

INRS
Institut Armand-Frappier

Caractérisation toxicologique et chimique des produits
de combustion d'un composé pur du tabac :
l'acide chlorogénique

Par
Martine Lacasse

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences
en Sciences Expérimentales de la Santé

Jury d'évaluation

Examineur interne et président du jury	Michel Charbonneau, INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Karen Waldron, Université de Montréal
Directeur de recherche	Michel Fournier, INRS-Institut Armand-Frappier
Codirecteur de recherche	André Morin, Impérial Tobacco Canada Ltée

Résumé

Le tabac est un sujet entouré de controverse en raison de certains effets adverses ayant été attribué à sa consommation. En effet, des études épidémiologiques ont mis en évidence une association entre certaines maladies ou cancers et le tabagisme. Toutefois, le mécanisme précis à l'origine de l'apparition de ces maladies n'a pas encore été établi. La plante de tabac est constituée de milliers de composés dont près de 5000 répertoriés dans sa fumée. L'étude de la fumée du tabac est un donc objet d'étude d'une complexité incroyable. Jusqu'à présent, la majorité des études ont porté sur la chimie du tabac. Dans ce contexte, notre approche consiste à combiner la toxicologie et la chimie pour réaliser une étude originale sur la fumée. Une étude antérieure ayant révélé que, parmi 12 principaux composés du tabac, l'acide chlorogénique (AC) est un des composés induisant une forte toxicité, ce composé sera notre objet d'étude. La phase particulière de la fumée de l'AC est donc caractérisée toxicologiquement et chimiquement. Pour ce faire, la fumée de l'AC a été captée sur des filtres Cambridge et, afin d'en extraire sélectivement les composés, cinq solvants ont été utilisés. Ce sont le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'eau distillée (H₂O), le méthanol (MeOH), le dichlorométhane (DCM) et l'acétate d'éthyle (EA). Les cinq extraits ainsi générés ont été caractérisés selon des tests toxicologiques *in vitro* incluant le test *in vitro* du micronoyau (IVMNT) et le test du cycle cellulaire ainsi que chimiquement par chromatographie gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC/MS) et par chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse (HPLC/MS). Selon le IVMNT, l'extrait DCM serait le plus toxique et selon le test du cycle cellulaire, l'extrait DCM induirait la plus forte inhibition du cycle cellulaire. La chromatographie liquide préparative (LC) a été utilisée pour fractionner l'extrait DMSO générant trois fractions principales. La fraction contenant le catéchol a induit la plus forte toxicité dans le IVMNT et contenait principalement du catéchol et ses dérivés. La plus forte toxicité de la fraction renfermant le catéchol et ses dérivés ainsi que les données dans la littérature rapportant la toxicité du catéchol suggèrent le catéchol comme principal composé responsable de la toxicité induite, suite à la combustion de l'AC.



Directeur de recherche



Éudiante



Codirecteur de recherche

Remerciements

Je souhaite remercier mon directeur de recherche, Dr Michel Fournier, ainsi que mon codirecteur, Dr André Morin, pour leur implication dans ce projet et pour l'aide apportée lors de la recherche et de la rédaction de ce mémoire.

Merci également à Dr André Morin pour sa disponibilité et son support assidu tout au long de ce projet. Je souhaite aussi remercier Impérial Tobacco Canada Ltée pour son implication dans la réalisation de ce projet et pour son appui financier. Merci aussi à tous les gens du département de Recherche et Développement chez ITCAN. Plus particulièrement Nicole Poirier, pour son aide inestimable au laboratoire, ses précieux conseils et pour sa complicité, Dr Jacques Dumont pour l'aide apportée lors des analyses en chimie et Nicole Lemyre du centre d'information corporatif d'ITCAN, pour l'aide apportée au niveau de la documentation.

Je souhaite également remercier :

Marlène Fortier pour sa collaboration et ses conseils qui m'ont permis d'approfondir mes connaissances.

L'INRS-Institut Armand-Frappier.

Alexandra Fürtös du laboratoire de MS de l'Université de Montréal pour les analyses LC/MS ainsi que toutes les personnes ayant contribué aux analyses.

Le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie du Canada pour son appui financier.

David, Navneet, Jules, Mario et Lucie pour leur aide et leur amitié.

Finalement, merci à Etienne pour ses encouragements et sa présence tout au long de ce projet.

Merci sincèrement à tous !

Table des matières

Résumé	II
Remerciements	III
Liste des abréviations	V
Liste des Figures	VII
Liste des Tableaux.....	IX
Introduction.....	1
CHAPITRE 1: Revue de littérature	4
1.1 Le tabac	4
1.2 Les composés phénoliques.....	6
1.3 L'acide chlorogénique	7
1.4 La fumée du tabac.....	8
1.4.1 Fumée entière	8
1.4.2 Température.....	11
1.4.3 Les machines à fumer.....	11
1.4.4 Étude par composés.....	13
1.4.5 Fumée de l'acide chlorogénique.....	15
1.5 Toxicologie de la fumée du tabac.....	16
1.5.1 Tests In Vivo.....	17
1.5.1.1 Exposition par inhalation.....	17
1.5.1.2 Exposition par la peau	18
1.5.2 Tests In Vitro	19
1.6 Toxicité des produits de combustion de l'acide chlorogénique.....	25
1.7 Identification chimique des produits de combustion de l'acide chlorogénique.....	26
1.7.1 Extraction sélective.....	26
1.7.2 Fractionnement et identification par Chromatographie Liquide	26
1.7.3 Identification de composés par chromatographie gazeuse.....	27
1.8 La cytométrie en flux	28
1.9 Objectifs	32
CHAPITRE 2 : TOXICOLOGICAL AND CHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE COMBUSTION PRODUCTS OF A SINGLE TOBACCO COMPONENT: CHLOROGENIC ACID	33
Contribution personnelle	33
Résumé français	33
CHAPITRE 3 : DISCUSSION GÉNÉRALE.....	74
3.1 L'acide chlorogénique	74
3.2 Combustion.....	75
3.3 Extraction sélective de la phase particulaire	75
3.4 Toxicité des différents extraits.....	76
3.5 Fractionnement de l'extrait DMSO	77
3.6 Toxicité des différentes fractions.....	78
3.7 Immunotoxicité.....	78
3.8 Blocage du Cycle Cellulaire et Mesure de la Viabilité et de l'Apoptose.....	79
CONCLUSION.....	83
PERSPECTIVES FUTURES	84
Bibliographie.....	85
ANNEXE I : Matériels et Méthodes des résultats non publiés	90
ANNEXE II : Résultats non publiés	93

Liste des abréviations

Ac :	Acide acétique (acetic acid)
ADN-DNA :	Acide désoxyribonucléique (desoxiribonucleic acid)
AC :	Acide chlorogénique ou chlorogenic acid (CA)
ATC :	American Tobacco Company
B(a)P :	Benzo(a)pyrène
CHO	Chinese Hamster Ovary cells
CORESTA :	Centre de Coopération pour les Recherches Scientifiques Relatives au Tabac
Cl ₅₀ :	Concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire
CSC :	Cigarette Smoke Condensate (condensat de fumée de cigarette)
CV :	Coefficient de variation (coefficient of variation)
DCM :	Dichlorométhane
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
EA :	Ethyl Acetate (acétate d'éthyle)
EtOH :	Ethanol
GC/MS :	Gas Chromatography / Mass Spectrometry
GJIC	Gap Junction Intercellular Communication
H ₂ O :	Eau distillée
HPLC :	High Pressure Liquid Chromatography
IARC :	International Agency for Research on Cancer
ITCAN :	Impérial Tobacco Canada Ltée
IVMNT :	In Vitro Micronucleus Test (test in vitro du Micronoyau)
JPTP :	John Payne Tar Predictor
LC/MS :	Liquid Chromatography / Mass Spectrometry
MeOH :	Méthanol
MN :	Micronoyau (micronucleus)
MSS :	Main Stream Smoke (fumée principale)
NRU :	Neutral Red Uptake (test du Rouge Neutre)
PAH :	Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (hydrocarbones polycycliques aromatiques)
PI :	Propidium Iodine (iodure de propidium)
PS :	Phosphatidylsérine
ROS :	Reactive Oxidative Species

SCE :	Sister Chromatide Exchange (échange de chromatide soeur)
SCGE	Single Cell Gel Electrophoresis
TPM :	Total Particulate Matter (phase particulaire de la fumée)
TL :	Transformation lymphoblastique

Liste des Figures

Mémoire :

Figure 1:	Structure moléculaire de l'acide chlorogénique, de l'acide quinique et de l'acide caféique.....	8
Figure 2:	Schéma d'une cigarette en combustion au cours de la bouffée. La répartition de la chaleur dans le charbon suit un gradient de température allant de 950°C à 300°C.....	10
Figure 3:	Représentation de la machine à fumée John Payne Tar Predictor - utilisée pour la combustion de l'AC.....	14
Figure 4:	Cellule binucléée avec micronoyau.....	24
Figure 11:	Genotoxic activity (% Micronucleus) and inhibition of cell proliferation (% Cytotoxicity) induced by DMSO extract, H ₂ O-dmso, DCM-dmso, MeOH-dmso and EA-dmso re-extracts	94
Figure 12:	Genotoxic activity (%MN) and inhibition of cell proliferation (%cytotoxicity) induced by V79 cells exposed 3 h to blank extracts	95
Figure 13:	Distribution of V79 cells as a function of cell cycle phases following an exposure of 3 h to DMSO extract, H ₂ O-dmso, MeOH-dmso, DCM-dmso and EA-dmso re-extracts	96
Figure 14:	Percentage of viability and percentage of apoptosis of V79 cells exposed 3 h to DMSO, H ₂ O, MeOH, DCM and EA extracts.....	97
Figure 15 :	Profil UV de l'extrait DMSO obtenu par LC-UV/MS préparatif.....	98

Article :

- Figure 1: Combustion of the chlorogenic acid using the John Payne Tar Predictor.....64
- Figure 2: HPLC chromatogram of DMSO extract showing the chlorogenic acid combustion products which were analyzed by LC-negative ESI-TOF65
- Figure 3: Genotoxic activity (% Micronucleus) and inhibition of cell proliferation (% Cytotoxicity) induced by three DMSO extracts66
- Figure 4: a) Genotoxic activity (% Micronucleus) and b) inhibition of cell proliferation (% Cytotoxicity) induced by DCM, DMSO, H₂O, EA and MeOH extracts67
- Figure 5: a) Genotoxic activity (% Micronucleus) and b) inhibition of cell proliferation (% Cytotoxicity) induced by DMSO extract, Fraction 1, Fraction 2 and Fraction 368
- Figure 6: Inhibition of human and mice T lymphocytes proliferation induced by DMSO extract69
- Figure 7: Distribution of V79 cells as a function of cell cycle phase following an exposure of 3 h to DMSO, water, MeOH, DCM and EA extracts70
- Figure 8: Distribution of V79 cells as a function of cell cycle phase following an exposure of 3 h to DMSO extract, fraction 1, fraction 2 and fraction 371
- Figure 9: Distribution of mice and human T lymphocytes as a function of cell cycle phase following an exposure of 48 h to the whole DMSO extract, as assessed by flow cytometry72
- Figure 10: GC/MS chromatograms of DMSO extract and control73

Liste des Tableaux

Article :

Table I:	Concentration range of the working solutions	61
Table II:	Fluorescence detection program for repeatability studies	61
Table III:	Gradient elution conditions for repeatability study	61
Table IV:	Gradient Phenolic compounds identified by HPLC fluorescence analyses in extracts generated from CA combustion	62
Table V:	Normalized compounds content relative to hydroquinone	62
Table VI:	Extracted combustion products separated and identified by GC/MS	63
Table VII:	Caffeine content in one DMSO and three DCM extracts as analyzed by analytical HPCL/MS	63

Introduction

La consommation du tabac n'est pas un phénomène nouveau. En effet, il y a des évidences qui permettent de croire que les populations Natives d'Amérique du Nord consommaient déjà du tabac il y a quelque deux milles ans av. J.C.. La plante de tabac, native d'Amérique, était alors utilisée comme plante médicinale et lors des rituels (Rafferty, 2006; Massie, 1981). Ce serait lors de la colonisation par les Européens au cours des XV^e et XVI^e siècle que le tabac fut connu de ceux-ci et rapporté en Europe où sa culture se répandit ensuite dans tout le continent. La plante de tabac s'est vue attribuer le genre *Nicotiana* suite à son introduction à la cour royale de Paris par Jean Nicot vers 1535 (Massie, 1981). Depuis, l'espèce la plus cultivée à travers le monde est *Nicotiana tabacum* (Hoffmann et Hoffmann, 1997).

Au départ, le tabac était chiqué ou fumé dans des pipes. Puis, les cigarettes sont graduellement devenues populaires. Faites à la main au début, les machines à cigarettes ont fait leur apparition à la fin du XIX^e siècle. Dès lors, la consommation de cigarettes n'a cessé d'augmenter jusqu'au milieu des années '60. Suite à la publication du rapport de la « *Royal College of Physicians of London* » en 1962 par le Surgeon General et du rapport de la « *U.S. Public Health Service* » en 1964, la consommation de cigarettes a amorcé son déclin (Hoffmann et Hoffmann, 1997; Hecht, 1999).

La première association du tabac comme cause possible de maladies a été rapportée par Sömmering en 1795 et liait le cancer des lèvres au fait de fumer le tabac à la pipe (Wynder et Hoffmann, 1967). Ce n'est toutefois que dans les années '50 que les premières études épidémiologiques à grande échelle ont démontré que fumer pouvait causer le cancer du poumon. Depuis, cette association entre le cancer et la fumée de cigarette a été supportée par des essais *in vivo* et *in vitro* (Yang *et al.*, 1999; Hoffmann et Hoffmann, 1997). De nos jours, le cancer du poumon est la cause numéro un de mortalité chez les hommes et les femmes aux États-Unis et plus d'un million de personnes meurent annuellement du cancer du poumon à travers le monde (Hecht, 1999). Différentes maladies, telles les maladies cardiovasculaires et

différents types de cancers sont maintenant associés à la fumée de cigarette. Mais, le mécanisme précis à l'origine de ces maladies n'est pas encore tout à fait compris quoique beaucoup de progrès ait été réalisé depuis les 20 dernières années (Torikau *et al.*, 2005; Rodgman et Green, 2003; DeMarini, 1983 et 2004).

Plusieurs études ont estimé le nombre de composés présents dans la fumée du tabac sans pouvoir dire avec certitude quels composés ou classe de composés sont responsables des effets adverses ni comment ils agissent sur l'organisme (Rodgman and Greene, 2003). Selon l'Agence Internationale pour la Recherche sur le Cancer (IARC), au moins 60 des 5000 composés de la fumée ont été identifiés comme étant carcinogènes chez les animaux dont 10 composés seraient également carcinogènes chez l'humain (Andreoli *et al.*, 2003; Anonyme, 1997; IARC, 1986). La fumée du tabac est reconnue comme étant un mélange extrêmement complexe dont les interactions entre les composés de la fumée peuvent être de nature synergique, additive ou inhibitrice. Aussi, les précurseurs du tabac à l'origine des constituants les plus toxiques de la fumée ne sont pas encore tous bien connus. Ainsi, la façon de mesurer ou de caractériser le risque associé à la consommation de cigarette n'a pas encore été établi (Andreoli *et al.*, 2003; Rodgman and Green, 2003).

Pour plus de 95% des constituants de la fumée primaire (Main Stream Smoke) du tabac, il n'y a pas de données biologiques ou toxicologiques. Afin de pouvoir réduire certains constituants de la fumée, il faut déterminer lesquels sont les plus toxiques, de quelle façon ils sont générés et quels en sont les constituants du tabac à l'origine (Torikau *et al.*, 2005). Une étude antérieure ayant révélé que, parmi 12 principaux composés du tabac, la fumée de l'acide chlorogénique (AC) induit une forte toxicité, ce composé sera notre objet d'étude (Préfontaine *et al.*, 2006). Ainsi, la toxicité de la phase particulaire de la fumée de l'AC sera caractérisée toxicologiquement et chimiquement. L'AC étant naturellement présent dans tout le règne végétal, on le retrouve aussi dans le tabac. En fait, l'AC est le composé polyphénolique le plus important du tabac (Wynder et Hoffmann, 1967).

Notre projet de recherche combinera donc l'étude toxicologique et chimique des produits de combustion de l'AC. L'étude toxicologique caractérisera la toxicité

des produits de combustion de l'AC via l'utilisation de différents bioessais *in vitro*. L'étude chimique permettra l'identification de certains des composés issus de la combustion de l'AC. L'originalité de cette approche nous permettra de mieux définir la contribution de l'AC dans la génération de composés potentiellement toxiques dans la fumée du tabac et d'identifier certains de ces composés. L'objectif principal de ce projet de recherche est de caractériser la toxicité des produits de combustion de l'acide chlorogénique via l'utilisation de différents bioessais toxicologiques *in vitro* et d'identifier certains de ces produits via l'utilisation de méthodes analytiques en chimie. Comme objectif secondaire, deux nouveaux bioessais *in vitro* seront réalisés dans le but de trouver des méthodes plus rapides pour repérer la toxicité des produits de combustion.

Globalement, ce projet de recherche est réalisé dans le cadre du développement de produits du tabac à risque réduit. Il ne peut être dit avec certitude l'envergure de la réduction d'exposition nécessaire pour noter une diminution du risque mesurable. De même, nous ne savons pas si la réduction d'un ou de plusieurs des composés toxiques de la fumée ou du tabac mènera à la réduction du potentiel toxique de la cigarette (CORESTA, 2002; Shields, 2002). Toutefois, notre étude se veut une source d'information additionnelle permettant l'augmentation des connaissances sur un constituant individuel du tabac, sur les composés qu'il génère dans la fumée et sur leur toxicité.

CHAPITRE 1

Revue de littérature

1.1 Le tabac

Le tabac est une plante existant sous plus d'une soixantaine d'espèces, pour la plupart originaires d'Amérique. Les deux espèces les plus cultivées n'ont jamais été trouvées à l'état sauvage. L'espèce principalement cultivée à travers le monde pour la production de tabac à cigarette est *Nicotiana tabacum* (Davis et Nielsen, 1999). La plante nécessite un climat chaud et beaucoup d'eau et peut atteindre de trois à six pieds de hauteur. *Nicotiana tabacum* possède une grande diversité génétique. Ainsi, au sein des plants d'un même champ, les constituants chimiques varient beaucoup tel la quantité de sucres, d'alcaloïdes, d'azote ou de cellulose. Les facteurs environnementaux et la position des feuilles sur la tige étant en partie responsables de cette variation chimique (Davis et Nielsen, 1999). Parmi les facteurs environnementaux on retrouve le type de sols (sablonneux à argileux), l'aération du sol, la disponibilité et la présence des nutriments et l'apport en eau. La plante de tabac est aussi affectée par la présence de nutriments néfastes dans le sol tel le cobalt, le nickel, le cuivre, le cadmium. Elle aura tendance à les accumuler dans ses feuilles, ce qui produira un tabac de moindre qualité.

D'autres facteurs environnementaux et commerciaux influencent les propriétés chimiques de la feuille de tabac. Il y a la pratique en agriculture, l'utilisation de pesticides ou d'herbicides, les procédures de récolte, le mode de séchage et le mode de fermentation du tabac. C'est justement au cours des étapes de séchage et de fermentation que les modifications chimiques les plus importantes surviennent. En bout de ligne, l'influence de ces facteurs sur la composition chimique des feuilles de tabac finit par influencer la composition de la fumée (Davis et Nielsen, 1999).

Le tabac subit différentes étapes avant de se retrouver sur le marché. Il est d'abord récolté dans les champs, séché et fermenté. Il existe plusieurs modes de

séchage du tabac : séché à l'air chaud, à l'air naturel, au feu et au soleil. Lors du séchage à l'air chaud, le tabac est soumis à des changements physiques et chimiques importants. La première étape de séchage consiste en un processus physiologique au cours duquel la biochimie des feuilles est changée par le contrôle de la température et de l'humidité relative. Ce processus, appelé le jaunissement, se termine par le séchage ou la fixation de la couleur (Davis et Nielsen, 1999). À la fin du processus, les feuilles sont presque complètement déshydratées. Au cours de ce mode de séchage, le taux de sucres contenus dans le produit final augmentera, principalement au niveau du fructose et du glucose (Davis et Nielsen, 1999). Le niveau de nicotine sera aussi plus élevé que la moyenne. Ce type de séchage à l'air chaud est le principal procédé utilisé pour fabriquer le tabac à cigarettes (Agriculture Canada, 1987). Les trois autres types de séchage du tabac sont principalement utilisés pour la fabrication de tabac à cigare, à pipe et à chiquer. Chacun de ces quatre types de séchage influe sur la teneur en nicotine et sur le taux de sucres.

La dernière étape de transformation du tabac est celle de la fermentation et du vieillissement. Au cours de cette étape, le tabac est entreposé de quelques jours à plusieurs mois. Les feuilles sont préalablement séparées selon leur position sur la tige; les feuilles du haut ayant des propriétés physiques et chimiques différentes de celles du centre et du bas de la tige (Davis et Nielsen, 1999). Le processus de fermentation et de vieillissement du tabac permet de développer une fumée au goût et à l'arôme plus doux. C'est une étape importante influençant la qualité du produit. Le processus de fermentation et de vieillissement inclut des transformations biochimiques, biologiques et physiques (Agriculture Canada, 1987).

Près de 4000 composés ont été identifiés dans la plante de tabac. Les principaux groupes de composés sont les hydrates de carbone (amidon, glucose etc.), la cellulose, les composés azotés (acides aminés, protéines), les alcaloïdes (nicotine), les composés phénoliques (acide chlorogénique, lignine, rutine et scopoletine), les acides carboxyliques (acide malique, acide formique etc.), les résines et les autres (fibres, acides organiques, esters, stérols etc.) (Davis et Nielsen, 1999). De ces principaux groupes, celui des composés phénoliques représente entre 5 et 10% du poids sec des feuilles de tabac. Cette variation

s'expliquant selon le mode de séchage, la génétique des plants et le mode de culture du tabac (Huber, 1989; Stedman, 1968).

1.2 Les composés phénoliques

Les premières études détaillées sur les composés phénoliques du tabac ont été rapportées par Shmuk et ses collègues en 1953. Toutefois, dès 1927, l'importance des polyphénols dans la qualité de la fumée est mise de l'avant. Puis, en 1933, leur importance est confirmée alors que les polyphénols sont identifiés par Koenig et Dörr en tant que contributeurs importants au goût et à l'arôme de la fumée (Wynder et Hoffmann, 1967). Les polyphénols varient considérablement entre les différents types de tabac. Cette variabilité est attribuée à la génétique des plants, aux conditions environnementales, au type de séchage ainsi qu'à la position de la feuille sur la tige (Davis et Nielsen, 1999). Bien qu'un certain nombre de composés phénoliques simples existent en petite quantité dans le tabac, ce sont l'acide chlorogénique (AC), la rutine et la scopoletine qui sont les principaux composés polyphénoliques individuels du tabac (Wynder et Hoffmann, 1967). Les polyphénols sont divisés en trois classes : les Coumarins, les Caffétannins et les Flavonoïdes; l'AC fait partie de la classe des Caffétannins, la rutine fait partie des Flavonoïdes et la scopoletine fait partie des Coumarins. L'AC représente entre 0,31 et 4,3% des composés polyphénoliques, la rutine entre 0,15 et 1,8% et la scopoletine entre 0,003 et 0,012% des composés polyphénoliques (Wynder et Hoffmann, 1967).

Le tabac séché à l'air chaud renferme une concentration plus élevée d'AC, de rutine et de scopoletine comparativement au tabac séché à l'air libre. Comme les polyphénols sont positivement associés avec un tabac de qualité, il est utile de savoir où le trouver dans la plante et quelles pratiques ou facteurs permettent d'en faire varier les quantités (Wynder et Hoffman, 1967). Cette association du tabac de qualité avec le contenu en polyphénols réside dans le fait que les composés phénoliques sont facilement oxydés en quinones et qu'ils subissent une réaction rapide avec les acides aminés, les alcaloïdes et les amines pour produire les pigments colorés du tabac. Plusieurs de ces pigments colorés sont des résines ayant un poids moléculaire très élevé et qui, au cours de la combustion, produisent certains

composés contribuant à la saveur et à l'arôme de la fumée (Wynder et Hoffmann, 1967). En 1965, Zane a démontré la formation d'acide-gamma-lactone quinique à partir de la combustion de l'AC (Wynder et Hoffmann, 1967). Cet acide, ayant un goût caractéristique amer, a été isolé de la fumée et non du tabac et au moins 50 autres composés phénoliques simples isolés dans la fumée y étaient trois fois plus nombreux que dans le tabac (Wynder et Hoffmann, 1967). La formation de ces composés phénoliques simples a donc principalement lieu lors de la combustion du tabac, plus précisément, lors de la combustion des composés polyphénoliques. Cependant, les composés phénoliques simples retrouvés dans la fumée ne dérivent pas tous des constituants polyphénoliques (Wynder et Hoffmann, 1967).

1.3 L'acide chlorogénique

L'AC et ses isomères sont très répandus et abondants dans tout le règne végétal. L'AC est synthétisé à partir de l'acide caféique et de l'acide quinique (Figure 1) et on peut le retrouver dans différentes parties de la plante telles les feuilles et les fruits (Stich *et al.*, 1981, The Merck Index, 1968). Ayant été identifié comme constituant du tabac en 1933 par König and Dörr, il s'y retrouve principalement sous la forme de l'acide 3-O-caffeoyl-D-quinique. Dans le tabac séché à l'air chaud, l'acide chlorogénique peut atteindre jusqu'à 8% du poids sec des feuilles (Runeckles, 1963). Comme tous les autres composés du tabac, les concentrations d'AC présentes dans le tabac varient selon les conditions environnementales, la génétique et la partie de la plante ou la hauteur des feuilles sur la tige (Wynder et Hoffmann, 1967).

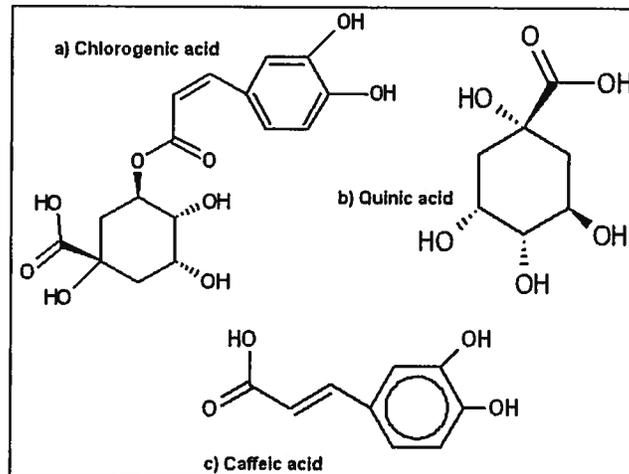


Figure 1: Structure moléculaire de a) l'acide chlorogénique, de b) l'acide quinique et de c) l'acide caféique. * Source : The Merck Index, 8th Edition, 1968.

L'AC comme a été identifié comme étant directement convertogénique¹ et clastogénique² selon le test d'aberration chromosomique réalisé sur les cellules CHO (Chinese Hamster Ovary), et le test de conversion génique réalisé avec *Saccharomyces cerevisiae*. Toutefois, selon le test de mutagénèse de Ames réalisé avec *Salmonella*, l'AC n'est pas mutagène (Stitch *et al.*, 1981).

