante, ainsi que de stimuler des réponses immunologiques ou possiblement activer la carcinogenèse. Cette propriété de se lier aux protéines nous a mené à émettre l'hypothèse que le contact direct des vapeurs d'éthanol avec les poumons pourrait causer un risque à la santé humaine.

Une fois en contact avec les poumons, l'éthanol se transforme en acétaldéhyde pour ensuite être métabolisé en acétate par l'enzyme ALDH2. Un polymorphisme significatif existe au niveau de cette enzyme qui est présente tant chez l'humain que chez le rat Sprague-Dawley. Une mutation ponctuelle au niveau du gène *aldh2* est responsable de l'apparition d'une enzyme quasi déficiente à métaboliser l'acétaldéhyde. Cette mutation est présente chez l'allèle ALDH2^R, mais elle absente sur l'allèle ALDH2^Q; l'allèle ALDH2^R exprime une dominance incomplète. Partant de la notion que l'ajout de l'éthanol à l'essence résultera en une concentration atmosphérique plus importante de celui-ci, et par le fait même un accroissement des concentrations d'acétaldéhyde pulmonaire formées *in situ*, les sujets ayant une déficience génétique au niveau de l'ALDH2, pourraient être plus vulnérables à une toxicité pulmonaire causée par une accumulation locale d'acétaldéhyde.

Les objectifs des présents travaux sont de 1) de déterminer le polymorphisme de l'ALDH2 chez le rat Sprague-Dawley et, 2) d'évaluer le rôle possible du polymorphisme de l'ALDH2 dans la réponse des poumons aux vapeurs d'éthanol. Les études de la cinétique des vapeurs d'éthanol ont démontré que les concentrations d'éthanol sanguin étaient plus élevées et plus persistantes chez les rats femelles que chez les rats mâles. D'autre part, l'acétaldéhyde n'a pu être détecté dans le sang des rats des deux sexes exposés aux vapeurs d'éthanol. Ceci nous a permis de suggérer une liaison de l'acétaldéhyde aux protéines.

Le polymorphisme de l'ALDH2 chez le rat Sprague-Dawley a été évalué à l'aide d'une technique de RFLP (amplification par PCR suivit d'une digestion par enzyme de restriction sensible au site muté) et les différences métaboliques pulmonaires des isoenzymes pulmonaires ont été réalisées *in vitro*. La distribution des génotypes ALDH2^Q/ALDH2^Q, ALDH2^Q/ALDH2^R, ALDH2^R/ALDH2^R était respectivement de 30, 53 et 17%. Les expériences *in vitro* sur le métabolisme pulmonaire de l'ALDH2 ont démontré que l'isoenzyme ALDH2^Q/ALDH2^Q possédait une activité catalytique plus importante que l'isoenzyme ALDH2^R/ALDH2^R; appuyant la notion que l'isoenzyme ALDH2^R/ALDH2^R est déficiente. Afin de déterminer le rôle des différents génotypes sur le potentiel toxique des vapeurs d'éthanol, des instillations intra-trachéale répétées de [¹⁴C]-EtOH ont été effectuées sur une période de trois jours chez des rats Sprague-Dawley mâles et femelles. Les résultats ont démontré que les métabolites radioactifs de l'éthanol étaient liés aux protéines pulmonaires, hépatiques et sanguines chez la totalité des rats instillés; la liaison aux protéines n'étaient pas plus élevée chez les rats déficients en ALDH2. Finalement, nous avons également observé que les rats mâles présentaient un plus grand nombre d'adduits aux protéines que les rats femelles. L'ensemble de ces résultats suggère que l'inhalation des vapeurs d'éthanol peut engendrer de la toxicité pulmonaire.

Les recherches subséquentes devraient viser la caractérisation complète du métabolisme pulmonaire des vapeurs d'éthanol et démontrer les conséquences possibles de la liaison aux protéines tissulaires. L'extrapolation des résultats de cette étude de la cinétique et des effets toxiques possibles des vapeurs d'éthanol permettra d'évaluer le risque sur la santé des populations exposées et assurera que la santé des Canadiens ne sera, en aucun temps, compromise en raison d'une exposition quotidienne à ce produit chimique.


Gianni
Étudiant


Michel Lebonneau
Directeur de recherche

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	2
TABLE DES MATIÈRES	4

CHAPITRE 1- REVUE DE LITTÉRATURE

INTRODUCTION	7
1. Consommation mondiale de pétrole brut.....	7
1.1 Consommation mondiale de l'essence dans le secteur de transport	8
1.2 Effets environnementaux de l'utilisation du pétrole.....	10
2. La réduction de l'utilisation du pétrole et l'avenir des essences renouvelables	10
2.1 Conséquences de l'ajout d'éthanol à l'essence	13
3. Voies d'expositions aux vapeurs d'éthanol et son métabolisme	14
3.1 Alcool déshydrogénase	15
3.2 MEOS et les bactéries pulmonaires	17
3.3 L'acétaldéhyde déshydrogénase.....	19
3.4 Le polymorphisme de l'ALDH2	19
4. Effets toxiques de l'acétaldéhyde	23
4.1 Liaison protéines-acétaldéhyde.....	24
4.2 Liaison acétaldéhyde-protéines reliée à l'ingestion d'éthanol	25
4.3 Acétaldéhyde et protéines sanguines	28
4.4 Acétaldéhyde et composantes nucléaires	28
4.5 Apparition de la fibrogenèse	29
4.6 Effets sur le système immunitaire.....	30
4.7 Formation et liaison d'acétaldéhyde extra-tissulaire	31
4.8 Génotoxicité liée à une exposition d'acétaldéhyde.....	31
4.9 Carcinogénèse de l'acétaldéhyde.....	32
4.9.1 Carcinogénèse de l'acétaldéhyde chez des animaux	32

4.9.2 Carcinogénèse de l'acétaldéhyde chez l'humain	33
4.10 L'acétaldéhyde et le système respiratoire	33
5. Pathologies reliées à la déficience de l'ALDH2	34
6. Hypothèses	35
7. Objectifs	35

CHAPITRE 2 - ARTICLE SCIENTIFIQUE

Vapors from Ethanol in Gasoline: Kinetic studies and the Potential Role of Type 2 Aldehyde Dehydrogenase (ALDH2) Polymorphism in Pulmonary Effects.....	36
Abstract	37
Introduction.....	38
Materials and Methods.....	41
Discussion	47
References.....	53
Annexe	57

CHAPITRE 3 - DISCUSSION GÉNÉRALE

Discussion générale	62
Bibliographie des sections Introduction et Discussion	69
APPENDICE I - Méthode pour la détermination du génotype de l'ALDH2.....	81

CHAPITRE 1 – RELEVÉ DE LA LITTÉRATURE

1. Consommation mondiale de pétrole brut

De nos jours, l'essence à moteur demeure un sujet volatil sur la scène internationale. Les vingt cinq dernières années ont été marquées par des fortes fluctuations au niveau du prix du pétrole. On associe ce manque de stabilité à des problèmes politiques et économiques des pays producteurs de pétrole. En effet, les crises intérieures au niveau de ces gouvernements ou des changements drastique dans leurs relations internationales influenceront la production de pétrole et par conséquent affecteront le prix final du baril. Nous vivons dans un monde qui est fortement dépendant de la disponibilité du pétrole brut. Avec la croissance constante de la population sur Terre, la demande énergétique sera de plus en plus importante et par conséquent, notre dépendance au pétrole sera encore plus grande. Les deux prochaines décennies auront le pétrole brut comme une source dominante d'énergie où il occupera 40% de la totalité des autres combustibles. On s'attend à ce que la demande mondiale de pétrole augmente annuellement de 2,2% passant de 74,9 millions de barils par jour en 1999 à 118,6 millions de barils par jour en 2020. En ce qui concerne l'Amérique du Nord, on envisage que la consommation de pétrole brut augmentera de 10,3 millions de barils par jour entre 1999 et 2020 avec une croissance annuelle de 1,8% (EIA, 2001). De toutes les régions industrialisées, l'Amérique du Nord est de loin la région où la demande éventuelle en pétrole brut sera la plus forte. En l'an 2000, le Canada consommait en moyenne 2,07 millions de barils de pétrole par jour et on estime que la croissance annuelle se situera à 0,5 millions de barils de pétrole brut et ce jusqu'en 2020 (tableau 1).

Tableau 1 Consommation canadienne de pétrole brut total, de pétrole au niveau du milieu de transport ainsi que la consommation d'essence dans le milieu de transport pour la période 1990-2020 (million de barils par jour)

	Année			Projection			
	1990	1998	1999	2005	2010	2015	2020
Consommation de pétrole brut	1,69	1,95	2,03	2,1	2,2	2,3	2,4
Pétrole brut dans le milieu de transport	0,9	1,0	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4
Consommation d'essence dans le milieu de transport	0,6	0,6	0,6	0,7	0,7	0,8	0,8

Source: Energy Information Administration (EIA), *International Energy Annual 1999*, DOE/EIA-0219(99) (Washington, DC, February 2001). Projections: EIA, *Annual Energy Outlook 2002*, DOE/EIA-0383(2002) (Washington, DC, December 2001)

On pense que dans les années à venir, la plus grande partie de la consommation de pétrole brut se situera au niveau du transport. En effet, l'essentiel de la production d'énergie industrielle et commerciale sera fournie par nos vastes ressources de gaz naturels ainsi que par nos nombreux réseaux hydroélectriques. L'essence à moteur demeure le combustible de choix pour les Canadiens en ce qui concerne le milieu de transport.

1.1 Consommation mondiale de l'essence dans le secteur de transport

Le nombre de personnes possédant un véhicule au niveau mondial sera sous une croissance constante jusqu'en 2020. On estime qu'en 2020, il y aura 144 véhicules par mille habitants à comparer à 122 en 1999. La croissance la plus marquée sera au niveau des pays en développement. Avec leur demande énergétique de plus en plus vorace, on

estime que la consommation d'énergie dans le secteur du transport des pays en voie de développement atteindra le cap de 38% en 2020 à comparer à 29% en 1999 (EIA, 2001). De leur côté, les pays industrialisés auront une croissance beaucoup plus lente puisqu'un niveau de saturation sera quasi atteint. Selon des récentes données, l'énergie utilisée dans le domaine du transport au Canada augmenterait de 1,4% par année entre 1999 et 2020 (EIA, 2001). Tout comme les États-Unis, le Canada est un important consommateur d'essence. En effet, notre essence à moteur compte pour environ 61% de tous les carburants utilisés dans ce domaine. En terme de chiffres, les Canadiens ont utilisé plus de 637 000 barils d'essence à moteur par jour en 1999 (EIA, 2001). Pour ce qui est de la consommation annuelle *par capita* des Canadiens, elle est assez impressionnante. Elle se situe à 12,4 barils par année ce qui nous place au deuxième rang au niveau international tout juste derrière les États-Unis qui eux consomment 17,8 barils par jour (tableau 2). Toutes ces données démontrent clairement que le style de vie des Canadiens et Canadiennes est fortement influencé par la disponibilité du pétrole.

Tableau 2 Possession de véhicules au Canada par 1000 habitants et consommation de pétrole *par capita*, pour la période 1990-2020

	Année			Projection			
	1990	1998	1999	2005	2010	2015	2020
Possession de véhicules par 1000 habitants	596	598	607	646	665	678	686
Consommation de pétrole <i>par capita</i>	11,7	12	12,4	13	13,5	13,8	14,1

Sources: Energy Information Administration (EIA), *International Energy Annual 1999*, DOE/EIA-0219(99) (Washington, DC, February 2001). Projections: EIA, *Annual Energy Outlook 2002*, DOE/EIA-0383(2002) (Washington, DC, December 2001)

1.2 Effets environnementaux de l'utilisation du pétrole

Le gouvernement canadien est tout à fait conscient de notre dépendance face au pétrole brut. C'est justement pour cette raison qu'il essaie de développer des solutions alternatives afin de compléter le domaine industriel ainsi que celui du transport. Deux problématiques majeures poussent le gouvernement canadien à développer des alternatives : la dépendance envers les pays producteurs de pétrole et la pollution environnementale. Actuellement, les pays de la péninsule persiques fournissent plus de 45% de la production mondiale de pétrole et on estime qu'en 2020, ils fourniront plus de 60% du pétrole brut mondial (EIA, 2001). La pollution environnementale demeure une problématique importante puisqu'en plus d'affecter les différents écosystèmes, elle affecte également la santé humaine. On sait que la combustion de carburants est un danger pour l'environnement et par conséquent un danger pour la santé humaine. Des composés comme les oxydes d'azote (NOx), les composés organiques volatils (COV), les oxydes de soufre (SOx), les particules (P) et le monoxyde de carbone (CO) sont générés lors de cette combustion et contribuent au phénomène « smog ». Le « smog », qui est en fait un mélange de polluants atmosphériques, peut être fortement toxique pour le système respiratoire. De plus, cette combustion incomplète de carburant favorise l'échappement des gaz à effet de serre et par conséquent contribue au phénomène de réchauffement de la planète. C'est pourquoi, plusieurs gouvernements, tel celui du Canada, tentent par différents moyens de limiter l'utilisation de pétrole.

2. La réduction de l'utilisation du pétrole et l'avenir des essences renouvelables

La crainte d'une augmentation de pollution atmosphérique ainsi qu'une dépendance accrue envers les pays étrangers a poussé le gouvernement canadien à injecté d'importantes ressources financières afin d'en limiter les conséquences. En l'an 2000, le Canada a signé une entente avec les États-Unis afin de réduire le smog transfrontalier. Les mesures visent à éliminer la pollution entre les États-Unis et les régions de l'Est du Canada. Cette entente vise aussi à limiter la pollution de l'Ontario et du Québec vers les

États-Unis. Dans le cadre d'un investissement de 120 M\$, le Canada s'est engagé à améliorer la surveillance de la pollution atmosphérique ainsi que de garantir des véhicules et des carburants plus propres (Environnement Canada). En 2001, le gouvernement a de nouveau investi plus de 22 M\$ afin de permettre un élargissement des rapports fournis par l'industrie à l'Inventaire National des Rejets de Polluants (INRP). Ces rapports comprendront dorénavant un suivi plus poussé sur le « smog ». En cette même année, le Canada a annoncé qu'il allait harmoniser certaines qualités de l'essence avec celle des États-Unis afin de maintenir une certaine logique entre les deux pays. Les niveaux de soufre dans l'essence diesel seront dorénavant limités à 15 parties par million et ce à partir de l'an 2006 (Environnement Canada). Par ailleurs, un investissement de plus de 48 M\$ servira à encourager la fabrication de moteurs et de carburants dits plus « propres » (Environnement Canada). Les carburants renouvelables proviennent de sources biologiques renouvelables et sont de bonnes alternatives aux essences conventionnelles.

L'addition de l'éthanol comme combustible remonte aussi loin que la conception du modèle T développé par Henry Ford. En effet, monsieur Ford avait reconnu que l'éthanol pouvait être une excellente source de combustible renouvelable. Par contre, le pétrole était devenu la source principale pour les automobiles puisque les moteurs à essences étaient plus faciles à concevoir et la disponibilité du pétrole était devenue monnaie courante. L'éthanol demeure un produit intéressant afin de diminuer la pollution atmosphérique causée par la combustion d'essence. Puisque l'éthanol contient près de 35% d'oxygène, la combustion de l'essence sera améliorée et par conséquent les émissions polluantes seront réduites. Des polluants comme les gaz à effet de serre, le monoxyde de carbone ainsi que la formation d'ozone au niveau du sol seront réduits (Environnement Canada). En utilisant des carburants à base d'éthanol, les émissions auront une réaction moindre avec le soleil résultant ainsi en une diminution de la formation d'ozone. Des mélanges contenant que 10% d'éthanol pourront réduire les gaz de serre de 2,4 à 2,9% et la consommation de pétrole de 3,3 à 3,9% (Wang *et al.*, 1997). Les mélanges de 10% d'éthanol (E10) sont favorisés puisque l'éthanol joue un rôle important au niveau de la volatilité de l'essence. En effet, des quantités minimales

d'éthanol dans l'essence à moteur augmente sa tension de vapeur/volatilité ; une addition importante d'éthanol à l'essence augmenterait trop fortement sa tension de vapeur et par conséquent diminuerait ses effets bénéfiques.

De par l'addition d'éthanol à l'essence, on réduira les gaz qui contribuent au réchauffement de la planète ainsi que les gaz responsables de la formation de smog. Ainsi, plusieurs provinces canadiennes, états américains et pays n'hésitent pas à utiliser l'éthanol comme additif à l'essence. En effet, c'est depuis les années 1980 que le Brésil utilise l'éthanol comme un additif au niveau de leur réseau de transport communautaire. Tout récemment, il est mentionné que la compagnie pétrolière Shell® s'est donné comme objectif de remplacer à court terme, pour l'état de la Californie, le MTBE (Méthyle tert Butyle Éther) ajouté à l'essence par l'éthanol.

En plus de posséder des avantages environnementaux, l'utilisation d'éthanol dans nos essences pourrait être extrêmement avantageux pour les producteurs agricoles. En effet, on produit l'éthanol qu'on utilise dans nos essences par le biais de composés biologiques tel la canne à sucre et le maïs. Le processus de production débute avec le broiement de la plante en question. Une fois broyés, les saccharides sont extraits et mis en contact avec des bactéries de fermentation. Ces mêmes bactéries utilisent les saccharides comme source d'énergie et forme l'éthanol comme sous-produit. Il est alors évident que cette industrie pourrait être plus que profitable pour l'économie d'un pays comme le Canada. Les agriculteurs auront un plus gros bassin de clients. La création d'emplois sera également favorisée et notre dépendance envers les pays producteurs de pétrole aura diminuée. Le Québec n'a pas perdu temps et a annoncé en l'an 2000, qu'il allait investir 100 M de dollars pour la construction d'une usine de production d'éthanol. Il est alors clair que l'intention d'utiliser de l'éthanol comme additif dans nos essences n'est pas qu'un projet d'avenir, mais plutôt un sujet d'actualité.

2.1 Conséquences de l'ajout d'éthanol à l'essence

Malgré le potentiel intéressant de l'éthanol dans nos essences, il reste qu'il existe quelques désavantages à envisager. Certaines études suggèrent que l'éthanol augmenterait l'émission des composés organiques volatils et par le fait même, augmenterait la volatilité de l'essence (NESCAUM, 1999). De plus, en étant soluble dans l'eau, plusieurs villes américaines ont rapporté des niveaux appréciables d'éthanol dans leur eau potable. En effet, le 8 mai de l'an 2000, le South Tahoe Public Utility District a confirmé des rapports dictant qu'on avait retrouvé des niveaux d'éthanol atteignant jusqu'à 130,000 ppm (partie par milliards) dans les eaux du Lac Tahoe (*Tahoe Daily Tribune*; 28 avril, 2000). Il est également évident que son addition à l'essence à moteur résultera en une augmentation nette d'émissions atmosphériques d'éthanol. Les niveaux ambiants et microenvironnementaux actuellement retrouvés dans les régions utilisant de l'éthanol sont quasi inconnus. A ce jour, seules quelques études d'exposition ont été effectuées. Les niveaux maximaux observés dans quelques études atteignaient 46 ppm lors d'un plein d'essence aux États-Unis, de 0,51 ppm dans un autobus à Stockholm et de 0,07 ppm dans l'air ambiant au Brésil. Or, ces niveaux pourraient être nettement plus élevés advenant que la totalité des véhicules utiliseraient un combustible possédant 10% d'éthanol ou pire encore, un combustible contenant 85% d'éthanol. En plus, de hausser ses propres niveaux, l'addition d'éthanol augmenterait, par l'intermédiaire d'une réaction photochimique (réaction de l'éthanol avec les radicaux libres, notamment le radical hydroxyle), les émissions primaires et secondaires d'acétaldéhyde, un produit de transformation de l'éthanol.. Présentement, on estime à 39% la contribution de l'essence aux niveaux d'acétaldéhyde retrouvé dans l'environnement. Des études de Santé Canada à Vancouver ont estimé que l'usage d'une essence E10 augmenterait les émissions d'acétaldéhyde d'environ 10 % en hiver. Par ailleurs, d'autres études ont démontré qu'une essence E10 diminuerait de 15% les émissions de CO, mais qu'elle augmenterait les émissions d'acétaldéhyde de 2,9 à 4,5% (Singleton *et al.*, 1997). Or, le gouvernement Canadien a placé l'acétaldéhyde dans sa liste prioritaire des substances toxique (LPS2).

De leur côté, le EPA (Environmental Protection Agency), l'IARC (International Agency for Research on Cancer) et le CARB (California Air Resources Board) ont tous classifié l'acétaldéhyde comme un carcinogène probable. **Notre première hypothèse nous a mené à postuler que le contact direct des vapeurs d'éthanol avec les poumons pourrait se traduire par un risque potentiel à la santé humaine**

3. Voies d'expositions aux vapeurs d'éthanol et son métabolisme

Tout comme l'éthanol, l'acétaldéhyde pourrait être retrouvé au niveau de l'environnement et par conséquent poser des risques pour la santé des populations exposées. Deux formes principales d'exposition sont attendue avec l'acétaldéhyde. Due à sa haute tension de vapeur et à ses propriétés de solubilité, l'acétaldéhyde sera principalement véhiculé dans l'environnement par voie aérienne et aquatique. De plus, puisque la réactivité de ce composé lui permet d'être lié aux particules du sol, l'acétaldéhyde pourrait également se retrouver au niveau de ses particules pour être ensuite vaporisé dans l'atmosphère et/ou s'introduire dans les eaux souterraines (IARC, 1985; EPA,1993). Ceci dit, l'acétaldéhyde pourra envahir les différents milieux de l'environnement par plusieurs procédés. Il s'agit d'un problème potentiellement sérieux à envisager. De plus, des recherches plus approfondies sont de mises afin de parvenir à une conclusion mieux documentée sur les propriétés carcinogènes de l'acétaldéhyde.

Environ 90 à 98% de l'éthanol absorbé par le corps est complètement oxydé. Son métabolisme est particulier car son taux d'élimination est assez constant (cinétique d'ordre zéro). Le foie demeure l'organe métabolique principal pour l'oxydation de l'éthanol. Par contre, il est maintenant évident que le poumon est un organe métabolique important et par conséquent, joue un rôle crucial dans les processus de détoxification (Fishman et Pietra, 1974). D'autres études ont démontré que le poumon possède une habileté extraordinaire pour métaboliser l'éthanol et pourrait être responsable pour environ 40% de son métabolisme (Khanna et Israel, 1980). Le métabolisme de l'éthanol débute via son oxydation par l'intermédiaire de l'alcool déshydrogénase (ADH) ou du

cytochrome P450 2E1 pour ensuite formé l'acétaldéhyde. Ce dernier est ensuite oxydé en acétate par l'acétaldéhyde déshydrogénase (ALDH). L'acétate produit au niveau de l'organe métabolisant est presque inutilisable au niveau de cet organe et l'acétate libre est ensuite transporté vers d'autres organes tel le cœur et les muscles afin d'être utilisé comme source d'énergie (Yamashita *et al.*, 2001)

3.1 Alcool déshydrogénase

L'alcool déshydrogénase est une molécule dimérique contenant deux atomes de zinc par sous-unité, une pour des fonctions catalytiques et l'autre pour des fonctions structurales (Horjales *et al.*, 1987). Cette enzyme joue un rôle important dans la détoxification de l'éthanol puisqu'il le métabolise en acétaldéhyde. Il existe présentement sept gènes d'ADH humains connus. Les cinq premiers gènes code respectivement pour les sous-unités α , β , γ , π et χ tandis que le septième gène code pour la sous-unité μ ou σ (Smith 1986; Yoshida *et al.*, 1991; Pares *et al.*, 1992). Des doutes demeurent à savoir si le sixième gène, ADH₆, exprime une enzyme active et c'est la raison pour laquelle il n'a pas encore été assigné à une lettre grecque (Chen et Yoshida, 1991; Yasunami *et al.*, 1991). De plus, les enzymes ADH humaines sont classées en cinq classes selon leurs caractéristiques structurales et cinétiques. La classe I est composée d'homo et d'hétérodimères qui eux, peuvent posséder la sous-unité α , β , ou γ . Les classes II, III et IV sont respectivement composées des sous-unités π, χ et μ . (Kaiser *et al.*, 1989; Yoshida *et al.*, 1991 ; Pares *et al.*, 1992). Les propriétés cinétiques des cinq classes humaines de l'ADH varient grandement. En effet, les valeurs de K_m des ADH de classe I pour l'éthanol varie entre 0,049 et 36 mM selon les différents isoenzymes tandis le K_m des ADH de classe II se situe à 34 mM (tableau 3). Les enzymes de classe III ($\chi\chi$) contribuent de façon minime au métabolisme de l'éthanol puisque leur K_m est $> 3M$ (Vallee et Bazzone, 1983).

Tableau 3 : Valeurs de Km et de Vmax pour les différentes classes d'ADH hépatique

	Classe I				ClasseII	ClasseIV
	$\alpha\alpha$	$\beta_1\beta_1$	$\beta_2\beta_2$	$\beta_3\beta_3$	$\pi\pi$	$\mu\mu$
K_m Éthanol (mmol/l)	4,2	0,049	0,94	36	34	29
V_{max} (mmol/min)	27	9,2	400	300	20	1500

Des sept gènes de l'ADH, seuls l'ADH₂ et l'ADH₃ expriment des polymorphismes qui sont présents chez différents groupes ethniques (Lee *et al.*, 1989; Thomasson *et al.*, 1994). Les formes ADH₂¹, ADH₂², ADH₂³, ADH₃¹, et ADH₃² codent respectivement pour les sous-unités β_1 , β_2 , β_3 , γ_1 et γ_2 (Bosron et Li, 1986; Smith, 1986; Lee *et al.*, 1989). Les allèles β_2 sont principalement retrouvés chez les Asiatiques tandis que les allèles β_1 se retrouvent principalement chez les caucasiens et les allèles β_3 sont uniques aux noirs (Bosron et Li, 1986; Smith 1986; Lee *et al.*, 1989; Thomasson *et al.*, 1994). Ce polymorphisme retrouvé dans les différentes populations influence grandement l'activité ultime de l'enzyme. En effet, l'enzyme $\beta_1\beta_1$ hépatique possède un V_{max} beaucoup plus faible que l'enzyme $\beta_2\beta_2$. On attribue cette différence enzymatique à une substitution Arg-47 et Arg-369 en β_1 par une His-47 en β_2 , endroit où se lie le groupe phosphate du coenzyme (Jornvall *et al.*, 1984; Eklund *et al.*, 1987). Puisque la dissociation du NADH est l'étape limitant de la réaction, un changement au niveau de cette liaison affectera grandement son rendement final (Stone *et al.*, 1993).

La distribution tissulaire des ADH est assez ubiquitaire. On retrouve la majorité des isoenzymes de l'ADH au niveau du foie où son activité est la plus importante (Yin, 1994). Par ailleurs, Yin (1994) a caractérisé la présence des isoenzymes $\beta_1\beta_1$ et $\beta_2\beta_2$ au niveau du poumon chez une population chinoise. Leurs recherches *in vitro* ont démontré qu'à un pH optimal de 8,5 et 10, l'isoenzyme $\beta_2\beta_2$ possédait un K_m semblable à l'isoenzyme $\beta_2\beta_2$ hépatique, suggérant ainsi une activité pulmonaire des ADH. Par contre, on s'aperçoit que le pH optimal d'activité pour les ADH pulmonaires se situe hors

des valeurs physiologiques. En effet, des études menées sur des rats ont démontré que les ADH pulmonaires avaient une activité très faible à un pH neutre à comparer avec les ADH hépatiques (Manautou *et al.*, 1992).

Les ADH pulmonaires semblent jouer un rôle mineur dans le métabolisme *in vivo* de l'éthanol et son polymorphisme aurait également un rôle négligeable au niveau des différences métaboliques (Manautou *et al.*, 1992). Par contre, les ADH pulmonaires pourraient avoir une fonction importante même après inhalation. En effet, après inhalation, une partie des vapeurs de l'éthanol demeurera inchangé et se trouvera au niveau du système sanguin, où il pourra être métabolisé par d'autres organes tel le foie. Puisque les ADH pulmonaires auront une fonction limitée et que les concentrations atmosphériques d'éthanol risque d'être assez faibles pour un organe comme le foie lorsque comparés à l'ingestion de l'éthanol, le polymorphisme au niveau de l'ADH risque d'avoir des conséquences quasi inexistantes sur la transformation finale de l'éthanol. Une question se pose alors, comment le poumon est-il capable de métaboliser l'éthanol si les isoenzymes ADH pulmonaire sont presque inactives à un pH physiologique? La réponse semble se trouver au niveau du « microsomal ethanol oxidizing system » (MEOS) et des bactéries pulmonaires.

3.2 MEOS et les bactéries pulmonaires

Précédent la découverte du MEOS (*Microsomal ethanol oxidizing system*), il a longtemps été convenu que le système ADH était le seul impliqué dans la première étape de la transformation d'éthanol. Des recherches préliminaires suggéraient qu'il semblait y avoir un système microsomal qui participait à la transformation de l'éthanol en acétaldéhyde. On a longtemps pensé que cette oxydation microsomale se faisait avec la participation d'un système catalase-dépendant (Orme-Johnson et Ziegler, 1965). Des recherches ultérieures ont démontré qu'il existait en fait un système microsomal responsable du métabolisme de l'éthanol mais que le système catalase-dépendant jouait un rôle mineur (Oshino *et al.*, 1975). En 1966, Lieber et ses collègues ont découvert que chez des rats et

des humains, qu'une consommation chronique d'éthanol, induisait une prolifération des membranes microsomales d'où la découverte du MEOS. Comme son terme le désigne, le MEOS demande la participation des cytochromes. Le cytochrome CYP2E1 demeure l'enzyme principale du MEOS bien que d'autres enzymes de la famille des cytochromes soient reconnues comme étant capable de métaboliser l'éthanol (Kunitoh *et al.*, 1993). Des études récentes ont prouvé que plusieurs tissus tels le foie et le poumon exprimaient des concentrations appréciables de CYP2E1, donnant ainsi le potentiel à ses deux organes de métaboliser l'éthanol (De Waziers *et al.*, 1990 ; Zerilli *et al.*, 1995 ; Goasduff *et al.*, 1996).

Malgré que le MEOS possède un K_m assez élevé pour l'éthanol (8-10 mM) lorsque comparé avec celui de l'ADH (0,2 –2 mM), la majorité de la transformation de l'éthanol à faible concentration se fera par l'intermédiaire de l'ADH tandis qu'à des fortes concentrations ou à des expositions chroniques à l'éthanol, le MEOS semblerait être favorisé (Lieber et DeCarli, 1970). On peut alors spéculer qu'une hausse au niveau de la concentration d'éthanol atmosphérique associée à son addition dans l'essence, entraînerait une exposition chronique de la population à l'éthanol et par conséquent, favoriserait la participation du MEOS. En effet, des études menées par Zerilli et ses collègues (1995) ont établi que l'activité des CYP2E1 hépatique et pulmonaire était respectivement 5 fois et 2,5 fois plus actif après une inhalation chronique d'éthanol que par ingestion.

En plus, du système MEOS, la microflore pulmonaire a été reconnue comme étant capable de produire une quantité importante d'acétaldéhyde lorsque incubée avec l'éthanol (Miyakawa *et al.*, 1986). La combinaison de ces deux systèmes fera en sorte que l'éthanol sera métabolisé au niveau du poumon et que des quantités significatives d'acétaldéhyde pulmonaire seront générées. Récemment, Tardif *et al.*(2002), ont exposé des volontaires à diverses concentrations d'éthanol par inhalation. Ils ont montré qu'il existait une relation directe entre la concentration d'exposition et le niveau d'acétaldéhyde présent dans l'air alvéolaire.

3.3 L'acétaldéhyde déshydrogénase

Une fois l'éthanol transformé en acétaldéhyde, l'acétaldéhyde déshydrogénase (ALDH) retrouvé au niveau du poumon sera responsable de son oxydation en acétate. Tout comme l'ADH, l'ALDH possède plusieurs isoenzymes qui influence grandement le métabolisme. L'ALDH est omniprésente chez différentes espèces mammifères et ce dans divers tissus. L'enzyme ALDH se retrouve au niveau du foie et des poumons tant chez l'humain que chez le rat (Bernstein *et al.*, 1983; Yin *et al.*, 1992; Yin, 1994). Il existe plusieurs isoenzymes d'ALDH mais l'isoenzyme mitochondriale ALDH2 joue un rôle majeur puisqu'elle possède un faible K_m pour l'acétaldéhyde (Lindahl, 1992). De son côté, l'isoenzyme cytosolique ALDH1 possède un K_m pour l'acétaldéhyde qui est beaucoup plus élevé que celui de ALDH2. En effet, le K_m de l'ALDH2 pour l'acétaldéhyde est 900 fois plus faible que celui de l'ALDH1 (Klyosov, 1996). De plus, il est de plus en plus évident que l'acétaldéhyde ne peut guère être un substrat de l'ALDH1 puisque son K_m de 180 μ M dépasse de façon exorbitante les concentrations physiologiques normales de 0,4-2,5 μ M (Inoue *et al.* 1984 ; Lieber, 1987; Hatake *et al.*, 1991).

3.4 Le polymorphisme de l'ALDH2

Les premières études menées sur des rats ont démontré qu'il existait plusieurs formes d'ALDH2. Suite à une étude isoélectrique, deux formes de l'isoenzyme mitochondriale ont été découvertes. L'isoenzyme-A (type 2A) démontre une bande prédominante à un pI de 5,2 et une plus faible bande à un pI de 5,1. Tandis que l'isoenzyme-B (type 2B) démontre une bande prédominante à un pI de 5,1 et une plus faible bande à un pI de 5,2 (Matsumoto, 1996). Matsumoto *et al.* (1996) ont également démontré que le type 2B possédait une plus faible activité que le type 2A, suggérant ainsi une différence d'activité dans le métabolisme de l'acétaldéhyde.

D'un point de vue génétique, la séquence d'ADNc de l'ALDH2 chez le rat Sprague-Dawley a été identifié par Carr *et al.* (1991). En effet, son étude sur des rats P (préférant

l'alcool) et NP (ne préférant pas l'alcool) leur ont permis d'identifier le polymorphisme génétique de l'ALDH2 chez le rat Sprague-Dawley. La séquence d'ADNc de l'ALDH2 possède une CAG (glutamine) au codon 67. Une mutation ponctuelle a été identifiée à ce codon, résultant d'une substitution de base de G pour A au niveau de l'ADNc chez les rats NP. Cette substitution résulte d'un changement de l'acide aminé 67 d'une glutamine par une arginine. Ainsi, les rats NP possèdent une plus haute fréquence du codon CGG ou de l'allèle ALDH2^R tandis que les rats P, présentent une plus haute fréquence du codon CAG ou de l'allèle ALDH2^Q (Carr *et al.* 1991) (Figure1).

Polymorphisme de l'ALDH2 chez le Rat Sprague-Dawley

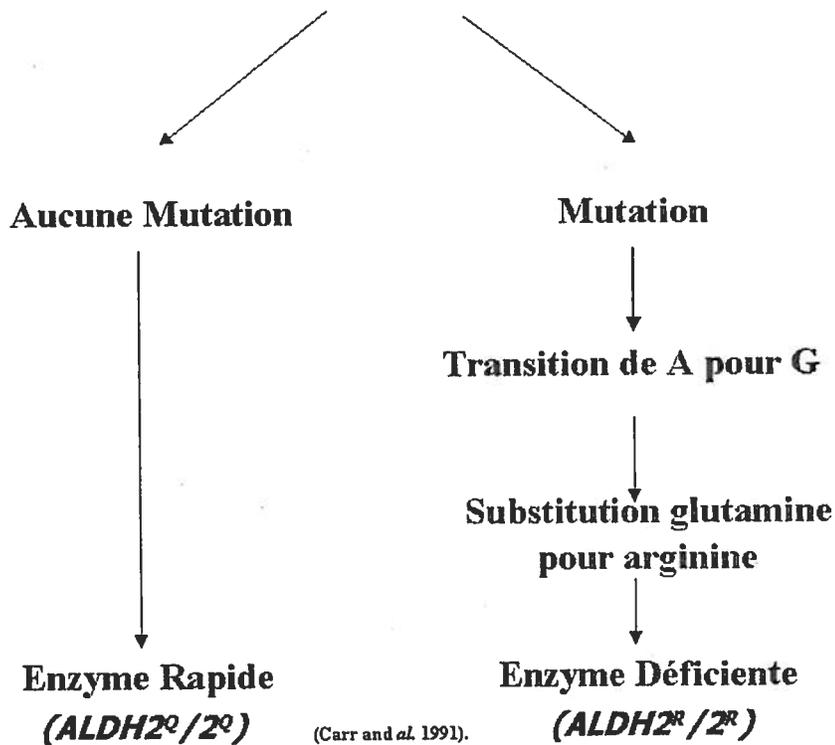


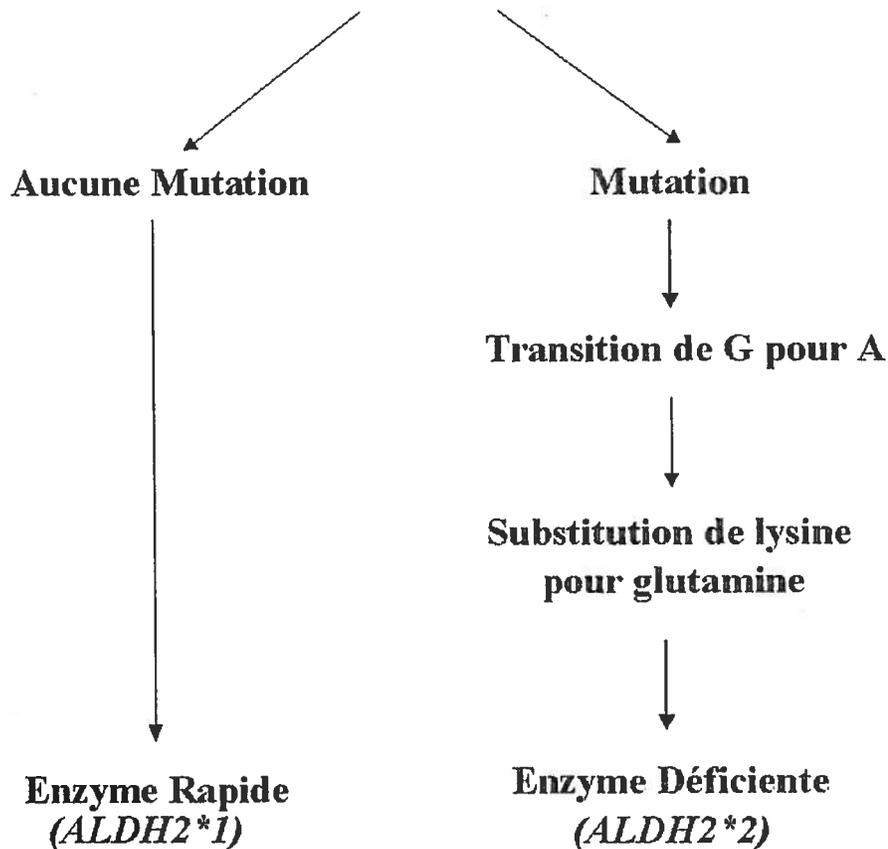
Figure 1. Polymorphisme de l'acétaldéhyde déshydrogénase rencontré chez le rat Sprague-Dawley

Effectivement, la fréquence de l'allèle ALDH2^R chez les rats NP est de 63% et de 18% chez les rats P. Pour ce qui est de l'allèle ALDH2^Q, 82% des rats P l'exprimaient tandis qu'il était exprimé à 37% chez les rats NP (Carr *et al.* 1991). Basée sur la séquence humaine de l'ALDH2, cette différence de nucléotide chez les rats NP et P serait trouvée au niveau du troisième exon et ce, vers la région 5' du gène (Carr *et al.* 1991). L'allèle ALDH2^R code pour un enzyme quasi inactif. (Crabb *et al.* 1989 ; Carr *et al.* 1991). En utilisant un système bactérien, la protéine encodée par l'allèle variant avait une augmentation marquée de son K_m pour le NAD⁺ et par le fait même, une réduction de son V_{max} (Farres, 1994). Ce changement dans le K_m pour le NAD⁺, rend l'enzyme quasi inactive à des concentrations de NAD⁺ cellulaire. Cette hausse du K_m suggère que l'enzyme déficiente puisse être déstabilisée puisque sa liaison avec le NAD⁺ ne serait pas aussi ferme qu'avec l'enzyme normal (Crabb, 1998).

Par ailleurs, l'allèle ALDH2^R exprime une dominance qui est incomplète sur l'allèle ALDH2^Q (Enomoto, 1991). Cette dominance a été confirmée lorsque l'ADNc de l'enzyme déficiente a été introduite dans des cellules exprimant l'enzyme normale résultant ainsi à une activité enzymatique plus faible (Xiao *et al.*, 1996). Or, les individus hétérozygotes possèdent également une enzyme déficiente mais à un degré plus faible que les homozygotes ALDH2^R/2^R. De plus, la fréquence des génotypes d'ALDH2 d'une population commerciale de Sprague-Dawley a été déterminée comme étant de 37% pour l'ALDH2^Q/ALDH2^Q, 53% pour l'ALDH2^Q/ALDH2^R et 10% pour l'ALDH2^R/ALDH2^R (Yamauchi *et al.* 1996). Ceci dit, environ 63% des rats Sprague-Dawley possèdent une enzyme déficiente. Par ailleurs, l'ALDH2 chez le rat est présente dans plusieurs tissus. Les niveaux d'ARNm de l'ALDH2 sont plus fortement exprimés au niveau du foie tandis que les concentrations d'ARNm de l'ALDH2 pulmonaire et rénale y sont intermédiaire (Dipple et Crabb, 1993).

Chez l'homme, la déficience catalytique de l'ALDH2 est causée par une mutation ponctuelle de l'acide aminé à la position 487, où une substitution de lysine pour glutamine est le résultat d'une transition de G pour A au nucléotide 1510, et ce, à partir du codon initial (Hsu *et al.* 1985).

Polymorphisme de l'ALDH2 chez l'humain



(Hsu and *al.* 1985).

Figure 2. Polymorphisme de l'acétaldéhyde déshydrogénase retrouvé chez l'humain

Tout comme chez le rat Sprague-Dawley, l'allèle récessif (ALDH2*2) est dominant sur l'allèle normal (ALDH2*1) mais de manière incomplète (Enomoto, 1991). Approximativement 50% de tous les Orientaux sont déficients au niveau de l'enzyme ALDH2 tandis que cette déficience est pratiquement absente chez les Caucasiens (Agarwal et Goedde, 1989).