1.4 La fumée du tabac

1.4.1 Fumée entière

La fumée du tabac, renfermant près de 5000 composés, est formée à partir de la combustion incomplète du tabac (Davis et Nielsen, 1999). Une combustion complète ne génère que de l'eau et du dioxyde de carbone (Davis et Nielsen, 1999; Wynder et Hoffmann, 1967). Ces nombreux composés sont répartis entre les phases vapeur et particulaire de la fumée, le tout formant l'aérosol. La phase vapeur contient les composés volatiles à 30°C et plus. La phase particulaire contient des composés semi-volatiles et non-volatiles dissous dans l'aérosol (Davis et Nielsen, 1999). La fumée résultant de la combustion du tabac peut être divisée en fumée principale,

¹ Habileté d'induire la conversion des gènes dans les modèles de levure.

² Altération de la structure des chromosomes.

celle inhalée par le fumeur via le filtre, et en fumée secondaire, fumée issue de la zone de combustion (charbon), diffusant à travers le papier ou exhalée par le fumeur (Davis et Nielsen, 1999; Wynder et Hoffmann, 1967). Les études portant sur la fumée se font surtout avec la fumée principale étant donné que c'est celle qui est inhalée par le fumeur. La fumée issue du filtre de cigarette contient environ 5×10^9 particules par millilitre et leur grosseur se situe entre 0,1 et 1,0 μm . La grosseur moyenne des particules étant d'environ 0,2 μm (Stedman, 1968; Wynder et Hoffmann, 1967).

La composition génétique variée de la plante de tabac, les facteurs environnementaux favorisant ou inhibant l'expression des gènes et les nombreuses étapes commerciales servant à transformer le tabac sont autant de facteurs jouant un rôle majeur dans la forme du produit final : la fumée (Davis et Nielsen, 1999). Il est difficile, voir impossible, de prédire quel composé est à l'origine de quoi dans la fumée et en quelle quantité (Davis et Nielsen, 1999).

Les réactions survenant dans un bâton de cigarettes sont en effet bien complexes. La pyrolyse et la combustion surviennent tous deux dans le charbon de la cigarette où un important gradient de concentration de gaz et de température existe (Figure 2). La pyrolyse et la combustion correspondent à la destruction de corps organiques par la chaleur. La pyrolyse a lieu en absence d'oxygène mais, en présence d'autres gaz tel que l'azote, alors que la combustion a lieu en présence d'oxygène. Lors de la pyrolyse, les composés sont brûlés dans une atmosphère contrôlée et il en résulte la destruction de composés donnant lieu à la formation de nouveaux composés et à la formation d'un résidu solide. Ainsi, le résultat de la combustion et de la pyrolyse diffère au niveau des composés générés (Baker, 1981). (Baker, 1981).

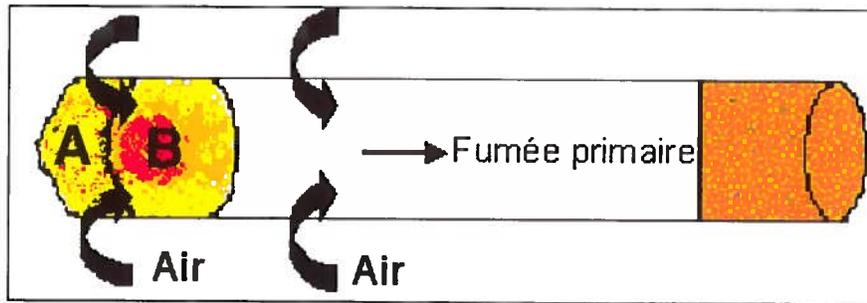


Figure 2 : Cigarette en combustion, au cours de la bouffée d'air. Dans le charbon on retrouve la zone de combustion exothermique (A) et la zone de pyrolyse endothermique et de distillation (B). La répartition de la chaleur dans le charbon (A+B) suit un gradient de température allant de 950°C (zone rouge) à 300°C (zone jaune).

Il existe deux types distincts de combustion dans la cigarette : la combustion lors de la bouffée et la combustion entre les bouffées. Au cours de la bouffée de cigarette, l'air est aspiré dans la cigarette et pénètre par le charbon. Cette aspiration d'air est responsable de la formation de la fumée primaire de la cigarette (MSS). Durant l'intervalle entre les bouffées, la convection d'air autour du charbon soutient la combustion et est responsable de la formation de la fumée secondaire (Baker, 1981). Le monoxyde de carbone et le dioxyde de carbone constituent près de 60% du poids des produits de la fumée primaire. Ces deux oxydes sont formés au cours de la combustion exothermique, étant la principale source d'énergie lors du processus de formation de la fumée.

Le transfert des composés du tabac à la fumée dépend de la volatilité du composé, du groupe fonctionnel présent et de la stabilité thermique du composé. La majorité des composés non-volatiles du tabac ne sont pas générés par distillation. Ces composés sont les hydrates de carbone, les sucres, les polysaccharides (cellulose, pectine, amidon), les polyphénols (lignine, acide chlorogénique) et les protéines. Ces composés sont enclins à être décomposés par pyrolyse. Enfin, le rapport entre les divers constituants du tabac et leurs produits de pyrolyse est complexe et difficile à démêler (Baker, 1981). Certaines techniques existent pour déterminer la relation entre les constituants du tabac et les composés générés dans la fumée, telle la technique utilisant la radioactivité. Cette technique implique le marquage de certains constituants de la cigarette avec des substances radioactives. Lorsque ces constituants sont pyrolysés, on retrace la radioactivité dans les

composés générés dans la fumée. Une autre méthode utilisée pour retracer les composés générés dans la fumée est le marquage de constituants du tabac au carbone-13. Le ratio carbone-13/carbone-12 dans des composés spécifiques peut ainsi être analysé par spectrométrie de masse et identifié.

1.4.2 Température

Lors de la combustion du tabac, différents composés seront formés dépendamment du degré de température atteint. Par exemple, la formation de B(a)P (benzo(a)pyrène) et d'autres PAH (hydrocarbures aromatiques polycycliques) a lieu à température élevée tandis que la formation de composés phénoliques a lieu aux températures moins élevées (Sharma *et al.*, 2002a et b; White *et al.*, 2001). La combustion du tabac à 800°C mène à la formation de B(a)P et à 700°C, la quantité de B(a)P ne s'élève qu'à un tiers de celle retrouvée à 800°C. À 600°C, il n'y a plus de trace de B(a)P (White *et al.* 2001).

La température a aussi des effets reconnus sur la formation de composés mutagènes dans la fumée du tabac. Les condensats de fumée de tabac (CSC) générés à des températures de 560°C, 720°C et 800°C ont démontré une activité carcinogène différente. Les CSC générés à 800°C avaient une activité carcinogène très élevée, ceux générés à 720°C avaient une activité modérée et les CSC générés à 560°C ne présentaient aucune activité carcinogène (White *et al.*, 2001). Donc, la température a une influence directe sur la toxicité du produit.

1.4.3 Les machines à fumer

La recherche sur la fumée du tabac a vraiment évolué avec l'arrivée des machines à fumer. Les premiers modèles de machines à fumer du début du XX^e siècle utilisaient la succion continue. Ensuite, vinrent les machines à succion interrompue, le contrôle de la succion dépendait d'appareils contrôlés manuellement. Puis, des appareils automatiques ont été développés pour contrôler l'ouverture des valves à succion. La formation du premier CSC utilisé pour des tests carcinogènes a été réalisée par la distillation destructive du tabac. La première machine à fumer

procurant des résultats reproductibles et précis et utilisant un filtre Cambridge pour retenir la phase particulaire de la fumée fut fabriqué par la *American Tobacco Company* (ATC). Développée en 1936 par Bradford, elle a été distribuée largement aux États-Unis. Les paramètres en place permettaient de prendre une bouffée de cigarette chaque 58 secondes selon un volume prédéterminé. La fumée de quatre cigarettes était recueillie sur un même filtre (Wynder et Hoffmann, 1967). Cette machine fut un outil important pour le développement des analyses de routine et pour la recherche toxicologique sur la fumée du tabac.

Succédant à la machine de ATC, la CSM-10 de la *Cigarette Components LTD* augmenta de beaucoup la précision de l'étude sur les CSC car elle permettait l'ajustement de la durée de la bouffée (durée disponible entre 0,1 et 6 secondes), du volume de la bouffée (entre 1,5 et 135 ml) et du choix entre trois méthodes pour la collection du condensat : par précipitation électrostatique, par des trappes à froid et par l'utilisation de filtres Cambridge.

Ainsi, avec l'essor des machines à fumée à partir des années '50, un nombre important de cigarettes pouvait être fumé par jour, fournissant à la demande en CSC nécessaires pour la recherche. Et c'est au cours de cette même période qu'ont été développées les Procédures Standards à Fumer (*Standards Smoking Procedures*) selon lesquelles les paramètres de génération de la fumée ont été définis. Ces paramètres correspondent à une bouffée par minute, d'une durée de 2 secondes, pour un volume de 35 ml. Le but de standardiser les procédures d'opérations était de pouvoir comparer le contenu en goudron, en nicotine et en d'autres composés générés par différentes sortes de cigarettes. Suite à la législation de 1969 qui a exigé la publication du rendement en goudron, en nicotine et en monoxyde de carbone pour tous les types de cigarettes mis en marché, la Commission Commerciale Fédérale (*Federal Trade Commission*) a officiellement adopté ces Procédures Standards à Fumer, lesquelles sont maintenant utilisées à travers le monde (Hoffmann et Hoffmann, 1997). Ceci a permis de mesurer les changements survenus dans la fabrication des cigarettes et dans la composition de la fumée. Ainsi, la quantité moyenne de goudron et de nicotine est respectivement passée de 38 mg et 2.7 mg en 1954 à 12 mg et 0.95 mg en 1992, aux États-Unis. Au Royaume Uni, la

quantité de goudron et de nicotine est passée respectivement de 32 mg et 2,2 mg à moins de 12 mg et 1,0 mg par cigarette, au cours de la même période.

Enfin, même si les Procédures Standards à Fumer sont utilisées partout dans le monde, les chercheurs savent que ces paramètres ne reflètent pas fidèlement le comportement des fumeurs et que le nombre de bouffées par minute et le volume de la bouffée peuvent varier d'une personne à l'autre. Ainsi, les études menées avec les CSC générés selon ces paramètres standards doivent inclure une certaine incertitude due au comportement réel des fumeurs (Hoffmann et Hoffmann, 1997).

1.4.4 Étude par composés

Bien qu'il soit possible d'étudier la fumée grâce aux machines à fumer, l'étude n'en demeure pas moins complexe. C'est pourquoi un autre type de machine à fumer a été développé : la *John Payne Tar Predictor* (JPTP). Elle est utilisée pour collecter la phase particulaire de la fumée provenant de la combustion de constituants purs du tabac. Cet appareil réalise la combustion de l'échantillon dans un tube de quartz. Ce tube étant automatiquement inséré dans la fournaise de la JPTP (Figure 3). Le quartz est utilisé pour la combustion de l'échantillon en raison de sa grande résistance à la chaleur permettant à l'échantillon d'être brûlé jusqu'à une température de 950°C. Au cours de la combustion de l'échantillon, un débit d'air est créé à l'aide d'une pompe qui aspire l'air à travers le tube de quartz, entraînant la fumée à passer au travers d'un filtre Cambridge. Le filtre permet de récolter la phase particulaire de la fumée de l'échantillon. L'extraction du filtre à l'aide d'un solvant permet de générer des extraits concentrés, contenant les produits de combustion du composé à l'étude.

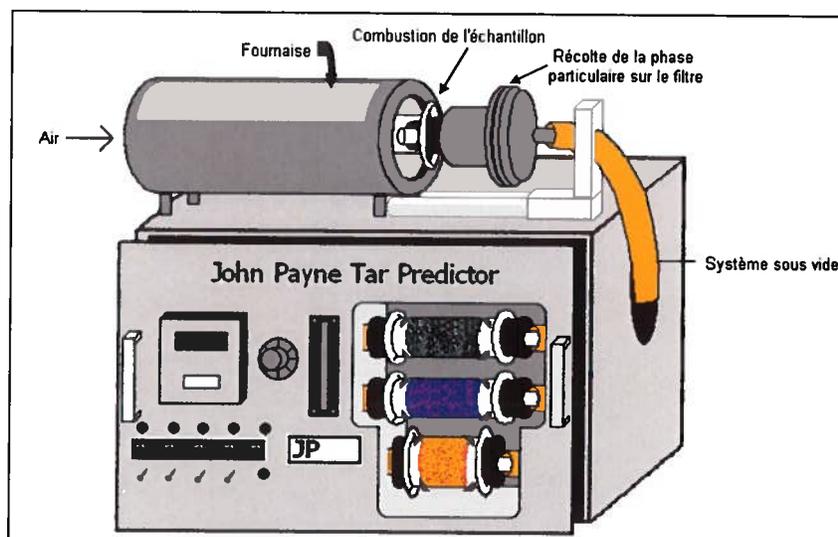


Figure 3 : Machine John Payne Tar Predictor utilisée pour la combustion de composés purs du tabac. Le tube de quartz contenant l'échantillon à brûler est inséré dans la fournaise où la combustion a lieu selon un temps pré-déterminé. La phase particulaire de la fumée est recueillie par un filtre Cambridge de fibre de verre. *Dessin réalisé par Navneet Kaur.*

Les paramètres de combustion pouvant être ajustés sont le temps de combustion, le débit d'air aspirant la fumée et la température de la fournaise. Le choix de la température pour la JPTP a été établi par Dr A. Porter, chercheur chez ITCAN (ITCAN, 1982). La combustion de l'échantillon dans la fournaise ne simule pas l'action de fumer. La ressemblance avec la combustion d'une cigarette est donc très limitée. C'est pourquoi il est important de bien choisir les conditions d'expérimentation, la température de combustion, la grosseur de l'échantillon, le débit d'air et le temps de combustion (Chen, 2004).

Cet appareil permet de générer les produits de combustion de composés purs afin de déterminer les caractéristiques biologiques et chimiques de ces derniers. Ainsi, il pourrait être possible d'identifier ce qu'un composé pur peut générer dans la fumée. Les tests toxicologiques permettent ensuite de déterminer la toxicité associée à la fumée générée par la combustion de ce composé pur.

1.4.5 Fumée de l'acide chlorogénique

L'AC est à l'origine de la présence de nombreux composés phénoliques dans la fumée du tabac (Sharma *et al.*, 2002 a et b). Outre l'AC, la lignine et la cellulose font partie des précurseurs de monophénols dans la fumée du tabac alors que les polysaccharides, les sucres, les protéines, les acides aminés et les polyphénols génèrent une large variété de phénols (Davis et Nielsen, 1999; Schlotzhauer et Chortyk, 1981). Il est à noter que dans la fumée du tabac, de petites quantités d'AC peuvent être retrouvées et le processus qui en serait responsable est la distillation (Wynder et Hoffmann, 1967).

La pyrolyse de l'AC pur a été étudiée selon différentes températures, variant de la température ambiante à 800°C, selon différents taux de combustion et selon différents appareils de combustion (un analyseur thermogravimétrique ou TGA et un réacteur tubulaire) (Sharma *et al.*, 2002a). Les composés recueillis ont été analysés par spectrométrie de masse. Les principaux composés générés par la pyrolyse de l'AC sont le benzène, le phénol, le catéchol, l'acide benzoïque et le vinyl catéchol. Des quantités d'eau (H₂O), de monoxyde de carbone (CO) et de dioxyde de carbone (CO₂) ont aussi été mesurées. De l'acide quinique-gamma-lactone (quinide) a été observée dans les condensats plus volatils. Les composés présents en concentrations plus élevées sont le phénol et le catéchol (Sharma *et al.*, 2002a).

Les composés formés à des températures plus faibles (ex. < 600°C) sont appelés composés primaires, alors que les composés formés à des températures plus élevées (ex. > 800°C) sont appelés composés secondaires parce que leur formation nécessite plus d'énergie. Lors de la pyrolyse de l'AC, les principaux composés primaires étaient le catéchol, le vinyl catéchol et le quinide et les composés présents en plus faibles concentrations étaient le méthyle catéchol et l'éthyle catéchol. Les composés secondaires étaient le phénol, le benzène, le CO, le CO₂, l'H₂O et l'acide benzoïque. La concentration du phénol et du benzène augmentant avec l'augmentation de la température. Comme le benzène n'est formé qu'à très haute température (ex. > 700°C), sa formation a lieu vers la fin de la pyrolyse, alors que l'acide benzoïque et le phénol sont formés tout au long de la

durée de la pyrolyse. L'acide quinique et les différents catéchols (composés primaires) sont formés à basse température par déshydratation et décomposition des fractions de l'AC, c'est-à-dire, de l'acide quinique et de l'acide caféique. La décomposition consiste en un bris des chaînes latérales de l'anneau aromatique qui lui, demeure intact (Sharma *et al.*, 2002b). Ainsi, bien que beaucoup moins complexe que la fumée entière du tabac, la fumée de l'AC comprend plusieurs composés.

1.5 Toxicologie de la fumée du tabac

Le tabac a été fumé pendant des siècles et probablement des millénaires par les populations d'Amérique. Suite à son arrivée en Europe au milieu du XVI^e siècle, fumer est vite devenu monnaie courante dans le monde et donc, le mode de consommation du tabac a dû s'adapter pour satisfaire à son utilisation courante (IARC, 1986). En 1965, le pourcentage de fumeurs dans la population américaine était de 42% (Hecht, 1999), certaines maladies étant associées à sa consommation. Le cancer du poumon tue plus d'un million de personnes par année à travers la planète et la cigarette est la cause majeure du cancer du poumon. Depuis la constatation de ces faits, le pourcentage de fumeurs dans la population américaine a chuté à 25% en 1990 et demeure stable à ce jour (Hecht, 1999).

Les premières associations de la consommation du tabac avec l'émergence de cancer datent du XVIII^e siècle. C'est en Allemagne, en 1795, que Sömmering a été le premier à exprimer clairement que le fait de fumer pouvait causer le cancer (IARC, 1986). Ce n'est toutefois qu'en 1950 que la première étude épidémiologique à grande échelle reliant la consommation du tabac et le cancer du poumon a été conduite par Wynder et Graham (Hoffmann et Hoffmann, 1997). De cette étude est ressorti le concept de la relation dose-réponse entre le nombre de cigarettes fumées et le risque de développer un cancer du poumon. En 1953, la première induction d'un cancer en laboratoire par application cutanée fut répertoriée. Cette méthode consiste en l'application de CSC sur le dos rasé de souris (Hoffmann et Hoffmann, 1997). Une relation dose-réponse claire ayant été observée entre la quantité de condensat appliqué sur le dos des souris et le pourcentage de papillomes cancéreux retrouvés sur la peau; cette méthode a grandement été utilisée par la suite. En 1973,

Dontenwill et ses collègues (Hoffmann et Hoffmann, 1997) ont développé une méthode consistant à exposer des hamsters à la fumée de cigarette diluée dans l'air (1:15) dans des chambres d'inhalation pour étudier les lésions des tissus du larynx. Encore une fois, une relation dose-réponse a été observée entre le degré d'exposition à la fumée et l'induction de tumeurs bénignes et malignes du larynx des hamsters (Hoffmann et Hoffmann, 1997).

La compréhension des mécanismes induisant le cancer du poumon devrait mener à de nouvelles stratégies pour réduire le risque de ce type de cancer, pour identifier les individus les plus susceptibles et pour développer des techniques innovatrices pour la détection précoce (Hecht, 1999). Entre temps, les différents tests *in vivo* et l'émergence des tests *in vitro* ont été fort utiles dans plusieurs études sur la fumée du tabac afin de caractériser et d'évaluer le potentiel toxique du tabac.

1.5.1 Tests *In Vivo*

1.5.1.1 Exposition par inhalation

La découverte que l'inhalation de la fumée du tabac était la cause de carcinomes dans le larynx chez des hamsters a permis d'établir un modèle par lequel la carcinogénicité de la fumée du tabac a été confirmée plusieurs fois (IARC, 1986). Les premières études sur le tabac ont débuté avec des modèles animaux d'inhalation où des hamsters, des souris, des rats ou des chiens étaient exposés à la fumée de cigarette. La plupart des essais ont été conduits sur les hamsters et les souris (IARC, 1986).

Tel qu'introduit dans la section sur les machines à fumer, des méthodes et des équipements pour fournir une fumée standard ont été développés afin d'étudier la réponse des animaux suite à leur exposition à la fumée de cigarette (IARC, 1986). Par conséquent, plusieurs appareils d'exposition à la fumée ont été développés, dont les principaux types sont : les appareils exposant tout le corps de l'animal et les appareils n'exposant que le nez de l'animal. Dans le but de simuler l'action de fumer

des humains, une bouffée de cigarette de deux secondes diluée dans l'air est introduite dans la chambre d'inhalation où se trouve l'animal, puis l'air est purgé. Cette méthode permet l'exposition contrôlée de l'animal à la fumée mais, les animaux ainsi exposés réagissent en adoptant un comportement protecteur. Leur respiration devient superficielle et hésitante ayant pour effet de réduire leur volume respiratoire. Ainsi, la dose fournie aux différentes régions du système respiratoire était plus faible. De plus, comme les rongeurs ne respirent que par le nez et qu'ils ont, tout comme les chiens, un modèle nasal plus complexe que celui des humains, la dynamique de déposition des particules dans les voies respiratoires supérieures est différente de celle retrouvée chez l'humain (IARC, 1986).

Les efforts pour produire des tumeurs pulmonaires chez les animaux de laboratoire par l'inhalation de l'aérosol de cigarette ont été entrepris à plusieurs reprises. La principale difficulté est de faire inhaler l'aérosol, dont la grosseur des particules se situe entre 0,1 μm et 1 μm , car la barrière nasale animale est très bien développée (Wynder et Hoffmann, 1967). L'inhalation par la bouche chez l'humain permet à l'aérosol de passer outre les défenses nasales et de pénétrer directement les voies du système respiratoire. Donc, les expérimentations d'inhalation chez les animaux ne peuvent que représenter les essais biologiques dans le secteur indirect, ou passif, de l'inhalation de la fumée. Bref, différents ajustements ont dû être apportés à ces bioessais *in vivo* d'exposition par inhalation (Wynder et Hoffmann, 1967).

1.5.1.2 Exposition par la peau

La peau de souris a été employée comme principal tissu d'essai dans les diverses expériences cutanées effectuées au milieu du siècle passé. Le but était d'étudier la formation de carcinomes afin d'établir une relation entre la dose, le CSC et l'apparition des cancers. Les résultats de ces expériences ont été comparés entre divers laboratoires. Ils se sont avérés semblables au niveau du degré global d'activité carcinogène des CSC et au niveau des différences d'activité parmi les CSC de conception différente. Ainsi, une relation entre la présence de composés carcinogènes et la destruction des glandes sébacées dans la peau des souris a été observée (Wynder et Hoffmann, 1967). La méthode utilisée pour l'exposition cutanée

consistait à raser le dos des souris et à le recouvrir du CSC avec un pinceau. L'application du CSC était accomplie en maintenant la souris par la queue tout en lui permettant de poser ses pattes arrière sur un support. Cette façon d'exposition était plutôt imprécise et fastidieuse. C'est pourquoi des pipettes automatiques ont été développées pour appliquer plus rapidement la solution sur le dos des souris. Cette méthode plus rapide était plus adaptée lors d'études nécessitant un grand nombre d'animaux. De plus, comme le volume de la pipette était réglable, la précision des études et la reproductibilité des expériences s'en trouvèrent augmentés (Wynder et Hoffmann, 1967). Cette méthode d'exposition a grandement contribué à élucider les mécanismes par lesquels les CSC induisent leur activité dans les tissus animaux (IARC, 1986).

Le but de ces études *in vivo* (inhalation et exposition cutanée) était de déterminer les relations possibles entre l'activité biologique et la conception des cigarettes ainsi que de caractériser chimiquement la fumée de cigarette. De nos jours, les tests *in vitro* sont d'avantages utilisés pour caractériser la fumée de cigarette étant donné leurs nombreux avantages.

1.5.2 Tests *In Vitro*

Les tests *in vitro* sont des essais à court terme servant à évaluer les dommages potentiels pouvant être causés aux cellules ou à l'ADN (CORESTA, 2002) et sont un outil tout à fait valable dans l'évaluation de la toxicité de la fumée du tabac (Andreoli *et al.*, 2003). Ils ont connu leur émergence avec le test de mutagenèse de Ames dans les années 1970. Il existe plusieurs avantages à l'utilisation des tests *in vitro* en comparaison des tests *in vivo* tels : a) la rapidité, car les résultats peuvent être obtenus en l'espace de quelques jours à quelques semaines; b) le faible coût qui leur est associé; c) la possibilité de tester un plus large éventail de substances sans recourir à l'emploi de nombreux animaux et d) la diminution de la variabilité génétique entre individus (CORESTA, 2002; Andreoli *et al.*, 2003). Actuellement, les essais *in vitro* à court terme mesurent deux caractéristiques principales : la cytotoxicité et la génotoxicité (Andreoli *et al.*, 2003).

L'évaluation de la cytotoxicité *in vitro* mesure principalement la viabilité et le taux de croissance des cellules. Ces deux paramètres sont reliés à des mécanismes généraux communs à toutes les cellules. D'autres aspects peuvent être mesurés pour traduire la cytotoxicité tel la compartimentalisation cellulaire (l'intégrité des membranes), les voies d'oxydoréduction, les voies de signalisation cellulaire, l'induction de l'apoptose ou de la nécrose. Ces phénomènes interfèrent avec le métabolisme cellulaire normal et la réplication de l'ADN (Andreoli *et al.*, 2003). Le test du Rouge Neutre (NRU), le test GJIC (évaluation de la communication intracellulaire par les jonctions lacunaires dans les membranes plasmiques cellulaires ou mitochondriales) et le test du stress oxydatif (mesure de la fluorescence des ROS) sont quelques uns des tests utilisés pour mesurer la cytotoxicité (CORESTA, 2002; Andreoli *et al.*, 2003). Tous ces tests ont été utilisés pour comparer l'exposition de cellules à différents types de tabac (Andreoli *et al.*, 2003).

L'évaluation de la génotoxicité *in vitro* mesure les dommages causés aux gènes. Ces dommages peuvent être des mutations, des réarrangements de chromosomes ou des délétions de chromosomes. On parle de délétion lorsqu'il y a perte d'un petit fragment d'ADN par un chromosome et d'aneuploïdie lorsqu'il y a gain ou perte d'un chromosome entier. (Andreoli *et al.*, 2003). Il existe deux types de tests génotoxiques, les tests directs et les tests indirects. Les tests directs évaluent le type d'altérations génétiques : mutations géniques ou effets chromosomiques. Les tests indirects mesurent les dommages causés à l'ADN, lesquels ont mené à des altérations génétiques. Les dommages reliés à l'ADN incluent les adduits à l'ADN et les ruptures de brin d'ADN ou les réponses cellulaires reliées aux dommages générés à l'ADN (réparation de l'ADN ou transcription). Environ 100 types de tests génotoxiques *in vitro* ont été développés mais, quelques uns sont suffisamment précis et sensibles pour être utilisés dans l'évaluation de la fumée du tabac (Andreoli *et al.*, 2003). Parmi ces tests on retrouve le Test *In Vitro* du Micronoyau (IVMNT), le test de mutagenèse de Ames, le test *in vitro* d'Échange de Chromatide Sœur (SCE) et le test Comet. Ce dernier essai est rapide, peu coûteux, très sensible et a

beaucoup été utilisé pour tester les CSC et les composés individuels du tabac (Andreoli *et al.*, 2003).