Une étude menée par Stewart (1996) sur des fœtus humains a démontré que l'ARNm de l'ALDH2 était plus fortement exprimé dans les divers tissus que toutes les autres formes

d'ALDH. Ce qui suggère une forte présence de cette enzyme au niveau de l'organisme. Bien que l'ARNm de l'ALDH2 se retrouvent dans la majorité des tissus adultes, les plus fortes concentrations d'ARNm se localisent au niveau du foie, des reins, des poumons et des muscles cardiaques ainsi que squelettiques. De son côté, l'ARNm de l'ALDH1 au niveau des poumons et du foie présentait des niveaux plus faibles que ceux de l'ALDH2. En effet, la plus forte concentration d'ARNm des ALDH au niveau des poumons est celle de l'ALDH2. Ces dernières découvertes démontrent de façon convaincante que l'ALDH2 demeure l'isoenzyme principal dans le métabolisme de l'acétaldéhyde. Il est maintenant évident que le poumon est un organe métabolique important, et par conséquent, joue un rôle crucial dans les processus de détoxication (Fishman et Pietra, 1974). Des études ont démontré que le poumon possédait une habileté extraordinaire pour métaboliser l'éthanol et pourrait être responsable pour environ 40% de son métabolisme (Khanna et Israel, 1980). **Ce qui nous amène à notre deuxième hypothèse de recherche, à savoir que « Les sujets ayant une déficience catalytique au niveau de l'ALDH2, seraient plus vulnérables à une toxicité pulmonaire causée par une accumulation locale plus importante d'acétaldéhyde ».**

4. Effets toxiques de l'acétaldéhyde

Comme il a été mentionné auparavant, le gouvernement Canadien a placé l'acétaldéhyde sur sa liste prioritaire des substances toxiques. La production locale d'acétaldéhyde au niveau du poumon par la transformation des vapeurs de l'éthanol, pourrait avoir des conséquences potentiellement toxiques pour la population exposée, en particulier pour les sujets ayant une déficience en ALDH2, puisque leurs niveaux d'acétaldéhyde pulmonaire pourraient être plus élevés que les sujets normaux. Des études réalisées sur des animaux et des humains ont démontré, qu'une fois absorbé, l'acétaldéhyde se distribuait de façon extensive au niveau de l'organisme où il traversait les membranes de pratiquement tous les tissus, incluant le fœtus et les poumons (EPA,1993). L'acétaldéhyde généré par l'oxydation de l'éthanol est reconnu comme ayant un fort potentiel de se lier avec une

variété de protéines. En effet, il semble que c'est par cette voie que l'acétaldéhyde cause la plupart de ses effets toxiques.

4.1 Liaison protéines-acétaldéhyde

Plusieurs études ont démontré que l'acétaldéhyde avait le pouvoir de se lier avec une variété de protéines sous des conditions physiologiques. En effet, dû à sa haute réactivité, l'acétaldéhyde peut former des adduits avec une variété de protéines. Une étude réalisée avec des fortes concentrations d'acétaldéhyde à des pH physiologiques, ont démontré que l'acétaldéhyde se liait aux protéines et était en mesure de produire des cross-linking entre les chaînes peptidiques (Mohammed *et al.*, 1949). La nature électrophile de la fonction carbonyle de l'acétaldéhyde lui permet d'attaquer une variété de composés nucléophiles (O'Donnell, 1982). Les groupes ϵ -aminolysine libres sont des cibles importantes dans la formation d'adduits (Tuma *et al.* 1987). Plusieurs protéines avec une forte sensibilité à réagir avec des groupes de type aldéhyde sont présentes *in vivo* et peuvent par conséquent réagir avec l'acétaldéhyde. En effet, des protéines tels que l'albumine (Donohue *et al.*, 1983 ; Israel *et al.*, 1986), la tubuline (Smith *et al.*, 1989), les lipoprotéines (Wehr *et al.*, 1993 ; Lin *et al.*, 1995) et les enzymes microsomiales, participant dans le métabolisme de l'éthanol, sont reconnues comme étant capable de se lier avec l'acétaldéhyde (Behrens *et al.*, 1988).

La liaison de l'acétaldéhyde aux protéines résulte en la formation de deux types d'adduits : stable et instable (Donohue *et al.* 1983 ; Tuma *et al.* 1987). Les adduits instables (liaison réversible) ont l'habilité de se dissocier afin de reformer l'acétaldéhyde et les protéines (Donohue *et al.* 1983 ; Tuma et Sorrel, 1987). Bien que les adduits instables aient la possibilité de se lier à des groupes fonctionnels tels les thiols, les hydroxyles et les imidazoles, les bases de Schiff sont la principale forme d'adduits retrouvés (Donohue *et al.*, 1983 ; Tuma *et al.* 1987). Les bases de Schiff se forment lorsque le carbonyle réactif de l'acétaldéhyde se lie avec les groupes aminés des protéines. De leur côté, les adduits stables sont pratiquement irréversibles (liaison

covalente) et peuvent être à l'origine des effets toxiques de la liaison de l'acétaldéhyde aux protéines (Tuma et Sorrell, 1987). La majorité des adduits formés par la réaction de l'acétaldéhyde avec les protéines sont des adduits instables lorsque incubés pour des courtes périodes. Par contre, lorsque incubés pour des périodes beaucoup plus longue, le pourcentage d'adduits stable croît de façon significative. Les adduits instables peuvent éventuellement se transformer en adduits stables et par conséquent former des adduits irréversibles (Tuma *et al.*, 1991). Cette liaison acétaldéhyde-protéines peut avoir comme conséquence d'interférer avec la fonction de la protéine liée (Smith *et al.*, 1989 ; Mauch *et al.*, 1986), d'inhiber les enzymes lysine-dépendante (Mauch *et al.*, 1986), ainsi que de stimuler des réponses immunologiques (Israel *et al.*, 1986 ; Tuma et Klassen, 1992 ; Worrall *et al.* 1991 ; Viitala *et al.*, 1997) ou possiblement activer la carcinogénèse (Tillonen *et al.*, 1999).

4.2 Liaison acétaldéhyde-protéines reliée à l'ingestion d'éthanol

On sait maintenant que l'acétaldéhyde a le potentiel de se lier aux protéines et par conséquent de déstabiliser l'homéostasie de l'organisme. Ce qui demeure encore plus intéressant, c'est que non seulement l'acétaldéhyde se lie de façon *in vitro* avec les protéines mais il peut également se lier avec les protéines *in vivo* après l'ingestion d'éthanol. Or, les hausses éventuelles de l'éthanol atmosphérique, pourraient être à l'origine d'une liaison acétaldéhyde-protéines et ainsi avoir des conséquences réelles sur la santé humaine.

Formation d'adduits protéines-acétaldéhyde

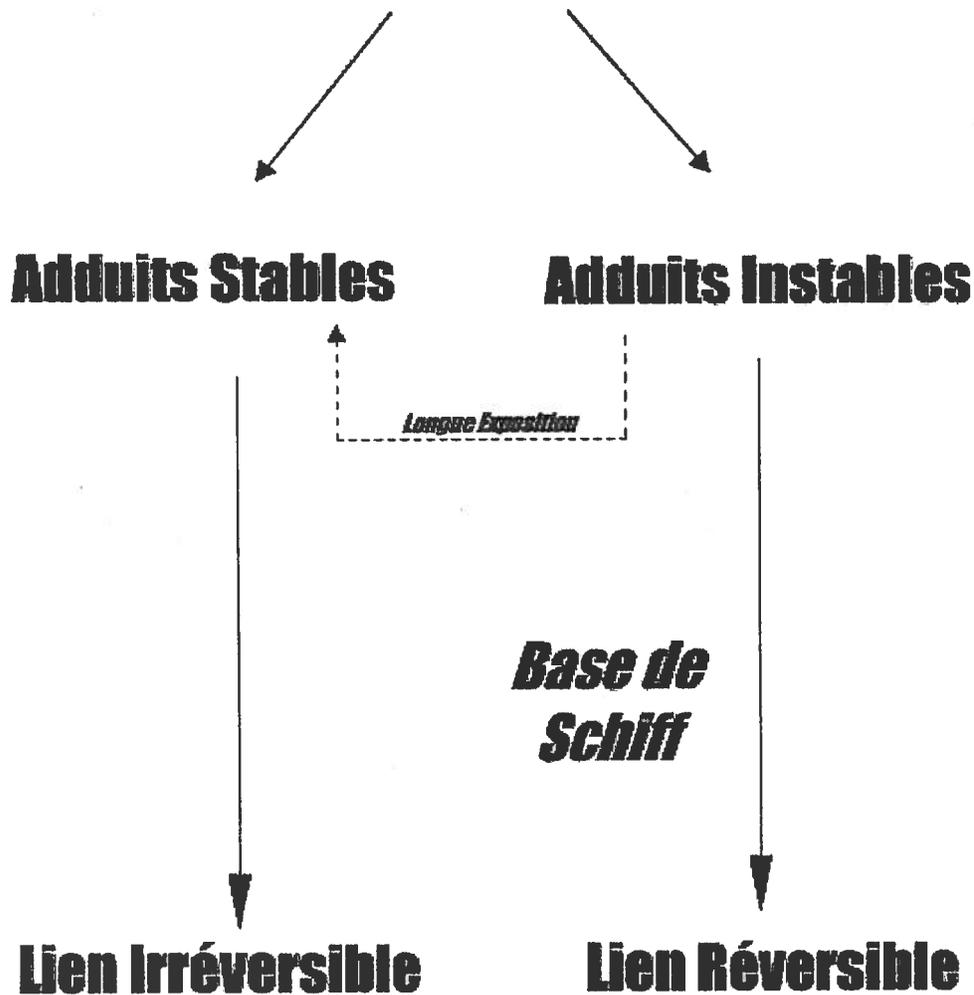


Figure 3. Formation d'adduits stables et instables entre des protéines cibles et l'acétaldéhyde. Une exposition à long terme peut transformer les adduits instables en adduits stables et par conséquent mène à la formation de liens irréversibles.

De récentes études ont montré que l'ingestion d'alcool chez l'homme et chez les animaux pouvait mener à la formation d'adduits hépatiques acétaldéhyde-protéines *in vivo* (Niemelä *et al* 1991 ; Niemelä *et al* 1995). La consommation chronique d'éthanol induit également la peroxydation des lipides qui, à son tour, génère la formation d'aldéhydes réactifs, dont le malondialdéhyde (MDA) (Dianzani, 1985 ; Cederbaum, 1989; Kamimura *et al.*, 1992). La formation des radicaux libres se fait par l'intermédiaire du MEOS et en particulier le CYP2E1 puisqu'il génère la formation de radicaux libres et induit la peroxydation des lipides (Lieber, 1988 ; Morimoto *et al*, 1993). On a observé qu'une consommation régulière d'éthanol augmentait l'expression des différents types de cytochromes dont les CYP2E1, CYP2A et CYP3A, et que cette expression était proportionnelle à la formation d'adduits causée par la consommation d'éthanol puisque l'acétaldéhyde est capable de se fixer sur les cytochromes tel que le CYP2E1 *in vivo* (Clot *et al.*, 1996 ; Niemelä *et al.*, 2000). En résumé, une consommation d'éthanol génère la formation de deux composés réactifs, soit l'acétaldéhyde et le MDA. Des études récentes ont montré que la formation d'adduits acétaldéhyde-protéines étaient beaucoup plus prononcée avec la présence de MDA et ce même à des concentrations faibles des deux aldéhydes (0,1mmol/L) (Tuma *et al.*,1996). Il a également été établi que l'incubation d'acétaldéhyde et de MDA avec les protéines générait la formation d'un nouveau composé, désigné MAA (« MDA-acétaldéhyde adducts ») (Tuma *et al.*,1996). Le MAA est reconnu comme étant capable de se lier aux protéines cytosoliques du foie (Tuma *et al.*,1996). Non seulement la consommation chronique d'éthanol génère des adduits protéines-acétaldéhyde mais elle génère également la formation de MDA via la peroxydation des lipides. À son tour, le MDA augmente la réactivité de l'acétaldéhyde pour les protéines ainsi qu'initier la formation d'un nouvel aldéhyde, soit le MAA. La formation d'adduits hépatiques peut être effectivement toxique pour le foie. On a en effet observé qu'il existait une corrélation entre le degré de la modification protéique produite par l'acétaldéhyde et la gravité des dommages hépatiques (Li *et al.*, 1997) .C'est à dire que plus il y avait une présence d'adduits dans la région péricentrale du foie, plus les dommages hépatiques étaient importants (Li *et al.*, 1997) .

4.3 Acétaldéhyde et protéines sanguines

Les adduits acétaldéhyde-protéines peuvent affecter d'autres tissus que le foie. En effet, on sait que les protéines plasmatiques ainsi que les globules rouges ont le potentiel de former des adduits avec l'acétaldéhyde. Des études *in vitro* ont démontré qu'une incubation d'érythrocytes avec l'acétaldéhyde générait la formation d'adduits stables avec l'hémoglobine (Gapstur *et al.*, 1992) et que cette formation s'effectuait au niveau de la partie N-terminal des chaînes α et β de l'hémoglobine (Gross *et al.*, 1992). Des expériences *in vivo* ont aussi démontré que l'hémoglobine produisait des liens covalents (Niemelä *et al.*, 1990 ; Lin *et al.*, 1993) tandis que les lysats de globules rouges produisaient que des adduit instables (Worrall *et al.*, 2000). Les adduits formés au niveau du plasma sont différents des adduits formés au niveau des érythrocytes. Ceci peut être expliqué par le fait que les érythrocytes matures sont dépourvus de réticulum endoplasmique et par le fait même n'ont aucune activité de MEOS, on peut donc s'attendre à ce que les quantités de composés réactifs soient bas et par conséquent contenir très peu de protéines modifiées (Worrall *et al.*, 2000). L'absence d'adduits tels le MDA ou le MAA au niveau des érythrocytes peut s'expliquer par le fait qu'ils possèdent une quantité importante de glutathion réduit les protégeant grandement contre les radicaux libres (Worrall *et al.*, 2000). De leur côté, les adduits instables formés avec les lysats des globules rouges peuvent éventuellement être transférés aux cellules tissulaires où ils peuvent créer davantage d'effets toxiques (Wickramasinghe *et al.*, 1994).

4.4 Acétaldéhyde et composantes nucléaires

En plus d'avoir le potentiel de s'attaquer aux protéines tissulaires et sanguines, les composés réactifs générés par la consommation d'éthanol peuvent également s'attaquer aux composantes nucléaires. Il existe plusieurs procédés enzymatiques nucléaires capables de métaboliser l'éthanol (NEMS) en acétaldéhyde ainsi que de générer des produits réactifs tels que le 1-hydroxyethyl ainsi que des radicaux libres (Castro *et al.*, 1997 ; Castro *et al.*, 1998). La génération de radicaux libres près des composantes

nucléaires tels l'ADN, les protéines et les lipides nucléaires pourrait avoir des conséquences toxicologiques. En effet, il a été démontré que les métabolites produits lors du métabolisme de l'éthanol par les NEMS étaient capables de se lier de façon covalente avec les macromolécules et lipides nucléaires. Les protéines nucléaires étaient également susceptibles d'être liées par l'acétaldéhyde via l'intermédiaire de la fonction des bases de Schiff. Cette liaison de l'acétaldéhyde avec les composantes nucléaires pourrait avoir des conséquences néfastes. En réagissant avec les protéines nucléaires, l'acétaldéhyde pourrait interférer avec l'apoptose, la croissance cellulaire ainsi que sa division et sa différenciation (Dasso, 1995; Martelli *et al.*, 1994).

L'acétaldéhyde généré par la consommation d'éthanol est également reconnu comme étant capable d'inhiber la réparation de l'ADN par alkylation en réagissant avec l'enzyme de réparation l'O⁶-méthylguanine transférase (Garro *et al.*, 1986 ; Espina *et al.*, 1988). Cette enzyme est responsable de la réparation de l'ADN en transférant la méthylation ou l'éthylation de l'ADN sur son groupement guanine. De plus, l'exposition des cellules fibroblastiques à différentes concentrations d'éthanol perturberait le cycle cellulaire en bloquant les phases G0/G1, diminuant la quantité d'ADN formée au niveau des cellules (Mikami *et al.*, 1997). Par contre, on a trouvé qu'il n'y avait aucune liaison covalente entre l'acétaldéhyde produite par les NEMS et l'ADN (Mikami *et al.*, 1997).

4.5 Apparition de la fibrogenèse

La formation d'adduits associée à la consommation d'éthanol affecte également la formation de collagène. De nombreuses études réalisées à l'aide de cultures cellulaires ont démontré que l'acétaldéhyde augmentait les concentrations d'ARNm de collagène et par conséquent, augmentait l'expression protéique des tissus conjonctifs (Brenner et Chojkier, 1987; Casini *et al.*, 1994). D'autres études sont arrivées aux mêmes conclusions, c'est-à-dire que les adduits aldéhydiques stimulaient la fibrogenèse et l'expression du gène à collagène chez des fibroblastes et des cellules hépatiques (Brenner et Chojkier, 1987; Tsukamoto *et al.*, 1995). On a également prouvé que l'acétaldéhyde stimulait la

fibrinogénèse *in vivo*. À l'aide d'un modèle utilisant des cobayes, Niemelä et ses collaborateurs (1995) ont trouvé qu'il y avait présence de fibrogénèse chez les foies de cochons-dindes castrés lorsque soumis à une consommation chronique d'éthanol. Ils ont aussi observé que la présence de tissu conjonctif se trouvait où il y avait précédemment des adduits acétaldéhyde-protéines, suggérant que la formation d'adduit acétaldéhyde-protéines précède la fibrogénèse. Un autre fait intéressant de cette étude est le fait que la formation d'adduits acétaldéhyde-protéines était plus importante chez ces cobayes castrés à comparé aux cobayes non castrés, laissant croire que les hormones sexuelles pourraient avoir un effet important sur la formation d'adduits (Niemelä *et al.*, 1999)

4.6 Effets sur le système immunitaire

La consommation d'éthanol peut également affecter le système immunitaire. En effet, des rats maintenus sur un régime d'éthanol formaient une quantité constante d'anticorps réactifs aux adduits acétaldéhyde-protéines comparativement aux rats témoins qui eux n'avaient aucune génération d'anticorps (Worrall *et al.*, 1994). Cette formation d'adduits acétaldéhyde-protéines générait une formation d'anticorps qui eux, avaient le potentiel de s'attaquer à ces adduits (Donohue *et al.*, 1983). Une caractérisation approfondie des immunoglobulines a démontré que la production d'acétaldéhyde stimulait la production des anticorps IgA et IgG (Worrall *et al.*, 1991; Clot *et al.*, 1995; Viitala *et al.*, 1997). Les adduits formés par l'intermédiaire de l'acétaldéhyde ont également le potentiel d'inhiber la sécrétion d'interleukine-2 (IL-2) murin et ce, de manière dose-dépendante (Braun *et al.*, 1995). On sait que l'IL2 est produite par les cellules Th et joue un rôle essentiel dans la prolifération des cellules T et de la synthèse de certaines cytokines dont l'IFN γ . Outre ceci, l'IL2 augmente également la prolifération des cellules B et active les monocytes ainsi que les cellules NK. Par ailleurs, les bases de Schiff sont également reconnues comme étant capables de stimuler les cellules CD4 via un mécanisme stimulant le transport de K⁺ et de Na⁺ en favorisant une réponse Th1 via une production de cytokines (Rhodes *et al.*, 1995). La formation d'adduits d'acétaldéhyde pourrait jouer le rôle d'immunorégulateur.

4.7 Formation et liaison d'acétaldéhyde extra-tissulaire

On a aussi observé qu'il existait une formation importante d'acétaldéhyde extrahépatique après l'ingestion d'éthanol (Jokelainen *et al*, 1994 ; Jokelainen *et al*, 1996) et que cette production extrahépatique induisait des adduits acétaldéhyde-protéines au niveau du foie (Jokelainen *et al*, 2000). C'est à dire que la production d'acétaldéhyde par un organe comme le poumon pourrait non seulement contribuer à la formation d'adduits locaux mais également former des adduits au niveau d'autres organes (e.g le foie). En effet, on a observé une formation d'adduits acétaldéhyde-protéines hépatique chez des rats après une administration d'acétaldéhyde dans leur eau de boisson (Li *et al*, 1997). Il a également été suggéré que l'acétaldéhyde puisse être impliqué dans la neurotoxicité induite par l'alcool en formant des adduits avec les protéines du cerveau (Rintala *et al.*, 2000).

4.8 Génotoxicité liée à une exposition d'acétaldéhyde

Plusieurs études *in vitro* ont démontré que l'acétaldéhyde pouvait induire des mutations génétiques au niveau des cellules mammifères. En effet, on a observé que l'acétaldéhyde induisait des mutations aux niveaux des gènes des lymphocytes humains (He et Lambert, 1990). Une augmentation dans la fréquence d'aberrations chromosomiques a également été observée chez des lymphocytes humains lorsque incubés avec de l'acétaldéhyde, et ce, de manière dose-dépendante (Ristow et Obe, 1979 ; Jansson, 1982). De plus, ce composé agit également sur les chromatides. Une chromatide est un des deux brins dupliqués d'un chromosome. Des chromatides sœurs sont deux chromatides identiques d'un chromosome réunis par un centromère. Les chromatides sœurs s'échangent des brins d'ADN entre elles sous des conditions normales. Par contre, lorsque exposé à un toxique génétique, les chances d'avoir plus d'échange de chromatides sœurs (ECS) sont plus grandes. En comparant la fréquence des ECS des cellules exposées avec celles des cellules témoins, la mesure du potentiel génotoxique d'un composé est obtenu. On a observé que l'acétaldéhyde est capable d'induire des ECS chez les lymphocytes humains

ainsi que chez des embryons de souris pré-implantation (Ristow et Obe, 1979 ; Jansson, 1982 ; Lau *et al.*, 1991).

De plus, une autre étude a démontré que les ECS étaient persistants et ce, pendant plusieurs générations cellulaires (He et Lambert 1985). L'acétaldéhyde est également capable de produire l'aneuploïdie chez *Saccharomyces cerevisiae* et chez les cellules d'ovaires des hamsters chinois (Dulout et Furnus, 1988 ; Albertini *et al.* 1993). On a également observé une induction de synthèse d'ADN « non programmé » chez des hépatocytes de rats et une formation de liens transversaux entre les protéines de l'ADN dans les cellules d'ovaires d'hamster chinois (Olin *et al.*, 1996). En plus des tests *in vitro*, des expériences *in vivo* ont démontré que l'acétaldéhyde pouvait réagir avec l'ADN. En effet, les études de Lam *et al.* (1986) sur des rats Fisher-344, ont prouvé que lorsque exposés à des concentrations de 1000 ppm d'acétaldéhyde à raison de six heures par jour pendant cinq jours, il y avait formation de liens transversaux entre les protéines de l'ADN dans les muqueuses respiratoires des rats.

4.9 Carcinogénèse de l'acétaldéhyde

4.9.1 Carcinogénèse de l'acétaldéhyde chez des animaux

Le potentiel carcinogène de l'acétaldéhyde a été testé sur des rats par Woutersen (1984). Des rats albinos SPF Wistar mâles et femelles ont été exposés par inhalation à des concentrations de 0, 750, 1500 ou 3000 ppm d'acétaldéhyde à raison de 6 heures par jour pendant une période de 52 semaines. Cette étude a relevé que les vapeurs d'acétaldéhyde causaient deux types de tumeurs dans les voies nasales des rats. Les adénocarcinomes étaient significativement augmentés chez les mâles et les femelles à toutes les concentrations d'expositions. Par contre, les carcinomes des cellules squameuses étaient plus nombreux à des concentrations moyennes et élevées chez les mâles tandis que chez les femelles, ces carcinomes étaient présents qu'à des fortes concentrations d'acétaldéhyde. On a également découvert qu'il existait une relation distincte de dose-réponse chez

les carcinomes des cellules squameuses chez ces rats. L'étude a aussi démontré que l'acétaldéhyde était fortement toxique au niveau des tissus nasaux, puisqu'il présentait une dégénération marquée à tous les niveaux d'exposition. Une étude subséquente par ces mêmes chercheurs a démontré que les lésions nasales pouvaient très bien se transformer en tumeurs et ce, même après un arrêt de l'exposition à l'acétaldéhyde (Woutersen *et al.*, 1984)

4.9.2 Carcinogénèse de l'acétaldéhyde chez l'humain

Les recherches épidémiologiques de la carcinogénèse de l'acétaldéhyde chez les humains sont rares. La seule étude jusqu'à cette date a été conduite en 1974 chez des travailleurs d'une usine de production d'acétaldéhyde. Cette étude a comparé l'incidence de cancer chez ces travailleurs vis-à-vis l'incidence de cancer chez la population générale. Les données ont démontré que les travailleurs avaient cinq fois plus d'incidence de cancer que la population générale (Bittersohl, 1974). Par contre, cette étude n'a pas considéré plusieurs facteurs tels que l'âge, la consommation de cigarette etc. Les preuves fournies par cette étude demeurent inadéquates pour classer l'acétaldéhyde comme carcinogène.

4.10 L'acétaldéhyde et le système respiratoire

Comme il a été mentionné auparavant, l'acétaldéhyde inhalé était fortement toxique au niveau des tissus nasaux et que ces lésions nasales pouvaient très bien se transformer en tumeurs (Woutersen *et al.*, 1984). Une autre étude portée sur des hamsters a relevé qu'une instillation trachéale d'acétaldéhyde produisait des changements histopathologiques importants ainsi qu'inflammatoires au niveau de la région bronchio-alvéolaire (Feron *et al.*, 1982) Une étude sous-chronique avec l'acétaldéhyde a démontré que ce composé pouvait modifier la composition du surfactant pulmonaire chez des rats. Une dose intra-péritonéale d'acétaldéhyde réduisait de façon significative la concentration phospholipidique du surfactant, affectant ainsi la stabilité et l'élasticité des

parois alvéolaires (Prasanna *et al.*, 1981). On a également observé que l'acétaldéhyde généré par l'éthanol inhalé affectait les cellules épithéliales bronchiales en diminuant la motilité des cils de ces dernières (Sisson et Tuma, 1994). Il semble que cette dysfonction soit reliée à l'inactivation directe de l'ATPase ainsi que la formation d'adduits avec la tubuline et la dynéine des cils bronchiaux (Sisson *et al.*, 1991). Ceci dit, l'acétaldéhyde formé via le métabolisme de l'éthanol inhalé pourrait avoir des conséquences néfastes puisque les cils bronchiaux demeurent une des premières lignes de défense contre les polluants aériens.

5. Pathologies reliées à la déficience en ALDH2

Il existe dans la littérature des recherches suggérant que les sujets ayant l'allèle atypique de l'ALDH2 étaient susceptibles de développer certaines pathologies. En effet, on a découvert que les fréquences de l'allèle ALDH2*2 étaient significativement plus élevées chez des Japonais alcooliques qui avaient une plus grande incidence de cancer oropharyngolaryngien, pulmonaire et oesophagien chez les personnes déficientes en ALDH2 (Yokoyama *et al.*, 1998). Une étude récente tend à confirmer les données précédentes où Chao et ses collègues (2000) ont rapporté que les alcooliques chinois ayant l'allèle ALDH2*2 étaient plus susceptibles de développer des cancers oesophagiens. De plus, une étude portée chez des fumeurs a montré que le niveau d'adduits à l'ADN chez des fumeurs ayant une déficience en ALDH2 est plus élevé que chez les sujets normaux (Wang *et al.*, 1998). Tous ces résultats suggèrent que le polymorphisme de l'ALDH2 pourrait moduler les niveaux d'adduits d'ADN. Ces résultats suggèrent un rôle plus que probable de l'acétaldéhyde et du génotype atypique de l'ALDH2 dans le développement de certains cancers humains.

On a également observé que les individus ayant une déficience en ALDH2 et qui étaient exposés à l'alcool, étaient plus à risque à une attaque asthmatique (Takao *et al.*, 1998). On a conclu que l'augmentation des niveaux pulmonaires d'acétaldéhyde était à l'origine de ces attaques puisqu'il cause une bronchoconstriction indirecte par la libération

soudaine d'histamine (Myou *et al*, 1995). Ceci demeure un point extrêmement intéressant au point de vue de notre étude. En effet, étant donné les concentrations croissantes d'éthanol atmosphérique et l'existence d'un métabolisme pulmonaire, on peut facilement penser que les gens déficients en ALDH2 seront plus susceptibles aux attaques asthmatiques puisqu'ils auront des concentrations d'acétaldéhyde pulmonaire plus importantes que la population générale. Or, l'addition de l'éthanol au niveau de l'essence demeure un sujet nébuleux puisqu'il pourrait avoir plusieurs effets toxiques comme la liaison acétaldéhyde-protéines pulmonaire et également favoriser des attaques asthmatiques chez l'ensemble de la population et plus particulièrement chez les gens déficients en ALDH2.

6. Hypothèses

Les hypothèses de cette recherche nous ont mené à envisager que le contact direct des vapeurs d'éthanol avec les poumons pourrait causer un risque potentiel à la santé humaine et que les sujets ayant une déficience catalytique au niveau de l'ALDH2, pourraient être plus vulnérables à une toxicité pulmonaire causée par une accumulation locale plus importante d'acétaldéhyde.

7. Objectifs

Une première étape de l'étude des vapeurs d'éthanol a consisté à déterminer les propriétés toxicocinétiques des vapeurs d'éthanol chez le rat Sprague-Dawley. Ce travail, qui avait pour objectif de mesurer l'évolution des concentrations sanguines d'éthanol et d'acétaldéhyde suivant une exposition à diverses concentrations, a été réalisé sous la direction du Dr. Robert Tardif, directeur de l'Unité d'inhalation de l'Université de Montréal. Ces travaux nous ont ensuite amené à évaluer le rôle possible du polymorphisme de l'ALDH2 dans la réponse des poumons aux vapeurs d'éthanol afin de déterminer le risque sur la santé des populations exposées.

CHAPITRE 2 - ARTICLE SCIENTIFIQUE

Vapors from Ethanol in Gasoline: Kinetic studies and the Potential Role of Type 2 Aldehyde Dehydrogenase (ALDH2) Polymorphism in Pulmonary Effects in Rats

Gianni Del Zoppo¹, G. Rondeau², R. Tardif², M. Charbonneau^{1,3}

- 1 INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Pointe-Claire, Montréal (Quebec) Canada H9R 1G6
- 2 Département de santé environnementale et santé au travail, Université de Montréal, Montreal (Quebec) Canada H7C 3J7
- 3 To whom correspondence should be addressed. FAX: (514) 630-8850
E-mail : michel.charbonneau@inrs-iaf.quebec.ca

Running title : *Kinetics and Pulmonary Effects of Ethanol Vapors*

Abstract

Addition of ethanol (EtOH) to gasoline is likely to increase atmospheric emissions of ethanol and acetaldehyde. EtOH is metabolized in a two-step process by the enzymes alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase. By converting acetaldehyde to acetate ALDH2 could play a major role in the toxicity of EtOH at the pulmonary level. A significant polymorphism exists in both humans and rats. In the latter, a polymorphism gives rise to a slow metabolizing enzyme. This mutation is present on the ALDH2^R allele but is absent on the ALDH2^Q allele, with the ALDH2^R allele expressing an incomplete dominance. The purpose of the present study was (1) to characterize the toxicokinetics of ethanol in blood of male and female Sprague-Dawley rats following inhalation exposure to three levels of ethanol vapors and, (2) to assess the role of the ALDH2 polymorphism in pulmonary ethanol binding following intratracheal administration of ethanol. The kinetic study was performed using groups of male and female Sprague-Dawley rats and exposing them to 6 hours to 500, 1000 and 2000 ppm of ethanol vapors. Additionally, 5 male and 5 female Sprague-Dawley rats were exposed, 6h/day to 1000 ppm of ethanol vapors for 14 consecutive days. The results indicate that blood ethanol concentrations tend to be higher and more persistent in female than in male rats exposed to the same ethanol concentration. Detection of ALDH2 polymorphism by PCR amplification of a polymorphic site followed by digestion with restriction enzyme *DdeI* showed that in the Sprague-Dawley rat, the ALDH2 genotype distribution was as followed : 2R/2R (17%), 2Q/2R (53%), 2Q/2Q (30%). Pulmonary ALDH2^Q/2^Q isozyme showed greater *in vitro* metabolic activity, assessed by NADH formation, than ALDH2^R/2^R isozymes. Blood levels of acetaldehyde could not be detected in these rats suggesting its binding to proteins. Three consecutive days of intratracheal instillation of [¹⁴C]-EtOH in both male and female rats showed that ethanol-derived radiolabeled material was bound to pulmonary, liver and blood proteins. This work showed that subjects deficient in ALDH2 do not appear to be more vulnerable to protein binding and that male rats seem to be more vulnerable to protein binding than female rats. Similarities between acetaldehyde and formaldehyde binding to proteins suggest that EtOH vapors may lead to pulmonary toxicity. Future work should look at the complete characterization of pulmonary metabolism of inhaled ethanol and the consequences of chemical binding to the lung proteins.

Introduction

The total energy demand for the transportation sector as well as the worldwide vehicle ownership is projected to increase over the next 20 years as oil will remain the dominant fuel (Energy Information Administration, 2001). The dependence on foreign markets for oil and the foreseeable rise in atmospheric pollution have pushed governments to launch initiative based on alternative fuels. The addition of ethanol to gasoline is commonly used in several countries in order to produce cleaner burning fuels. This is leading, however, to increasing levels of atmospheric ethanol and acetaldehyde emissions such that over the next years, inhalation may become a significant route of environmental exposure to these compounds. Even though the levels of ethanol exposure reported upon refueling are relatively low (46 ppm; American Petroleum Institute, 1995) this phenomenon will subject people to chronic involuntarily exposure to ethanol (Ahmed, 2001). Furthermore, recent studies have also reported that the use of E10 gasoline (10% ethanol) was expected to lead to a 15% decrease in CO emissions, but predicted a 0.4 to 1.6 % increase in maximum 1-hour ozone levels, a 1.0 to 1.5 % increase in formaldehyde levels, a 2.7 % increase in acetaldehyde levels, and a 2.9 to 4.5 % increase in peroxyacetyl nitrate (PAN) (Singleton *et al.*, 1997).

This potential rise in atmospheric ethanol and acetaldehyde concentrations causes concern since data on the toxic effects of ethanol and acetaldehyde vapors are limited. Due to this absence of data the first step in the present study aimed to assess the disposition of different ethanol vapor concentrations in the Sprague-Dawley rat, as well as demonstrating if acetaldehyde is present in the expired air of normal human subjects. This first step guided us to a second objective, i.e. to assess binding of ethanol-derived metabolites, such as acetaldehyde, in the lungs and other organs.

The lungs represent an important organ in the metabolism of ethanol and acetaldehyde. It has been reported that only 60 % of inhaled ethanol is absorbed into human lungs, the remaining 40 % being expired as a result of the wash-in-wash-out effect observed for water soluble chemicals (Kruhoffer, 1983; Johanson, 1991). This effect also occurs in

rats (Morris *et al.*, 1986). Once in lung cells, ethanol is oxidized to acetaldehyde by the alcohol dehydrogenase (ADH) or by the cytochrome P450 2E1 ; this oxidation can also be done by pulmonary bacteria (Miyakawa *et al.*, 1986) A subsequent oxidation of acetaldehyde to acetate is catalyzed by acetaldehyde dehydrogenase (ALDH).

The ALDH family of enzymes is comprised of many isoenzymes of which the form found in the mitochondria is the most active. Designated as ALDH2, this enzyme possesses the lowest Km value towards acetaldehyde and its mRNA levels are the most abundant when compared to all the other ALDH isoenzymes (Lindahl 1994; Dipple and Crabb 1993). The pulmonary mRNA levels of ALDH2 are fairly important suggesting that the lung may significantly contribute to ethanol metabolism (Dipple and Crabb 1993). Recent studies have found that a polymorphism exists in the *aldh2* gene in both humans and rats (Yoshida and *al.*, 1984; Carr *et al.*, 1991). This polymorphism results in two types of enzymes, one with a high catalytic ability and one being a slow to inactive form. In humans, a single base-pair substitution in codon 487, which is responsible for a G to A transition, lead to the slow acting enzyme which has a lysine instead of a glutamine in that position (Yoshida and *al.*, 1984). In the Sprague-Dawley rat, the most frequent cDNA sequence of ALDH2 reported has a glutamine (CAG) at codon 67. A polymorphism has been detected at this level, where A is substituted by G. Rats having this specific sequence (CGG) exhibit an ALDH2 enzyme that is almost inactive (Carr *et al.*, 1991). In humans as well as in rats, this atypical genotype expresses an incomplete dominance over the typical enzyme, meaning that even heterozygotes express some sort of deficiency towards acetaldehyde metabolism (Enomoto *et al.*, 1991).

This deficiency results in higher blood or tissue concentrations of acetaldehyde in subjects having the ALDH2 deficient enzyme which can lead to several types of toxicity. Studies have shown that acetaldehyde is highly toxic. Acetaldehyde has been shown to induce mutations in human lymphocytes and it can form DNA-protein crosslinks *in vitro* (Lam and *al.*, 1986; He and Lambert, 1990). Acetaldehyde has also been shown to bind to proteins and to form both stable and unstable adducts, the latter being eventually converted to stable adducts (Donohue *et al.*, 1983 ; Tuma and Sorrell, 1987; Tuma *et al.*,

1991). This acetaldehyde-protein binding phenomenon can eventually cause interference with protein functions, stimulate immune responses or induce carcinogenesis (Smith *et al.*, 1989 ; Mauch *et al.*, 1986; Israel *et al.*, 1986 ; Tuma and Klaassen, 1992 ; Worrall *et al.*, 1991 ; Viitala *et al.*, 1997 ; Tillonen *et al.*, 1999). Furthermore, a long term exposure to ethanol has been shown to generate hepatic acetaldehyde adducts *in vivo* in both humans and rats (Niemelä *et al* 1991 ; Niemelä *et al* 1995). Finally, chronic exposure to ethanol can induce lipid peroxydation which in turn, can generates the formation of other toxic aldehydes, notably malondialdehyde (MDA) (Dianzani, 1985 ; Cederbaum, 1989; Kamimura *et al.*, 1992).

ALDH2 deficient people are more vulnerable than normal subjects to certain pathologies. One study reported that the level of DNA adducts in smokers with the ALDH2 deficiency was significantly higher than that in smokers with the typical enzyme (Wang *et al.*, 1998). The incidence of stomach, oropharyngolaryngeal, esophageal and lung cancer was also higher in ALDH2 deficient alcoholics (Yokoyama *et al.*, 1998). Takao *et al.* (1998) reported that ALDH2 deficient people who ingested ethanol were at greater risk for asthma attacks due to a sudden rise in pulmonary acetaldehyde levels. The latter has been shown to trigger a sudden release of histamine causing bronchoconstriction (Myou *et al*, 1995). It is important to note that about 50% of the Asian population possesses an ALDH2 deficient enzyme (Takeshita *et al.*, 1994). These findings prompted us to make the hypothesis that individuals with a deficient ALDH2 enzyme exposed to ethanol vapors may be at greater risk to develop pulmonary toxic effects due to *in situ* acetaldehyde.

This first toxicity study of inhaled ethanol assessed the disposition of ethanol vapors in male and female Sprague-Dawley rats and the role of the ALDH2 polymorphism in pulmonary ethanol binding following an intratracheal administration of ethanol. Also, acetaldehyde in exhaled air was measured in human volunteers.

Materials and Methods

Chemicals.

Ethanol (95%) and tert-butyl alcohol were obtained from Aldrich Chemicals (Milwaukee, Wisc.). Heparin (20 mg/L NaCl 0.9%) was obtained from Fisher (Nepean, Ont). CCl₄ (Sigma), [¹⁴C]-EtOH (Sigma), Hyamine (Aldrich), Sodium phosphate, EDTA, Rotenone (Sigma), 4-méthylpyrazole (Sigma), Acetaldehyde (Aldrich)

Animals

Adult male (240-260 g) and female (230-250 g) Sprague-Dawley rats were purchased from Charles River Canada (St-Constant, Québec). Animals were kept on a 12 hours light/dark cycle in a humidity- and temperature-controlled room prior to experimentation. During inhalation exposures, animals were individually caged in the exposure chamber and were not provided with food or water.

Exposures

Ethanol exposures were conducted in a dynamic exposure chamber of 500 L (Unifab, Kalamazoo, MI) for which the air-flow rate was set at 280 L/min. A high-pressure liquid chromatography (HPLC 2510) pump (Varian Canada, Montréal, Québec) was used to deliver ethanol into the inhalation chamber. A Hewlett-Packard HP-5890 Series II gas chromatograph equipped with an Air Cadet pump (Cole Parmer model 7530-40) was used to monitor the ethanol concentration in the exposure chamber, at 4 minute intervals. An infrared spectrophotometer Miran 1-A (Wilks, Foxboro) was also used to monitor the ethanol concentration continuously in the exposure chamber. Groups of 5 male rats and female rats were exposed to ethanol during 6 hours (9:00 a.m.-3:00 p.m.) to 500, 1000 and 2000 ppm or to 1000 ppm during 6 hour per day for 14 consecutive days. The mean concentrations (\pm SD) measured in the exposure chamber during the 6 hours exposure for male rats were 494 ± 7.7 ppm, 1008 ± 16 ppm and 2013 ± 78 ppm ethanol whereas concentrations measured for female rats were 499 ± 5.8 , 1009 ± 32 and 1955 ± 97 ppm, respectively.

Measurement of Unchanged Ethanol in Blood.

A 100 μ l (1000 and 2000 ppm exposures) or 200 μ l (500 ppm exposure) sample of heparinized blood was collected from the tail vein at various intervals post-exposure (2, 20, 40 and 60 min.). The blood ethanol concentration was measured by head-space gas chromatography equipped with a flame-ionization detector, according to the method described by Pastino et al. (1997). Standard curves were generated by adding ethanol in blood from a control rat. Tert-Butyl alcohol was used as an internal standard. The current levels of exposures were chosen as such since the acceptable exposure limit in most countries is at 1000 ppm. We then selected the other tested concentrations accordingly. Furthermore, the time points were carefully chosen knowing the elimination rate of ethanol is rapid.

Standard curve and determination of acetaldehyde in blood.

The analysis method was used according to the method of Ohata *et al.* (1997). The standard curve was established by adding 1 mM (10 to 40 μ l) of acetaldehyde to 1.0 ml of control hemolyzed blood. Samples (1.0 ml) from both control and ethanol exposed rats were treated in the same manner. The mixture was then centrifuged at 3500g for a period of 10 minutes at 4°C. The supernatant (500 μ l) was transferred into a 10 ml extraction tube containing 400 μ l of cold distilled water; 200 μ l of 2,4-dinitrophenylhydrazine at 2 mg/ml (dissolved in a 6M solution of chlorhydric acid) and 20 nmol of butyraldehyde (standard). The mix was incubated at 40°C for a period of 60 min, then hydrazone (a derivative) was extracted with 2 ml of heptane. The heptane supernatant was evaporated with nitrogen in a bath of 25°C and the residue was dissolved in 1 ml of hexane then transferred into an automatic injector vial.

Determination of ALDH2 Genotype in the Sprague-Dawley Rat.

We extracted 500 μ L of whole blood and isolated the rat DNA using a commercial kit (Amersham). We then proceeded to the gene amplification by the PCR method previously described by Yamauchi *et al.* (1996) with a few modifications : purification of the PCR products with a commercial kit (Fisher), the PCR-amplified DNA was digested overnight with *DdeI* (New England Biolabs) enzyme at 37°C and samples were subjected

to electrophoresis on a 12,5% polyacrylamide gel. The polymorphism of the ALDH2 enzyme is present under three distinct forms. Rats with the ALDH2^R/2^R genotype will present a single band at 134 bp whereas the ALDH2^Q/2^Q genotype will show two distinct bands at 109 and 25 bp. *DdeI* digestion of the ALDH2^Q/2^R genotype will produce three fragments of 134, 109 and 25 bp.