Le Centre de Coopération pour les Recherches Scientifiques Relatives au Tabac (CORESTA) est une association qui a été fondée en 1956 ayant pour but de promouvoir la coopération internationale quant à la recherche relative au tabac. Lors de sa fondation, le CORESTA comptait 24 membres. Présentement, on dénombre quelque 194 membres. Les membres sont des compagnies et des instituts de recherche ayant des activités de recherche et de développement reliées au tabac; de la plante dans le champs, passant par la transformation du produit, la chimie, les cigarettes et la fumée. Les membres actuels proviennent de 52 pays répartis en Europe (55%), en Asie (19%), au Canada et aux États-Unis (16%), en Amérique du sud (5%) et en Océanie (1%).

Un groupe de travail a été formé au sein du CORESTA quant à l'étude *in vitro* de la toxicité de la fumée du tabac (CORESTA, 2002). Ce groupe, *Task Force*, a recommandé les trois tests *in vitro* suivant : le test de mutagenèse de Ames, le test *In Vitro* du Micronoyau et le test du Rouge Neutre (CORESTA, 2002). Le test de mutagenèse de Ames est recommandé pour tester la mutagenèse des CSC, le NRU est recommandé pour tester la cytotoxicité des CSC et le IVMNT est recommandé pour tester la génotoxicité des CSC. Le groupe de travail a conclu que ces analyses fournissaient une base scientifique valable pour évaluer la toxicité *in vitro* de la fumée de tabac (CORESTA, 2002). Ceci est appuyé par Santé Canada qui recommande aussi l'utilisation de ces trois mêmes tests *in vitro* pour évaluer le potentiel toxique des CSC (Health Canada, 2004).

Depuis la publication du papier original sur le test de mutagenèse de Ames, plus de 5000 composés ont été testés (Maron et Ames, 1983). Le test de mutagenèse de Ames permet de mesurer l'habilité des substances chimiques à produire des mutations dans une souche spécifique de bactéries auxotrophes, c'est-à-dire incapable de synthétiser un composé organique essentiel pour sa croissance, l'histidine (*Salmonella typhimurium* ou *Escherichia coli*). La souche de bactérie possédant une mutation au niveau de l'opéron histidine est donc incapable de croître

et de former des colonies en absence d'histidine dans son milieu. À la suite de l'ajout d'une substance chimique dans le milieu des bactéries auxotrophes, la présence de colonies permet de définir la substance ajoutée comme étant mutagène. Le test de mutagénèse de Ames a été spécifiquement développé pour détecter les mutations induites chimiquement. Depuis, ce test a été reconnu par la communauté scientifique ainsi que par les agences et corporations gouvernementales pour sa valeur dans la détection de la mutagénèse de plusieurs substances. Il est maintenant le test en toxicologie génétique le plus utilisé à travers le monde pour déterminer le potentiel mutagène de nouveaux médicaments et produits chimiques (CORESTA, 2002). À cet effet, la prédiction de la carcinogénicité chez les rongeurs, à partir d'une réponse mutagène positive obtenue dans le test de Ames, s'avère être très élevée (Mortelmans et Zieger, 2000).

Parce qu'il est rapide, peu coûteux et facile à réaliser, le test de mutagénèse de Ames est fréquemment utilisé, avec ou sans l'ajout d'un homogénat de foie de rat (fraction S9). La fraction S9 simule le système de biotransformation retrouvé chez les mammifères. La majorité des produits pénétrant dans un organisme mammifère sont biotransformés afin d'être rapidement éliminés. Les systèmes enzymatiques qui interviennent lors de ces réactions se situent principalement au niveau du foie et sont inductibles. L'ajout d'un homogénat de foie de rat (S9) aux bactéries sert donc à mimer le métabolisme des mammifères qui est inexistant dans les cellules bactériennes (Mortelmans et Zieger, 2000). Le test de mutagénèse de Ames est utilisé dans l'industrie du tabac pour évaluer la cytotoxicité des condensats du tabac (Health Canada, 2004a; CORESTA, 2002; Mizusaki *et al.*, 1977; Hutton and Hackney, 1975).

Le test du NRU est un test permettant d'établir la cytotoxicité d'une substance en mesurant la viabilité et la survie des cellules exposées. Il est basé sur la capacité des cellules vivantes à incorporer le colorant rouge neutre (*Neutral Red*). Le rouge neutre est un colorant cationique faible qui pénètre aisément les membranes des cellules par diffusion non-ionique et qui s'accumule dans les lysosomes intracellulaires (Health Canada, 2004c). L'analyse du rouge neutre examine l'intégrité cellulaire de la membrane ainsi que le statut d'énergie cellulaire puisque le rouge

neutre est incorporé dans les lysosomes par un processus nécessitant de l'énergie. Des changements au niveau de la prise de rouge neutre provoqués par l'action de substances toxiques reflètent des dommages causés à l'intégrité de la membrane cellulaire et au processus d'internalisation du colorant dans les lysosomes. Ainsi, il est possible de distinguer les cellules viables des cellules endommagées ou mortes en comparant la quantité de rouge neutre incorporé dans les cellules (Health Canada, 2004c). Il est aussi possible de déterminer la CI_{50} pour chacune des substances chimiques utilisées dans le test du NRU. La CI_{50} , soit la concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire, est calculée à partir de la courbe dose-réponse établie pour chaque exposition des cellules à une substance chimique. Le test du NRU est utilisé dans l'industrie du tabac pour évaluer la cytotoxicité des condensats du tabac (Health Canada, 2004c, CORESTA, 2002, Borenfreund, 1982).

Le test *in vitro* du micronoyau est un essai bien établi pour la détection précoce des propriétés cytotoxiques et génotoxiques des substances chimiques et il a été très utilisé en toxicologie industrielle. L'évaluation des mutations chromosomiques causées par certains composés est une partie essentielle de la caractérisation du potentiel génotoxique d'une substance. À cette fin, l'induction de micronoyau dans les cultures cellulaires s'est avérée être une alternative précise et fiable (Frieauff *et al.*, 1998). Les micronoyaux sont générés au cours de la division cellulaire et sont composés de bouts de chromosomes (clastogènes) ou de chromosomes entiers (aneugènes), qui ont été brisés du noyau lors de la mitose par les agents toxiques. Ils sont détectés comme particules extranucléaires appelées micronoyaux (MN). La visualisation des MN est rendue possible grâce à l'ajout de cytochalasine B. La cytochalasine B est un membre des toxines fongiques et empêche la division cytoplasmique des cellules en bloquant la formation des microfilaments contractiles d'actine. Cela a pour effet de bloquer la division cellulaire mais, pas la séparation des noyaux. Les cellules apparaissent donc avec deux noyaux (Figure 4). Si les cellules ont subi des dommages au niveau génique, il y aura en plus la présence d'un MN (Figure 4). Le test du micronoyau consiste donc à déterminer le nombre de cellules avec micronoyau dans un échantillon cellulaire représentatif (Frieauff *et al.*, 1998).

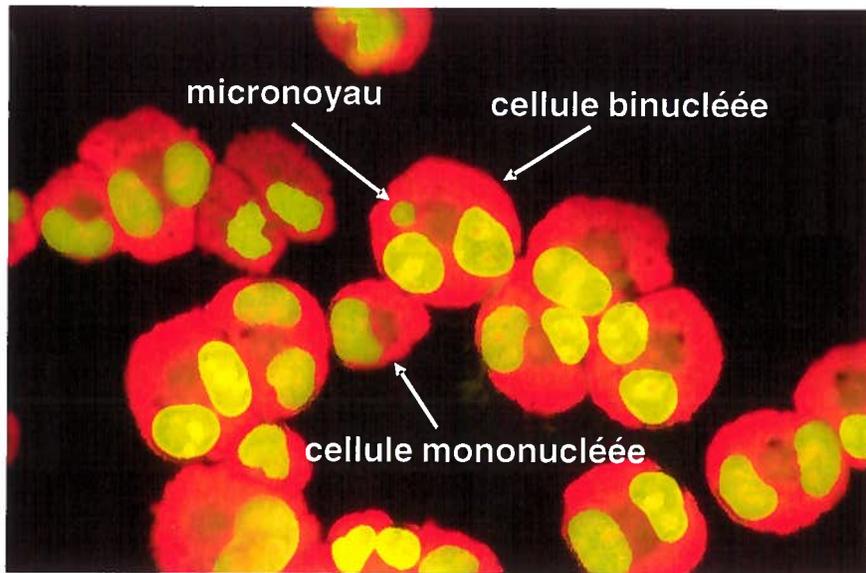


Figure 4 : Cellules mononucléées et binucléées avec et sans micronoyau, colorées à l'acridine orange. Photo prise au microscope à fluorescence, magnitude 63X.

Le test du micronoyau est utilisé depuis les années `70 où l'induction de micronoyau dans les cellules de la moelle osseuse de souris servait à déterminer la génotoxicité *in vivo* de certaines substances (Frieauff *et al.*, 1998). Depuis, il y a eu différentes innovations qui ont permis d'accélérer le temps de préparation et d'automatiser l'analyse cellulaire. Plusieurs avantages sont associés à l'utilisation du test du micronoyau. L'identification des MN dans les cellules en interphase est beaucoup plus objective que l'identification des aberrations chromosomiques dans les cellules en métaphase et la formation du personnel pour le test du micronoyau est plus simple (OECD, 2004). De plus, le comptage des MN est plus rapide que le comptage des aberrations chromosomiques et le nombre de MN comptés est de loin supérieur au nombre d'aberrations chromosomiques qu'il est possible de compter. Finalement, les MN peuvent contenir un chromosome entier, ce qui permet d'identifier les substances induisant l'aneuploïdie. Le test du micronoyau, comme le test de Ames, peut être réalisé avec ou sans la fraction S9, certaines substances nécessitant l'ajout de la fraction S9 pour être bioactives (OECD, 2004).

Plusieurs lignées cellulaires peuvent être utilisées dans le cadre de ce test : les fibroblastes de poumons de hamster Chinois (CHL/IU), les fibroblastes d'ovaire de hamster Chinois (CHO), les cellules embryonnaires de hamster Syriens (SHE) et

les fibroblastes de hamster Chinois (V79). Le IVMNT est utilisé dans l'industrie du tabac pour évaluer la cytotoxicité des condensats du tabac (Health Canada, 2004b; CORESTA, 2002; Massey *et al.*, 1998).

1.6 Toxicité des produits de combustion de l'acide chlorogénique

L'AC, une molécule de 354,31 g/mol dont la formule chimique est $C_{16}H_{18}O_9$, est formée à partir de l'acide cafféique et de l'acide quinique (Stich *et al.*, 1981). Tel que mentionné précédemment, la pyrolyse de l'AC génère principalement des composés phénoliques (le benzène, le phénol, le catéchol, l'acide benzoïque et le vinyl catéchol) qui sont responsables de l'arôme et de la saveur de la fumée du tabac (Davis et Nielsen, 1999). Les produits de combustion de l'AC ont été identifiés comme étant cytotoxiques et génotoxiques selon le IVMNT (Préfontaine *et al.*, 2006). Parmi les composés générés lors de la combustion de l'AC, la quantité de catéchol retrouvée dans la fumée a été identifiée comme étant directement proportionnelle à la quantité d'AC retrouvée dans le tabac (Schlotzhauer *et al.*, 1992). De 200 à 300 μg de catéchol, le principal co-carcinogène de la phase particulaire de la fumée du tabac, est retrouvé dans la fumée d'une cigarette (Schlotzhauer *et al.*, 1992; Hoffmann *et al.*, 1983). La co-carcinogénicité du catéchol a été démontrée via l'augmentation de la formation de tumeur cutanée lorsqu'il se retrouvait en combinaison avec le carcinogène B(a)P (Schlotzhauer *et al.*, 1992).

Une étude a montré que l'hydroquinone (aussi retrouvé dans les produits de combustion de l'AC) et le catéchol inhibent de 90% la prolifération de lymphocytes T humains alors que le phénol n'a aucun effet (Li *et al.*, 1997). Ces données démontrent l'induction d'effets immunosuppresseurs suite à l'exposition de cellules T à l'hydroquinone et au catéchol, lesquels s'avèrent aussi être génotoxiques. En effet, l'exposition de lymphocytes humains à l'hydroquinone induit la formation de MN tandis que l'exposition au catéchol et au phénol ne rapporte qu'une faible présence de MN (Robertson *et al.*, 1991). Enfin, l'hydroquinone et le catéchol ont aussi un effet important sur le cycle cellulaire des lymphocytes T en bloquant leur progression à travers le cycle cellulaire en phase G_1 (McCue *et al.*, 2003).

1.7 Identification chimique des produits de combustion de l'acide chlorogénique

1.7.1 Extraction sélective

L'extraction sélective des produits de combustion du tabac permet une séparation grossière des composés. En effet, une étude a démontré que l'utilisation de différents solvants pour traiter le tabac menait à la formation d'extraits de constitution chimiquement différente (Schlotzhauer et Chortyk, 1981). Des échantillons de tabac ont été extraits dans de l'éthanol, du méthanol et de l'acétone. Les extraits obtenus ont été séchés par lyophilisation et les résidus solides récoltés ont été fumés. Selon la polarité des solvants d'extraction, la quantité de résidus solides récoltés changeait. Plus la polarité était élevée, moins il y avait de résidus collectés. La fumée des trois extraits a été analysée par chromatographie gazeuse (GC) et l'extrait à l'éthanol a généré plus de composés phénoliques que les autres extraits (Schlotzhauer et Chortyk, 1981). Ainsi, la quantité et la composition de chaque extrait varient selon le solvant avec lequel il a été traité ainsi que la composition de la fumée d'un extrait à l'autre (Schlotzhauer et Chortyk, 1981).

1.7.2 Fractionnement et identification par Chromatographie Liquide

La chromatographie en phase liquide (LC) est une technique de séparation fine des composés d'un mélange. Cette technique peut combiner la séparation physique du chromatographe liquide à l'analyse de masse du spectromètre de masse (MS). Généralement, ses applications sont la détection spécifique et l'identification de composés chimiques contenus dans des mélanges de composés (Scott, 1994).

Le fonctionnement du LC consiste en l'injection de l'échantillon à analyser ou à fractionner, dans le LC/MS. Suite à son injection, l'échantillon injecté migre dans une colonne composée d'une phase mobile et d'une phase stationnaire. C'est cette dernière qui permet la séparation des composés de l'échantillon à analyser. La séparation des composés se fait selon la taille, la polarité, l'hydrophilie et l'affinité avec la phase stationnaire ou la contenance en métaux des composés à analyser. La colonne du LC étant couplée à un MS, les composés retrouvés dans l'échantillon

peuvent être identifiés (Scott, 1994). De plus, comme la chromatographie en phase liquide est une technique non destructive, elle permet le fractionnement de l'échantillon à des endroits bien précis du chromatogramme et permet de générer plusieurs fractions. Les fractions sont recueillies, à leur sortie du MS, dans différents tubes (Scott, 1994). Ces fractions peuvent être soumises à plusieurs autres traitements, comme par exemple une autre séparation par chromatographie selon des conditions différentes. Enfin, les fractions peuvent être testées dans des tests *in vitro* en toxicologie, d'où une combinaison intéressante entre la chimie et la toxicologie. Il est important de mentionner qu'il existe deux sortes de LC, soit un LC analytique et un LC préparatif. Le LC analytique sert à l'identification des composés d'un mélange alors que le LC préparatif sert au fractionnement du mélange. Le HPLC a déjà été utilisé dans l'identification des composés du tabac, de la fumée du tabac et des polyphénols de la fumée (Torikaiu *et al.* 2005; Li *et al.* 2003). Dans le cadre de ce projet, le HPLC-MS est utilisé pour identifier certains des composés phénoliques dans la fumée de l'AC alors que le LC-UV/MS préparatif est utilisé pour générer des fractions de composés présents dans la fumée de l'AC.

1.7.3 Identification de composés par chromatographie gazeuse

La chromatographie gazeuse (GC) est une technique utilisée pour la séparation et l'identification des composés dans un mélange, à la différence que ce sont des composés volatiles dont il est question. Le GC/MS est un appareil composé de deux parties principales soit le GC et le MS. Le mélange est donc injecté dans le GC sous forme liquide et vaporisé dès son entrée dans la colonne. Il est ensuite introduit dans un flux de gaz vecteur qui traverse la colonne enduite d'une phase stationnaire. Les composés du mélange sont poussés par le gaz vecteur et selon leur affinité plus ou moins grande avec la phase stationnaire, il y aura séparation des différents composés (Scott, 1995). Les molécules prennent chacune un temps différent (temps de rétention) pour sortir du chromatographe gazeux et entrer dans le MS qui se trouve à la sortie de la colonne. Le spectromètre de masse brise les molécules des composés en plusieurs fragments en les bombardant avec des électrons. Les différents fragments de masses sont caractéristiques de la structure du composé et sont plus ou moins l'empreinte digitale de celui-ci. À partir d'une

librairie de spectres, il est alors possible d'identifier le composé. Le GC utilisé avec un MS permet une identification plus complète et précise que chacun des deux appareils utilisés séparément (Scott, 1995).

Le GC/MS est utilisé pour identifier les composés de la fumée du tabac (Torikaiu *et al.*, 2005; Nanni *et al.*, 1990; Hirohiko *et al.*, 1981) et spécifiquement pour quantifier la plupart des composés phénoliques retrouvés dans la fumée de cigarette (Clark et Bunch, 1996, Health Canada, 1999). Dans le cadre de ce projet, le GC/MS est utilisé pour identifier les composés présents dans la fumée de l'AC.

1.8 La cytométrie en flux

Comme objectif secondaire, nous avons testé deux tests *in vitro* dans le but de trouver des méthodes plus rapides pour repérer la toxicité des produits de combustion, le temps requis pour réaliser un IVMNT étant de 2 semaines.

Le cycle cellulaire comprend quatre phases : la phase G_1 , la phase S, la phase G_2 , la phase M ainsi que l'état G_0 (souvent associée à la phase G_1). L'état G_0 est une période plus ou moins longue, au cours de laquelle la cellule est dans un état de repos non prolifératif. Les cellules vont passer à la phase G_1 sous l'effet de certains facteurs externes. La phase G_1 est la phase du cycle cellulaire dont la durée est la plus longue et la plus variable selon le type cellulaire. Le temps passé en G_1 est inversement proportionnel au taux de prolifération. En effet, les cellules s'arrêtent en G_1 jusqu'à ce que les conditions du milieu extérieur soient favorables à la prolifération. C'est au cours de cette phase que la cellule croît en taille et fabrique les protéines cytoplasmiques qui seront éventuellement divisées entre les cellules filles. La phase S est la phase au cours de laquelle la synthèse de l'ADN s'effectue. Le matériel génétique passe de $2n$ à $4n$. Cette phase est d'une durée variable, de quelques minutes à plusieurs heures. C'est au cours de cette phase qu'a lieu la transcription active des gènes et protéines. La phase G_2 est uniquement une phase de contrôle de la bonne transcription du matériel génétique. Cette phase implique des gènes et des protéines importants au bon déroulement de la mitose. Contrairement aux autres phases, la durée de la phase G_2 est extrêmement constante, courte et automatique. C'est une phase de passage entre les phases S et

M et elle est souvent associée à la phase M. La phase M (pour Mitose) est la phase où a lieu la division cellulaire et sa durée est en général très courte, inférieure à une heure. Au cours de cette phase, le contenu génétique passe de $4n$ à $2n$. Les deux cellules filles ainsi créées sont en G_1 et le cycle est bouclé (Cooper, 1999).

La cytométrie en flux peut donc être utilisée pour détecter, dans une population cellulaire, la phase dans laquelle se trouvent les cellules. Toutefois, il arrive que l'exposition des cellules à certains composés altère le bon fonctionnement du cycle. Les cellules se retrouvent alors bloquées dans une des phases du cycle. Des points de contrôles existant entre chacune des phases provoquent des pauses pendant lesquelles la fidélité de la duplication est vérifiée (Cooper, 1999). Le point de contrôle en phase G_1 implique l'action d'une protéine particulière, la p53. Lorsque des erreurs de codage surviennent au niveau de l'ADN suite à l'exposition des cellules à certains composés, la p53 bloque les cellules en phase G_1 . Un autre point de contrôle, au niveau du passage de la phase G_2 à M, implique l'intervention de la cycline B et de la cdk1, lesquelles peuvent provoquer le blocage des cellules dans la phase G_2 lorsque des erreurs sont détectés au niveau de l'ADN (Cooper, 1999).

Pour déterminer dans quelle phase du cycle cellulaire se trouvent des cellules exposées à des composés toxiques, il suffit de colorer l'ADN des cellules avec un colorant fluorescent comme l'iodure de propidium (PI), une molécule s'intercalant dans l'ADN des cellules. La fluorescence de chaque cellule est détectée par le cytomètre et sera proportionnelle à la quantité d'ADN ($2n$ ou $4n$) dans la cellule. Ainsi, les cellules en phase G_1 ($2n$) seront moins fluorescentes que les cellules en phase S (de $2n$ à $4n$) ou que les cellules en phase G_2/M ($4n$). Il est donc possible de détecter le blocage du cycle cellulaire par certaines substances selon l'accumulation des cellules dans une phase ou l'autre du cycle cellulaire. Cet essai, réalisé avec le FACS Calibur™ dans le cadre de notre projet de recherche, est assez rapide : suite à l'exposition des cellules (3 h à 20 h), quelques minutes suffisent pour colorer les cellules, les passer dans le cytomètre et visualiser graphiquement le résultat.

Un deuxième test utilisant la cytométrie en flux a été testé dans le cadre de notre objectif visant à trouver des essais plus rapides pour détecter la toxicité. Ce cytomètre en flux provient de Guava Technologies inc. et son avantage est que qu'il est petit, simple à utiliser et aisément transportable. La technologie de Guava repose sur un système de laser et de micro-capillaires capables de détecter des cellules de mammifères et de microorganismes. Les cellules marquées par un colorant fluorescent sont aspirées dans un flot de micro-capillaire, proportionnel à la grosseur d'une seule cellule, dans lequel un laser vert ou bleu de diode excite 200 pl d'échantillon contenant des cellules. Chaque cellule émet un signal qui est individuellement détecté par des photomultiplicateurs et une photodiode. Deux essais ont été réalisés à l'aide du Guava PCA[®] (*Personal Cell Analysis*), soit l'essai du ViaCount[™] et celui du Nexin[™]. Le ViaCount[™] est un essai servant à déterminer la viabilité des cellules dans un échantillon alors que le Nexin[™] est un essai servant à déterminer le pourcentage de cellules en apoptose ou nécrotique dans une population cellulaire. Ces deux essais sont assez rapides : suite à l'exposition des cellules (3h à 20h) quelques heures suffisent pour obtenir les résultats.

Le ViaCount permet d'obtenir le compte de la population cellulaire et le pourcentage de cellules viables dans une population de cellules exposées. L'essai est basé sur la différence de perméabilité des cellules à deux colorants contenus dans la solution de coloration. La viabilité est déterminée par le colorant 7-AAD (7 amino-actinomycine D) qui colore l'ADN en pénétrant dans les cellules endommagées ou mortes. Le deuxième colorant pénètre les membranes plasmiques et colore le noyau des cellules vivantes. Donc, les cellules colorées avec le 7-AAD représentent la population de cellules mortes alors que les cellules colorées avec le deuxième colorant permettent la distinction entre les cellules nucléées et les débris. Le ViaCount permet donc de distinguer entre trois populations cellulaire : les cellules vivantes, les cellules mortes et les débris.

Le Nexin permet de distinguer les cellules viables des cellules pré-apoptotiques, apoptotiques et nécrotiques. L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus important de la régulation de la croissance et de la prolifération des cellules (Cooper, 1999). C'est le processus par lequel les cellules

déclenchent leur auto destruction en réponse à un signal provenant de l'environnement ou de la cellule même. C'est une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. L'apoptose est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Contrairement à la nécrose, elle ne provoque pas d'inflammation et les membranes plasmiques ne sont pas détruites (Cooper, 1999). La cellule émet des signaux précis dont l'exposition de la phosphatidylsérine (PS) sur le feuillet externe de sa membrane plasmique, un phospholipide normalement constitutif de son feuillet interne. La présence de PS sur le feuillet externe permet la phagocytose de la cellule par les globules blancs mais, permet aussi la détection des cellules ayant amorcé le processus d'apoptose (Cooper, 1999). Ainsi, le Nexin permet la détection de l'expression de la PS sur la membrane extérieure de la cellule via un colorant, l'annexin V-PE (phosphoerythrin). Un deuxième colorant, le 7-AAD, est aussi inclus dans l'essai comme indicateur de l'intégrité structurelle de la membrane. Suite à la coloration des cellules avec l'Annexin V-PE et le 7-AAD, le cytomètre en flux Guava PCA classe les cellules selon leur intensité fluorescente moyenne. Le Nexin permet l'identification de quatre populations de cellules : les cellules non-apoptiques ou viables, les cellules dans le premier stade d'apoptose, les cellules en apoptose avancée ou mortes et les cellules nécrotiques.

Enfin, la cytométrie en flux permet, via le test du cycle cellulaire, de la viabilité et de l'apoptose, de pouvoir déterminer plus rapidement qu'avec le IVMNT, le niveau d'atteinte d'une population de cellule exposée à des produits toxiques.

1.9 Objectifs

Des études ont été menées sur la toxicologie de la fumée du tabac ou sur des composés issus du tabac (Préfontaine *et al.*, 2006; Li *et al.*, 1997; McCue *et al.*, 2003; Robertson *et al.*, 1991) et d'autres sur l'identification chimique des composés de la fumée du tabac ou de l'AC (Sharma *et al.*, 2002a et b; White *et al.*, 2001, Schlotzhauer *et al.*, 1992; Schlotzhauer et Chortyk, 1981). L'originalité de ce projet de recherche réside dans le fait que nous combinons l'étude toxicologique et chimique des produits de combustion de l'AC. L'objectif principal de ce projet de recherche est donc la caractérisation toxicologique et chimique des produits de combustion de l'acide chlorogénique. Cette caractérisation se fera via l'utilisation de différents bioessais toxicologiques *in vitro* (IVMNT, transformation blastique) et de différentes méthodes de chimie analytique et préparative (GC/MS, HPLC, LC/MS). Comme objectif secondaire, deux nouveaux bioessais *in vitro* sont réalisés dans le but de trouver des méthodes plus rapides que le IVMNT pour repérer la toxicité des produits de combustion de l'AC.

CHAPITRE 2

TOXICOLOGICAL AND CHEMICAL CHARACTERIZATION OF THE COMBUSTION PRODUCTS OF A SINGLE TOBACCO COMPONENT: CHLOROGENIC ACID

Contribution personnelle

Voici ma participation dans l'ensemble des travaux présentés. Tout d'abord elle comprend la recherche bibliographique, la planification des expérimentations et les manipulations dans le cadre des tests toxicologiques (IVMNT, test du cycle cellulaire, de viabilité, d'apoptose et de la transformation blastique). J'ai aussi réalisé la collecte et la compilation des données, l'analyse statistique puis la synthèse des résultats. Enfin, j'ai réalisé le test de la transformation blastique avec l'aide de Marlène Fortier chez INRS-IAF et les analyses chimiques qualitatives utilisant le GC/MS chez ITCAN avec l'aide du Dr Jacques Dumont. Finalement, les analyses chimiques et la fractionnement utilisant le LC/MS et le HPLC-UV/MS ont été réalisées à l'Université de Montréal par le groupe du Dr Karen Waldron.