Pulmonary ALDH2 Activity

Lungs were extracted from previously screened Sprague-Dawley rat. The lungs were homogenized in four volumes of 10 mM Tris-HCl buffer containing 0.25M of sucrose and 1mM of mercaptoethanol, pH 7,4. The homogenate was centrifuged at 2 500g for 10 minutes. The supernatant was then centrifuged at 12 500g for 15 minutes and the pellet which contained the mitochondria was suspended with the same buffer. The activity of ALDH2 was assayed as previously described by Kishimoto *et al.* (1995) with a few modifications. The mitochondria fraction was placed in a 0,1M sodium phosphate buffer containing 1mM of EDTA, 2µM of rotenone and 10mM of 4-methylpyrazole, pH 7.5. Then 4.8 mM of NAD was added to the mixture and the solution was gently mixed. After waiting for a period of one minute, acetaldehyde (100 mM) was added to start the reaction and the tubes were capped. The formation of NADH within the reaction tube was measured at 340 nm. Rotenone and 4-methylpyrazole were added to inhibit NADH oxidase from the mitochondria and ADH activity, respectively. Specific activity is expressed as nmol of NADH produced/ mg of protein.

Intratracheal Instillation of Radiolabeled Ethanol

Male and female rats were divided into ALDH2^Q/2^Q and ALDH2^R/2^R groups identified using the PCR method described above. Eight rats from each group were then submitted to an intratracheal instillation for three (3) consecutive days with 5,5 µCi of radiolabeled ethanol (EtOH-1-¹⁴C, Sigma). Twenty four (24) hours following the last instillation, the rats were sacrificed by exsanguination. Lungs, liver and blood were collected.

Protein Isolation

Lungs and liver were homogenized using a polytron. An aliquot of 100 μ L of the whole fraction was collected and mixed with 1ml of 1M of hyamine. Samples were then centrifuged at 2 500g for 10 minutes. Pellets were then mixed with 2ml of 1M of hyamine and placed in a 55⁰C bath. Supernatants were mixed with 4 parts of cold acetone and placed at -20⁰C for 20 minutes in order to precipitate the proteins. Afterwards, the solution containing the precipitated proteins was centrifuged at 12 500g for 15 minutes. The pellet was then washed and mixed with 2ml of 1M of hyamine and placed in a 55⁰C bath. The supernatant was kept for further analysis. Once the pellets were completely liquefied, the samples were placed in a solution of Ecolite and then neutralized by adding HCl after 500 μ L of hydrogen peroxide (2%) was added in all samples except the whole fraction samples.

Blood samples were immediately placed in a tube containing heparin and 100 μ L were mixed with 1ml of hyamine 1M. Samples were then centrifuged at 2 500g for 10 minutes. Afterwards, 100 μ L of the supernatent was mixed with another 1ml of hyamine 1M. The rest of the supernatant was mixed with 4 parts of cold acetone and placed at -20⁰C for 20 minutes in order to precipitate the proteins. Afterwards, the solution containing the precipitated proteins was centrifuged at 12 500g for 15 minutes. The pellet was then washed and mixed with 2ml of 1M of hyamine and placed in a 55⁰C bath. The supernatant was kept for further analysis. Once completely liquefied, the samples were neutralized and lightened in color while in the solution of Ecolite . A quench curve was subsequently made using CCl₄ and radioactivity in all samples were measured using a liquid scintillation counter.

Statistics

Mean blood ethanol concentration were compared using a standard t test. Mean protein binding values were compared using a t test. Level of significance was 0.05

Results

Blood ethanol concentrations following inhalation exposures

Exposure of rats to increasing levels of ethanol vapors caused a dose-related increase in blood ethanol concentrations (Table 1). The 2000 ppm concentration appears to result in saturation of metabolism since a 4-fold rise of atmospheric concentration results in a greater rise of blood concentration (5.3 and 4.5 for male and female rats respectively) following a single exposure to 500, 1000 or 2000 ppm ethanol, during 6 hours (Table 1). Blood ethanol concentration tends to be higher in female rats than in male rats exposed to the same concentration. This difference appears to increase with post-exposure time ; in female rats, blood ethanol concentrations were still detectable 60 min after exposure whereas they declined below the detection level in male rats. These sex-related differences were significant 20 minutes (500 and 2000 ppm exposure) and 40 and 60 minutes (500, 1000 and 2000 ppm exposure) post-exposure ($p < 0.05$), respectively. Repeated exposure to 1000 ppm for 14 days (6 h/d) did not change the blood ethanol levels in females but in males it resulted in higher level than after a single exposure. Acetaldehyde levels in the blood of rats could not be detected, suggesting a possible binding of acetaldehyde to proteins. Detection limit of ethanol and acetaldehyde was 4 μM and 5 μM respectively.

ALDH2 profile in the Sprague-Dawley rat.

After digestion with restriction enzyme, electrophoretic profiles of the ALDH2 gene in the liver of Sprague-Dawley rats clearly showed three genotypes ($\text{ALDH2}^{\text{Q}/2\text{Q}}$, $\text{ALDH2}^{\text{R}/2\text{R}}$ and $\text{ALDH2}^{\text{Q}/2\text{R}}$) (Figure 1). The DNA of rats having the $\text{ALDH2}^{\text{Q}/2\text{Q}}$ genotype yields to 2 fragments of 109 and 25 base pairs. On the other hand, since the DNA of rats of $\text{ALDH2}^{\text{R}/2\text{R}}$ lack the polymorphic site, the restriction enzyme DdeI cannot fragment its DNA leaving only one fragment of 134 base pairs. Heterozygous rats, which have both alleles, produce a DNA pattern of three bands of 134, 109 and 25 base pairs. We tested a total of 115 Sprague-Dawley rats and determine that the frequency of

the ALDH2^{Q/2Q}, ALDH2^{R/2R} and ALDH2^{Q/2R} genotypes is 30, 17 and 53%, respectively.

Pulmonary ALDH2 activity in the Sprague-Dawley rat.

Pulmonary ALDH2 activity in ALDH2^{Q/2Q} rats was compared to that of the ALDH2^{R/2R} genotype (Figure 2). A concentration of 100 mM of acetaldehyde was used to perform the *in vitro* assay of the homogenized tissue. Although pulmonary ALDH2 is active in rats with either genotypes, the ALDH2^{R/2R} rats possess a less activity compared to the ALDH2^{Q/2Q} genotype. We found that ALDH2^{Q/2Q} lungs generated 407 nmol of NADH/mg of proteins compared to 172 for ALDH2^{R/2R} lungs.

Intratracheal Instillation of radiolabeled ethanol in the Sprague-Dawley rat.

In order to determine the possible toxic effect of ethanol on the lungs and other tissues, intratracheal instillations of radiolabeled ethanol were done to rats and binding of radioactive metabolites was measured for the different fractions. Results demonstrate that radiolabeled materials were present in every fraction measured. More importantly, we determined that ethanol-derived material is bound to the proteins (Tables 2 and 3). Interestingly, there was no difference in the amount of radioactivity bound between the ALDH2^{Q/2Q} and ALDH2^{R/2R} genotypes for both male and female rats. The amount of radioactivity measured in the precipitated lung proteins from female rat liver was lower than the amount measured in the lungs, which was not observed in the males. In fact, female rats with the ALDH2^{Q/2Q} genotype, had 36.97% of the radioactive metabolites bound to their lung proteins while only 12.12% were bound to their liver proteins. We also found that a large percentage of metabolites were bound to proteins of both male and female plasma. Though we did not find a significant difference in the amounts of radioactive metabolites bound to proteins between the ALDH2^{Q/2Q} and ALDH2^{R/2R} genotypes, there exists a difference between male and female rats ($p < .$). Regardless of the genotype, male rats seem to have higher percentage of metabolites bound to liver proteins when compared to females (tables 2 and 3). For example, in male ALDH2^{Q/2Q} rats 33.01% of ethanol-derived metabolites in fraction is bound to liver proteins whereas in

female ALDH2^{Q/Q} female the level is only at 12,12%. A similar pattern is observed for blood and liver proteins

Discussion

The addition of ethanol to unleaded gasoline introduced a new involuntary route of exposure to ethanol and few studies have dealt with the toxicity of the latter following inhalation exposure. Our research showed that when administered by pulmonary route, ethanol could possibly lead to lung toxicity, i.e [¹⁴C]-EtOH derived radiolabeled metabolites, possibly acetaldehyde, bound to the pulmonary proteins of both male and female rats. Other studies using [¹⁴C]-EtOH demonstrated that the metabolite bound to nuclear proteins was in fact acetaldehyde (Diaz *et al*, 1999). It is well documented that the electrophile nature of acetaldehyde for carbonyl groups enables it to attack a wide variety of nucleophiles compounds (O'Donnel, 1982). Proteins are particularly vulnerable to acetaldehyde binding since the presence of ε-amino groups of internal lysines and the amino group of N-terminal amino acids make them a prime target for aceteladhyde binding (Tuma et Sorrell, 1987). These adducts can eventually interfere with protein functions, stimulate immune responses or induce carcinogenesis (Israel *et al.*, 1986; Mauch *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1989; Worrall *et al.*, 1991; Tuma and Klaassen, 1992 ; Viitala *et al.*, 1997 ; Tillonen *et al.*, 1999)

The kinetic studies showed that blood concentrations of ethanol measured in the present study (Table 1) are within the range of those obtained on Wistar rats by Pastino et al. (1997). These authors, however, reported that there were no sex-dependent differences in rats following inhalation exposure to ethanol. The present study indicates that blood ethanol concentrations are higher and more persistent in female than in male rats exposed to the same concentration following a 6 hours exposure (Table 1). This sex-related difference could be attributed to a difference in blood partition coefficient between male and female rats, by a difference in hormone secretory pattern (Mezey et al., 1992) or by a difference in ethanol metabolism (Harada et al. 1998). The results of the present study indicate that ethanol is metabolized or excreted more rapidly in male than in female rats. Furthermore, we found that ethanol was rapidly excreted from the blood of the exposed

rats (Table 1) ; acetaldehyde can not be detected possibly because once it is produced in the lungs it is quickly bound to the blood and/or pulmonary proteins. Sarkola (2002) also found that acetaldehyde levels could not be found in the peripheral venous blood during alcohol intoxication in premenopausal women.

We determined the genetic profile of the ALDH2 enzyme in rats by using the PCR technique. Our genetic mapping has shown that polymorphism of the ALDH2 enzyme in the Sprague-Dawley rat is expressed into three distinct forms; $ALDH2^Q/2^Q$, $ALDH2^Q/2^R$ and $ALDH2^R/2^R$. We also have found that the $ALDH2^Q/ALDH2^R$ genotype is the most common, while the $ALDH2^R/2^R$ is the less frequent. In fact, 53% of our rats have the $ALDH2^Q/ALDH2^R$ genotype while only 17% have the $ALDH2^R/2^R$ genotype. This is in accordance with the value of 53.3% reported by Yamauchi *et al.*(1996), for the $ALDH2^Q/ALDH2^R$ genotype and 10% for the $ALDH2^R/2^R$ genotype. As mentioned earlier, a polymorphism has been detected on the $ALDH2^R$ allele, resulting in an impaired ALDH2 enzyme (Carr *et al.*,1991). This allele also exhibits an incomplete dominance over the $ALDH2^Q$ allele thus making the $ALDH2^R/2^R$ and to the lesser extent, the $ALDH2^Q/ALDH2^R$ genotypes deficient towards acetaldehyde metabolism (Enomoto, 1991). In total, 70% of the Sprague-Dawley rats tested have some sort of deficiency in acetaldehyde metabolism.

We have assessed the metabolic differences between the $ALDH2^Q/2^Q$ and $ALDH2^R/2^R$ genotypes. Previous studies by Yin *et al.* (1992) used the cytosolic fraction of the lung to perform their *in vitro* assays but since the ALDH2 enzyme is mainly located in the mitochondria, we decided to use this fraction for our experiments. Using the mitochondrial fraction from $ALDH2^Q/2^Q$ and $ALDH2^R/2^R$ rats, we showed that there is a marked difference in the *in vitro* metabolism of acetaldehyde by lung activity of these two genotypes, the latter being less efficient. This is in agreement with the concept that a punctual mutation on the $ALDH2^R$ allele gives rise to an almost inactive enzyme (Carr *et al.*,1991).

We made the hypothesis that individuals having the atypical ALDH2 enzyme would have a larger amount of protein bound to ethanol metabolites than the individuals possessing the typical ALDH2 enzyme. To assess the possible role of the ALDH2 polymorphism in the response of lungs to ethanol vapors. The results from the intra-tracheal instillations demonstrated that there was no significant difference in the amounts of radioactive ethanol/metabolites bound to the pulmonary proteins between the ALDH2^Q/2^Q and ALDH2^R/2^R rats. However, we found a significant amount of ethanol metabolites bound to the different fractions of all the exposed rats. This can be explained by the high reactivity of acetaldehyde and its ability to form both stable and unstable adducts to the pulmonary proteins (Donohue *et al.*, 1983 ; Tuma and Sorrell, 1987). Indeed, recent studies have shown that the *in vivo* ingestion of alcohol in humans and animals could lead to the formation of acetaldehyde-protein binding (Niemelä *et al* 1991, Niemelä *et al* 1995). Since our experiment was done over a fairly short term period, we can anticipate that the majority of adducts would be unstable. However, during a long term exposition, these instable adducts could eventually become stable and irreversible (Tuma *et al.*, 1991). We can also expect that the long exposure to ethanol stimulates lipid peroxidation. In fact, several studies have shown that the chronic ingestion of ethanol stimulated the peroxidation of lipids by the MEOS (Microsomal ethanol oxidizing system) and in turn generated the formation of other reactive aldehyde such as malondialdehyde (MDA) and MDA-acetaldehyde adducts (MAA) (Dianzani., 1985; Lieber, 1988; Cederbaum 1989; Kamimura *et al.*, 1992; Morimoto *et al*, 1993; Tuma *et al.*,1996). Interestingly, Takeshita *et al.* (2000) who investigated the relationship between alcohol drinking and the risk for hepatocellular carcinoma in individuals with the typical and atypical ALDH2 enzyme showed that there were no significant differences between the ALDH2 genotype and the incidence of hepatocellular carcinoma in Japanese patients.

We observed that there was significant binding of ethanol metabolites to fractions other the lungs. Studies have shown that marked amounts of acetaldehyde could be generated through extrahepatic metabolism of ethanol. More precisely acetaldehyde produced

within a specific organ would be likely to produce acetaldehyde-protein adducts in other organs (Jokelainen *et al.*, 1994 ; Jokelainen *et al.*, 1996; Jokelainen *et al.*, 2000). Thus, it is possible that part of the acetaldehyde produced in the lungs could have formed unstable adducts with the red blood cells in circulation (Worall *et al.*, 2002). These adducts formed within the red blood cells could in turn, travel down and eventually be transferred to the tissue cells of the liver where it could produce other acetaldehyde-protein adducts (Wickramasinghe *et al.*, 1994). Even though no gas chromatography (GC) was performed on the ethanol metabolites, studies done by Diaz *et al.* (1999) using [¹⁴C]-EtOH on nuclear proteins, showed that the formation of the adducts with these proteins was a result of binding with acetaldehyde.

The formation of adducts in the different fractions could produce toxic effects on human health. Indeed, the acetaldehyde-protein binding phenomenon can eventually result in an interference with protein function, stimulate immune responses or even activate carcinogenesis (Israel *et al.*, 1986; Mauch *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1989; Worrall *et al.*, 1991; Tuma and Klaassen, 1992 ; Viitala *et al.*, 1997; Tillonen *et al.*, 1999). More importantly, acetaldehyde could have an important negative effect on the respiratory system, which in the case of this study is highly important. It is at this level where the addition of ethanol to gasoline will likely have the greatest effect on human health. Multiple studies on rats have shown that inhaled acetaldehyde was highly toxic to the nasal tissues and could eventually lead to the formation of tumors as well as producing important histopathological and inflammatory changes in the bronchoalveolar region (Feron *et al.*, 1982; Woutersen, 1984). Recent research has also shown that the generation of acetaldehyde through the inhalation of ethanol impaired ciliary motility of the bronchial epithelial cells (Sisson and Tuma, 1994). This dysfunction is apparently associated with a direct inactivation of cilia ATPase by acetaldehyde as well as promoting adduct formation with cilia dynein and tubulin (Sisson *et al.*, 1991). This said, the acetaldehyde generated by the metabolism of atmospheric ethanol could lead to serious multi-level respiratory toxicity. Takao *et al.* (1998) observed that ALDH2 deficient subjects were more vulnerable to asthmatic attacks when exposed to ethanol. Studies have concluded that acetaldehyde was responsible for these asthmatic attacks by

releasing a sudden dose of histamine causing an indirect bronchoconstriction (Myou *et al.*, 1995). Furthermore, a case study performed on an ALDH2 deficient subject found that when food was ingested with small amounts of ethanol, a severe bronchial asthma attack occurred in this individual (Saito *et al.*, 2001). Even though our study concluded that the ALDH2 genotype did not influence the number of pulmonary acetaldehyde-protein adducts, further studies should be performed in order to verify the role of the ALDH2 polymorphism on the incidence of asthmatic attacks of exposed populations.

We found that there was less binding of ethanol/metabolites in female compared to male rats. By having a slower metabolism, we can speculate that the rate in which acetaldehyde will be generated in the female rats will be slower and that the formation of acetaldehyde-protein adducts reduced. Recent research has raised the notion that sexual hormones could play an important factor in acetaldehyde-protein adduct formation (Niemela *et al.*, 1999). The sex-related differences observed in this study could therefore be attributed to differences in lung alcohol dehydrogenase activity which would be higher in male than in female rats. These sex-related differences are also found in humans. Women have lower gastric alcohol dehydrogenase activity and thus metabolize ethanol less rapidly (Baraona *et al.*, 2001). Whether this sex-related difference is also present in human lung alcohol dehydrogenase is still unclear. However, studies performed on rat alcohol dehydrogenase confirmed that the pulmonary K_m values were considerably higher than those found in the liver and that the optimum pH for lung activity was much higher than physiologically values (Carlson *et al.*, 1995), suggesting a minimal role of pulmonary alcohol dehydrogenase in the metabolism of ethanol. Other pathways such as the involvement of cytochromes P450s and/or pulmonary bacteria could play a factor in the metabolism of pulmonary metabolism of ethanol.

In summary, we have seen that through ethanol metabolism, acetaldehyde can potentially lead to lung and liver toxicity through the formation of protein adducts. This study also demonstrated that ALDH2 polymorphism had no apparent effect on acetaldehyde-protein formation but interestingly a sex-dependant relationship appears to exist. Even though the addition of ethanol to gasoline will reduce things such as greenhouse gases and our dependance on foreign oil, its effects on human health are still to be discovered. Future work should look at the complete characterization of human exposures and pulmonary metabolism of inhaled ethanol and the consequences of chemical binding to the lung proteins.

References

- Ahmed F (2001) Toxicology and human health effects following exposure to oxygenated or reformulated gasoline. *Toxicol Lett* 2001 **123**, 89-113
- Baraona, E Abittan CS, Dohmen K, Moretti M, Pozzato G, Chayes ZW, Schaefer C, Lieber CS (2001). Gender differences in pharmacokinetics of alcohol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **25**, 502-507.
- Carlson GP, Olson RM (1995) Comparison of the metabolism of alcohols by rat hepatic and pulmonary alcohol dehydrogenase. *Biochem Mol Biol Int* **37** 65-71
- Carr LG, Mellencamp RJ, Crabb DW, Weiner H, Lumeng L, Li TK. (1991) Polymorphism of the rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase cDNA. *Alcohol Clin Exp Res* **15**, 753-756
- Cederbaum A (1989) Oxygen radical generation by microsomes: role of iron and implications for alcohol metabolism and toxicity. *Free Radic Biol Med* **7**, 559-567
- Energy Information Administration (EIA), *International Energy Annual 1999*, DOE/EIA-0219(99) (Washington, DC, February 2001).
- Diaz Gomez MI, Fanelli SL, Castro GD, Costantini MH, Castro JA. (1999) A liver nuclear ethanol metabolizing system. Formation of metabolites that bind covalently to macromolecules and lipids. *Toxicology* **138**, 19-28
- Dianzani M (1985) Lipid peroxidation in ethanol poisoning: a critical reconsideration. *Alcohol Alcohol* **20**, 161-173
- Dipple KM and Crabb DW (1993). The mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene resides in an HTF island but is expressed in a tissue-specific manner. *Biochem Biophys Res Commun* **193**, 420-427
- Donohue TM, D.J. Tuma & M.F. Sorrell (1983) Acetaldehyde adducts with proteins: binding of [¹⁴C]acetaldehyde to serum albumin. *Arch Biochem Biophys* **220**, 239-246
- Enomoto N, Takase S, Yasuhara M, Takada A. (1991) Acetaldehyde metabolism in different aldehyde dehydrogenase-2 genotypes. *Alcohol Clin Exp Res* **15**, 141-144
- Feron, V. J., Kruyse, A., and Woutersen, R. A (1982) Respiratory tract tumours in hamsters exposed to acetaldehyde vapour alone or simultaneously to benzo(a)pyrene or diethylnitrosamine. *Eur J Cancer Clin Oncol* **18:1** 13-31
- Harada S, Tachiyashiki K, Imaizumi K. (1998). Effect of sex hormones on rat liver cytosolic alcohol dehydrogenase activity. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **44**, 625-639.