Cet article sera soumis en 2007.

Résumé français

Nous avons étudié la fumée générée par la combustion de l'acide chlorogénique (AC), le polyphénol le plus abondant du tabac. La phase particulaire de la fumée de l'AC a été captée sur des filtres Cambridge, lesquels ont été extraits par cinq solvants différents : le diméthylsulfoxyde (DMSO), l'eau distillée (H₂O), le méthanol (MeOH), le dichlorométhane (DCM) et l'acétate d'éthyle (EA). Dans le but d'en caractériser les effets toxiques, les cinq extraits ainsi générés ont été étudiés par le test *in vitro* du micronoyau (IVMNT), la transformation lymphoblastique (TL) et l'analyse du cycle cellulaire. L'extrait DCM génère la plus forte toxicité d'après le IVMNT et la plus forte inhibition des cellules dans la phase G₁ d'après le test du cycle cellulaire. L'extrait DMSO provoque l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T dans la TL. Le fractionnement de l'extrait DMSO par LC (*Liquid Chromatography*) a donné trois fractions de constitutions chimiquement différentes qui ont été testées dans le IVMNT et le cycle cellulaire. La fraction induisant la plus forte toxicité d'après le IVMNT et la plus forte inhibition des cellules dans la phase G₁ d'après le test du cycle cellulaire est celle contenant le catéchol et ses dérivés. Cette étude démontre que la combustion de l'AC génère des produits toxiques dans la fumée, dont le plus abondant serait le catéchol.

Article

Title: Toxicological and Chemical Characterization of the Combustion Products of a Single Tobacco Component: Chlorogenic Acid.

Authors : Lacasse Martine¹⁻²; Morin André², Fournier Michel¹, Fortier Marlène¹ and Waldron Karen³

¹ INRS-Institut Armand-Frappier
245, boul Hymus
Pointe-Claire (Québec) H9R 1G6
Canada

² Impérial Tobacco Canada Ltd
3711, rue Saint-Antoine Ouest
Montréal (Québec) H4C 3P6

³ Université de Montréal
Département de Chimie, Faculté des arts et des sciences
C.P. 6128, succursale Centre-Ville
Montréal (Québec) H3C 3J7

Abbreviations:

ACN, acetonitrile; Ac, acetic acid; ANCOVA, analysis of covariance; CA, chlorogenic acid; CSC, cigarette smoke condensate; DCM, dichloromethane; DMEM, Dubelcco's modified Eagle medium; DMSO, dimethylsulfoxide; DPM, dry particulate matter; EA, ethyl acetate; EtOH, ethanol; HBSS, Hanks balanced salted solution; H₂O, distilled water; HPLC, high pressure liquid chromatography; ITCAN, Imperial Tobacco Canada Limited; IVMNT, *in vitro* micronucleus test; LC, liquid chromatography; LT, lymphoblastic transformation; MeOH, methanol; MS, mass spectrometry, PI, picoliter; TPM, total particulate matter.

Abstract

This study assessed the toxicity of the combustion of the most abundant polyphenol in the tobacco plant, chlorogenic acid (CA). The combustion products of CA were collected onto Cambridge filters and extracted with the following five solvents: dimethyl sulfoxide (DMSO), water (H₂O), methanol (MeOH), dichloromethane (DCM) and ethyl acetate (EA). The five extracts thus generated were tested by *In Vitro* Micronucleus Test (IVMNT), lymphoblastic proliferation test (LP) and cell cycle analysis. The DCM extract induced the highest toxicity as per the IVMNT and rapidly inhibited cell proliferation as per the cell cycle analysis. DMSO extract inhibited the T lymphocytes proliferation in the LP test. Fractionation of the DMSO extract was carried out by preparative Liquid Chromatography (LC). The latter resulted in three fractions of different chemical compositions that were assessed by the IVMNT and cell cycle analysis. The fraction inducing the highest toxicity as per the IVMNT and inhibiting the cell cycle was identified by analytical HPLC/MS (High Pressure Liquid Chromatography/Mass Spectrometry) to contain catechol and its derivatives. The present study shows that the combustion of CA gives rise to toxic compounds, in which the most abundant is catechol.

Introduction

The tobacco plant consists of about 4000 compounds which, during the combustion process, generate about 5000 compounds in the smoke (Davis and Nielsen, 1999). A list of cigarette smoke toxicants is published annually but it does not give the relative toxicity of all the compounds found in smoke (Rodgman and Green, 2003). As it is well recognized that smoking can cause some diseases, the findings of relative toxicity of more tobacco smoke compounds is relevant.

Among the major groups of constituents found in tobacco, the polyphenol group accounts for about 10 % of the dry leaf weight (Stedman, 1968; Huber, 1989). The major polyphenol compounds are chlorogenic acid (CA), rutin and scopoletin (Davis and Nielsen, 1999). Among polyphenols, CA is the most abundant single constituent and it represents about 2.5 to 8% of leaf dry weight of the tobacco plant (Wynder and Hoffmann, 1967, Runeckles, 1968). Combustion of this polyphenolic tobacco constituent principally generates catechol, phenol, hydroquinone, quinide, benzene and benzoic acid (Sharma *et al.*, 2002; Schlotzhauer *et al.*, 1992, Schlotzhauer *et al.*, 1982). Some of those phenolic compounds were found to be toxic (McCue *et al.*, 2003; Schlotzhauer *et al.*, 1992; Robertson *et al.*, 1991). Moreover, catechol and phenol were found to enhance carcinogenic processes induced by other compounds such as polynuclear aromatic hydrocarbons (Hoffmann *et al.*, 1983).

While some studies reported the identification of components found in the smoke of CA (Sharma *et al.*, 2002; Schlotzhauer *et al.*, 1992; Sakuma *et al.*, 1981), others reported toxicological data on single tobacco smoke components (Préfontaine *et al.*, 2006; Poirier *et al.*, 2002; McCue *et al.*, 2003; Li *et al.*, 1997 and 1996). Therefore, this project shows a unique approach which consists on the combination of analytical chemistry to *in vitro* toxicological analysis to expand knowledge on toxicity of one single tobacco component and its smoke constituents. The aim of our study is to characterize the toxicity of the combustion products of CA by *in vitro* toxicological assays and to characterize and identify toxic compounds found in its smoke by analytical chemistry techniques. Toxicological analyses were assessed by

the *In Vitro* Micronucleus Test, which is recommended by the CORESTA and Health Canada for tobacco smoke studies, the cell cycle analysis and the lymphoblastic proliferation test. Analytical chemistry techniques consisted of HPLC, GC/MS and HPLC/MS.

Materials and Methods

Chemicals

Chlorogenic acid (CA) (CAS 327-97-9) was purchased from Sigma-Aldrich (St.Louis, MO) and was of 95% purity. Glass wool (Pyrex[®] brand wool filtering fiber) was purchased from Corning (NY). The HPLC grade solvents used for the filter extraction were DMSO, MeOH, DCM and EA and were purchased at Fisher Scientific (Whitby, Ontario). Water used for the filter extraction was distilled water. Each extract resulted from the pooling of three Cambridge filters extraction solution. Extract solutions were aliquoted in 1.5 ml vials and kept in the dark at -80°C.

For combustion repeatability study using HPCL, acetonitrile (ACN), acetic acid (Ac), formic acid and MeOH were supplied by Fisher Scientific (Whitby, Ontario). Water was obtained from a Milli-Q[®] system, which consisted of a carbon cartridge, two high-capacity mixed ion exchange cartridges and a 0.45 µm filter (Chromatographic Specialties inc. Brockville, Ontario). The following standard compounds: hydroquinone (H; CAS registry No. 123-31-9), catechol (C; 120-80-9), resorcinol (R; 180-46-3), phenol (P; 108-95-2), m-cresol (m-C; 108-39-4), p-cresol (p-C; 106-44-5) and o-cresol (o-C; 95-48-7) were supplied by Sigma-Aldrich (St-Louis, MO) and were of 99.0% purity.

Sample preparation

Aliquots of 0.5 g chlorogenic acid dissolved in 5 ml of pure MeOH (Fisher Scientific, Whitby, Ontario) were prepared using a vortex. Then, the solution was deposited onto a matrix of 0.5 g of glass wool (Pyrex[®] brand wool filtering fiber, Corning, NY) cut into little pieces. Adsorbed CA was stored for at least 72 h in the conditioned smoking room (60% relative humidity/ 22.5°C) in order to let the MeOH evaporate. Following the storage period, as some solution of CA had fall on the bottom of the Petri, the weight of CA adsorbed on the matrix was determined to ±1.0 mg by subtracting the glass wool matrix and Petri dish weight from the total weight of the sample (matrix, CA and Petri dish weight).

Combustion of a single component and collection of the particulate phase of its smoke

The CA sample adsorbed onto glass wool was introduced into a quartz combustion tube (outer dimensions: 26.5 X 1.2 cm, wall thickness: 1 mm) without being compressed too much (Figure 1a). The John Payne Tar Predictor (John Payne Machinery Spares Ltd., Winchester, UK) was used to burn and collect the combustion products from the particulate phase of pure tobacco components. The quartz tube that contained the CA sample was automatically driven into the furnace where combustion was conducted at $640^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ for 2 min (Figure 1b). During combustion, atmospheric air was drawn through the quartz tube at 1.8l/min, forming smoke that passed through the Cambridge filter (diameter 55 mm, Borgwaldt, Richmond, Virginia) which trapped the particulate phase of the smoke, or total particulate matter (TPM) (ITCAN, 1982). Silicone grease was used to avoid leaking of the tubing at specific locations.

The Cambridge filter was weighed to four decimal places before and after combustion to determine the amount of collected TPM. The particulate matter collected on the Cambridge filter was extracted under vacuum, using a Büchner funnel, by adding drop-wise a volume of solvent. For DMSO extraction, the volume of DMSO used was that needed to obtain a specific concentration of 15 mg/ml of TPM assuming 100% extraction efficiency. For the other solvents, the extraction volume was fixed at 10 ml per filter then the solvent was evaporated using either a lyophiliser (FreeZone 4.5 L Benchtop Freeze Dry System, Labconco, Kansas, Missouri) or a rotovap (Rotovapor-R, Büchi, Switzerland). The dry particulate matter (DPM), which refers to the compounds remaining after the evaporation of the solvent and of water, were re-suspended in DMSO to give a final concentration of 15 mg/ml of DPM for the H₂O, MeOH and EA extracts and 5 mg/ml for the DCM extract. A more dilute solution of the DCM extract was necessary to maintain a manageable volume since very little DPM was obtained.

Mammalian cell cultures

The cellular lineage used for the IVMNT assay was an internationally registered V79 Chinese hamster cell line (lung fibroblast) obtained from the

European collection of Cell Cultures (V79 86041102 lot 04/C/016). Cells were cultured in complete culture medium (Dulbecco Modified Eagle Medium, DMEM; Gibco, Grand Island, NY) supplemented with 10% v/v heat inactivated Fetal Bovine Serum (FBS; Gibco) and 0.5% v/v penicillin/streptomycin (50 units/ml, 50 µg/ml; Gibco). Cells were resuspended by trypsinization (0.1% Trypsin, 1.06 mM EDTA; Gibco) at 37°C. Subcultivation of cells was performed two times per week (1.0 to 2.0 X 10⁵ cells) into a 75cm² Corning flask (Corning, NY).

***In Vitro* Micronucleus Test**

The IVMNT was performed with V79 Chinese hamster fibroblast cells without metabolic activation. Cells were grown in 25cm² flasks at a concentration of 5.0 X 10⁵ cells/ml in 10 ml of complete DMEM for 24h. The complete DMEM was replaced by complete DMEM containing different concentrations of the extracts. The test compounds (extracts) were prepared in-house as described in the combustion procedure. Cells were exposed for 3h to 5, 10, 15 and 20 µg of DPM or TPM per ml of complete DMEM. The positive control was mitomycin C (MMC, Sigma-Aldrich; 0.8 µg/mL) and negative control was DMSO (1% v/v in DMEM). After the 3h exposure, cells were rinsed twice with Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco) and re-incubated 17 h in complete DMEM containing cytochalasin B at 3 µg/mL. Cells were harvested by trypsinization and resuspended in culture medium at 1.0 X 10⁵ cells/ml and centrifuged onto microscopic slides at 1200 rpm for 8 min. using a Cytospin 3 (Shandon, UK). Slides were air dried, fixed in 90% methanol (9 min at -20°C) and stained with Acridine Orange solution (30s; 12.5 mg/100ml 1X PBS). Slides were scored at 400x magnification according to Fenech *et al.* (2003) criteria. The percentage of micronuclei was calculated by the number of binucleated cells with a micronucleus on a total of 1000 binucleated cells. A micronucleus is a particle surrounded by distinct borders, having a maximum of one third of the size of the main nucleus and lying inside the cytoplasm (Friauff *et al.*, 1998). The percentage of cytotoxicity was calculated by using the CBPI (Cytokinesis-Block Proliferation Index) (Fenech *et al.*, 2003). The average and standard deviation were calculated from two replicate cultures per extract dose after subtracting the DMSO control background.

Cell cycle assay

V79 fibroblast cell suspensions exposed to extracts in the IVMNT assay were kept after the test. They were all adjusted to give the same concentration (as per the lowest sample concentration measured), fixed in 250 μ l of cold 70% ethanol (EtOH) and kept at 4°C until utilization.

To perform the cell cycle assay, fixed cells were rinsed twice in cold 1X PBS (Gibco) with 2% serum by centrifugation at 310 g at 4°C for 7 min. The supernatant was removed and 500 μ l of the staining solution was added to each sample. The staining solution consisted of propidium iodide (PI, Sigma-Aldrich; 50 μ g/ml), RNase (Sigma-Aldrich; 100 μ g/ml) and 1X PBS. The data analysis was acquired by the flow cytometer FACSCalibur™ system from Becton Dickinson (BD) with the software CellQuest Pro.

Lymphoblastic transformation

C57BL/6 female mice, obtained from Charles River Canada Inc. (Qc, Canada) weighing between 12 to 15 g, were placed in an exposure room with an automatic 12 h light/dark cycle and fed with a standard rodent diet and tap water *ad libitum*. At 11 weeks of age, three mice were killed by CO₂ inhalation and the spleens were aseptically removed and placed in RPMI 1640 medium with 10% v/v heat inactivated fetal bovine serum (Sigma Aldrich, MO,USA), 1% v/v penicillin/streptomycin (Sigma Aldrich, St-Louis, MO) and 10 mM HEPES (Sigma Aldrich, St-Louis, MO) and homogenized. The cell suspensions were then filtered through nylon wool into Pasteur pipettes, washed two times in supplemented RPMI 1640 medium, and then retrieved by centrifugation at 1200 rpm for 10 min. Cells were resuspended in supplemented RPMI 1640 medium. The concentration of murine lymphocytes was adjusted at 5 x 10⁶ cells/ml. Cell viability was determined by trypan blue dye exclusion using a light microscope before culturing the cells.

Blood came from volunteers recruited under a protocol approved by the INRS Review Ethics Board delivered to Dr Denis Girard for immunological *in vitro* studies

(INRS-IAF, Pointe-Claire, Qc). Blood was collected in tubes containing heparin as anticoagulant, and was diluted with an equal volume of PBS (Sigma Aldrich, St-Louis, MO). A 6 ml volume of diluted blood was gently layered over 3ml Lympholyte[®]-H, into a centrifuge tube. The solution was centrifuged 20 min at 800 g at room temperature. After the centrifugation, the lymphocytes layer was well defined at the interface of medium and Lympholyte[®]-H while the red cells formed a pellet in the bottom of the tube. Lymphocytes were removed with a Pasteur pipette, put in a new centrifugation tube and diluted with complete medium. The lymphocyte solution was centrifuged 10 min at 800 g to pellet the lymphocytes and the supernatant was discarded. Lymphocytes were washed twice and then the concentration was adjusted at 5×10^6 cells/ml of complete medium.

Lymphocytes (human and murine) were exposed to DMSO extract at final concentrations of 2.5, 5, 10, 15, 20 and 25 $\mu\text{g/ml}$, in flat bottom 96-well plates. 100 μl of cells (5×10^5), 100 μl of Concanavalin A (Sigma Aldrich, MO, USA) at a final concentration of 2.5 $\mu\text{g/ml}$, and 10 μl of each dosage concentration of the DMSO extract were plated under sterile conditions. The stock solution of DMSO extract was 21 times the final concentration of exposure since the step of preparation involved a 1:21 dilution to get the final concentrations. The cells were incubated for 48 h at 37°C with 5% CO_2 . A quantity of 0.5 μCi of [³H]-tritiated thymidine (6.7 Ci/mmol; ICN, Mississauga, Ontario) was then added to each well, and the plates were further incubated for 18 h at 37°C with 5% CO_2 . The cells were then filtered using a Titertech Cell Harvester, and the incorporation of ³H-methyl-thymidine was measured using a RackBeta from LKB (Turku, Finland) scintillation counter. The results were expressed in disintegrations per minute (DPM) and triplicates were averaged (Brousseau *et al.* 1998).

Combustion repeatability study

An HPLC system was used to determine the repeatability of the generation of the combustion products of CA. The instrument consisted of a Waters 2695 Separation Module with a Waters 715 Ultra Wisp automatic injector (Milford, Massachusetts). Detection was achieved with a Waters 2475 Multi wavelength fluorescence detector and a Waters 2487 Dual wavelength Absorbance detector.

Phenolic compounds were separated on a Waters Spherisorb 5 μ m, ODS2 analytical column (4,6 mm i.d. X 150 mm long).

The mobile phase was a mixture of aqueous 1% (v/v) Ac (solvent A) and 1% (v/v) Ac in ACN (solvent B). A 1.00 mg/ml stock solution of each standard was prepared in 1% Ac (ITCAN method 23, 2004). From the stock solutions, six working solutions, ranging from 0 to 50 μ g/ml, were prepared in 1% Ac, filtered through a 0.45 μ m filter and transferred into 2ml amber vials (Table I). A 20 μ l volume of each working solution was injected in duplicate and a calibration curve was made by plotting the concentration of the working solutions versus their respective peak areas (ITCAN method 23, 2004 and Health Canada, 1999).

Following the calibration, the HPLC system was used to assess the repeatability of the generation of the combustion products by the JPTP. Four different combustions were carried out and a quarter of each Cambridge filter (with the combustion products of CA trapped on it) was extracted in 10 ml of 1% (v/v) aqueous Ac during 30 min on an orbital shaker. The four extracts, obtained from the extraction of one quarter of the Cambridge filter, were filtered through a 0.45 μ m filter, transferred into 2 ml amber vials and analyzed. 10 μ l of each extract was injected with mobile phase into the column at a flow rate of 1.2 ml/min, which was maintained at 30°C. The program of the Multi wavelength fluorescence detector was as presented in Table II and the gradient elution program used for the phenolic separation consisted of 1% (v/v) aqueous Ac and ACN (Table III). For quality control, the working solutions, as well as a blank (1% aqueous Ac), were also injected at regular intervals to validate the calibration of the apparatus. The identification of phenolic compounds of the four combustion samples was achieved by comparing their chromatograms with the chromatograms obtained from the working solutions. Quantification was achieved by external calibration (Health Canada, 1999, Risner and Cash, 1990).

GC/MS analysis for smoke compounds identification

An Agilent Technologies 6890 Network Gas Chromatography system (Palo Alto, CA) directly interfaced with an Agilent 5973 Network Mass Selective Detector (MSD) was used to separate and identify the phenolic components. The instrument was controlled by G1701 DA MSD ChemStation software, version D.00.01. Injections were made with an Agilent 7683 series automatic injector equipped with an Agilent 5181-1267 syringe. Separation was accomplished on a DB-WAXTR column (0.32 mm i.d. X 60 m, 0.25 μm film thickness) in a temperature gradient mode.

The samples analyzed were the DMSO, H₂O, MeOH, DCM and EA extracts of the CA combustion products (generated as described in the combustion method) redissolved in DMSO. The extracts were transferred into 2 ml amber vials and 1 μl of each sample was injected at 250°C in splitless mode at a helium flow rate of 1.2 ml/min. The initial oven temperature was 40°C. It was held for 6 min and then increased to 250°C at a rate of 10°C/min. Then, the temperature was maintained at 250°C for 75 min. The extracts were analyzed for identification by the MSD in negative ion mode.

Analytical HPLC/MS

An analytical HPLC/MS system was used for the investigation of caffeine content. The instrument consisted of an Agilent Technologies 1100 Liquid Chromatograph directly interfaced with a Time-of-Flight Mass Spectrometer (TOFMS) from Agilent. The instrument was controlled by Agilent TOF software, version A101.01, and the data analyses were processed by Analyst QS software (Agilent Technologies). Injections of 1 μl (0.25 μg of product per injection) were performed on a Gemini C₆-phenyl column (4.6 mm i.d. X 150 mm; 5 μm film thickness). The mobile phase consisted of 0,1% (v/v) aqueous formic acid (solvent A) and ACN (solvent B).

A DMSO extract and three different DCM extracts were injected onto the Agilent 1100 system and separated at a flow rate of 0.5 ml/min. The presence of

caffeine content was confirmed by retention time and mass-to-charge ratio (m/z) in reference to a standard caffeine sample.

Preparative LC fractionation

The preparative LC system used for the fractionation of the DMSO extract consisted of a Gilson 215 Liquid Chromatography Handler with UV absorbance detection (Middletown, WI) directly interfaced with an MSQ Single Quadrupole Mass Spectrometer from Thermo Electron (Waltham, MA). The instrument was controlled by XCaliber software, version 1.3 (Thermo Electron). Injections were made into the mobile phase, having a flow rate of 15 ml/min on an Alltech preparative Prevail C-18 column (22 mm i.d. X 250 mm length; 5 μ m particles) (Lexington, Kentucky). The mobile phase consisted of 0.1% (v/v) aqueous formic acid (solvent A) and methanol (solvent B).

To fractionate the DMSO extract (by preparative LC), two separate injections of 1.8 ml (27 mg each) were made on the Gilson LC system. Both the UV and MS signals were monitored. Fractions of 8 ml each were collected every 32 s into borosilicate disposable culture tubes (10 X 100 mm; Fisher Scientific) and then pooled to give three major fractions spanning the following time intervals: 0-18 min, 18-38 min and 38-57 min. The second injection was treated identically and pooled with the first. Each major fraction was desiccated and weighed: 39.5 mg of product was obtained for the first pooled fraction, 22.5 mg of product was obtained for the second pooled fraction and 7.9 mg of product was obtained for the third pooled fraction. Samples were kept at -80°C in clear glass vials until utilization. 29% more material was collected than what was injected (69.9 mg collected vs 54 mg injected) probably due to residual DMSO in the first fraction.

Statistical analysis

Toxicological data obtained from the IVMNT (percentage of genotoxicity and of cytotoxicity separately) was analyzed using XLSTAT software, version 7.5 (Addinsoft[®], NY). The results were tested for comparison of linear regression

between different groups, which were whole extracts or fractions, using an analysis of covariance (ANCOVA). The percentages of genotoxicity and of cytotoxicity were taken as the direct quantitative variable, the dose of exposure as the quantitative dependent covariable while the extract or the fraction was taken as the qualitative covariable for two repetitions. The ANCOVA compared the dose-response linear regression between each extract and fraction. Significant differences between extracts and fractions were determined by the Duncan's multiple comparison test and were considered significant when $p < 0.05$. The genotoxicity background generated by the control solvent (1% DMSO) was subtracted from genotoxicity percentage values of other extracts.

In the lymphoblastic transformation assay, data were presented as mean \pm SD (three subjects per species and three readings per dose) and the dose-response curves represented the percentage of inhibition of the transformation according to the dose of exposure. The slopes of the two curves were compared and tested for difference (Duncan's multiple comparison test) in a confidence range of 95%.

Results

Repeatability of the generation of the extracts

The first step of our study was to determine the repeatability of the generation of the combustion products of CA. The repeatability was assessed by measuring and comparing the phenol content of four different extracts by HPLC with fluorescence detection using the existing method for the phenol determination and by measuring and comparing the genotoxicity and cytotoxicity between three different extracts in the IVMNT.

The TPM collected on one quarter of a Cambridge filter was extracted with 1% Ac which is known to extract phenolic compounds well. The phenolic content was measured by comparing peak area to standard calibration curve. The HPLC analysis showed that the content of hydroquinone, resorcinol, catechol and phenol (reported as a function of the quantity of TPM extracted per quarter filter) varied with an average coefficient of variation of 15.4% (%CV ranging from 9.8 to 27.5%) (Table IV). The concentration of p-cresol was less than the limit of quantification, so this value was not taken into account. To evaluate the proportion of each compound, their content was normalized relative to hydroquinone (Table V) and varied with an average coefficient of variation of 11.1% (%CV ranging from 7.2 to 19.0).

The IVMNT showed that, even if the phenol content varied with an average of 15.4 %, the percentage of genotoxicity and the percentage of cytotoxicity (Figure 3a and 3b) were not affected. As per the ANCOVA analyses, no statistically significant difference between the three extracts generated from three independent combustions of CA was found.

Assessment of genotoxicity and cytotoxicity

The geno- and cytotoxicity of the five extracts resulting from extraction by five solvents and of the three fractions resulting from DMSO extract fractionation were assessed by the IVMNT on V79 cells without metabolic activation (S9 fraction).

Among the five extracts tested, the DCM extract exhibited a statistically significant difference in the percentage of genotoxicity and of cytotoxicity (Figures 4a and 4b). The percentage of genotoxicity of the DCM extract reached $5.8\% \pm 2.0\%$ and its percentage of cytotoxicity reached $83.6\% \pm 9.0$, both at $20 \mu\text{g/ml}$. Differences between extracts were considered significant when $p < 0.05$. The negative values found in the percentage of cytotoxicity reflected cell proliferation (Figure 4b).

Among the three major fractions tested, fraction 2 exhibited a statistically significant difference in the percentage of genotoxicity and of cytotoxicity (Figures 5a and 5b). The percentage of genotoxicity and of cytotoxicity of fraction 2 reached, respectively, $4.3\% \pm 1.0$ and $93.7\% \pm 1.0$, both at $35 \mu\text{g/ml}$. The unfractionated DMSO extract exhibited also a statistically significant difference in the percentage of genotoxicity and cytotoxicity, which were of $6.7\% \pm 0.9$ and $95.0\% \pm 1.2$ respectively. Fraction 3 exhibited a statistically significant difference in the percentage of cytotoxicity, which was $75.7\% \pm 7.0$. Data were analyzed using linear regression and ANCOVA.

Lymphoblastic proliferation

Human and mice lymphocytes proliferations were exposed to various doses of DMSO extract (Figure 6). The inhibition of the human and mice lymphocytes reached $97.0\% \pm 2.5$ and $99.5\% \pm 0.5$ respectively, both at $25 \mu\text{g/ml}$, the highest dose. At doses of 2.5 and $5 \mu\text{g/ml}$, there was no significant inhibition of the proliferation as the regression lines are in the negative. The concentrations that inhibited 50% of the human and mice lymphocytes proliferation were $11.8 \mu\text{g/ml} \pm 2.6 \mu\text{g/ml}$ and $15.4 \mu\text{g/ml} \pm 2.6 \mu\text{g/ml}$, respectively. There was no statistically significant difference between human and mice lymphocytes proliferation (at any doses) or IC_{50} values. As there is no significant differences between human and mice lymphocytes proliferation inhibition, further experiments could only used the mice model.

Cell cycle investigation

Harvested V79 cells from the IVMNT (exposed to the five extracts and to the three fractions) were assessed by the cell cycle assay using flow cytometry. As the dose of exposure increased, an increase in cells in the G₁/G₀ phase and slight increase in the apoptotic phase was observed for all extracts, while the percentage of cells in the S and G₂/M phases decreased (Figures 7a to 7e). The DCM extract showed the largest increase of the percentage of cells in G₁/G₀ phase, up to a dose of 15 µg/ml where it reached 68.8% ± 5.5. Then, at 20 µg/ml, the percentage of cells decreased to 54.0% ± 8.5 while the percentage of apoptotic cells increased to 40.2% ± 7.3, at 20 µg/ml.

Cells exposed to the three fractions and to the whole DMSO extract followed the same pattern. As the dose of exposure increased, the percentage of cells in the G₁/G₀ and apoptotic phases increased and the percentage in the S and G₂/M phases decreased (Figure 8a to 8d). Fraction 2 exhibited the largest increase in percentage of cells in G₁/G₀ phase, which reached 75.5% ± 2.9 at a dose of 10 µg/ml compare to fraction 1 and 3 which only reached about 40.0% at a dose of 10 µg/ml. Then, at 35 µg/ml, the percentage of cells in G₁/G₀ for fraction 2 decreased to 50.8 % ± 3.3 while the apoptotic percentage of cells increased to 45.4% ± 3.5, at a dose of 35 µg/ml.

However, mice and human T lymphocytes exposed the whole DMSO extract are mainly found in the S phase. Mice and human T cells reached 41 % and 51 % at dose of 5 µg/ml (Figure 9). As the dose of exposure increased, the percentage of cells in S phase decreased but increased in the apoptotic phase. At 20 µg/ml, the percentage of mice and human T cells reached 72 % and 52 % (Figure 9).

GC/MS analysis

DMSO, H₂O, MeOH, DCM and EA extracts were qualitatively analyzed by GC/MS. The control was a mixture of DMSO, H₂O, MeOH, DCM and EA. The chromatogram of the control (Figure 10) showed the presence of phenol and catechol which may be explained because of the order of injection of the sample

(carry-over). The main compounds found in all extracts were phenol, benzoic acid, catechol and hydroquinone (Table VI). There were minor compounds found in only one or in some of the extracts. Decene, dodecanol and caffeine were found only in the MeOH, EA and DCM extracts, respectively. Cyclododecane was found in both MeOH and DMC extracts. Propenoic acid was found in both DCM and EA extracts and quinic acid was found in all except in the H₂O extract.

LC/MS analysis

The DMSO and DCM extracts were assessed for their caffeine content by analytical HPLC/MS and both extracts exhibited caffeine (Table VII). However, DCM extract contained a higher quantity of caffeine.

Analytical HPLC/MS analysis of whole DMSO extract (Figure 2) revealed more than forty different compounds. Based on this high resolution separation, a preparative LC-UV/MS experiment was performed to fractionate the whole DMSO extract into 3 fractions: the first contains mostly hydrophilic compounds, the second the catechols and the third, the most hydrophobic compounds. The approximate distribution of components among the three fractions is shown by the overlaid dotted lines in figure 2.

Discussion and Conclusion

The various toxicological studies carried out on tobacco smoke have been generally related to the combustion products of whole tobacco (Frenesius, 1985; Rodgman and Green, 2003; DeMarini, 2004). The aim of our study was to characterize the toxicity of the combustion products of one individual tobacco component, chlorogenic acid (CA), which is the major polyphenolic component of tobacco. Some toxicological studies have been carried out on the genotoxicity of CA (Stich *et al.*, 1981) and its combustion products (Préfontaine *et al.*, 2006; Schlotzhauer *et al.*, 1992; Hoffmann *et al.*, 1983). Furthermore, some chemical studies have revealed the identification of CA combustion products (Sharma *et al.*, 2002; Sakuma *et al.*, 1981). Our approach is unique in that we combined a toxicological study of the products of combustion of CA with the chemical identification of the main products of combustion.

To assess the reproducibility of the combustion method, four combustions of CA were performed and their phenolic content was compared (Table IV and V). The *p*-cresol content will not be discussed because its abundance is below the limit of quantification. The average coefficient of variation of the HPLC analysis of phenols was 15.4% (Table IV). This variation of 15.4% did not translate to a variation in bioactivity assessed by the IVMNT assay. The IVMNT data (Figure 3a and 3b) showed that the percentage of genotoxicity and cytotoxicity among different DMSO extracts were not significantly different as per the Duncan's multiple comparison test. This prompted us to continue with this method of combustion, using the JPTP. However, to account for the variability between combustions (CV=15.4%), we pooled three extracts from three different combustions to obtain one final pooled extract, divided into equal aliquots to do biological assays. Subsequently, each pooled extract was toxicologically and chemically analyzed.

Selective solvent extraction was used to initiate the chemical characterization of the combustion products of CA. The five solvents used were DMSO, H₂O, MeOH, DCM and EA yielding five different extracts. These solvents were used due to a difference in their respective polarity index values. Schlotzhauer and Chortyk (1981)

showed that tobacco directly extracted with solvents of various polarity yielded extracts of various chemical composition. Subsequently, the toxicity of the five different extracts were assessed by the IVMNT and the cell cycle assay. Only the DMSO extract was tested by the lymphoblastic proliferation assay. The five extracts were then analyzed by GC/MS for identification and comparison of their chemical composition.

Finally, analytical HPLC/MS was used to identify as many compounds as possible in the whole DMSO extract and serve as a precursor to preparative LC, which was used to fractionate the extract. The whole DMSO extract was fractionated and pooled to give three major fractions, which were tested by the IVMNT and cell cycle assays to determine the most bioactive fraction. The three fractions were re-analyzed by analytical HPLC/MS in order to identify their chemical composition.

The IVMNT was conducted on Chinese fibroblast V79 cells. Among the five extracts tested, the DCM extract most significantly affected cell genotoxicity and cytotoxicity at doses ranging from 5.0 to 20.0 $\mu\text{g/ml}$ (Figure 4a and 4b). The increased level of toxicity generated by the DCM extract may have been due to the presence of compounds only extracted by DCM or certain compounds extracted in higher quantities by DCM as opposed to the other solvents used.

Among the three fractions generated from the whole DMSO extract, fraction 2 significantly affected cell genotoxicity and both fraction 2 and 3 significantly affected cell cytotoxicity in the IVMNT (Figure 5a and 5b). The increased level of toxicity generated by fraction 2, as opposed to fractions 1 and 3, may have been due to the presence of the most bioactive compounds (phenolic compounds) found in that fraction. The combustion of CA has been reported to yield phenol, catechol, vinyl catechol, benzene and benzoic acid as major products (Sharma *et al.*, 2002; Sakuma *et al.*, 1982). Among these products, the bioactivity of catechol is well known and catechol has been identified as a toxic co-carcinogen component (Gopalakrishna *et al.*, 1994; Schlotzhauer *et al.*, 1992; Robertson *et al.*, 1991; Hoffmann *et al.*, 1983; Schlotzhauer *et al.*, 1982). Moreover, combusted CA was found to produce the highest yields of catechol and ethyl-catechol and a directly proportional relationship

was established between CA found in tobacco and catechol found in smoke (Schlotzhauer *et al.*, 1992; Schlotzhauer *et al.*, 1982). It was also reported that, assuming that the composition of the compounds obtained by the pyrolysis of pure CA is the same as that of the compounds obtained by pyrolysis of the CA in tobacco, about 30% of catechol and phenol in the pyrolysis compounds of tobacco could be derived from the CA present in tobacco, since the CA content of tobacco is 2.64% (Sakuma *et al.*, 1982). In addition, catechol, benzoquinone, hydroquinone and phenol were identified to induce genotoxicity in the form of micronuclei in human lymphocytes (Schlotzhauer *et al.*, 1992; Robertson *et al.*, 1991). Therefore, it would be interesting to confirm that catechol generated during the combustion of pure CA is indeed responsible for toxicity.

The GC/MS analysis on the five extracts showed the presence of phenolic compounds such as catechol, phenol, hydroquinone, ethyl catechol, benzoic acid and quinic acid in most extracts (Table VI), which is consistent with the studies previously mentioned. The presence of different compounds from one extract to the other is a function of the different extraction strengths. According to their miscibility and polarity index, DMSO, H₂O and MeOH are hydrophilic solvents while DCM and EA are more hydrophobic solvents. Therefore, the most hydrophilic products are preferentially extracted by DMSO, H₂O and MeOH, whereas less hydrophilic products are found in the DCM and EA extracts. Although the DCM extract showed an increased level of toxicity by the IVMNT, it did not contain any identified compounds that were not also present in some of the other extracts. As phenolic compounds are eluted between hydrophilic and hydrophobic compounds, they are found in every extracts. Therefore, quantitative analysis of the phenolic compounds of the extracts needs to be evaluated as the amount in which they are found may vary.

However, caffeine was identified in the DCM extract by GC/MS and in both DMSO and DCM extracts by HPLC/MS. The presence of caffeine in the extract was determined to originate from impurities in the chlorogenic acid reagent (> 95% pure according to the manufacturer) used for the combustion. Since, the amount of the complete extract exposed during *in vitro* assay was between 5 and 20 µg/ml, the

quantity of caffeine (one compound of many present) never exceed 20 µg/ml. No bioactivity has been reported in the literature for quantities of caffeine lower than approximately 194 µg/ml (1mM) (Slvak *et al.*, 1982). We found that caffeine induced formation of micronuclei and inhibited cell proliferation only when cells were exposed to a mixture of caffeine at concentrations of 194 µg/ml (1mM) and 970 µg/ml (5mM).

Analyses carried out by analytical HPLC/MS on the three fractions showed that fraction 2 contained mainly catechol and its derivatives (methyl-catechol, ethyl-catechol and vinyl-catechol) as well as caffeic acid and hydroxybenzoic acid, among others (Figure 2). However, those two compounds are not listed as carcinogenic nor genotoxic as opposed to catechol (Gold and Zeiger, 1997). As previously discussed, catechol and its derivatives are known to be bioactive compounds and thus, could be responsible for the increased level of bioactivity of fraction 2.

In reference to the control used in the GC/MS analysis, phenol and hydroquinone were found to be present (Table VI). This may be explained because of the order of injection of the sample (carry-over) as shown on figure 10.

Although an association between smoking and lung cancer was evident in early 1900's, the association between immunosuppressive effects and smoking was only recognized recently (Li *et al.*, 1997). The first report of such a case was reported by Haynes *et al.* (1966) who found an incidence between smoking and increasing respiratory tract infections in adolescents. Another report showed that the proliferative response of T cells in the lungs of smokers was reduced by more than 85% in comparison to non smokers (Daniele *et al.*, 1977). Also, a few immunomodulatory substances and their mechanisms of action have been identified (McCue *et al.*, 2003). The proliferation and the viability of lymphocytes exposed to 13 pure compounds found in tobacco smoke were mainly affected by hydroquinone and, to a lesser extend, by catechol (Poirier *et al.*, 2002). In our study, T lymphocytes from human and mice were exposed to the whole DMSO extract. Even if DCM extract was found to be the most toxic extract in the IVMNT and cell cycle experiment, we exposed lymphocytes to DMSO extract as when the lymphoblastic experiment was performed, we did not had that result. So, our results showed that, for mice and

human lymphocytes exposed to the DMSO extract, a proliferation of the cells equal to and under a dose of 5 $\mu\text{g/ml}$ was observed (Figure 6). Between doses of 10 to 25 $\mu\text{g/ml}$, the percentage of inhibition of lymphocyte proliferation increased up to 97% for human T cells and up to 99.5% for mice T cells. Thus, the immunosuppressive response observed was consistent with literature previously mentioned.

The cell cycle assay was conducted on V79 cells exposed to the five extracts and to the three fractions. In addition, the T lymphocytes exposed to the whole DMSO extract were assessed by the cell cycle assay. The cell cycle is the series of events in a eukaryotic cell between one cell division and the next. It consists of four phases: G₁ phase, S phase, G₂ phase and M phase. The cell cycle or cell division is extremely well ordered. The passage from one phase to the other is due to the action of many proteins, cyclins and cyclin-dependent kinases, which ensure the proper cycle progression. When cells are exposed to toxic compounds, such as cigarette smoke, cells could be blocked in one particular phase to protect the organism from producing abnormal cells (Pines, 1995). Cells arrested in the G₁/G₀ phase may result from the action of a specific protein (p53). In our study, the four phases studied were G₁/G₀ phase, S phase, G₂/M phase and apoptotic phase representing cells beginning programmed cell death. The exposure of the V79 cells to the five extracts (Figure 7a to 7e), to the three fractions of the DMSO extract and to the whole DMSO extract (Figure 8a to 8d) showed an inhibition of cell proliferation because the cell cycle arrested in the G₁/G₀ phase. As shown by Palozza *et al.* (2004), fibroblasts treated with tar (cigarette smoke extract) resulted in the arrest of their cell cycle progression in the G₁/G₀ phase. Both the DCM extract and fraction 2 of the DMSO extract were found to act more rapidly, affecting the cell cycle by blocking cell proliferation at low doses (Figure 7d and 8b). The latter may be due to the presence of compounds acting on the proteins responsible for the passage from the G₁ to S phase. McCue *et al.* (2003) showed that catechol and hydroquinone interfered with the T lymphocyte cell progression through the G₁ phase. Also, these two compounds were identified as potent inhibitors of T cell proliferation by specifically acting on the blockage of DNA synthesis. As previously shown by GC/MS and HPLC/MS analyses, hydroquinone and catechol were identified among the combustion products of CA. Catechol and its

derivatives were the major compounds found in fraction 2 of the whole DMSO extract.

The cell cycle assay performed on T lymphocytes showed an arrest of the cell cycle progression in the S phase (Figure 9a and 9b). Although some authors have reported an arrest of the cell cycle in the G₁/G₀ phase after an exposure of cells to tobacco smoke components (McCue *et al.* 2003; Palozza *et al.* 2004; Pines, 1995), Li *et al.* (1996) observed that human T lymphocytes exposed to hydroquinone showed an arrest in the S phase. Moreover, an accumulation of cells in the S and G₂/M phases was shown after an exposure of normal human bronchial epithelial cells to 1R4F³ tobacco (Fields *et al.*, 2004).

Our results demonstrated that the CA combustion products was genotoxic and cytotoxic as per the IVMNT and that they affected cell proliferation as per the cell cycle test. Also, CA combustion products were found to be immunosuppressive as they inhibited lymphocyte proliferation in both human and mice cells. CA combustion products extracted with DCM were most bioactive in comparison to the other four solvents. Also, fraction 2 of the whole DMSO extract was more bioactive than fraction 1 and fraction 3. To date, no specific compounds were actually found to be those responsible for the bioactivity of the DCM extract. Since catechol and its derivatives were found in increased amounts in fraction 2 of the whole DMSO extract and it is known that catechol is a very bioactive compound, its presence in fraction 2 may explain the increased bioactivity in that particular sample. Therefore, in addition to the toxicological characterization of the products of combustion of CA, we have evidence that some of the bioactive compounds generated by the combustion of CA are catechol and its derivatives.

Our research carried out on the combustion products of CA may not be directly correlated to cigarette smoke due to the fact that the combustion of a single tobacco component does not take into account possible interactions between multiple components during combustion. Also, we cannot relate the toxicity from the

³ Control tobacco cigarette made with a blend of flue-cured, burley, reconstituted and oriental tobaccos.

in vitro toxicological assays used to *in vivo* toxicity, since there are detoxification pathways involved. Moreover, cigarettes that yield 20-35 mg of CSC were shown to contain nearly 100 µg of hydroquinone and 300 µg of catechol (Gopalakrishna *et al.*, 1994), which is several fold higher than the concentration used in our *in vitro* toxicological assays. However, our work has contributed to a better understanding of the toxicity of one single tobacco component, CA, and of the identification of some compounds responsible for its bioactivity as per the IVMNT and cell cycle assays.

As an overall objective to reduce toxicants from tobacco smoke, an effective way of developing additional techniques for the reduction of selected smoke compounds is to determine the tobacco constituents involved in the formation of the bioactive compounds in tobacco smoke (Torikaiu *et al.*, 2005). Future experiments include: (a) contribution to a more accurate chemical characterization of the compounds generated by the CA combustion, (b) identification of the most toxic compounds as per the IVMNT or (c) other more informative toxicological assays. Furthermore, studies on other tobacco components, such as lignin, would expand knowledge on various classes of bioactive compounds found in tobacco smoke.

References

- Brousseau, P., Payette, Y., Tryphonas, H., Blakley, B., Boermans, H., Flipo, D. and Fournier, M.** (1998) *Manual of Immunological Methods*. Boston, USA.
- Cooper, G.M.** (1999). *La Cellule : Une Approche Moléculaire*. De Boeck Université s.a. Paris. 674p.
- Daniele, R.P. Dauber, J.H. Altose, M.D. Rowlands, D.T. and Gorenberg, D.J.** (1977). Lymphocyte studies in asymptomatic cigarette smokers: A comparison between lung and peripheral blood. *American Review of Respiratory Disease*, 116: 997-1005.
- Davis, D.L. and Nielsen, M.T.** (1999). *Tobacco: Production, Chemistry and Technology*. CORESTA. Blackwell Science Ltd. 467p.
- DeMarini, D.M.** (2004). Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutation Research*, 567: 447-474.
- Fields, W.R. Ogden, M.W. Doolittle, D.J. and R.J. Reynolds Tobacco Company.** (2004). Gene expression in bronchial epithelial cells following in vitro exposure to cigarette smoke condensate. *Program Booklet and Abstracts, 58th Tobacco Science Research Conference*, page 64.
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E.** (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 534: 65-75.
- Frenesius, R.E.** (1985). Analysis of tobacco smoke condensate. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 8: 561-575.
- Frieauff, W., Pötter-Lacher, F., Cordier, A., Sutter, W.** (1998). Automatic analysis of the in vitro micronucleus test on V79 cells. *Mutation Research*, 413: 57-68.
- Gold, L. S., Zeiger, E.** (1997). *Handbook of Carcinogenic Potency and Genotoxicity Databases*. CRC Press inc. Florida. 754 p.
- Gopalakrishna, R., Chen, Z-H., Gundimeda, U.** (1994). Tobacco smoke tumor promoters, catechol and hydroquinone, induce oxidative regulation of protein kinase C and influence invasion and metastasis of lung carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91: 12 233-12 237.
- Haynes, W. Krstulovic, V. and Loomis. A.** (1966). Smoking habit and incidence of respiratory tract infections in a group of adolescent males. *American Review of Respiratory Disease*, 93: 730-735.
- Health Canada.** (1999). Determination of phenolic compounds in mainstream tobacco smoke, Official Method T-114.

Hoffmann, D. Hecht, S.S. Wynder, E.L. (1983). Tumor promoters and carcinogens in tobacco carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 50: 247-257.

Hoffmann, D. and Hoffmann, I. (1997). The changing cigarette, 1950-1995. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 50: 307-364.

Huber, G.L. (1989). Physical, chemical and biologic properties of tobacco, cigarette smoke and other tobacco products. *Beiträge zur Tabakforschung International*, 7: 142-147.

Imperial Tobacco Canada Ltd – ITCAN (1982). Prediction of DPM from samples of strip tobacco, Research and Development Department, Dr A. Porter.

Li, Q. Aubrey, M.T. Christian, T. and Freed, B.M. (1997). Differential inhibition of DNA in human T cells by the cigarette tar components hydroquinone and catechol. *Fundamental and Applied Toxicology*, 38: 158-165.

Li, Q. Geiselhart, L. Mittler, J.N. Mudzinski, S.P. Lawrence, D.A. and Freed, B.M. (1996). Inhibition of human T lymphoblast proliferation by hydroquinone. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 139: 317-323.

McCue J.M. Lazis, S. Cohen, J.J. Modiano, J.F. and Freed, B.M. (2003). Hydroquinone and catechol interfere with T cell cycle entry and progression through the G₁ phase. *Molecular Immunology*, 39: 995-1001.

Palozza, P. Serini, S. Di Nicuolo, F. Boninsegna, A. Torsello, A. Maggiano, N. Ranelletti, F.O. Wolf, F.I. Calviello, G. and Cittadini, A. (2004). β -Carotene exacerbates DNA oxidative damage and modifies p53-related pathways of cell proliferation and apoptosis in cultured cells exposed to tobacco smoke condensate. *Carcinogenesis*, 25: 1315-1325.

Pines J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinase: a biochemical view. *Biochemical Journal*, 308: 679-711.

Poirier, M. Fournier, M. Brousseau, P. and Morin A. (2002). Effects of volatile aromatics, aldehydes and phenols in tobacco smoke on viability and proliferation of mouse lymphocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 65: 1437-1451.

Préfontaine, D., Morin, A., Jumarie, C. and Porter, A. (2006). In vitro bioactivity of combustion products from 12 tobacco constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 724-738.

Risner, C.H. Cash, S. L. (1990). A high performance liquid chromatographic determination of major phenolic compounds in tobacco smoke. *Journal of Chromatographic Science*, 28: 2-7.

Robertson, M.L. Eastmond, D.A. and Smith, M.T. (1991). Two benzene metabolites, catechol and hydroquinone, produce a synergistic induction of

micronuclei and toxicity in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, 249: 201-209.

Rodgman, A. and Green, C.R. (2003). Toxic chemicals in cigarette mainstream smoke – hazard and hoopla. *Beiträge zur Tabakforschung International*, 20: 481-545.

Runeckles, V.C. (1963). Tobacco polyphenols II. On the biosynthesis of chlorogenic acid. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 41: 2249-2258.

Sakuma, H. Matsushima, S. Munakata, S. Sugawara, S. (1982). Pyrolysis of chlorogenic acid and rutin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46: 1311-1317.

Schlotzhauer, W.S. Snook, M.E. Chortyk, O.T. Wilson, R.L. (1992). Pyrolytic evaluation of low chlorogenic acid in tobaccos in the formation of the smoke co-carcinogen catechol. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 22: 231-238

Schlotzhauer, W.S. Martin, R.M. Snook, M.E., Williamson, R.E. (1982). Pyrolytic studies on the contribution of tobacco leaf constituents to the formation of smoke catechols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30: 372-374.

Schlotzhauer, W.S. and Chortyk, O.T. (1981). Pyrolytic studies on the origin of phenolic compounds in tobacco smoke. *Tobacco Science*, 25: 6-10.

Sharma, R.K., Fisher, T.S. and Hajaligol, M.R. (2002). Effect of reaction conditions on pyrolysis of chlorogenic acid. *Journal of analytical and applied pyrolysis*, 62: 281-296.

Slvak, A. Rudenko, L. and Teague, G.L. (1982). Variations among species and cell types in the effects of caffeine on mutagen-induced cytotoxicity and postreplication repair of DNA. *Environmental Mutagenesis*. 4: 143-162.

Stedman R.L. (1968). The chemical composition of tobacco and tobacco smoke. *Chemical Review*, 68: 153-207.

Stich, H.F., Rosin, M.P, Wu, C.H. and Prowie, W.D. (1981). A comparative genotoxicity study of chlorogenic acid (3-O-caffeoylquinic acid). *Mutation Research*, 90:201-212.

Torikaiu, K. Uwano, Y. Nakamori, T. Tarora, W. Takahashi, H. (2005) Study on tobacco components involved in the pyrolytic generation of selected smoke constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 43: 559-568.

Wynder, E.L. & Hoffmann, D. (1967) Tobacco and tobacco smoke, Studies in experimental carcinogenesis. Academic Press. New York and London. 730p.

Tables

Table I: Concentration range of the working solutions. H: Hydroquinone, R: Resorcinol, C: Catechol, P: Phenol, m-C: meta-Cresol, p-C: para-Cresol, m+p-C: meta-para-Cresol, o-C: octo-Cresol.

Working solutions	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)							
	H	R	C	P	m-C	p-C	m+p-C	o-C
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0,5	0,2	0,4	0,4	0,4	0,4	0,8	0,2
3	5	1	5	2	2	2	4	0,5
4	10	10	10	10	10	10	20	4
5	30	30	30	20	20	20	40	8
6	50	50	50	40	40	40	80	20

Table II: Fluorescence detection program for repeatability studies. λ_{exc} (nm) = excitation wavelength of the compound, λ_{em} (nm) = emission wavelength of the compound.

Time	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	Compounds detected
0	285	325	Hydroquinone
7	270	310	Resorcinol, Catechol
12	270	298	Phenol
20	270	305	m + p-Cresol, o-Cresol

Table III: Gradient elution conditions for repeatability study. Solvent A was 0.1% (v/v) aqueous acetic acid and solvent B was acetonitrile.

Time (min)	Flow (ml/min)	A (%)	B (%)
Initial	1,2	100	0
6	1,2	90	10
35	1,2	75	25
36	1,2	0	100
46	1,2	0	100

Table IV: Phenolic compounds identified by HPLC fluorescence analyses in extracts generated from CA combustion. The total particulate matter (TPM) was extracted from ¼ of each of four Cambridge filters with 1% acetic acid. H: hydroquinone; R: resorcinol; C: cresol; P: phenol; p-C: para-cresol.

CA combustions	TPM qty on ¼ Cambridge filters (mg)	Phenolic content (µg/mg TPM)				
		H	R	C	P	p-C
Combustion 1	27,8	16,1	0,8	32,9	10,2	0,1
Combustion 2	33,2	19,5	1,0	40,4	16,1	0,1
Combustion 3	32,9	19,2	1,0	34,1	10,4	0,0
Combustion 4	38,2	15,1	0,9	31,2	9,1	0,1
Avg	33,0	17,5	0,9	34,6	11,4	0,1
SD	4,2	2,2	0,1	4,0	3,1	0,1
CV (%)	12,8	12,6	9,8	11,6	27,5	64,8

Table V: Normalized compounds content relative to hydroquinone.

CA combustions	Normalised quantity relative to hydroquinone (µg)				
	H	R	C	P	p-C
Combustion 1	1,00	0,052	2,042	0,633	0,006
Combustion 2	1,00	0,053	2,076	0,826	0,007
Combustion 3	1,00	0,053	1,775	0,539	0,001
Combustion 4	1,00	0,060	2,067	0,604	0,005
Avg	-	0,054	1,990	0,651	0,005
SD	-	0,004	0,144	0,124	0,003
CV (%)	-	7,111	7,244	18,991	60,615

Table VI: Extracted combustion products separated and identified by GC/MS. The control consisted of a mixture of the five extraction solvents.

Compounds	Control	H ₂ O extract	DMSO extract	MeOH extract	EA extract	DCM extract
Benzoic acid		+	+	+	+	+
Catechol		+	+	+	+	+
Cyclododecane				+		+
DCM	+					
Decene				+		
Dimethyl sulfone		+	+	+	+	+
DMSO	+	+	+	+	+	+
Dodecanol					+	
Ethyl acetate	+					
Ethyl catechol		+				+
Hydroquinone	+ *	+	+	+	+	+
MeOH	+					
Phenol	+ *	+	+	+	+	+
Propanol methyl					+	
Propenoic acid					+	+
Quinic acid			+		+	+
Water	+	+	+	+	+	+

+ : Quality match higher than 80%

* : refers to Figure 10 and text for explanation on the presence of those compounds in the control.

Table VII: Caffeine content in one DMSO and three DCM extracts as analyzed by analytical HPCL/MS.