- He S and Lambert B (1990) Acetaldehyde-induced mutation at the hprt locus in human lymphocytes in vitro. *Environ Mol Mutagen* **16**, 57-63
- Hobbs, W.R., Rall, T.W., and Verdoorn, T.A. (1996). Hypnotics and sedative: Ethanol. In *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (J.G. Hardman, L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon, and A.G. Gilman, Eds), p. 390. McGraw-Hill New York.
- Israel Y, Hurwitz E, Niemela O, Arnon R. (1986) Monoclonal and polyclonal antibodies against acetaldehyde-containing epitopes in acetaldehyde-protein adducts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **83**, 7923-7927
- Johanson G (1991). Modelling of respiratory exchange of polar solvents. *Ann Occup Hyg.* **35**, 323-339
- Jokelainen K, Roine RP, Vaananen H, Farkkila M, Salaspuro M (1994) In vitro acetaldehyde formation by human colonic bacteria. *Gut*, **35**, 1271-1274
- K Jokelainen, T Matysiak-Budnik, H Makisalo, K Hockerstedt and M Salaspuro (1996) High intracolonic acetaldehyde values produced by a bacteriocolonial pathway for ethanol oxidation in piglets. *Gut* **39** 100-104
- Jokelainen K, Parkkila S, Salaspuro M, Niemela O. (2000) Covalent adducts of proteins with acetaldehyde in the liver as a result of acetaldehyde administration in drinking water. *J Hepatol* **33** 926-932
- Kamimura S, Gaal K, Britton RS, Bacon BR, Triadafilopoulos G, Tsukamoto H (1992) Increased 4-hydroxynonenal levels in experimental alcoholic liver disease: association of lipid peroxidation with liver fibrogenesis. *Hepatology* **16**,448-453
- Kishimoto R, Fujiwara I, Kitayama S, Goda K, Nakata Y. (1995) Changes in hepatic enzyme activities related to ethanol metabolism in mice following chronic ethanol administration. *J Nutr Sci Vitaminol* **41** 527-543
- Kruhøffer PW (1983). Handling of inspired vaporized ethanol in the airways and lungs (with comments on forensic aspects). *Forensic Sci Int.* **21**, 1-17
- Lam CW, Casanova M, Heck HD. (1986) Decreased extractability of DNA from proteins in the rat nasal mucosa after acetaldehyde exposure. *Fundam Appl Toxicol.* **6**, 541-550
- Lieber C, (1988) The microsomal ethanol oxidizing system: its role in ethanol and xenobiotic metabolism. *Biochem Soc Trans* **16**,232-239
- Lindahl R (1992) Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **27**, 283-335

- Mauch TJ, Donohue TM Jr, Zetterman RK, Sorrell MF, Tuma DJ. (1986) Covalent binding of acetaldehyde selectively inhibits the catalytic activity of lysine-dependent enzymes. *Hepatology*. **6**, 263-269
- Mezey E, Sharma S, Rennie L, Potter JJ. (1992) Sex differences in gastric alcohol dehydrogenase activity in Sprague-Dawley rats. *Gastroenterology*. **103**, 1804-1810.
- Miyakawa,H., Baraona,E., Chang,J.C., Lesser,M.D. and Lieber,C.S. (1986) Oxidation of ethanol to acetaldehyde by bronchopulmonary washings: role of bacteria. *Alcohol Clin Exp Res* **10:5** 517-20
- Morimoto M, Hagbjork AL, Nanji AA, Ingelman-Sundberg M, Lindros KO, Fu PC, Albano E, French SW. (1993) Role of cytochrome P4502E1 in alcoholic liver disease pathogenesis. *Alcohol* **10**, 459-464
- Morris JB, Clay RJ, Cavanagh DG. (1986). Species differences in upper respiratory tract deposition of acetone and ethanol vapors. *Fundam Appl Toxicol*. **7**, 671-680
- Myou S, Fujimura M, Saito M, Matsuda T (1995) Intravenous injection of acetaldehyde but not ethanol induces histamine-mediated bronchoconstriction in guinea pigs. *Respiration* **62**, 143-147
- Niemelä O, Juvonen T, Parkkila S. (1991) Immunohistochemical demonstration of acetaldehyde-modified epitopes in human liver after alcohol consumption. *J Clin Invest* **87** 1367-1374
- Niemelä O, Parkkila S, Ylä-Herttuala S, Villanueva J, Ruebner B, Halsted CH. (1995) Sequential acetaldehyde production, lipid peroxidation, and fibrogenesis in micropig model of alcohol-induced liver disease. *Hepatology* **22**,1208-1214
- Niemelä O, Parkkila S, Pasanen M, Viitala K, Villanueva JA, Halsted CH (1999) Induction of cytochrome P450 enzymes and generation of protein-aldehyde adducts are associated with sex-dependent sensitivity to alcohol-induced liver disease in micropigs. *J Lab Clin Med* **133** 451-460
- Novelli EL, Rodrigues NL, Ribas BO, Novelli Filho JL. (1996) Toxicity of chronic ethanol ingestion and superoxide radical formation on seminal vesicle of rats. *Food Chem Toxicol* **34:10** 1003-7
- O'Donnell JP (1982). The reaction of amines with carbonyls: its significance in the nonenzymatic metabolism of xenobiotics. *Drug Metab Rev* **13** 123-159
- Pastino GM, Asgharian B, Roberts K, Medinsky MA, Bond JA. (1997). A comparison of physiologically based pharmacokinetic model predictions and experimental data for inhaled ethanol in male and female B6C3F1 mice, F344 rats and humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **145**, 147-157.

- Rovinski (1987) Hepatotoxicity of maternal ethanol consumption in rat offspring: an assessment with a study of the ontogenetic development of ethanol-oxidizing systems. *Alcohol Drug Res* 7:3 195-205
- Saito Y, Sasaki F, Tanaka I, Sato M, Okazawa M, Sakakibara H, Suetsugu S. (2001) Acute severe alcohol-induced bronchial asthma. *Intern Med.* 40:643-645
- Sarkola, T., Iles, MR., Kohlenberg-Mueller, K., & Eriksson, CJ. (2002). Ethanol acetaldehyde, acetate and lactate levels after alcohol intake in white men and women: effect of 4-methylpyrazole. *Alcohol Clin Exp Res* 26, 239-245
- Sisson JH, Tuma DJ, Rennard SI. (1991) Acetaldehyde-mediated cilia dysfunction in bovine bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 260:2 Pt 1 L29-36
- Sisson J and Tuma D (1994) Vapor phase exposure to acetaldehyde generated from ethanol inhibits bovine bronchial epithelial cell ciliary motility. *Alcohol Clin Exp Res.* 18, 1252-1255
- Smith SL, Jennett RB, Sorrell MF, Tuma DJ. (1989) Acetaldehyde substoichiometrically inhibits bovine neurotubulin polymerization. *J Clin Invest* 84, 337-41
- Takao A, Shimoda T, Kohno S, Asai S, Harda S. (1998) Correlation between alcohol-induced asthma and acetaldehyde dehydrogenase-2 genotype. *J Allergy Clin Immunol* 101:5 576-80
- Takeshita T, Morimoto K, Mao X, Hashimoto T, Furuyama J. (1994) Characterization of the three genotypes of low Km aldehyde dehydrogenase in a Japanese population. *Hum Genet* 94, 217-223
- Takeshita T, Yang X, Inoue Y, Sato S, Morimoto K (2000) Relationship between alcohol drinking, ADH2 and ALDH2 genotypes, and risk for hepatocellular carcinoma in Japanese. *Cancer Lett* 149:1-2 69-76
- Tillonen J, Homann N, Rautio M, Jousimies-Somer H, Salaspuro M. (1999) Role of yeasts in the salivary acetaldehyde production from ethanol among risk groups for ethanol-associated oral cavity cancer. *Alcoholism: Clin Exp Res* 23 1409-1415.
- Tuma D and Sorrell M, (1987) Functional consequences of acetaldehyde binding to proteins. *Alcohol Alcohol Suppl* 1, 61-66
- Tuma DJ, Hoffman T, Sorrell MF. (1991) The chemistry of acetaldehyde-protein adducts. *Alcohol Alcohol Suppl* 1: 271-6
- Tuma D and Klassen L, (1992) Immune responses to acetaldehyde-protein adducts: role in alcoholic liver disease *Gastroenterology* 103, 1969-1973

- Tuma DJ, Thiele GM, Xu D, Klassen LW, Sorrell MF (1996) Acetaldehyde and malondialdehyde react together to generate distinct protein adducts in the liver during long-term ethanol administration. *Hepatology* **23**, 872-880
- Uppal R, Rosman A, Hernandez R, Baraona E, Lieber CS. (1991) Effects of liver disease on red blood cell acetaldehyde in alcoholics and non-alcoholics *Alcohol Alcohol Suppl 1*: 323-6
- Viitala K., Israel Y., Blake and Niemela (1997) Serum IgA, IgG and IgM antibodies directed against acetaldehyde-derived epitopes: relationship to liver disease severity and alcohol consumption. *Hepatology*, **25**, 1418-1424
- Wang Y, Ichiba M, Iyadomi M, Zhang J, Tomokuni K. (1998) Effects of genetic polymorphism of metabolic enzymes, nutrition, and lifestyle factors on DNA adduct formation in lymphocytes. *Ind Health*. **36**, 337-346
- Wickramasinghe SN, Thomas S and Hasan R (1994) Reaction of ¹⁴C-acetaldehyde with whole blood in vitro: further evidence for the formation of unstable complexes with plasma proteins and red cells. *Alcohol Alcohol* **29** 51-57
- Worrall S, De Jersey J, Shanley BC, Wilce PA. (1991) Acetaldehyde-modified proteins and associated antibodies in ethanol-fed rats *Alcohol Alcohol Suppl 1*: 255-260
- Worrall S, de Jersey J, Wilce PA. (2002) Comparison of the formation of proteins modified by direct and indirect ethanol metabolites in the liver and blood of rats fed the Lieber-DeCarli liquid diet. *Alcohol Alcohol* **35**, 164-70
- Woutersen RA, Appelman LM, Feron VJ, Van der Heijden CA (1984) Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. II. Carcinogenicity study: interim results after 15 months. *Toxicology* **31:2** 123-33
- Yamauchi M., Maezawa, Y., Satoh, S., Mizuhara, Y., Toda, G. (1996) Genetic Polymorphism of the rat aldehyde dehydrogenase 2 and the severity of experimental alcohol-induced liver damage. *International Hepatology Communications* **5**, 143-149
- Yin S-J, Liao C-S, Cheng C-M, Fan F-T, Lee S-C. (1992) Genetic polymorphism and activities of human lung alcohol and aldehyde dehydrogenases: implications for ethanol metabolism and cytotoxicity. *Biochem Genet* **30**, 203-215
- Yokoyama A, Muramatsu T, Ohmori T, Yokoyama T, Okuyama K, Takahashi H, Hasegawa Y, Higuchi S, Maruyama K, Shirakura K, Ishii H. (1998) Alcohol-related cancers and aldehyde dehydrogenase-2 in Japanese alcoholics. *Carcinogenesis* **19**, 1383-1387
- Yoshida A, Ikawa M, Hsu LC, Tani K. (1984) Molecular abnormality and cDNA cloning of human aldehyde dehydrogenases. *Proc Natl Acad Sci U S A* . **81**, 258-261

Table 1 Blood ethanol concentrations in male and female Sprague-Dawley rats following a 6 h inhalation exposure to 500, 1000 or 2000 ppm ethanol and blood ethanol concentrations in male and female rats on the 14th day of exposure following a 14 day exposure to 1000 ppm ethanol, 6 h per day. (Mean \pm SEM, n=5)

Time	Blood ethanol concentration																
	(μ M)																
	EtOH 500 ppm (6h/d for 1 d)			EtOH 1000 ppm (6h/d for 1 d)			EtOH 1000 ppm (6h/d for 14 d)			EtOH 2000 ppm (6h/d for 1 d)							
min	males		females		males		females		males		females		males		females		
2	27.4	\pm 2.7	37.6	\pm 3.4	69.9	\pm 2.6	60.3	\pm 2.0	43.8	\pm 3.8 ^a	65.8	\pm	4.0	145.6	\pm 13.9	170.6	\pm 11.7
20	12.8	\pm 1.9	24.7	\pm 1.8*	39.5	\pm 3.4	45.5	\pm 4.2	35.4	\pm 4.4	45.3	\pm	5.1	69.0	\pm 2.9	116.0	\pm 8.1*
40	2.5	\pm 1.4	7.2	\pm 1.2*	4.7	\pm 2.8	17.2	\pm 1.9*		n.d.	16.8	\pm	5.4	11.1	\pm 3.1	53.9	\pm 6.3*
60		n.d.	2.2	\pm 0.8*		n.d.	8.7	\pm 1.3*		n.d.	7.0	\pm	4.3		n.d.	26.2	\pm 2.1*

n.d. : not detected

* : significant different from males, $p < 0.05$.

^a: significantly different from single exposure

Table 2 Ethanol metabolite binding¹ in lungs, blood and liver of ALDH2^Q/2^Q and ALDH2^R/2^R female Sprague-Dawley rat

	Lung		Blood		Liver	
Genotype	Q/Q	R/R	Q/Q	R/R	Q/Q	R/R
<i>Nucleus, Membranes or Plasma</i>	37 ± 2	34 ± 2	44 ± 3	40 ± 4	37 ± 3	42 ± 3
<i>Precipitated Proteins</i>	37 ± 5	38 ± 3	29 ± 6	30 ± 4	12 ± 3	14 ± 3

¹ Results are in percent calculated as the portion of radiolabeled metabolites found in the fraction over to the total radiolabeled metabolites found in the entire organ

Table 3 Ethanol metabolite binding¹ in lungs, blood and liver of ALDH2^Q/2^Q and ALDH2^R/2^R male Sprague-Dawley rat

	Lung		Blood		Liver	
Genotype	Q/Q	R/R	Q/Q	R/R	Q/Q	R/R
<i>Nucleus, Membranes or Plasma</i>	35 ± 5	35 ± 2	35 ± 6	42 ± 3	37 ± 7	41 ± 2
<i>Precipitated Proteins</i>	44 ± 3	46 ± 3	36 ± 2	43 ± 2	33 ± 3	35 ± 3

¹ Results are in percent calculated as the portion of radiolabeled metabolites found in the fraction over to the total radiolabeled metabolites found in the entire organ

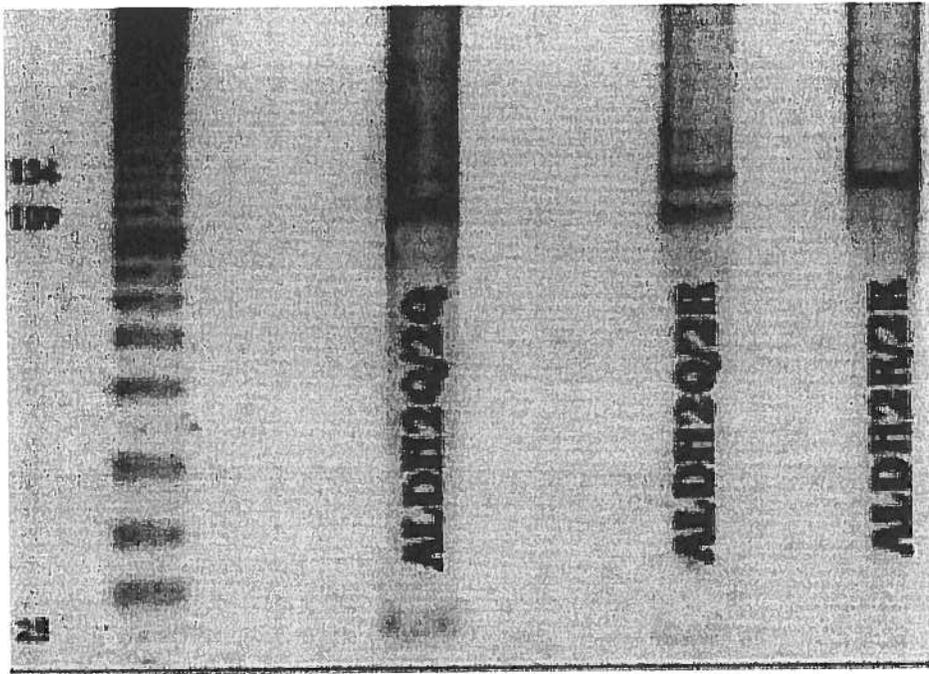


Figure 1 Electrophoresis profile of PCR products submitted to *DdeI* digestion. Rats with the $ALDH2^R/2^R$ genotype show a single band at 134 bp whereas the $ALDH2^Q/2^Q$ genotype shows two distinct bands at 109 and 25 bp. *DdeI* digestion of the $ALDH2^Q/2^R$ genotype produces three fragments at 134, 109 and 25 bp. The left column represents the DNA ladder (10bp)

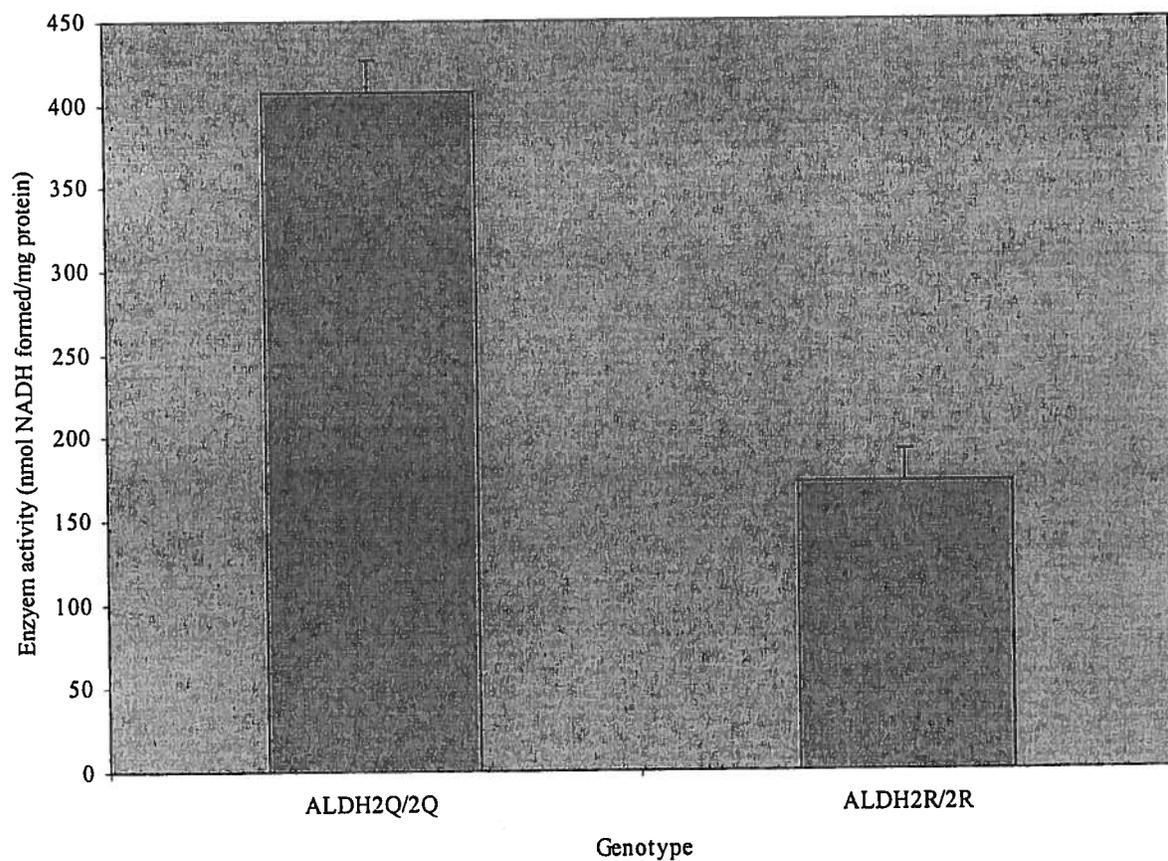


Figure 2 Effects of ALDH2 genotype on the *in vitro* pulmonary metabolism of acetaldehyde. Results are in nmol of NADH generated per mg of proteins.

CHAPITRE 3 – DISCUSSION GÉNÉRALE

Le travail présenté dans ce mémoire a été effectué à la lumière de notre hypothèse proposant que le contact direct avec les poumons des vapeurs d'éthanol contenues dans l'essence à moteur cause un risque potentiel à la santé humaine. Un polymorphisme au niveau de l'enzyme mitochondriale catalysant l'acétaldéhyde en acétate, désignée comme l'acétaldéhyde déshydrogénase de type 2 (ALDH2), est présent tant chez l'humain que chez le rat Sprague-Dawley ; deux profils d'activité, une enzyme rapide et une enzyme très lente ou inefficace, résultent de ce polymorphisme. Nous avons donc aussi étudié l'hypothèse que les sujets ayant une déficience catalytique au niveau de l'ALDH2 soient plus vulnérables à une toxicité pulmonaire causée par une accumulation locale plus importante d'acétaldéhyde.

Dans un premier temps, nos recherches ont permis de constater que l'éthanol pourrait avoir un potentiel toxique au niveau des poumons par l'intermédiaire de la liaison acétaldéhyde-protéines, lorsque administré par instillation intra-trachéale. En utilisant une approche par marquage isotopique, la mesure de la radioactivité des différentes fractions isolées d'un homogénat de poumons a démontré qu'un métabolite, probablement l'acétaldéhyde, se liait avec les protéines pulmonaires chez les rats mâles ainsi que femelles. D'autres études utilisant du [¹⁴C]-EtOH et des protéines nucléaires ont établi que le métabolite lié à ces protéines étaient bel et bien l'acétaldéhyde (Diaz *et al.*, 1999). Nos résultats nous incitent à conclure que l'éthanol administré par instillation intra-trachéale serait toxique et ce, principalement par l'intermédiaire de son métabolite l'acétaldéhyde. On sait qu'en raison de la nature électrophile sa fonction carbonyle, l'acétaldéhyde peut s'attaquer à une variété de composés nucléophiles (O'Donnel, 1982). Les groupes ε-aminolysine libres des protéines sont des cibles importantes dans la formation d'adduits et plusieurs de ces protéines possèdent une forte affinité pour des groupes de type aldéhyde, ce qui mène ainsi à la formation d'adduits (Tuma et Sorrell, 1987). Ces adduits acétaldéhyde-protéines peuvent avoir des conséquences néfastes sur l'organisme, comme interférer avec la fonction de la protéine liée (Mauch *et al.*, 1986; Smith *et al.*, 1989), inhiber les enzymes lysine-dépendante (Mauch *et al.*, 1986), ainsi que de stimuler des réponses immunologiques (Israel *et al.*, 1986 ; Worrall *et al.* 1991 ; Tuma

et Klassen, 1992 ; Viitala *et al.*, 1997) ou possiblement activer la carcinogénèse (Tillonen *et al.*, 1999).