Samples	Quantity of TPM injected	Peak height (cps)	Quantity of caffeine (μg)
Caffeine standard (1mg/ml)		$2,5 \times 10^6$	0,10
DCM extract 1	0,25 μg	$9,7 \times 10^4$	$3,9 \times 10^{-3}$
DCM extract 2	0,25 μg	$6,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^{-3}$
DCM extract 4	0,25 μg	$2,8 \times 10^6$	$1,1 \times 10^{-3}$
DMSO extract 3	0,25 μg	$1,6 \times 10^7$	$6,5 \times 10^{-4}$

FIGURES

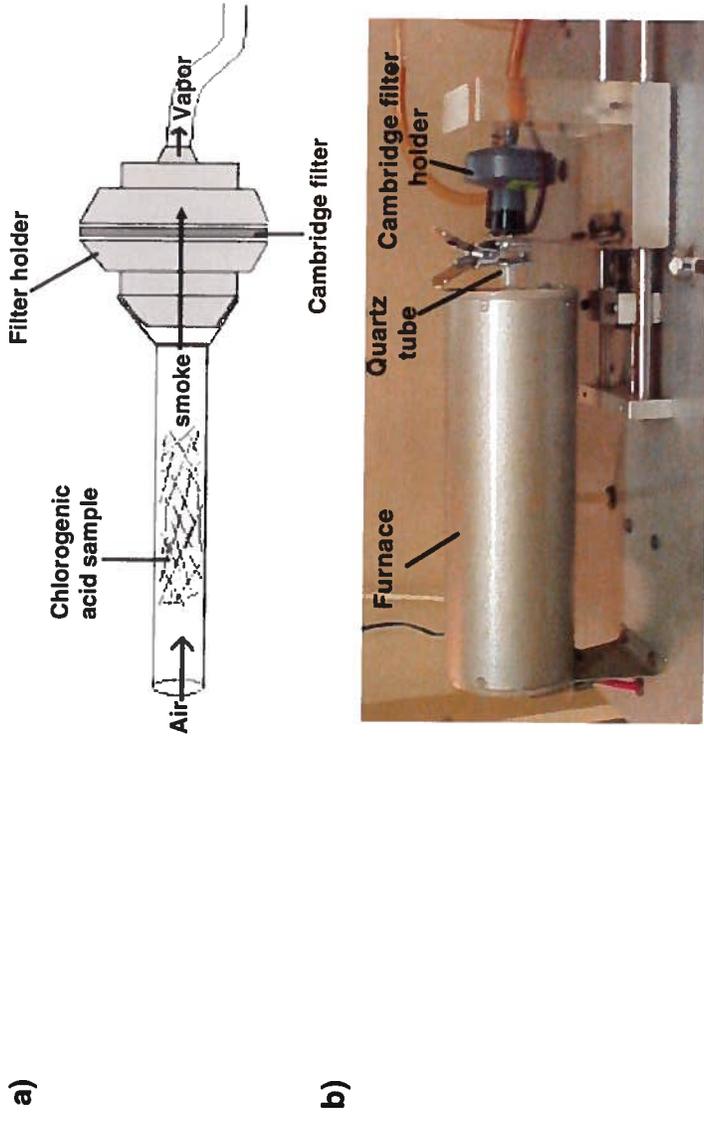
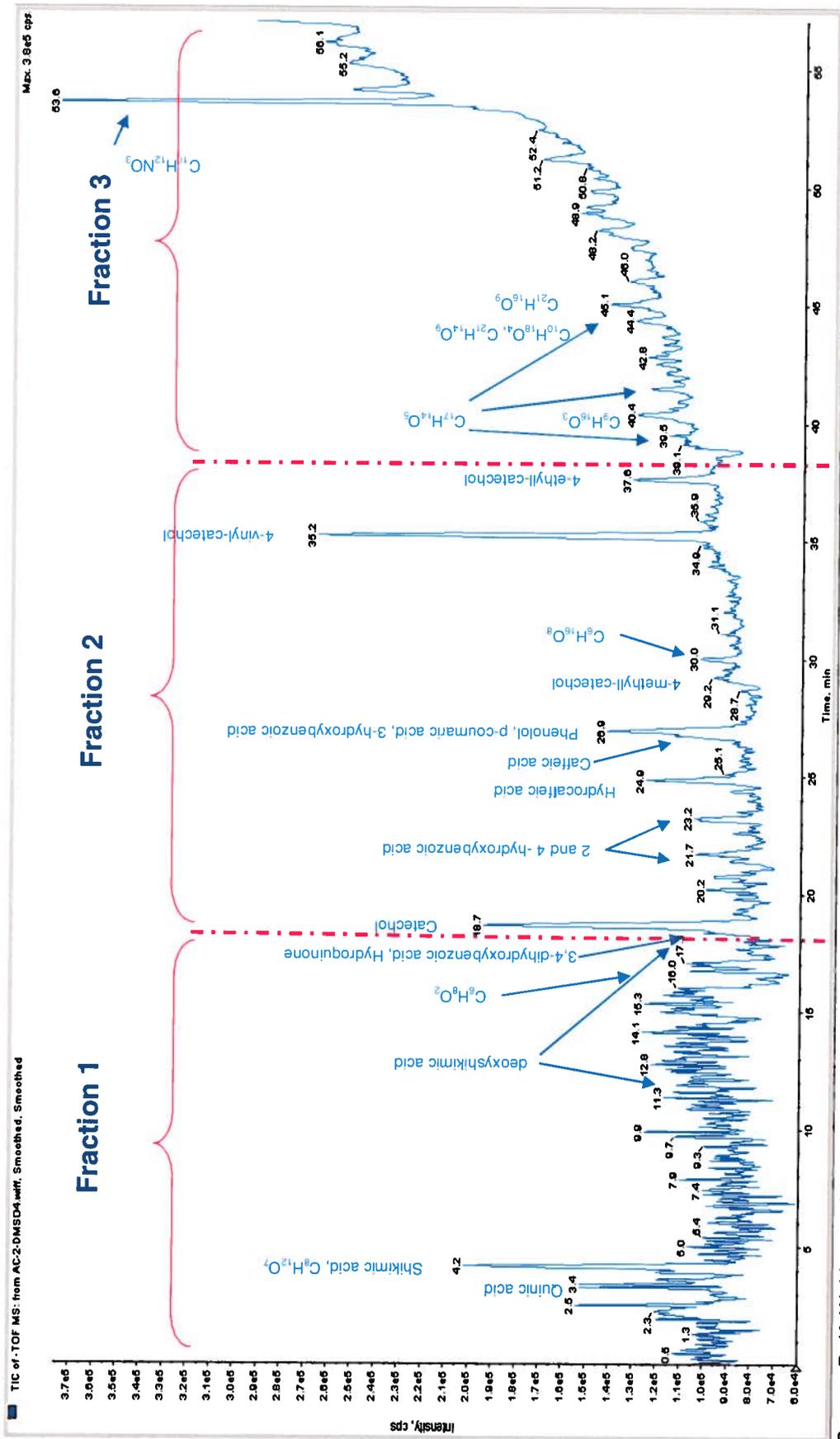


Figure 1: Combustion of the chlorogenic acid using the John Payne Tar Predictor. a) The adsorbed CA sample was placed in a quartz tube and heated at 640°C ($\pm 10^{\circ}\text{C}$). During combustion, air flow in the tube was 1.8 L/min . TPM is trapped onto the Cambridge filter as smoke passed through. b) Quartz tube was driven into the furnace.



Source: Dr K. Waldron and Dr A. Furtos, University of Montreal

Figure 2: HPLC chromatogram of DMSO extract showing the chlorogenic acid combustion products which were analyzed by LC-negative ESI-TOF. The red lines have been overlaid to represent the compounds isolated in the three main fractions collected.

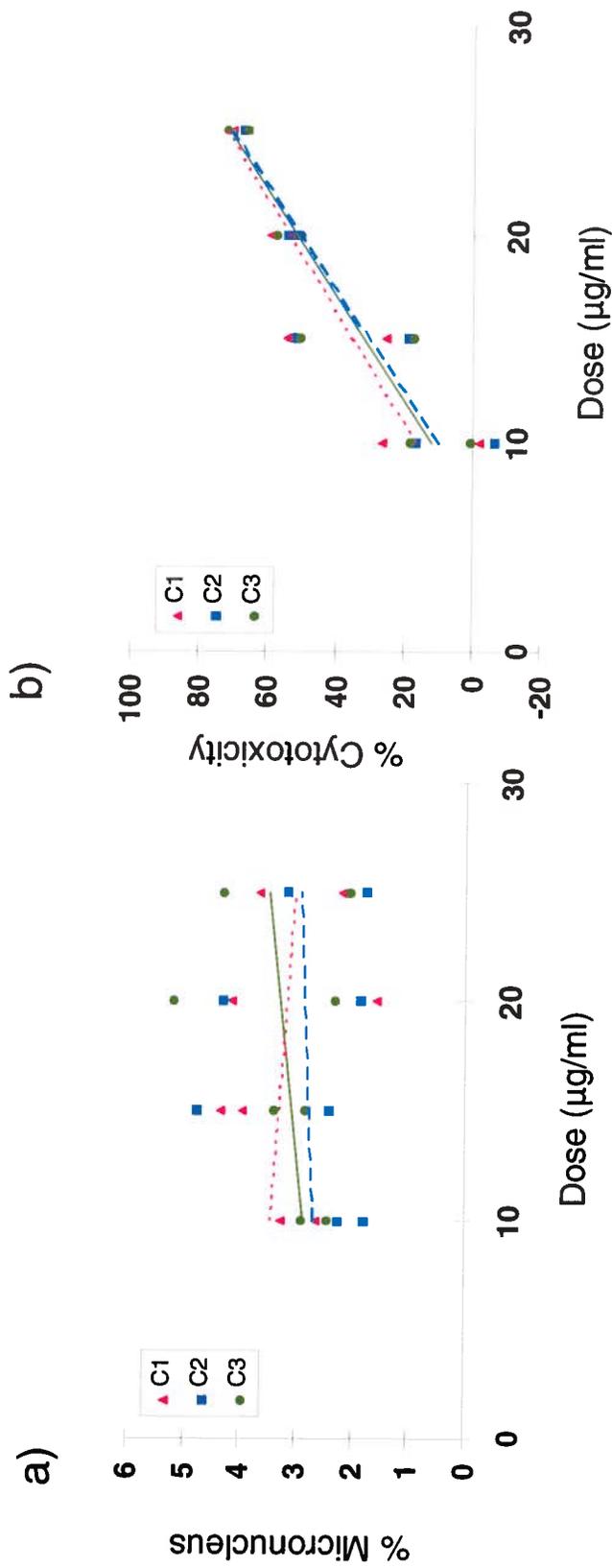


Figure 3: a) Genotoxic activity (% Micronucleus) and b) inhibition of cell proliferation (% Cytotoxicity) induced by three DMSO extracts from three independent combustions of 0,5 g of chlorogenic acid, on V79 cells exposed 3h, without metabolic activation. The dose refers to quantity of TPM or DPM (µg) per ml of medium. The three extracts were tested in the Duncan's test ($\alpha < 0.05$) and no statistically significant difference was found. Combustion 1:....., Combustion 2: ---, Combustion 3: —.

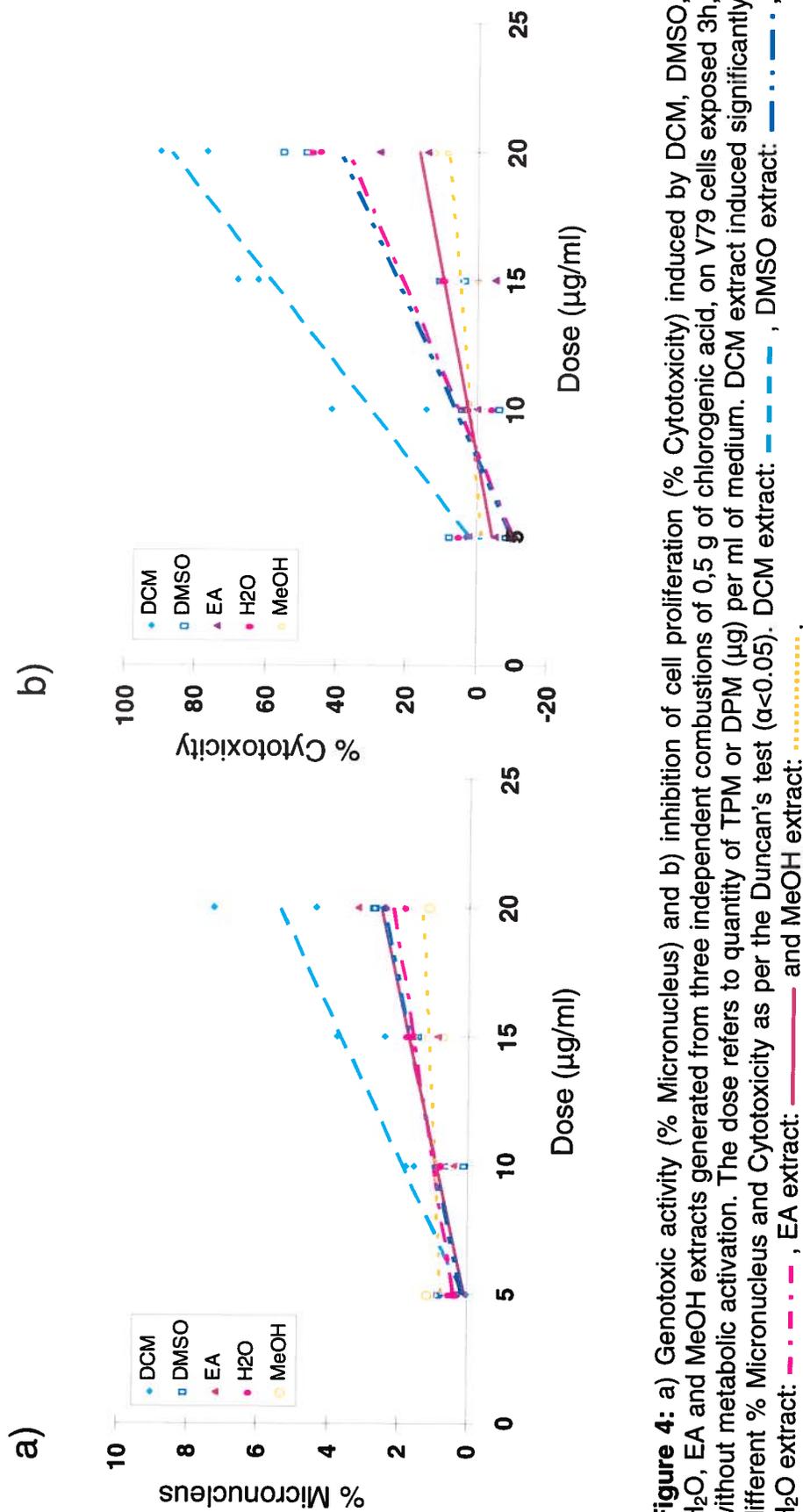


Figure 4: a) Genotoxic activity (% Micronucleus) and b) inhibition of cell proliferation (% Cytotoxicity) induced by DCM, DMSO, H₂O, EA and MeOH extracts from three independent combustions of 0,5 g of chlorogenic acid, on V79 cells exposed 3h, without metabolic activation. The dose refers to quantity of TPM or DPM (µg) per ml of medium. DCM extract induced significantly different % Micronucleus and Cytotoxicity as per the Duncan's test ($\alpha < 0.05$). DCM extract: —•—•—, DMSO extract: —□—□—, EA extract: —△—△—, H₂O extract: —●—●—, MeOH extract: —○—○—.

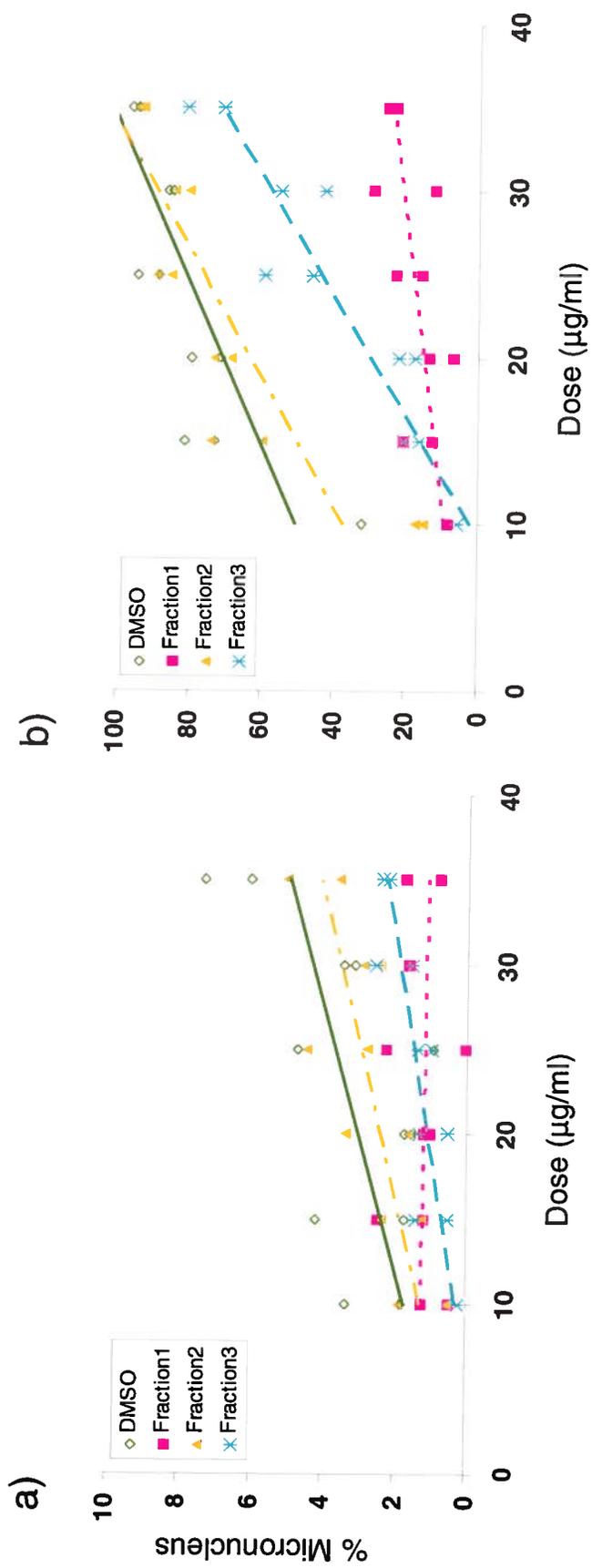


Figure 5: a) Genotoxic activity (% Micronucleus) and b) inhibition of cell proliferation (% Cytotoxicity) induced by DMSO extract, Fraction 1, Fraction 2 and Fraction 3 generated from three independent combustions of 0,5 g of chlorogenic acid, on V79 cells exposed 3h, without metabolic activation. The dose refers to quantity of TPM or DPM (µg) per ml of medium. Whole DMSO extract and fraction 2 induced significantly different % micronucleus and whole DMSO extract, fraction 2 and fraction 3 induced significantly different % cytotoxicity as per the Duncan's test ($\alpha < 0.05$). DMSO: — Fraction 1: Fraction 2: - - - - - Fraction 3: - - - - -.

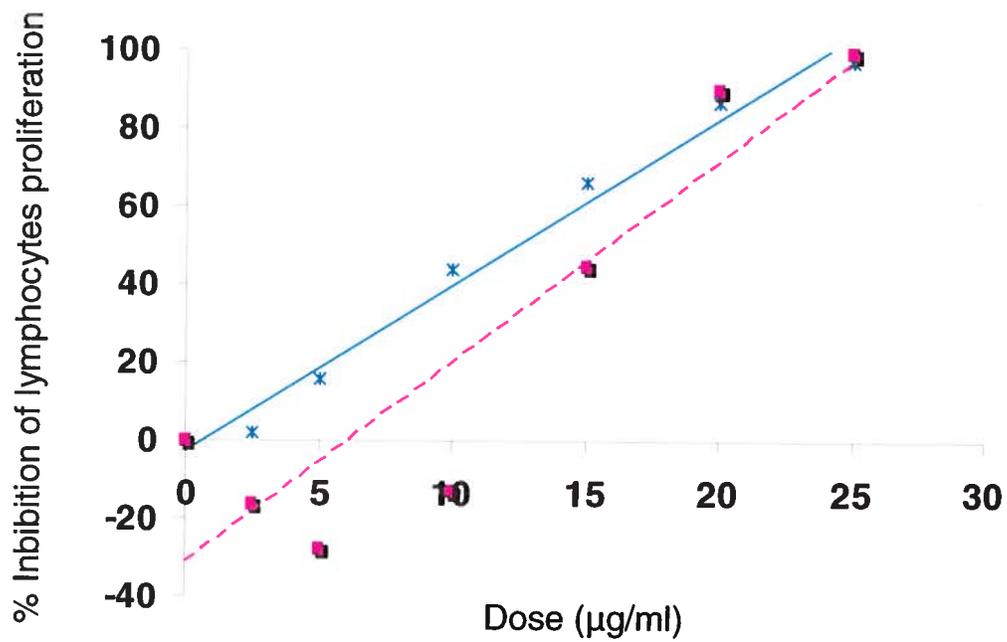


Figure 6: Inhibition of human and mice T lymphocytes proliferation induced by DMSO extract generated from three independent combustions of 0,5 g of chlorogenic acid exposed 48h, with ConA (2.5 µg/ml). The dose refers to quantity of TPM or DPM (µg) per ml of medium. Human:— Mice:---.

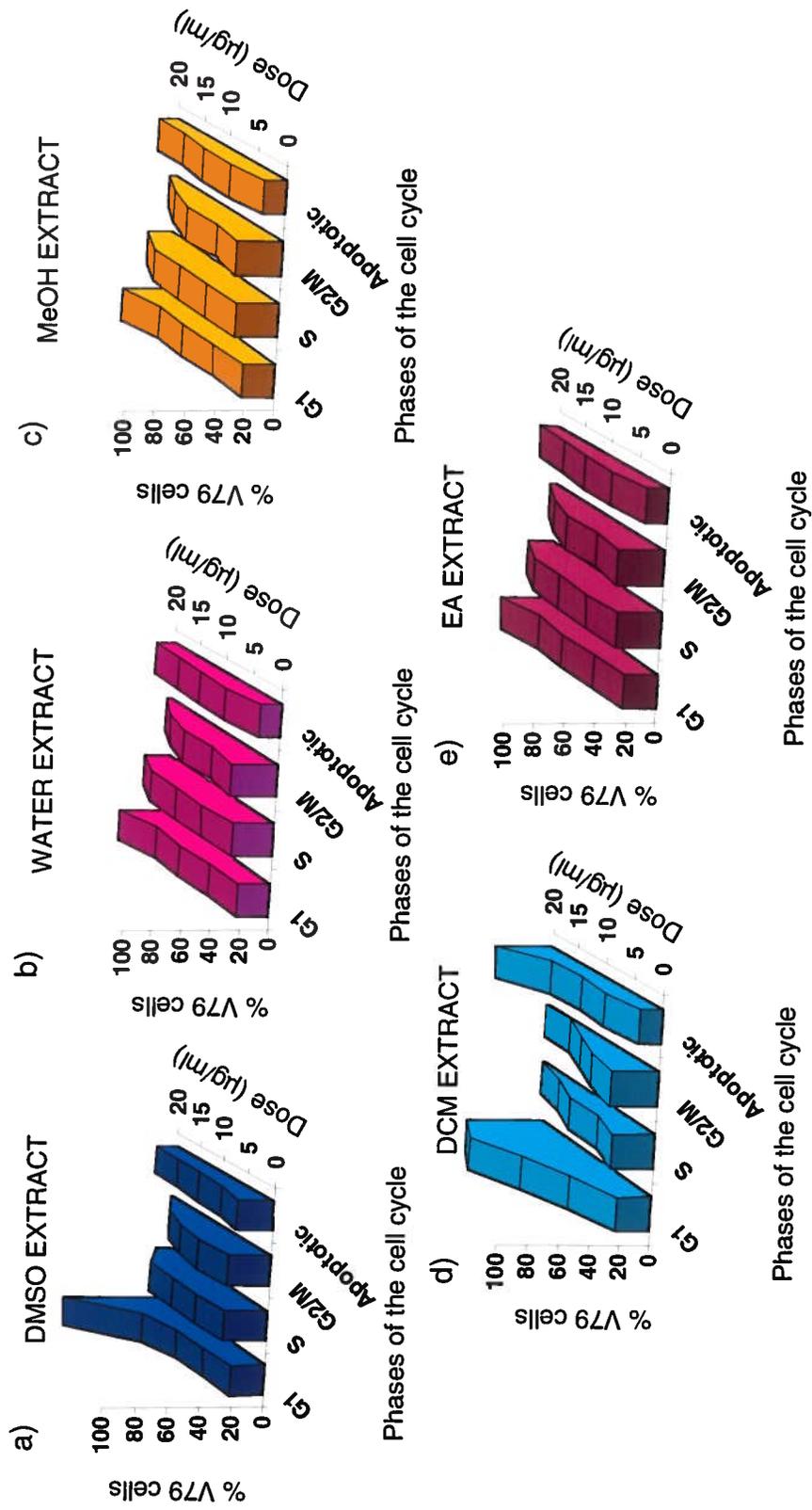


Figure 7: Distribution of V79 cells as a function of cell cycle phase following an exposure of 3 h to DMSO, water, MeOH, DCM and EA extracts, without metabolic activation, as assessed by flow cytometry. The dose refers to quantity of TPM or DPM (µg) per ml of medium.

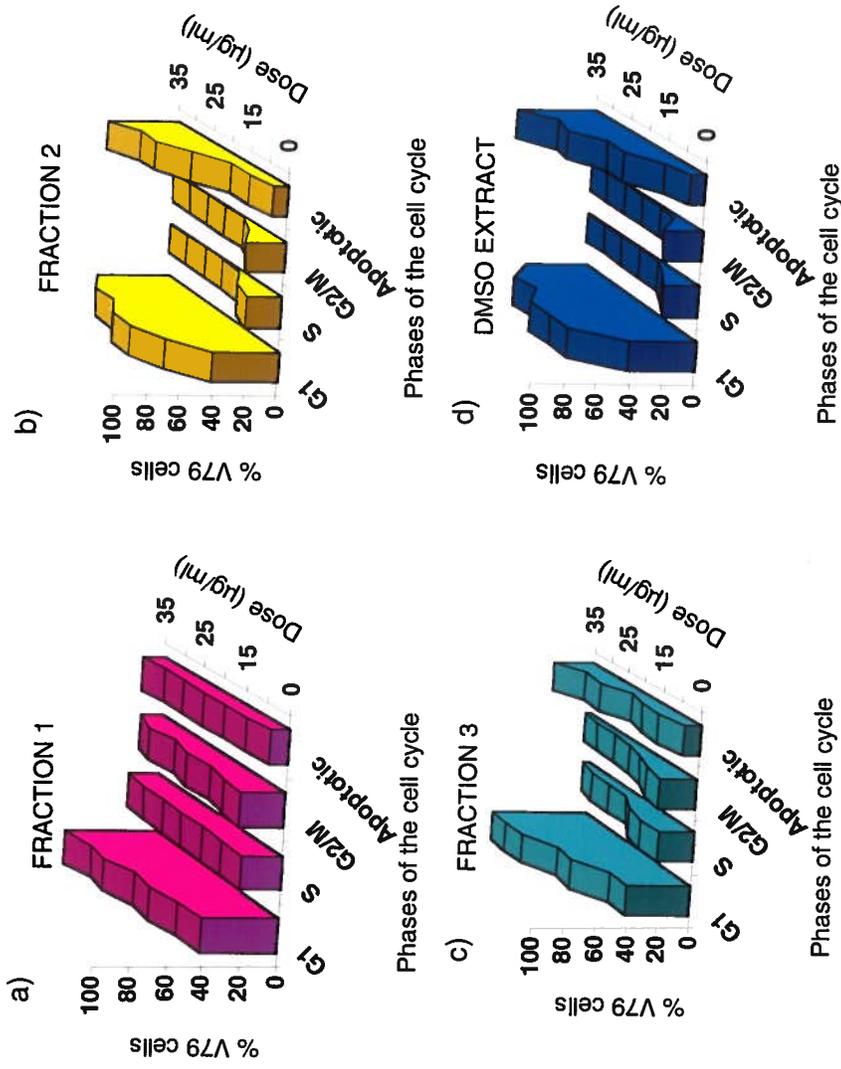


Figure 8: Distribution of V79 cells as a function of cell cycle phase following an exposure of 3h to DMSO extract, fraction 1, fraction 2 and fraction 3, without metabolic activation, as assessed by flow cytometry. The dose refers to quantity of TPM or DPM (µg) per ml of medium.

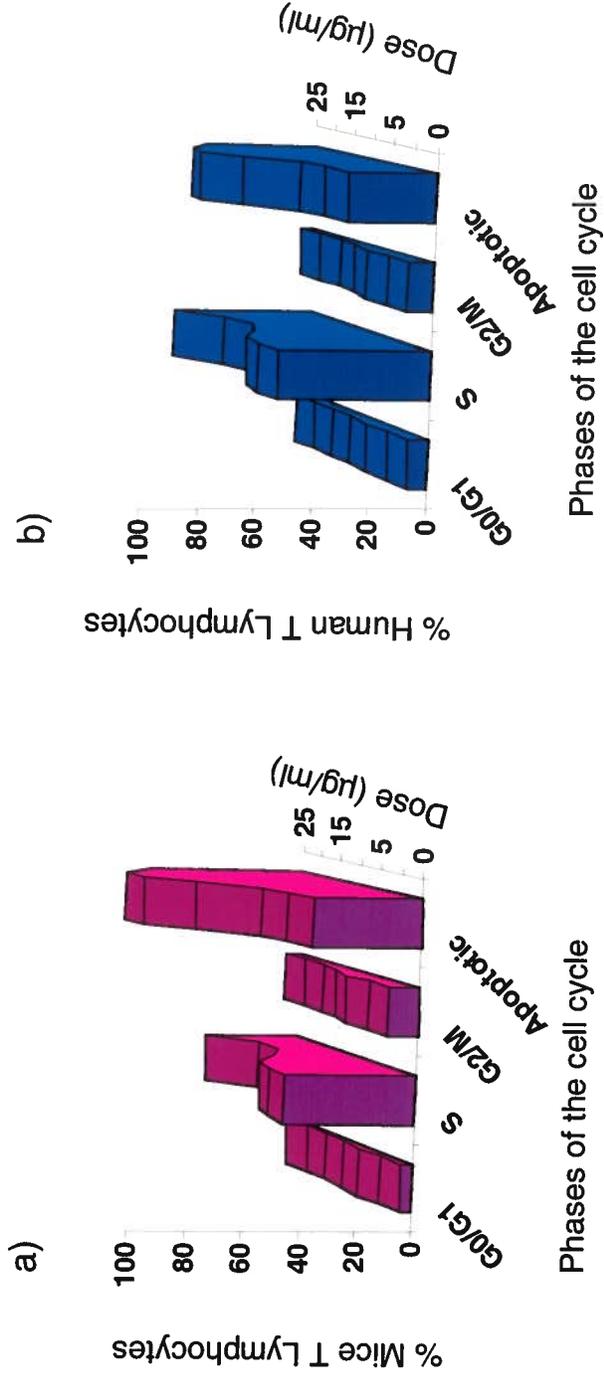


Figure 9: Distribution of mice and human T lymphocytes as a function of cell cycle phase following an exposure of 48h to the whole DMSO extract, as assessed by flow cytometry. The dose refers to quantity of TPM (µg) per ml of medium.

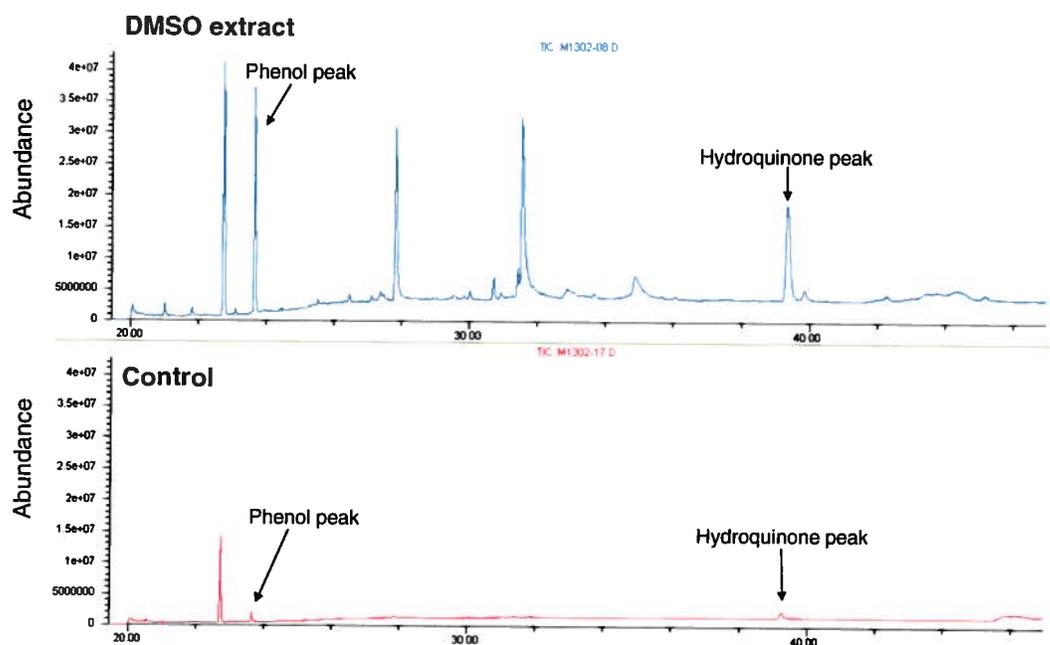


Figure 10: GC/MS chromatograms of DMSO extract and control. The hydroquinone and phenol peaks of the DMSO extract are about 15 times bigger than the hydroquinone and phenol peaks found in the control.

CHAPITRE 3

DISCUSSION GÉNÉRALE

Bien que la toxicité de la fumée du tabac ait été abondamment étudiée et documentée, la contribution propre à chacun des constituants du tabac a été moins largement étudiée (DeMarini, 2004; Andreoli *et al.*, 2003; Rodgman and Green, 2003; Fresenius, 1985). Toutefois, certaines études ont quand même rapporté la toxicité reliée à certains composés purs de la fumée de cigarette (Préfontaine *et al.*, 2006; Poirier *et al.*, 2002). D'autres études ont décrit la relation entre la combustion de différents types de tabac et la génération des composés phénoliques générés dans la fumée (Schlotzhauer and Chortyk, 1981) ou ont rajouté des composés spécifiques au tabac dont ils voulaient mesurer l'effet (Rodgman and Green, 2003; Baker, 1981). Actuellement, des recherches sont menées à travers le monde sur le développement de technologies pouvant mener à la réduction du niveau de composés spécifiques de la fumée. Ainsi, la détermination des constituants du tabac et des composés spécifiques qu'ils génèrent dans la fumée et leurs mécanismes de formation est une des avenues importantes devant être développée (Torikau *et al.*, 2005). Dans le cadre de ce projet de recherche, la toxicité d'un composé pur du tabac, l'acide chlorogénique, a été caractérisée toxicologiquement et chimiquement. L'originalité de notre étude vient de la combinaison de tests *in vitro* en toxicologie et de techniques en chimie analytique pour caractériser la toxicité des produits de combustion de l'AC.

3.1 L'acide chlorogénique

L'acide chlorogénique est le principal composé polyphénolique du tabac constituant entre 2,5 et 8% du poids sec des feuilles de tabac (Runekles, 1968; Wynder and Hoffmann, 1967). Nous avons choisi l'AC comme objet d'étude car il a été identifié par une étude antérieure comme étant l'un des principaux constituants du tabac dont la fumée génère des effets génotoxiques au niveau des cellules de mammifère (Préfontaine *et al.*, 2006).

3.2 Combustion

La première étape de notre étude a été de vérifier la méthode de combustion, en terme de répétabilité, utilisant la machine à fumée JPTP. La quantité d'hydroquinone, de catéchol, de phénol et de résorcinol a été mesurée et comparée entre quatre extraits provenant de quatre combustions d'AC différentes (Table IV et V de l'article). Le coefficient de variation moyen était de 15,4%. Parallèlement à la détermination du contenu phénolique, trois extraits (provenant de trois combustions différentes d'AC) ont été testés dans le IVMNT (Figure 3a et 3b de l'article). Malgré la variation du contenu phénolique, les extraits testés dans le IVMNT n'étaient pas statistiquement différents en terme du pourcentage de génotoxicité et de cytotoxicité induites. Ceci nous a permis de conclure que la variation (15,4%) du contenu de quatre composés phénoliques dans les extraits n'induisait pas de variation dans le IVMNT. La méthode de combustion décrite dans la partie « Material and Methods » de l'article a donc été adoptée. Toutefois, pour atténuer au maximum la variabilité entre les combustions, il a été convenu qu'un extrait serait issu de l'extraction de trois filtres Cambridge, provenant chacun d'une combustion d'acide chlorogénique différente.

3.3 Extraction sélective de la phase particulaire

Cinq solvants ont été utilisés pour extraire sélectivement les composés des condensats recueillis sur les filtres Cambridge : le DMSO, l'H₂O, le MeOH, le DCM et l'EA. Ces solvants ont été utilisés dû à leur différence respective d'index de polarité (H₂O= 9.0, DMSO= 7.2, MeOH= 5.1, EA= 4.4 et DCM= 3.1). En effet, selon une étude antérieure, l'extraction de tabac avec différents solvants de différente polarité a mené à la formation d'extraits de composition chimique différente (Schlotzhauer and Chortyk, 1981). Ainsi, nous supposons que les extraits générés à partir de l'extraction des filtres avec différents solvants, va mener à la formation d'extraits de composition chimiquement différente.

Les extraits H₂O, MeOH, DCM et EA ont été évaporés et les composés secs obtenus ont été resuspendus dans le DMSO. En supposant que les différents

solvants n'aient pas extrait tous les composés présents sur les filtres, le DMSO a été utilisé pour ré-extraire les filtres une seconde fois. Le filtre extrait au DMSO n'a pas été ré-extraire. Le DMSO a été utilisé car, étant le solvant communément utilisé dans l'industrie du tabac, nous supposons qu'il extrait tous les composés du filtre Cambridge. Les extraits et les ré-extraits ainsi générés ont été testés dans les différents tests *in vitro*.

3.4 Toxicité des différents extraits

Le IVMNT a été choisi comme test toxicologique servant à caractériser les produits de combustion de l'AC pour plusieurs raisons. Il fait partie de la batterie de tests *in vitro* recommandés par le groupe de recherche du CORESTA (CORESTA, 2002) et par Santé Canada (Health Canada T-501, 2004) pour l'étude de la fumée du tabac. Ensuite, c'est par ce test que Préfontaine *et al.* (2006) ont démontré le potentiel géno- et cytotoxique des produits de combustion de l'AC.

Parmi les cinq extraits d'AC (générés par extraction sélective) testés dans le IVMNT, l'extrait DCM est celui induisant la plus forte activité géno- et cytotoxique et ce, de façon statistiquement significative selon le test de comparaison multiple de Duncan's (Figure 3a et 3b de l'article). Parmi les quatre ré-extraits testés dans le IVMNT, le ré-extraire DCM-DMSO est beaucoup moins actif (Figure 1a et 1b, Annexe II : résultats non publiés) n'ayant généré que 1% et 40% de génotoxicité et de cytotoxicité comparativement à l'extrait DCM qui a généré 5.5% et 90% de génotoxicité et de cytotoxicité. La plus forte toxicité observée par l'exposition des cellules V79 à l'extrait DCM pourrait être due à la présence de composés seulement extraits par le DCM ou de certains composés extraits en plus grande quantité par le DCM.

Les principaux composés issus de la combustion de l'acide chlorogénique sont le phénol, le catéchol, le vinyle-catéchol, le benzène et l'acide benzoïque (Sharma *et al.*, 2002a; Sakuma *et al.*, 1982). Parmi ces composés, le catéchol et le phénol ont été identifiés comme inducteurs de micronoyaux (Robertson *et al.*, 1991) alors que le catéchol a été identifié comme un important co-carcinogène très toxique

(Gopalakrishna *et al.*, 1994; Schlotzhauer *et al.*, 1992; Robertson *et al.*, 1991; Hoffmann *et al.*, 1983; Schlotzhauer *et al.*, 1982). L'analyse de la composition chimique des extraits par GC/MS a démontré la présence de catéchol, de phénol, d'hydroquinone, d'éthyle-catéchol et d'acide quinique dans tous les extraits (Table VI de l'article). La présence d'autres composés, tel l'acide benzoïque, a été retrouvée dans presque tous les extraits alors que d'autres composés n'ont été retrouvés que dans certains extraits. Ainsi, la composition chimiquement différente des extraits, due aux différentes propriétés des solvants utilisés pour l'extraction (ex. : polarité), serait à l'origine de la différence de toxicité mesurée chez les différents extraits dans le IVMNT. Enfin, comme le catéchol et le phénol sont d'importants toxiques, leur présence, en plus ou moins grande quantité selon l'extrait, pourrait expliquer la différence de toxicité entre les extraits.

Quant à l'extrait DCM, bien qu'il ait été identifié comme étant plus toxique que les autres extraits, il fallait s'assurer que le solvant en question ait été entièrement évaporé. Pour mesurer si l'évaporation des différents solvants a été complète, nous avons réalisé différentes combustions à blanc (Méthode de combustion à blanc, Annexe I : Matériels et Méthodes des résultats non publiés). Les résultats obtenus dans le IVMNT (Figure 2, Annexe II : résultats non publiés) nous prouvent qu'effectivement, tous les solvants ont été complètement évaporés et que la toxicité mesurée dans le IVMNT provient bien des composés extraits par chacun des solvants.

3.5 Fractionnement de l'extrait DMSO

Un autre niveau de séparation des produits de combustion de l'AC est l'utilisation d'un LC préparatif. L'extrait DMSO a été fractionné en trois fractions principales, de constitution chimiquement différente (Figure 15, Annexe II). L'avantage de ce mode de séparation des composés est sa spécificité due à la récolte des fractions et à la possibilité d'identifier chimiquement les composés. Les trois fractions ainsi générées ont aussi été testées dans les différents tests *in vitro*.

3.6 Toxicité des différentes fractions

Parmi les trois fractions générées par la séparation de l'extrait DMSO par LC préparatif et testées dans le IVMNT, la fraction 2 est celle ayant induit la plus forte activité géno- et cytotoxique. Selon le test de comparaison multiple de Duncan's, la fraction 2 a induit un pourcentage de génotoxicité statistiquement différent des deux autres fractions et de l'extrait DMSO. Les fractions 2 et 3 ont induit un pourcentage de cytotoxicité statistiquement différent de la fraction 1 et de l'extrait DMSO (Figure 4a et 4b de l'article). La plus forte bioactivité de la fraction 2 est probablement due à la présence de composés potentiellement plus toxiques que ceux retrouvés dans les fractions 1 et 3. L'analyse de la composition chimique des fractions issues de l'extrait DMSO par HPLC/MS analytique a démontré que la fraction 2 contient principalement du catéchol et ses dérivés (méthyle-catéchol, éthyle-catéchol et vinyle-catéchol) ainsi que de l'acide cafféique et de l'hydroxybenzoïque (Figure 2 de l'article). Tel que mentionné, le catéchol est toxique (Gopalakrishna *et al.*, 1994; Schlotzhauer *et al.*, 1992; Robertson *et al.*, 1991; Hoffmann *et al.*, 1983; Schlotzhauer *et al.*, 1982) et dans le cas des fractions, il n'est présent que dans la fraction 2, laquelle est la plus toxique selon le IVMNT. Ceci vient donc appuyer l'association de la toxicité mesurée dans le IVMNT avec la présence du catéchol dans les extraits ou fractions. Toutefois d'autres études plus poussées de fractionnement et d'identification de la toxicité devront être menées pour confirmer cette hypothèse.

3.7 Immunotoxicité

La transformation lymphoblastique est un test très utilisé en immunologie et certains composés présents dans la fumée de cigarette (l'hydroquinone et le catéchol) ont été identifiés comme ayant des effets immunosuppresseurs (Li *et al.*, 1997). Nous avons réalisé la transformation lymphoblastique en exposant des cellules T à l'extrait DMSO car à ce moment, les données de toxicité n'étant pas encore disponibles, la plus forte toxicité de l'extrait DCM n'était pas encore connue. Par ce test, nous avons voulu explorer si les produits de combustion de l'AC avaient un effet immunosuppresseur. Le test a été réalisé sur des lymphocytes de souris et humains pour comparer s'il y avait une différence de sensibilité entre les lymphocytes des deux espèces. L'extrait DMSO a effectivement eu un effet

immunosuppresseur sur les cellules des deux espèces, inhibant la prolifération cellulaire des lymphocytes de souris et humains de 99,5% et 97% respectivement, à la dose d'exposition la plus élevée (Figure 5 de l'article). Parmi les composés identifiés dans l'extrait DMSO se trouvaient entre autre le catéchol et l'hydroquinone. Une étude a rapporté que l'exposition de lymphocytes T humains à l'hydroquinone et au catéchol provoquait l'inhibition de la prolifération des lymphocytes de 90% (Li *et al.*, 1997). De plus, une autre étude a démontré que la prolifération et la viabilité de lymphocytes T exposés à l'hydroquinone et au catéchol diminuaient considérablement (Poirier *et al.*, 2002). Donc, la présence de catéchol et d'hydroquinone dans l'extrait DMSO serait probablement à l'origine de l'effet immunosuppresseur mesuré dans la transformation lymphoblastique. De plus, comme nous n'avons pas mesuré d'effets statistiquement différents entre l'inhibition des lymphocytes de souris et humains, les lymphocytes de souris pourraient être préférablement utilisé aux lymphocytes humains à l'avenir.

3.8 Blocage du Cycle Cellulaire et Mesure de la Viabilité et de l'Apoptose

Les trois lauréats du prix Nobel de Physiologie/Médecine en 2001 (Leland Hartwell, Timothy Hunt et Paul Nurse) ont fait une découverte fondamentale concernant le contrôle du cycle cellulaire : ils ont identifié les molécules clés qui régulent le cycle cellulaire. La régulation du cycle cellulaire est par conséquent essentielle au bon fonctionnement de tous les organismes (Cooper, 1999). Le cycle cellulaire consiste en quatre phases, G₀/G₁, S, G₂ et M, au cours desquelles survient une série de transformation extrêmement bien orchestrées. Le passage d'une phase à l'autre est régulé par des protéines appelées cyclines et kinases dépendantes des cyclines (cdk). Lorsque des cellules sont exposées à des produits chimiques, il peut arriver qu'elles soient arrêtées dans une phase du cycle en particulier (Pines, 1995). Dans le cadre de ce projet, le test du cycle cellulaire a été choisi pour mesurer quelle phase du cycle était affectée par l'exposition des cellules aux produits de combustion de l'AC. Le test a été réalisé sur les cellules V79 exposées aux cinq extraits, aux quatre ré-extraits, aux trois fractions ainsi que sur les lymphocytes T (humains et de souris) exposés à l'extrait DMSO.

L'exposition aux extraits et aux fractions a entraîné l'inhibition de la prolifération cellulaire de façon plus ou moins marquée selon l'échantillon (Figures 5 et 6 de l'article). L'inhibition s'est traduite par l'accumulation des cellules dans la phase G₁ du cycle cellulaire. Le pourcentage de cellules V79 retrouvées dans chaque phase a été mesuré par cytométrie de flux et c'est l'extrait DCM et la fraction 2 qui ont induit la plus forte inhibition de la prolifération cellulaire. Le pourcentage de cellules, exposées à l'extrait DCM, dans la phase G₁ est d'environ 55% dès la dose de 5 µg TPM / ml de milieu de culture et atteint près de 90% à la dose de 20 µg/ml (Figure 5d de l'article). Quant à la fraction 2, le pourcentage de cellules de la phase G₁ augmente rapidement jusqu'à atteindre 90% puis, alors que le pourcentage de cellules en G₁ diminue, le pourcentage de cellules apoptotiques augmente jusqu'à environ 50% à la dose de 20 µg/ml (Figure 6b de l'article). Une étude portant sur l'exposition de fibroblastes aux CSC a démontré le blocage des cellules en phase G₁/G₀ (Palozza *et al.*, 2004). De plus, une autre étude a démontré que l'hydroquinone et le catéchol ont un effet important sur le cycle cellulaire de lymphocytes T, bloquant leur progression à travers le cycle cellulaire en phase G₁ (McCue *et al.*, 2003). Le point de contrôle de la phase G₁ implique l'action d'une protéine spécifique, la p53. Cette protéine est fabriquée en présence d'erreurs du codage de l'ADN, erreurs pouvant être induites par différentes substances toxiques comme les amines du tabac. La p53 agit de concert avec la protéine p21 et inhibe le passage des cellules de la phase G₁ à la phase S (Cooper, 1999). Donc, le blocage entre les phases G₁ et S par les extraits et les fractions pourrait être attribué à des dommages causés à l'ADN, possiblement par le catéchol et l'hydroquinone, ayant entraîné l'activation de la p53. Des investigations plus poussées devraient être faites confirmer l'activation de la p53.

Contrairement aux V79, les lymphocytes T humains et de souris exposés à l'extrait DMSO ont causés le blocage du cycle cellulaire dans la phase S (Figure 9 de l'article). Bien que plusieurs auteurs ont rapporté le blocage des cellules exposées à la fumée du tabac ou à certains composés en particulier en phase G₁ (McCue *et al.*, 2003; Palozza *et al.*, 2004; Pines, 1995), une autre étude a rapporté de blocage de lymphocytes T humains exposé à l'hydroquinone en phase S (Li *et al.*, 1997). Ainsi, il est probable que les composés présents dans l'extrait DMSO aient des effets à

plusieurs niveaux dans les différents types de cellules, causant, dans ce cas-ci, le blocage des lymphocytes T humains et de souris en phase S.

Enfin, comme le pourcentage de génotoxicité mesuré dans le IVMNT reflète des dommages causés à l'ADN des cellules et que le pourcentage de cellules bloquées dans la phase G₁ reflète aussi des dommages causés à l'ADN, il pourrait y avoir un lien entre les pourcentages de génotoxicité et de cellules en phase G₁ induit par l'extrait DCM. Et si ce lien était confirmé, le test du cycle cellulaire pourrait être réalisé en tant que test dépisteur des doses optimales à utiliser pour le IVMNT. Comme trois jours sont nécessaires pour obtenir les résultats du test du cycle cellulaire contre deux semaines pour obtenir les résultats du IVMNT, il pourrait être avantageux de tester d'abord les échantillons par le cycle cellulaire pour établir les doses d'exposition à utiliser pour le IVMNT. Les doses à utiliser se situeraient avant une trop grande baisse du pourcentage de cellules en phase G₁ et d'une hausse élevée du pourcentage de cellules en apoptose.

Le ré-extrait DCM-DMSO a aussi induit le blocage des cellules V79 entre les phases G₁ et S où on retrouve environ 55% de cellules dans la phase G₁ à la dose 20 µg/ml (Figure 3d, Annexe II : résultats non publiés). Mais, l'inhibition de la prolifération cellulaire est beaucoup moins drastique que lorsque les cellules sont exposées à l'extrait DCM. La ré-extraction démontrant une certaine activité toxique, nous pouvons conclure que soit, le DCM n'extrait pas tous les composés du filtre Cambridge (première extraction) soit, l'extraction n'est pas complète dû à l'évaporation très rapide du solvant.

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, implique plusieurs altérations de l'état biochimique et physiologique de la cellule. Un événement se produisant tôt lors de l'apoptose est la translocation de phosphatidylsérine (PS) à partir du feuillet interne de la membrane plasmique jusqu'à la surface cellulaire. L'utilisation du colorant Annexin-V, ayant une haute affinité pour la PS, se lie à la partie de la protéine qui se trouve à la surface de la cellule et permettant la visualisation de la portion de cellules apoptotique au sein d'une population cellulaire. La viabilité et l'induction de l'apoptose ont donc été mesurées sur les cellules V79 exposées aux

cinq extraits, via le cytomètre en flux PCA de Guava[®]. Le pourcentage de viabilité des cellules exposées aux différents extraits, indépendamment de la dose d'exposition, est toujours supérieur à 97% (Figure 4a, Annexe II : résultats non publiés). Le pourcentage de cellules apoptotique commence cependant à augmenter à partir de la dose de 20 µg/ml et dépasse 50% lors de l'exposition des cellules à l'extrait DCM, à la dose de 35 µg/ml (Figure 4b, Annexe II : résultats non publiés). Ce test démontre que, même si les cellules ont subi des dommages au niveau génétique ou cytosolique (affectation de la prolifération cellulaire) démontré par le IVMNT, le cycle cellulaire et la transformation lymphoblastique, elles sont toujours viables. Au-delà d'une certaine dose (20 µg/ml), l'apoptose est enclenchée car les cellules exposent la PS sur leur membrane externe. La mesure de la viabilité et de l'apoptose sur les cellules exposées aux extraits pourrait donc être utilisée, comme pour le cycle cellulaire, en tant que test dépisteur des doses optimales à utiliser pour le IVMNT. Comme trois jours sont nécessaires pour obtenir cette information contre deux semaines pour le IVMNT, il pourrait être avantageux de tester les échantillons quant à la dose à partir de laquelle l'apoptose est induite. La dose limite d'exposition des cellules pour le IVMNT serait celle à partir de laquelle l'apoptose est induite.

CONCLUSION

Cette étude avait pour but premier de caractériser biologiquement et chimiquement les produits de combustion de l'AC. Suite aux différents tests toxicologiques réalisés, les produits de combustion de l'AC s'avèrent être génotoxiques et cytotoxiques, ils inhibent la prolifération cellulaire (blocage en phase G₁), ont des effets immunosuppresseurs et ils induisent l'apoptose. La caractérisation chimique des produits de combustion de l'AC a révélé que les principaux composés toxiques générés par la combustion de l'AC sont le catéchol et ses dérivés. Les effets mesurés par les différents tests *in vitro* peuvent être expliqués, en partie, par la présence de composés toxiques identifiés par HPLC/MS et par GC/MS. Ainsi, le principal composé présent dans les extraits d'AC, et possiblement responsable de la toxicité de la fraction 2 en particulier, serait le catéchol.

Si le catéchol est bel et bien en cause dans l'induction de la toxicité suite à la combustion de l'AC, deux options peuvent être envisagées. Soit, éliminer l'AC du tabac, soit, éliminer le catéchol de la fumée par filtration spécifique de ce composé. Toutefois, d'autres études quantitatives en chimie devront encore être réalisées dans le but d'associer la quantité de catéchol présent dans les extraits et au degré de toxicité mesuré par les tests toxicologiques.