En plus de s'attaquer aux protéines pulmonaires, on a observé que l'acétaldéhyde a également le potentiel de se lier à d'autres protéines tissulaires, c'est-à-dire aux protéines hépatiques et sanguine. Des études ont effectivement démontré que l'acétaldéhyde formé au niveau d'une organe spécifique pouvait engendrer des adduits acétaldéhyde-protéines dans un autre organe (Jokelainen *et al.*, 1994 ; Jokelainen *et al.*, 1996; Jokelainen *et al.*, 2000). Or, on peut effectivement penser qu'une partie de l'acétaldéhyde produit au niveau des poumons forme des adduits instables avec les globules rouges en circulation (Worrall *et al.*, 2000). À leur tour, ces adduits au niveau des globules rouges pourraient se déplacer jusqu'au foie et être transférés aux cellules du tissu hépatique où ils pourraient produire d'autres adduits acétaldéhyde-protéines (Wickramasinghe *et al.*, 1994). Ce schéma nous laisse croire que l'acétaldéhyde généré par le métabolisme pulmonaire de l'éthanol pourrait être toxique pour une variété de tissus et de cellules cibles.

La deuxième hypothèse de cette recherche était de savoir si les sujets ayant une déficience catalytique au niveau de l'enzyme ALDH2, pourraient être plus vulnérables à une toxicité pulmonaire causée par une accumulation locale plus importante d'acétaldéhyde. On sait que chez le rat, tout comme chez l'humain, une mutation ponctuelle du gène codant pour l'ALDH2 est responsable du polymorphisme qui existe au niveau de l'enzyme et qui résulte en des enzymes déficientes pour métaboliser l'acétaldéhyde. Ce projet a montré que le polymorphisme au niveau de l'ALDH2 n'avait aucune influence sur la quantité d'adduits acétaldéhyde-protéines formés et ce, pour toutes les fraction analysées. Cette conclusion vient en quelque sorte confirmer les recherches de Takeshita *et al.* (2000). En effet, ces auteurs ont examiné la relation entre la consommation d'alcool et le risque de carcinome hépatocellulaire chez des individus ayant l'enzyme typique et atypique de l'ALDH2. Cette étude a indiqué qu'il n'y avait aucune différence significative entre le génotype de l'ALDH2 et l'incidence de carcinome hépatocellulaire chez des patients Japonais.

Les travaux sur le polymorphisme de l'ALDH2 chez le rat Sprague-Dawley ont nécessité la mise au point d'une nouvelle méthode au laboratoire. Celle-ci repose sur la technique de PCR développée par Yamauchi *et al.* (1996). Cette méthode consiste à amplifier le site polymorphique du codon 67 en utilisant deux oligonucléotides spécifiques, appelés LC5 et LC6. Une fois la séquence amplifiée, le produit de PCR est purifié pour être ensuite digéré (^ indique le site de coupure) par l'enzyme de restriction DdeI (5'... C ^ T N A G... 3). Ainsi, l'allèle ALDH2^Q (codons BCT CAG) est clivé et conduit à deux fragments possédant des longueurs de 109 et de 25 pb (paire de bases). Par contre, l'allèle ALDH2^R (codons GCT CGG) n'est pas clivé par l'enzyme de restriction et le fragment amplifié conserve son poids moléculaire de 134 pb. Finalement, le génotype ALDH2^Q/2^R présente les trois fragments de 134, 109 et 25 pb ayant à la fois un brin clivé et un second résistant à la digestion. Le profil génétique est ensuite caractérisé sur gel de polyacrylamide 12,5%. Nous avons ensuite procédé au génotypage de l'ALDH2 chez le rat Sprague-Dawley. Nos résultats ont démontré qu'il existe un polymorphisme de l'enzyme ALDH2 et qu'il est présent sous trois formes distinctes; soit sous la forme ALDH2^Q/2^Q, ALDH2^Q/2^R et ALDH2^R/2^R. Une analyse du génotype chez le rat Sprague-Dawley a confirmé que la forme ALDH2^R/2^R est la moins fréquente. Au total, environ 70% de tous les rats Sprague-Dawley sont déficients en ALDH2 puisque l'allèle ALDH2^R possède une dominance incomplète sur l'allèle ALDH2^Q (Enomoto *et al.*, 1991).

Par la suite, nous avons étudié la différence métabolique au niveau pulmonaire en fonction des deux génotypes. Les résultats d'analyse du métabolisme *in vitro* de l'acétaldéhyde chez les poumons de rats ALDH2^Q/2^Q et ALDH2^R/2^R confirment que la mutation présente sur l'allèle ALDH2^R résulte en une enzyme déficiente puisque nous avons démontré que dans le poumon, l'isoenzyme ALDH2^Q/2^Q était plus active que l'isoenzyme ALDH2^R/2^R dans le métabolisme de l'acétaldéhyde. Or, suite aux différences métaboliques observés entre les deux génotypes, il a été possible d'évaluer le rôle du polymorphisme de l'ALDH2 dans la réponse des poumons suite à l'inhalation d'éthanol..

Bien que nous n'ayons pas observé de différence au niveau de la quantité d'adduits métabolites d'éthanol-protéines formés entre les rats $ALDH2^Q/2^Q$ et $ALDH2^R/2^R$, on a découvert qu'il existait une différence marquée dans la formation d'adduits acétaldéhyde-protéines entre les rats mâles et femelles et ce, dans toutes les fractions analysées. De fait, les rats femelles sont moins susceptibles à la formation d'adduits protéiques que les mâles. Les femelles ayant un métabolisme plus lent, on peut penser que le taux par lequel l'acétaldéhyde est formé sera plus lent que chez les mâles et que par conséquent la formation d'adduits acétaldéhyde-protéines sera réduite. Des études récentes ont soulevé l'hypothèse que les hormones sexuelles pourraient avoir un rôle à jouer au niveau de la formation acétaldéhyde-protéines (Niemela *et al.*, 1999). En effet, leurs recherches ont démontré que la génération d'adduits acétaldéhyde-protéines était associée à une induction des cytochromes P-450 qui elle, était dépendante des stéroïdes sexuelles (Niemela *et al.*, 1999)

On pourrait également penser que le dimorphisme sexuel pourrait être attribué à l'alcool déshydrogénase selon l'hypothèse d'une activité plus importante chez les mâles que chez les femelles. Chez l'humain, les femelles possèdent effectivement une alcool déshydrogénase gastrique moins active et par conséquent elles métabolisent l'éthanol moins rapidement (Baraona *et al.*, 2001). Par contre, l'alcool déshydrogénase pulmonaire semble jouer un rôle réduit dans le métabolisme de l'éthanol, minimisant ainsi son rôle dans le métabolisme de l'éthanol inhalé (Carlson *et al.*, 1995). Cela suggère que d'autres processus tel la biotransformation par les cytochromes P450s et/ou des bactéries pulmonaires, pourraient jouer un rôle dans le métabolisme pulmonaire de l'éthanol. La problématique de la consommation d'essence au niveau mondial continue à être un sujet d'actualité qui suscite davantage l'intérêt de la population. Le Canada demeure un joueur important au niveau de la consommation d'essence où l'essence à moteur compte pour environ 61% de tous les carburants utilisés dans le domaine du transport. Nous savons que la croissance constante de la population humaine demandera une demande énergétique plus importante lors des prochaines décennies, une demande qui est de plus en plus inquiétante. Dès lors il est attendu que la demande mondiale de pétrole

augmentera annuellement de 2,2% passant de 74,9 millions de barils par jour en 1999 à 118,6 millions de barils par jour en 2020 (EIA, 2001). Plus près de chez nous, la consommation de pétrole en Amérique du Nord brut augmentera d'environ 10,3 millions de barils par jour entre 1999 et 2020 (EIA, 2001). Il s'agit d'un problème auquel les gouvernements doivent s'attaquer aujourd'hui et non demain. Dans un effort pour diminuer la croissance des demandes énergétiques, les gouvernements, ont intérêt à promouvoir le développement des produits de combustion alternatifs; en développant ces carburants, la dépendance envers les pays producteurs de pétrole et la pollution environnementale sont aussi réduites.

L'addition de l'éthanol à l'essence se présente comme une solution intéressante puisque sa production est commode et son potentiel écologique impressionnant. Par contre, son addition à l'essence à moteur et la hausse directe de consommation d'essence à moteur, comporte certains désavantages. En plus, de hausser ses propres niveaux atmosphériques, l'addition de l'éthanol augmentera les émissions primaires et secondaires d'acétaldéhyde. On sait également que les poumons ont le potentiel de métaboliser l'éthanol en acétaldéhyde produisant une concentration intra-pulmonaire d'acétaldéhyde qui pourrait être toxique. La population générale pourrait donc être affectée par les effets toxiques de l'acétaldéhyde, notamment via la formation d'adduits acétaldéhyde-protéines. Puisque nous avons observé la présence d'adduits chez tous les rats exposés et ce, indépendamment de leur sexe ou de leur génotype de l'ALDH2, l'ensemble de la population pourrait être à risque à la formation d'adduits acétaldéhyde-protéines. Une exposition à long terme à l'éthanol pourrait avoir des conséquences encore plus néfaste sur notre santé. En plus, de stimuler la peroxydation des lipides et l'apparition de nouveaux aldéhydes toxiques tels le malondialdéhyde et le MAA (MDA-acétaldéhyde adducts), une exposition à long terme transformerait vraisemblablement la majorité des adduits instables en adduits stables (Dianzani., 1985; Cederbaum 1989; Tuma *et al.*, 1991; Kamimura *et al.*, 1992; Tuma *et al.*, 1996). On sait qu'une fois formés, les adduits stables sont irréversibles, et c'est à ce stade, que les effets toxiques sont les plus probables.

Des effets toxiques peuvent avoir comme conséquence d'interférer avec la fonction de certaines protéines jusqu'à induire des dommages hépatiques importants (Mauch *et al.*, 1986 ; Smith *et al.*, 1989 ; Li, *et al.* 1997)

L'acétaldéhyde généré par le métabolisme de l'éthanol peut aussi avoir ses conséquences au stade cellulaire. Plusieurs études *in vitro* ont démontré que l'acétaldéhyde pouvait induire des mutations génétiques au niveau des cellules mammifères en induisant des mutations aux niveaux des gènes des lymphocytes humains et pouvait également induire des échanges de chromatides sœurs chez ces même lymphocytes (Obe et Ristow, 1979, Jansson, 1982 ; Boehlke *et al.*, 1983 ; He et Lambert, 1990). Bien que les études sur la carcinogenèse de l'acétaldéhyde soient rares, il semble que l'acétaldéhyde inhalé puisse causer deux types de tumeurs dans les voies nasales des rats exposés (Woutersen *et al.*, 1984). Les études sur l'humain ont rapporté que l'incidence de cancer chez des travailleurs exposés à l'acétaldéhyde était cinq fois plus élevée que celle de la population générale (Bittersohl, 1974). Par ailleurs, l'acétaldéhyde peut s'attaquer aux composantes nucléaires en interférant avec l'apoptose, la croissance cellulaire ainsi que la division et la différenciation cellulaire en plus d'inhiber la réparation de l'ADN réagissant avec l'enzyme de réparation l'O⁶-méthylguanine transférase (Garro *et al.*, 1986 ; Garro et Lieber, 1990, Dasso, 1995 ; He et Lambert, 1990 ; Martelli *et al.*, 1994).

De façon encore plus étroite avec les objectifs de notre recherche, l'acétaldéhyde joue un rôle significatif au niveau de la toxicité du système respiratoire. C'est effectivement à ce niveau que l'ajout de l'éthanol à l'essence à moteur aura son plus gros impact sur la santé des populations exposées. Dans un premier temps, on sait que l'acétaldéhyde inhalé est fortement toxique pour le tissu nasal et que ces lésions nasales peuvent très bien se transformer en tumeurs en plus de provoquer des changements histopathologiques importants ainsi qu'inflammatoire au niveau de la région branchioalvéolaire (Feron *et al.*, 1982 ; Woutersen *et al.*, 1984). On a également observé que l'acétaldéhyde généré par l'inhalation d'éthanol affectait les cellules épithéliales bronchiales en diminuant la motilité des cils de ceux-ci en inactivant directement l'ATPase des cils bronchiaux (Sisson *et al.*, 1991; Sisson et Tuma, 1994). Ceci dit, l'acétaldéhyde formé par le

métabolisme de l'éthanol atmosphérique pourrait avoir des conséquences néfastes sur le système respiratoire puisqu'il peut s'attaquer à celui-ci et ce, à plusieurs niveaux. Dans un autre ordre d'idées, on a également observé que les gens ayant une déficience en ALDH2 et qui était exposé à l'alcool, étaient plus à risque à une attaque asthmatique (Takao *et al.*, 1998). On a conclu que l'augmentation des niveaux pulmonaires d'acétaldéhyde était à l'origine de ces attaques puisqu'il cause une bronchoconstriction indirecte par la libération soudaine d'histamine (Myou *et al*, 1995). Bien que notre étude ait conclu que le génotype de l'ALDH2 avait aucune influence sur le nombre de liaisons acétaldéhyde-protéines suite à une instillation intra-trachéale d'éthanol, il reste à vérifier si le polymorphisme de l'ALDH2 aurait une influence directe sur l'incidence des attaques asthmatiques des populations exposées. Nos travaux ont également suggéré qu'il existait un dimorphisme sexuel puisque les rats mâles sont plus susceptibles à la formation d'adduits acétaldéhyde-protéines que les femelles. Cette observation doit être étudiée davantage afin d'établir le rôle précis des hormones sexuelles dans la formation des adduits acétaldéhyde-protéines. Or, il reste à voir si cette relation doit être extrapolée à l'humain.

Sur une note éditoriale, nous terminerons en se demandant de quelle façon les gouvernements vont aborder la question d'ajouter l'éthanol à l'essence à moteur. Cette nouvelle technologie est évidemment une avenue intéressante à plusieurs niveaux, puisque le milieu agricole sera fortement impliqué dans sa production, ce qui représentera un développement économique important pour ce milieu. Il est cependant nécessaire de s'assurer que la santé de la population exposée ne soit pas compromise. Des questions et des recherches futurs importantes se dressent face à la problématique :

1. Caractériser le métabolisme pulmonaire complet de l'éthanol inhalé et ce chez tous les génotypes.
2. Déterminer les conséquences de la formation d'adduits aux protéines pulmonaires chez le rat et établir les bases de l'extrapolation à l'humain.
3. Évaluer le rôle des hormones sexuelles dans la formation d'adduits acétaldéhyde-protéines.

4. Entreprendre des expositions à long terme à l'éthanol inhalé afin de déterminer ses propriétés toxiques cumulatives. Ces études toxicologiques devraient alors permettre de déterminer une dose de référence quotidienne pouvant potentiellement justifier l'addition d'une certaine quantité d'éthanol à l'essence à moteur.
5. Déterminer si les concentrations d'éthanol et d'acétaldéhyde atmosphériques prédites par les différentes recherches posent un problème pour la santé humaine particulièrement la santé des sous-population (enfants, personnes âgées, asthmatiques, etc.)
6. Vérifier si le gouvernement fédéral devrait établir des projets pilotes et implanter un programme de surveillance avant de déposer un projet de loi fédéral autorisant l'utilisation de l'éthanol dans l'essence à moteur

Bibliographie des sections Introduction et Discussion

- Agarwal et Goedde (1989) Human aldehyde dehydrogenases: their role in alcoholism. *Alcohol* 6 517-523
- Ahmed F (2001) Toxicology and human health effects following exposure to oxygenated or reformulated gasoline. *Toxicol Lett* 2001 123, 89-113
- Albertini *et al.*, (1993) Analysis of the six additional chemicals for in vitro assays of the European Economic Communities' EEC aneuploidy programme using *Saccharomyces cerevisiae* D61.M and the in vitro porcine brain tubulin assembly assay. *Environ Mol Mutagen* 21:2 180-192
- Baraona, E *et al* (2001). Gender differences in pharmacokinetics of alcohol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 25, 502-507.
- Behrens *et al.*, (1988) Formation of acetaldehyde adducts with ethanol-inducible P450IIIE1 in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 29 154:2 584-90
- Bernstein *et al.*, (1990) The pulmonary ethanol metabolizing system (PET). *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 39:1 49-67
- Bittersohl (1974) Epidemiologic investigations on cancer incidence in workers contacted by acetaldehyde and other aliphatic aldehydes] *Arch Geschwulstforsch* 43 172-176
- Braun *et al.*, (1995) Acetaldehyde-serum protein adducts inhibit interleukin-2 secretion in concanavalin A-stimulated murine splenocytes: a potential common pathway for ethanol-induced immunomodulation. *Alcohol Clin Exp Res* 19:2 345-349
- Brenner et Chojkier (1987) Acetaldehyde increases collagen gene transcription in cultured human fibroblasts. *J Biol Chem* 262 17690-5
- Bosron et Li (1986) Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenases, and their relationship to alcohol metabolism and alcoholism. *Hepatology* 6 502-510
- Carlson G *et al.* (1995) Comparison of the metabolism of alcohols by rat hepatic and pulmonary alcohol dehydrogenase. *Biochem Mol Biol Int* 37 65-71
- Carr L *et al.*, (1991) Polymorphism of the rat liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase cDNA. *Alcohol Clin Exp Res* 15, 753-756
- Casini *et al.*, (1994) Acetaldehyde regulates the gene expression of matrix-metalloproteinase-1 and -2 in human fat-storing cells. *Life Sci* 55 1311-1316

- Castro *et al.*, (1997) Hydroxyl and 1-hydroxyethyl free radical detection using spin traps followed by derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *Redox Rep* **3:5-6** 343-347
- Cederbaum A (1989) Oxygen radical generation by microsomes: role of iron and implications for alcohol metabolism and toxicity. *Free Radic Biol Med* **7**, 559-567
- Chao *et al.*, (2000) Chinese alcoholic patients with esophageal cancer are genetically different from alcoholics with acute pancreatitis and liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* **95:10** 2958-64
- Chen et Yoshida (1992) Enzymatic properties of the protein encoded by newly cloned human alcohol dehydrogenase ADH6 gene. *Biochem Biophys Res Commun* **181** 743-747
- Clot *et al.*, (1995) Detection of antibodies against proteins modified by hydroxyethyl free radicals in patients with alcoholic cirrhosis. *Gastroenterology* **108:1** 201-207
- Clot *et al.*, (1996) Cytochrome P4502E1 hydroxyethyl radical adducts as the major antigen in autoantibody formation among alcoholics. *Gastroenterology* **111** 206-216
- Crabb *et al.*, (1989) Genotypes for aldehyde dehydrogenase deficiency and alcohol sensitivity. The inactive ALDH2(2) allele is dominant. *J Clin Invest* **83** 314-316
- Crabb *et al.*, (1998) Studies on the enzymology of aldehyde dehydrogenase-2 in genetically modified HeLa cells. *Alcohol Clin Exp Res* **22:4** 780-781
- Dasso *et al.*, (1995) The role of the Ran GTPase pathway in cell cycle control and interphase nuclear functions. *Prog Cell Cycle Res* **1:** 163-72
- Energy Information Administration (EIA), *International Energy Annual 1999*, DOE/EIA-0219(99) (Washington, DC, February 2001)
- de Waziers *et al* (1990) Cytochrome P 450 isoenzymes, epoxide hydrolase and glutathione transferases in rat and human hepatic and extrahepatic tissues. *J Pharmacol Exp Ther* **253** 387-394
- Diaz Gomez M *et al.*, (1991) A liver nuclear ethanol metabolizing system. Formation of metabolites that bind covalently to macromolecules and lipids. *Toxicology* **138**, 19-28
- Dianzani *et al.*, (1985) Lipid peroxidation in ethanol poisoning: a critical reconsideration. *Alcohol Alcohol* **20**, 161-173

- Dipple KM and Crabb DW (1993). The mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene resides in an HTF island but is expressed in a tissue-specific manner. *Biochem Biophys Res Commun* **193**, 420-427
- Donohue *et al.*, (1983) Acetaldehyde adducts with proteins: binding of [¹⁴C]acetaldehyde to serum albumin. *Arch Biochem Biophys* **220**, 239-246
- Dulout et Furnus (1988) Acetaldehyde-induced aneuploidy in cultured Chinese hamster cells. *Mutagenesis* **3:3** 207-211
- Enomoto N *et al.*, (1991) Acetaldehyde metabolism in different aldehyde dehydrogenase-2 genotypes. *Alcohol Clin Exp Res* **15**, 141-144
- Energy Information Administration (EIA), (2001) *International Energy Annual 1999*, DOE/EIA-0219(99) (Washington, DC)
- Energy Information Administration (EIA), *Annual Energy Outlook 2002*, (2001) DOE/EIA-0383(2002) (Washington, DC)
- Environnement Canada, (2003), **La Voie verte^{MC}, site Web d'Environnement Canada.**
<http://www.ec.gc.ca>
- EPA (Environmental Protection Agency) (1993). Motor Vehicle-Related Air Toxics Study. Technical Support Branch Emission Planning and Strategies Division Office of Mobile Sources. April 1993
- Espina *et al.*, (1988) In vitro and in vivo inhibitory effect of ethanol and acetaldehyde on O6-methylguanine transferase. *Carcinogenesis* **9** 761-766
- Farres *et al.*, (1994) Effects of changing glutamate 487 to lysine in rat and human liver mitochondrial aldehyde dehydrogenase. A model to study human (Oriental type) class 2 aldehyde dehydrogenase. *J Biol Chem* **269** 13854-13860
- Feron *et al.*, (1982) Respiratory tract tumours in hamsters exposed to acetaldehyde vapour alone or simultaneously to benzo(a)pyrene or diethylnitrosamine. *Eur J Cancer Clin Oncol* **18:1** 13-31
- Fishman et Pietra (1974) Handling of bioactive materials by the lung. *N Engl J Med* **291** 884-889
- Gapstur *et al.*, (1992) The formation of stable acetaldehyde-hemoglobin adducts in a red blood cell model. *Alcohol* **9** 563-569
- Garro *et al.*, (1986) The effects of chronic ethanol consumption on carcinogen metabolism and on O6-methylguanine transferase-mediated repair of alkylated DNA. *Alcohol Clin Exp Res* **10:6 Suppl** 73S-77S

- Goasduff *et al.*, (1996) P450 2E1 expression in liver, kidney, and lung of rats treated with single or combined inducers. *Alcohol* 13 301-308
- Gross *et al.*, (1992) The identification and partial characterization of acetaldehyde adducts of hemoglobin occurring in vivo: a possible marker of alcohol consumption *Alcohol Clin Exp Res* 16 1093-103
- Harada, S. *et al.*, (1998). Effect of sex hormones on rat liver cytosolic alcohol dehydrogenase activity. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 44, 625-639
- Hatake *et al.*, (1991) Development of tolerance to inhibitory effect of ethanol on endothelium-dependent vascular relaxation in ethanol fed rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 15 112
- He S and Lambert B (1990) Acetaldehyde-induced mutation at the hprt locus in human lymphocytes in vitro. *Environ Mol Mutagen* 16, 57-63
- Hobbs, W.R., Rall, T.W., and Verdoorn, T.A. (1996). Hypnotics and sedative: Ethanol. In *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (J.G. Hardman, L.E. Limbird, P.B. Molinoff, R.W. Ruddon, and A.G. Gilman, Eds), p. 390. McGraw-Hill New York
- Horjales *et al.*, (1987) Comparison of computer modelling and X-ray results of the binding of a pyrazole derivative to liver alcohol dehydrogenase. *J Mol Biol.* 197 685-94
- Hsu *et al.*, (1985) Cloning of cDNAs for human aldehyde dehydrogenases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 3771-5
- IARC (1985) International Agency for Research on Cancer. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Allyl Compounds, Aldehydes, Epoxides, and Peroxides. Vol. 36. pp 369
- Inoue *et al.*, (1984). Accumulation of acetaldehyde in alcohol-sensitive Japanese: Relation to ethanol and acetaldehyde oxidizing capacity. *Alcohol. Clin. Exp. Res* 8 319-322
- Israel Y *et al.* (1986) Monoclonal and polyclonal antibodies against acetaldehyde-containing epitopes in acetaldehyde-protein adducts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 7923-7927
- Jansson, T. (1982) The frequency of sister chromatid exchanges in human lymphocytes treated with ethanol and acetaldehyde. *Hereditas.* 97: 301-303
- Johanson G (1991). Modelling of respiratory exchange of polar solvents. *Ann Occup Hyg.* 35, 323-339
- Jokelainen K *et al.*, (1994) In vitro acetaldehyde formation by human colonic bacteria. *Gut*, 35, 1271-1274

- Jokelainen K *et al.*, (1996) High intracolonic acetaldehyde values produced by a bacteriocolonial pathway for ethanol oxidation in piglets. *Gut* **39** 100-104
- Jokelainen K *et al.*, (2000) Covalent adducts of proteins with acetaldehyde in the liver as a result of acetaldehyde administration in drinking water. *J Hepatol* **33** 926-932
- Kaiser *et al.*, (1989) Characteristics of mammalian class III alcohol dehydrogenases, an enzyme less variable than the traditional liver enzyme of class I. *Biochemistry* **28** 8432-8438
- Kamimura S *et al.*, (1992) Increased 4-hydroxynonenal levels in experimental alcoholic liver disease: association of lipid peroxidation with liver fibrogenesis. *Hepatology* **16**,448-453
- Khanna et Israel (1980) Ethanol metabolism. *Int Rev Physiol.* **21** 275-315
- Kishimoto R *et al* (1995) Changes in hepatic enzyme activities related to ethanol metabolism in mice following chronic ethanol administration. *J Nutr Sci Vitaminol* **41** 527-543
- Klyosov (1996) Kinetics and specificity of human liver aldehyde dehydrogenases toward aliphatic, aromatic, and fused polycyclic aldehydes. *Biochemistry* **35** 4457-67
- Kruhøffer PW (1983). Handling of inspired vaporized ethanol in the airways and lungs (with comments on forensic aspects). *Forensic Sci Int.* **21**, 1-17
- Kunitoh *et al.*, (1993) Contribution of cytochrome P450s to MEOS (microsomal ethanol-oxidizing system): a specific and sensitive assay of MEOS activity by HPLC with fluorescence labeling. *Alcohol Alcohol Suppl* **1B**: 63-68
- Lam C *et al.*, (1986) Decreased extractability of DNA from proteins in the rat nasal mucosa after acetaldehyde exposure. *Fundam Appl Toxicol.* **6**, 541-550
- Lau *et al.*, (1991) Embryologic and cytogenetic effects of ethanol on preimplantation mouse embryos in vitro. *Reprod Toxicol* **5:5** 405-410
- Lee *et al.*, (1989) Lung alcohol and aldehyde dehydrogenase isoenzymes in Chinese. *Taiwan Yi Xue Hui Za Zhi* **88** 437-442
- Li *et al.*, (1997) Acetaldehyde-modified and 4-hydroxynonenal-modified proteins in the livers of rats with alcoholic liver disease. *Hepatology* **26** 650-657
- Lieber et DeCarli (1970) Effect of drug administration on the activity of the hepatic microsomal ethanol oxidizing system. *Life Sci II* **8 9:5** 267-276
- Lieber (1987). Microsomal alcohol oxidizing system. *Enzyme* **37** 4551

- Lieber C, (1988) The microsomal ethanol oxidizing system: its role in ethanol and xenobiotic metabolism. *Biochem Soc Trans* **16**,232-239
- Lin *et al.*, (1993) Measurement of hemoglobin-acetaldehyde adduct in alcoholic patients. *Alcohol Clin Exp Res* **17** 669-674
- Lin *et al.*, (1995) Serum low density lipoprotein of alcoholic patients is chemically modified in vivo and induces apolipoprotein E synthesis by macrophages. *J Clin Invest* **95** 1979-1986
- Lindahl R (1992) Aldehyde dehydrogenases and their role in carcinogenesis. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **27**, 283-335
- Lindahl (1994) Mammalian aldehyde dehydrogenases: regulation of gene expression. *Alcohol Alcohol Suppl* **2** 147-54
- Manautou *et al.*,(1992) Comparison of rat pulmonary and hepatic cytosolic alcohol dehydrogenase activities. *J Toxicol Environ Health* **35** 7-18
- Martelli *et al.*, (1994) Cytotoxicity and genotoxic effects of five n-alkenals in primary cultures of rat and human hepatocytes. *Mutat. Res.* **323** 121-126
- Matsumoto *et al.*, (1996) Mitochondrial ALDH polymorphism affects ethanol-derived acetate disposition in Wistar rats. *Alcohol Clin Exp Res* **20:9 Suppl** 284A-288A
- Mauch T *et al* (1986) Covalent binding of acetaldehyde selectively inhibits the catalytic activity of lysine-dependent enzymes. *Hepatology.* **6**, 263-269
- Mezey, E. *et al* (1992) Sex differences in gastric alcohol dehydrogenase activity in Sprague-Dawley rats. *Gastroenterology.* **103**, 1804-1810
- Mikami *et al.*,(1997) Ethanol induces transient arrest of cell division (G2 + M block) followed by G0/G1 block: dose effects of short- and longer-term ethanol exposure on cell cycle and cell functions. *Alcohol Alcohol* **32** 145-52
- Miyakawa *et al.*, (1986) Oxidation of ethanol to acetaldehyde by bronchopulmonary washings: role of bacteria. *Alcohol Clin Exp Res* **10:5** 517-20
- Mohammed *et al.*, (1949) The reaction of of proteins with acetaldehyde. *Arch Biochem* **24** 270
- Morimoto M *et al.*, (1993) Role of cytochrome P4502E1 in alcoholic liver disease pathogenesis. *Alcohol* **10**, 459-464
- Morris JB *et al.* (1986). Species differences in upper respiratory tract deposition of acetone and ethanol vapors. *Fundam Appl Toxicol.* **7**, 671-680

- Myou S *et al.*, (1995) Intravenous injection of acetaldehyde but not ethanol induces histamine-mediated bronchoconstriction in guinea pigs. *Respiration* **62**, 143-147
- Northeast States for Coordinated Air Use Management (NESCAUM) (1999). Use of methyl tertiary butyl ether (MTBE) as gasoline additive. section 5, p. 2
- Niemela *et al.*, (1990) Hemoglobin-acetaldehyde adducts in human volunteers following acute ethanol ingestion. *Alcohol Clin Exp Res* **14** 838-841
- Niemela O *et al.*, (1991) Immunohistochemical demonstration of acetaldehyde-modified epitopes in human liver after alcohol consumption. *J Clin Invest* **87** 1367-1374
- Niemela O *et al.*, (1995) Sequential acetaldehyde production, lipid peroxidation, and fibrogenesis in micropig model of alcohol-induced liver disease. *Hepatology* **22**,1208-1214
- Niemela *et al.*, (1999) Induction of cytochrome P450 enzymes and generation of protein-aldehyde adducts are associated with sex-dependent sensitivity to alcohol-induced liver disease in micropigs. *J Lab Clin Med* **133** 451-460
- Niemela *et al.*, (2000) Cytochromes P450 2A6, 2E1, and 3A and production of protein-aldehyde adducts in the liver of patients with alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *J Hepatol* **33** 893-901
- Novelli *et al.*, (1996) Toxicity of chronic ethanol ingestion and superoxide radical formation on seminal vesicle of rats. *Food Chem Toxicol* **34:10** 1003-7
- O'Donnell JP (1982). The reaction of amines with carbonyls: its significance in the nonenzymatic metabolism of xenobiotics. *Drug Metab Rev* **13** 123-159
- Obe et Ristow (1979) Mutagenic, cancerogenic and teratogenic effects of alcohol. *Mutat Res* **65:4** 229-259
- Olin *et al.*, (1996) The effects of some redox-active metals and reactive aldehydes on DNA-protein cross-links in vitro. *Toxicology* **110:1-3** 1-8
- Orme-Johnson et Ziegler (1965) Alcohol mixed function oxidase activity of mammalian liver microsomes. *Biochem Biophys Com.* **21** 78-82
- Oshino *et al.*, (1975) Optical Measurements of the Catalase-Hydrogen Peroxide Intermediate (Compound) in the Liver of Anaesthetized Rats and Its Implication to Hydrogen Peroxide Production, *Biochem J* **146** 67

- Pares *et al.*, (1992) Class IV alcohol dehydrogenase (the gastric enzyme). Structural analysis of human sigma sigma-ADH reveals class IV to be variable and confirms the presence of a fifth mammalian alcohol dehydrogenase class. *FEBS Lett* May 303 69-72
- Pastino, G. *et al* (1997). A comparison of physiologically based pharmacokinetic model predictions and experimental data for inhaled ethanol in male and female B6C3F1 mice, F344 rats and humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 145, 147-157
- Prasanna *et al.*, (1981) Effect of acetaldehyde on lung surfactant. *Indian J Exp Biol* 19:6 580-581
- Rhodes *et al.*, (1995) e* Therapeutic potentiation of the immune system by costimulatory Schiff-base-forming drugs. *Nature* 377:6544 71-75
- Rintala *et al.*, (2000) Evidence of acetaldehyde-protein adduct formation in rat brain after lifelong consumption of ethanol. *Alcohol Alcohol* 35:5 458-463
- Rovinski *et al.*, (1987) Hepatotoxicity of maternal ethanol consumption in rat offspring: an assessment with a study of the ontogenetic development of ethanol-oxidizing systems. *Alcohol Drug Res* 7:3 195-205
- Sisson *et al.*, (1991) Acetaldehyde-mediated cilia dysfunction in bovine bronchial epithelial cells. *Am J Physiol* 260:2 Pt 1 L29-36
- Sisson J and Tuma D (1994) Vapor phase exposure to acetaldehyde generated from ethanol inhibits bovine bronchial epithelial cell ciliary motility. *Alcohol Clin Exp Res.* 18, 1252-1255
- Smith (1986). Genetics of human alcohol and aldehyde dehydrogenases. *Adv Hum Genet* 15 249-90
- Smith S *et al.* (1989) Acetaldehyde substoichiometrically inhibits bovine neurotubulin polymerization. *J Clin Invest* 84, 337-41
- Stone *et al.*, (1993) Amino acid substitutions at position 47 of human beta 1 beta 1 and beta 2 beta 2 alcohol dehydrogenases affect hydride transfer and coenzyme dissociation rate constants. *J Biol Chem* 268 892-9
- Tardif *et al.*, (2002) Exhaled acetaldehyde by human subjects exposed to low levels of ethanol : a pilot study. *Tox. Letters* 135 (Suppl.1) S-138
- Takao *et al.*, (1998) Correlation between alcohol-induced asthma and acetaldehyde dehydrogenase-2 genotype. *J Allergy Clin Immunol* 101:5 576-80

- Takeshita T *et al.*, (1994) Characterization of the three genotypes of low Km aldehyde dehydrogenase in a Japanese population. *Hum Genet* **94**, 217-223
- Takeshita T *et al.*, (2000) Relationship between alcohol drinking, ADH2 and ALDH2 genotypes, and risk for hepatocellular carcinoma in Japanese. *Cancer Lett* **149**:1-2 69-76
- Thomasson *et al.*, (1994) Low frequency of the ADH2*2 allele among Atayal natives of Taiwan with alcohol use disorders. *Alcohol Clin Exp Res* **18** 640-643
- Tillonen *et al.*, (1999) Role of yeasts in the salivary acetaldehyde production from ethanol among risk groups for ethanol-associated oral cavity cancer. *Alcoholism: Clin Exp Res* **23** 1409-1415
- Tsukamoto *et al.*, (1995) Roles of oxidative stress in activation of Kupffer and Ito cells in liver fibrogenesis. *J Gastroenterol Hepatol.* **10 Suppl 1**: S50-53
- Tuma D and Sorrell M, (1987) Functional consequences of acetaldehyde binding to proteins. *Alcohol Alcohol Suppl 1*, 61-66
- Tuma D *et al.*, (1991) The chemistry of acetaldehyde-protein adducts. *Alcohol Alcohol Suppl 1*: 271-6
- Tuma D and Klassen L, (1992) Immune responses to acetaldehyde-protein adducts: role in alcoholic liver disease *Gastroenterology* **103**, 1969-1973
- Tuma D *et al.*, (1996) Acetaldehyde and malondialdehyde react together to generate distinct protein adducts in the liver during long-term ethanol administration. *Hepatology* **23**, 872-880
- Uppal *et al.*, (1991) Effects of liver disease on red blood cell acetaldehyde in alcoholics and non-alcoholics *Alcohol Alcohol Suppl 1*: 323-6
- Vallee et Bazzone (1983) Isozymes of human liver alcohol dehydrogenase. *Isozymes Curr Top Biol Med Res.* **8** 219-44
- Viitala K *et al.*, (1997) Serum IgA, IgG, and IgM antibodies directed against acetaldehyde-derived epitopes: relationship to liver disease severity and alcohol consumption. *Hepatology*, **25**, 1418-1424
- Wang *et al.*, (1997) Fuel-Cycle Fossil Energy Use and Greenhouse Gas Emissions of Fuel Ethanol Produced from U.S. Midwest Corn, *Sponsor Report to the Illinois Department of Commerce and Community Affairs (Argonne, IL: Argonne National Laboratory, Center for Transportation Research)*.
- Wang Y *et al* (1998) Effects of genetic polymorphism of metabolic enzymes, nutrition, and lifestyle factors on DNA adduct formation in lymphocytes. *Ind Health.* **36**, 337-346

- Wehr *et al.*, (1993) Acetaldehyde adducts and autoantibodies against VLDL and LDL in alcoholics. *J Lipid Res* **34** 1237-1244
- Wickramasinghe S *et al.*, (1994) Reaction of ¹⁴C-acetaldehyde with whole blood in vitro: further evidence for the formation of unstable complexes with plasma proteins and red cells. *Alcohol Alcohol* **29** 51-57
- Worrall S *et al.*, (1991) Acetaldehyde-modified proteins and associated antibodies in ethanol-fed rats *Alcohol Alcohol Suppl* **1**: 255-260
- Worrall *et al.*, (1994) Anti-acetaldehyde adduct antibodies generated by ethanol-fed rats react with reduced and unreduced acetaldehyde-modified proteins. *Alcohol Alcohol* **29**:1 43-50
- Worrall *et al.*, (2000) Comparison of the formation of proteins modified by direct and indirect ethanol metabolites in the liver and blood of rats fed the Lieber-DeCarli liquid diet. *Alcohol Alcohol* **35** 164-170
- Woutersen *et al.*, (1984) Inhalation toxicity of acetaldehyde in rats. II. Carcinogenicity study: interim results after 15 months. *Toxicology* **31**:2 123-33
- Xiao *et al.*, (1996) The mutation in the mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) gene responsible for alcohol-induced flushing increases turnover of the enzyme tetramers in a dominant fashion. *J Clin Invest* **98** 2027-2032
- Yamashita *et al.*, (2001) Production of acetate in the liver and its utilization in peripheral tissues. *Biochim Biophys Acta* **1532** 79-87
- Yamaguchi *et al.*, (1996) Genetic Polymorphism of the rat aldehyde dehydrogenase 2 and the severity of experimental alcohol-induced liver damage. *International Hepatology Communications* **5**, 143-149
- Yasunami *et al.*, (1991) A human alcohol dehydrogenase gene (ADH6) encoding an additional class of isozyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **88** 7610-7604
- Yin S *et al.*, (1992) Genetic polymorphism and activities of human lung alcohol and aldehyde dehydrogenases: implications for ethanol metabolism and cytotoxicity. *Biochem Genet* **30**,203-215
- Yin (1994) Alcohol dehydrogenase: enzymology and metabolism. *Alcohol Alcohol Suppl* **2**: 113-119
- Yokoyama A *et al.*, (1998) Alcohol-related cancers and aldehyde dehydrogenase-2 in Japanese alcoholics. *Carcinogenesis* **19**, 1383-1387

Yoshida A *et al.*, (1984) Molecular abnormality and cDNA cloning of human aldehyde dehydrogenases. *Proc Natl Acad Sci U S A* . **81**, 258-261

Yoshida *et al.*, (1991) Genetics of human alcohol-metabolizing enzymes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **40** 255-87

Zerilli *et al.*, (1995) Cytochrome P-450 2E1 in rat liver, kidney and lung microsomes after chronic administration of ethanol either orally or by inhalation. *Alcohol Alcohol* **30** 357-365

Appendice I – Méthode pour la détermination du génotype de l'ALDH2

Un extrait de 500 µL de sang entier est utilisé pour isoler l'ADN en utilisant un kit commercial (Amersham). Par la suite, une amplification génique à l'aide de la méthode PCR décrite par Yamaguchi *et al* (1996) est effectuée avec quelques modifications.

Dans un premier temps, une réaction de PCR est effectuée en duplicata pour chaque échantillon. Voici, en ordre, les réactifs ajoutés pour la réaction.

0,8 µL de l'oligonucléotide LC5 (100pmol)

0,8 µL de l'oligonucléotide LC6 (100pmol)

31,9 µL d'H₂O distillé

5,5µL de tampon de réaction (10x)

2.2 µL de dNTP (2mM)

3.3 µL de MgCl₂ (25mM)

10 µL d'ADN génomique

0,5 µL de Taq Polymérase (2.5 unités)

Volume total de 55 µL

Les conditions pour la réaction à PCR sont les suivantes :

- 1 minute à 94 °C
- 30 cycles de la séquence suivante : 94°C 1minute, 55°C 1minute, et 72°C 1minute
- Un cycle de 10 minutes à 72°C

Une fois les cycles terminés, les produits de PCR sont purifiés à l'aide d'un kit commercial (Fisher). Dans un premier temps, le tampon de liaison permet à l'ADN de se lier avec celui-ci afin qu'il puisse être lavé avec d'autres tampons (contenant EtOH 100%). Ces lavements ont comme effet de purifier le produit de PCR afin d'obtenir un ADN propice à la digestion. Les produits purifiés sont par la suite soumis à une digestion par l'enzyme *DdeI* (New England Biolabs).

- 17,5 µL de produit PCR purifié
- 2,0 µL de tampon de réaction NEB3 (10x) *DdeI*
- 0,5 µL d'une solution d'enzyme *DdeI*

Le mélange est ensuite placé dans un bain à 37°C pour 18 heures. Les échantillons sont ensuite soumis à une électrophorèse sur un gel de 12.5% de polyacrylamide. Le polymorphisme de l'enzyme ALDH2 est présent sous trois formes distinctes. Les rats possédant le génotype ALDH2^R/2^R présente un fragment à 134 pb, le génotype ALDH2^Q/2^Q dévoile une bande à 109 pb. alors que le génotype ALDH2^Q/2^R montre trois fragments de 134, 109 et 25 pb.