Enfin, ce projet de recherche nous permet de conclure sur l'avantage évident de l'association de la toxicologie et de la chimie dans la caractérisation de mélanges de composés. Dans une perspective de réduction du niveau de toxines dans la fumée du tabac, plusieurs étapes sont nécessaires dont l'identification des constituants du tabac, des composés qu'ils génèrent dans la fumée et de la corrélation entre les composés et la toxicité induite. Ce travail apporte quelques données en ce sens mais, étant donné la complexité de la fumée du tabac, beaucoup de travail reste à faire quant à la caractérisation des effets toxiques et des composés qui en sont à l'origine.

PERSPECTIVES FUTURES

Ce travail a suscité quelques questions restées sans réponses tel que : la plus forte toxicité de l'extrait DCM versus les autres extraits et la part de toxicité vraiment associée à la présence du catéchol. Ainsi, d'autres études devraient permettre d'en déterminer les raisons. À cet effet, des travaux présentement en cours et impliquant principalement la chimie analytique et la toxicologie devraient aider à répondre à ces questions. Ils sont réalisés par une étudiante de l'Université de Montréal, Navneet Kaur, et permettront de fractionner encore plus les produits de combustion de l'acide chlorogénique dans le but d'en identifier le ou les composés les plus toxiques et de confirmer la toxicité associée au catéchol. De plus, des études en chimie analytique permettront d'identifier les composés retrouvés dans l'extrait DCM et dans les autres extraits dans le but d'expliquer la différence de toxicité entre les extraits. Éventuellement, la combustion d'autres composés, comme la lignine, pourra être étudiée, tant au niveau toxicologique que chimique, dans le but d'établir la corrélation entre les constituants du tabac et les composés toxiques générés dans la fumée.

Bibliographie

Agriculture Canada (1987). Curing flue-cured tobacco in Canada. Publication 1312/E. Communications Branch, Agriculture Canada, Ottawa. 38p.

Andreoli, C., Gigante, D., Nunziata, A. (2003). A review of in vitro methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim of reducing the toxicity of smoke. *Toxicology in Vitro*, 17: 587-594.

Anonyme (1997). Tobacco smoke components. *Beiträge zur Tabakforschung International*, 17: 61-66.

Baker, R.R. (1981). Product formation mechanisms inside a burning cigarette. *Progress in Energy and Combustion Science*, 7: 135-153.

Bradford, J.A., Harlan, W.R., Hanmer, H.R. (1936). Nature of cigarette smoke: technic of experimental smoking. *Ind. Eng. Chem*, 28 : 836-839.

Borenfreund E., Puerner J. (1985). Toxicity determination in vitro by morphological alterations and Neutral Red absorption. *Toxicol Lett*, 24: 119-124.

Chen, P. (2004). Chemistry of cigarette burning processes. *Contributions to Tobacco Research* 21: 105-110.

Clark, T.J., Bunch, J.E. (1996). Quantitative determination of phenols in mainstream smoke with solid-phase microextraction gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry. *Journal of Chromatographic Science*, 34: 2-5.

Cooper, G.M. (1999). *La Cellule : Une Approche Moléculaire*. De Boeck Université s.a. Paris. 674p.

CORESTA – Centre de Coopération pour les Recherches Scientifiques Relatives au Tabac (2002). The rationale and strategy for conducting in vitro toxicology testing of tobacco smoke. *CORESTA In Vitro Toxicology Task Force*, 39p.

Davis, D.L. and Nielsen, M.T. (1999). *Tobacco: Production, Chemistry and Technology*. CORESTA. Blackwell Science Ltd. 467p.

DeMarini, D.M. (1983). Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate. *Mutation Research*, 114: 59-89.

DeMarini, D.M. (2004). Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutation Research*, 567: 447-474.

Frenesius, R.E. (1985). Analysis of tobacco smoke condensate. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 8: 561-575.

Frieauff, W., Pötter-Lacher, F., Cordier, A., Sutter, W. (1998). Automatic analysis of the in vitro micronucleus test on V79 cells. *Mutation Research*, 413: 57-68.

Gopalakrishna, R., Chen, Z-H., Gundimeda, U. (1994). Tobacco smoke tumor promoters, catechol and hydroquinone, induce oxidative regulation of protein kinase C and influence invasion and metastasis of lung carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91: 12 233-12 237.

Health Canada. (2004). Bacterial Reverse Mutation Assay for Mainstream Tobacco Smoke. Official Method T-501 Version 1.1.

Health Canada (2004). In Vitro Micronucleus Assay for Mainstream Tobacco Smoke. Official Method T-503.

Health Canada (2004). Neutral Red Uptake Assay for Mainstream Tobacco Smoke. Official Method T-502 Version 1.1.

Health Canada. (1999). Determination of Phenolic Compounds in Mainstream Tobacco Smoke, Official Method T-114.

Hecht S.S. (1999). Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 91: 1194-1210.

Hoffmann, D. and Hoffmann, I. (1997). The changing cigarette, 1950-1995. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 50: 307-364.

Hoffmann, D. Hecht, S.S. Wynder, E.L. (1983). Tumor promoters and carcinogens in tobacco carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 50: 247-257.

Hofnung M., Quillardet P. (1986) Recent developments in bacterial short-term tests for the detection of genotoxic agents. *Mutagenesis*. 1:319-330.

Huber, G.L. (1989). Physical, chemical and biologic properties of tobacco, cigarette smoke and other tobacco products. *Beiträge zur Tabakforschung International*, 7: 142-147.

Hutton, J. J. and Hackney, C. (1975). Metabolism of cigarette smoke extracts by human and rat homogenates to form mutagens detectable by *Salmonella typhimurium* TA1538. *Cancer Research*, 35: 2461-2468.

Imperial Tobacco Canada Ltd – ITCAN (1982). Prediction of DPM from samples of strip tobacco, Research and Development Department, Dr A. Porter.

International Agency for Research on Cancer - IARC (1986). Tobacco smoking. In: Monographs on the evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to humans. Vol. 38, Lyon, France, 421p.

Li, Q., Aubrey, M.T., Christian, T. and Freed, B.M. (1997). Differential inhibition of DNA synthesis in human T cells by the cigarette tar components hydroquinone and catechol. *Fundamental and Applied Toxicology*, 38: 158-165.

Li, Z, Wang, L. Yang, G. Shi, H. Jiang, C. Liu, W. Zhang, Y. (2003). Study on the determination of polyphenols in tobacco by HPLC coupled with ESI-MS after solid-phase extraction. *Journal of Chromatographic Science*, 41: 36-40.

Maron, M.D. and Ames, N. Bruce. (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research*, 113: 173-215.

Massey E., Aufderheide M., Koch W., Lodding H., Pohlmann G., Windt H., Jarck P., Knebel J. (1998). Micronucleus induction in V79 cells after direct exposure to whole cigarette smoke. *Mutagenesis* 13: 145-149.

Massie, I.E. (1981). Tobacco leaf – A look at history. *Recent Advance in Tobacco Science*. 7: 3-18.

McCue J.M. Lazis, S. Cohen, J.J. Modiano, J.F. and Freed, B.M. (2003). Hydroquinone and catechol interfere with T cell cycle entry and progression through the G₁ phase. *Molecular Immunology*, 39: 995-1001.

Mizusaki, S., Okamoto, H., Akiyama, A. and Fukuhara, Y. (1977). Relation between chemical constituents of tobacco and mutagenic activity of cigarette smoke extract. *Mutation Research*, 48: 319-326.

Mortelmans, K. & Zeiger, E. (2000). The Ames *Salmonella* /microsome mutagenicity assay. *Mutation Research*, 455: 29-60.

Nanni, E.J. Lovette, M.E., Hicks, R.D. Fowler, K.W., Borgerdins, M.F. (1990). Separation and quantification of phenolic compounds in mainstream cigarette smoke by capillary gas chromatography with mass spectrometry in the selected-ion mode. *Journal of Chromatography*, 505: 365-374.

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development (2004). Draft proposal for a new guideline 487: In Vitro Micronucleus test, OECD Guideline for the testing of chemicals, adopted 14th June 2004, 1st version.

Palozza, P. Serini, S. Di Nicuolo, F. Boninsegna, A. Torsello, A. Maggiano, N. Ranelletti, F.O. Wolf, F.I. Calviello, G. and Cittadini, A. (2004). β -Carotene exacerbates DNA oxidative damage and modifies p53-related pathways of cell proliferation and apoptosis in cultured cells exposed to tobacco smoke condensate. *Carcinogenesis*, 25: 1315-1325.

Pines J. (1995). Cyclins and cyclin-dependent kinase: a biochemical view. *Biochemical Journal*, 308: 679-711.

Poirier, M. Fournier, M. Brousseau, P. and Morin A. (2002). Effects of volatile aromatics, aldehydes and phenols in tobacco smoke on viability and proliferation of mouse lymphocytes. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 65: 1437-1451.

Préfontaine, D., Morin, A., Jumarie, C. and Porter, A. (2006). In vitro bioactivity of combustion products from 12 tobacco constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 44: 724-738.

Rafferty, S.M. (2006). Evidence of early tobacco in Northeastern North America. *Journal of Archeological Science*, 33: 453-458.

Robertson, M.L. Eastmond, D.A. and Smith, M.T. (1991). Two benzene metabolites, catechol and hydroquinone, produce a synergistic induction of micronuclei and toxicity in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*, 249: 201-209

Rodgman, A. and Green, C.R. (2003). Toxic chemicals in cigarette mainstream smoke – hazard and hoopla. *Beiträge zur Tabakforschung International*, 20: 481-545.

Runeckles, V.C. (1963). Tobacco polyphenols II. On the biosynthesis of chlorogenic acid. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 41: 2249-2258.

Sakuma, H. Matsushima, S. Munakata, S. Sugawara, S. (1982). Pyrolysis of chlorogenic acid and rutin. *Agricultural and Biological Chemistry*, 46: 1311-1317

Schlotzhauer, W.S. Snook, M.E. Chortyk, O.T. Wilson, R.L. (1992). Pyrolytic evaluation of low chlorogenic acid in tobaccos in the formation of the smoke co-carcinogen catechol. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 22: 231-238.

Schlotzhauer, W.S. Martin, R.M. Snook, M.E., Williamson, R.E. (1982). Pyrolytic studies on the contribution of tobacco leaf constituents to the formation of smoke catechols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30: 372-374.

Schlotzhauer, W.S. and Chortyk, O.T. (1981). Pyrolytic studies on the origin of phenolic compounds in tobacco smoke. *Tobacco Science*, 25: 6-10.

Scott, R.P.W. (1994). *Liquid Chromatography of the Analyst*. Volume 67. Marcel Dekker Inc. N.Y. 328 p.

Scott, R.P.W. (1995). *Techniques and Practice of Chromatography*. Volume 70. Marcel Dekker, Inc. N.Y. 395 p.

Sharma, R.K., Fisher, T.S. and Hajaligol, M.R. (2002a). Effect of reaction conditions on pyrolysis of chlorogenic acid. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 62: 281-296.

Sharma, R.K, Wooten, J.B., Baliga, V.L., Martoglio-Smith, P.A. and Hajaligol, M.R. (2002b). Characterization of char from the pyrolysis of tobacco. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 771-783.

Shields P.G. (2002). Tobacco smoking, harm reduction, and biomarkers. *Journal of National Cancer Institute*, 94:1435-1444.

Slvak, A. Rudenko, L. and Teague, G.L. (1982). Variations among species and cell types in the effects of caffeine on mutagen-induced cytotoxicity and postreplication repair of DNA. *Environmental Mutagenesis*, 4: 143-162.

Stedman R.L. (1968). The chemical composition of tobacco and tobacco smoke. *Chemical Reviews*, 68: 153-207.

Stich, H.F., Rosin, M.P., Wu, C.H. Powrie, W.D. (1981). A comparative genotoxicity study of chlorogenic acid (3-O-caffeoylquinic acid). *Mutation Research*, 90: 201-212.

The Merck Index, An Encyclopedia of Chemicals and Drugs, Eighth Edition. (1968). Merck & Co., Inc. Rahway, N.J. USA. 1713 p.

Torikau K., Uwano Y., Nakamori T., Tarora W., Takahashi H. (2005). Study on tobacco components involved in the pyrolytic generation of selected smoke constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 43: 559-568.

Web site of Tobaccopedia. www.tobaccopedia.org/, Copyright© 2002-2006.

White, J.L., Conner, B.T., Perfetti, T.A., Bombick, B.R., Avalos, J.T., Fowler, K.W., Smith, C.J. and Doolittle, D.J. (2001). Effect of pyrolysis temperature on the mutagenicity of tobacco smoke extract. *Food and Chemical Toxicology*, 39: 499-505.

Wynder, E.L. & Hoffmann, D. (1967). Tobacco and tobacco smoke, Studies in experimental carcinogenesis. Academic Press. New York and London. 730p.

Yang, Q., Hergenbahn, M., Weninger, A. and Bartsch, H. (1999). Cigarette smoke induces direct DNA damage in the human B-lymphoid cell Raji. *Carcinogenesis*, 9: 1769-1775.

ANNEXE I :**Matériels et Méthodes des résultats non publiés**

Ré-extraction des filtres

Suite à l'extraction des filtres Cambridge sous vide avec les différents solvants, les filtres ont été ré-extraits au DMSO. Les filtres dont la première extraction était avec du DMSO n'ont pas été ré-extraits. Pour les autres filtres, suite à leur première extraction, ils ont été laissés dans la pièce conditionnée (22°C, 60% d'humidité) pour leur permettre de sécher. Ensuite, les filtres ont été ré-extraits avec 5ml de DMSO ajouté goutte-à-goutte, sous vide, à l'aide d'un Büchner. Les ré-extraits ainsi obtenus ont été aliquotés dans des tubes Eppendorf de 1,5ml et conservés à -80°C.

Extraction à blanc

Douze échantillons ont été préparés en déposant 5 ml de MeOH sur 0,5 g de glass wool. Suite à 72 h dans la pièce conditionnée (22.5°C, 60% d'humidité) les échantillons ont été brûlés tel que décrit dans *Combustion of a single component and collection of the particulate phase of its smoke* de la partie *Material and Methods* de l'article. Les filtres Cambridge ont été pesés avant et après les combustions et la différence de leur poids était négligeable (± 0 mg). Quatre solvants ont été utilisés pour extraire les filtres trois par trois (H₂O, MeOH, DCM et EA) et les quatre extraits ainsi générés ont été évaporés tel que décrit dans *Combustion of a single component and collection of the particulate phase of its smoke* de la partie *Material and Methods* de l'article. Le poids du ballon vide avant l'évaporation et du ballon contenant les composés secs après l'évaporation, a été noté et les composés de chaque extrait ont été resuspendus dans 2 ml de DMSO. Les extraits « à blanc » ainsi créés ont été conservés à -80°C en attendant d'être utilisés pour le IVMNT.

Viabilité et apoptose

L'essai ViaCount™, pour tester la viabilité cellulaire, et l'essai Nexin™, pour tester le pourcentage d'apoptose, ont été utilisés pour tester l'état des cellules V79 exposées aux cinq extraits. Les cellules ont été exposées 3 h, sans activation métabolique, à des doses de 5 à 20 µg TPM / ml de milieu de culture. Pour réaliser

l'essai du ViaCount^M, suite à l'exposition de 3 h, les cellules exposées aux cinq extraits ont été récoltées et ajustées à 1×10^6 cellules/ml de milieu complet. Un volume de 25 μ l de cette suspension cellulaire a été coloré avec 225 μ l du colorant ViaCountTM (Guava Technologies inc, Hayward, CA) et incubé au moins 5 minutes.

Pour réaliser l'essai du NexinTM, suite à l'exposition de 3h, les cellules ont été centrifugées à 300 g pour 7 min. Le surnageant a été jeté et le culot a été délicatement défait et suspendu dans le tampon Nexin 1X (Guava Technologies inc, Hayward, CA). Suite à une autre centrifugation, le culot de cellules a été resuspendu à 1×10^6 cellules/ml de tampon Nexin 1X. Un volume de 5 μ l du colorant Annexin V-PE et de 5 μ l du colorant 7-AAD ont été ajoutés à 40 μ l de la suspension cellulaire et incubées 20 min dans le noir, sur glace. Ensuite, un volume de 450 μ l du Nexin buffer 1X a été ajouté à chaque échantillon.

Les données ont été acquises sur le cytomètre Guava PCA et à l'aide du logiciel CytoSoftTM 2.0.

ANNEXE II :**Résultats non publiés**

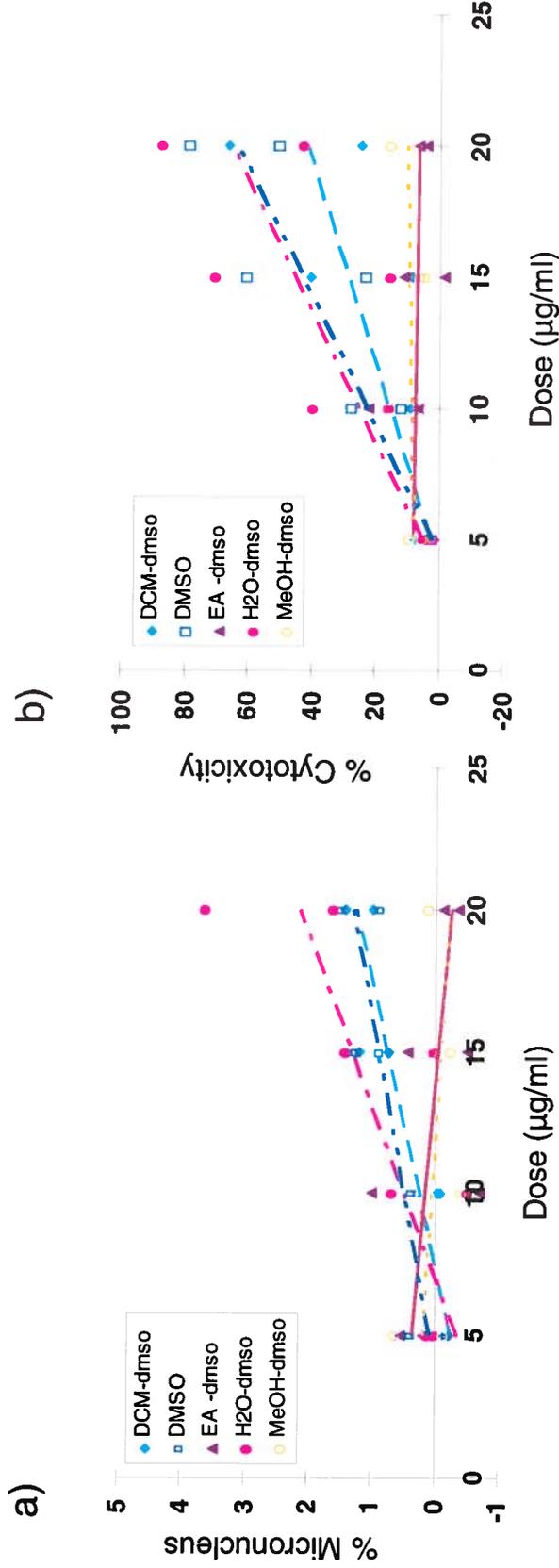


Figure 11: a) Genotoxic activity (% Micronucleus) and b) inhibition of cell proliferation (% Cytotoxicity) induced by DMSO extract, H₂O-dmso, DCM-dmso, MeOH-dmso and EA-dmso re-extracts generated from three independent combustions of 0,5 g of chlorogenic acid, on V79 cells exposed 3h, without metabolic activation. DMSO extract, H₂O-dmso and DCM-dmso induced significantly different % Micronucleus and DMSO extract and H₂O-dmso re-extract induced significantly different % Cytotoxicity as per the Duncan's test ($\alpha < 0.05$). The dose refers to quantity of TPM or DPM (μg) per ml of medium. DCM-dmso re-extract: —, DMSO extract: — · · ·, H₂O-dmso re-extract: - · · · ·, EA-dmso re-extract: — and MeOH-dmso re-extract: · · · · ·.

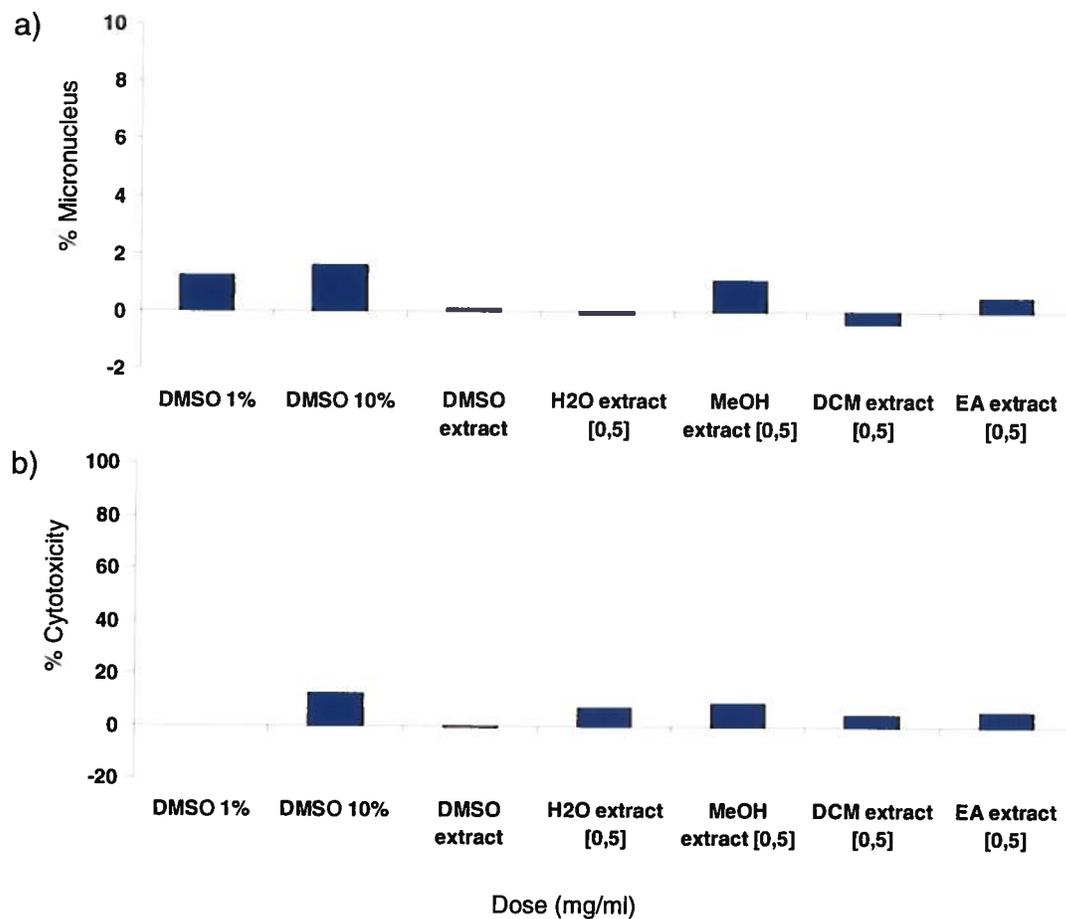


Figure 12: a) Genotoxic activity (%MN) and b) inhibition of cell proliferation (%cytotoxicity) induced by V79 cells exposed 3 h to blank extracts, without metabolic activation. Dose refers to quantity of particles weighed after solvent evaporation (mg) per ml of medium. DMSO 1% (100 μ l DMSO in 10ml complete medium) and DMSO 10% (1ml DMSO in 10ml complete medium) are controls.

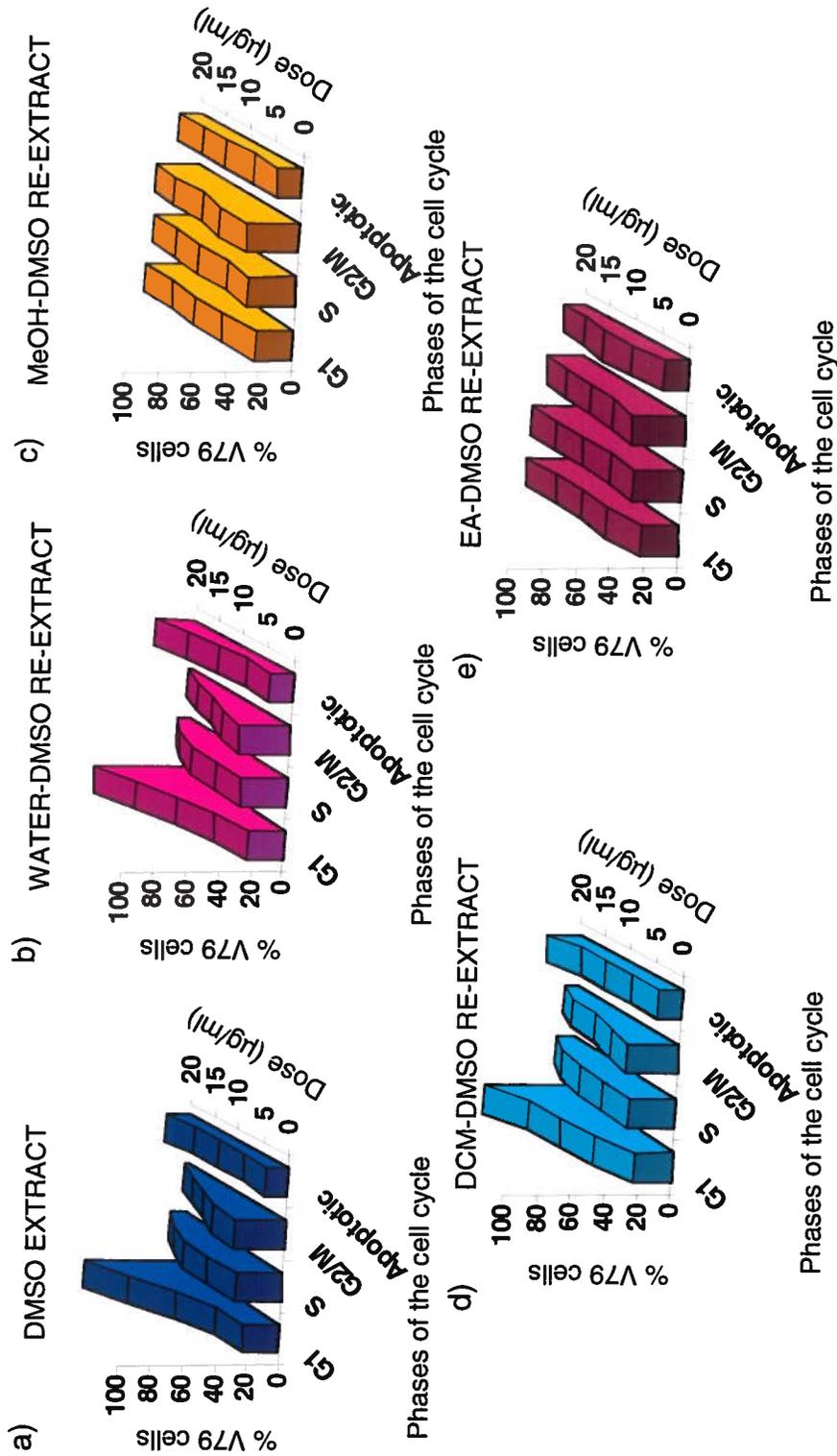


Figure 13: Distribution of V79 cells as a function of cell cycle phases following an exposure of 3h to DMSO extract, H₂O-dmso, MeOH-dmso, DCM-dmso and EA-dmso re-extracts, without metabolic activation, as assessed by flow cytometry. The dose refers to quantity of TPM or DPM (µg) per ml of medium.

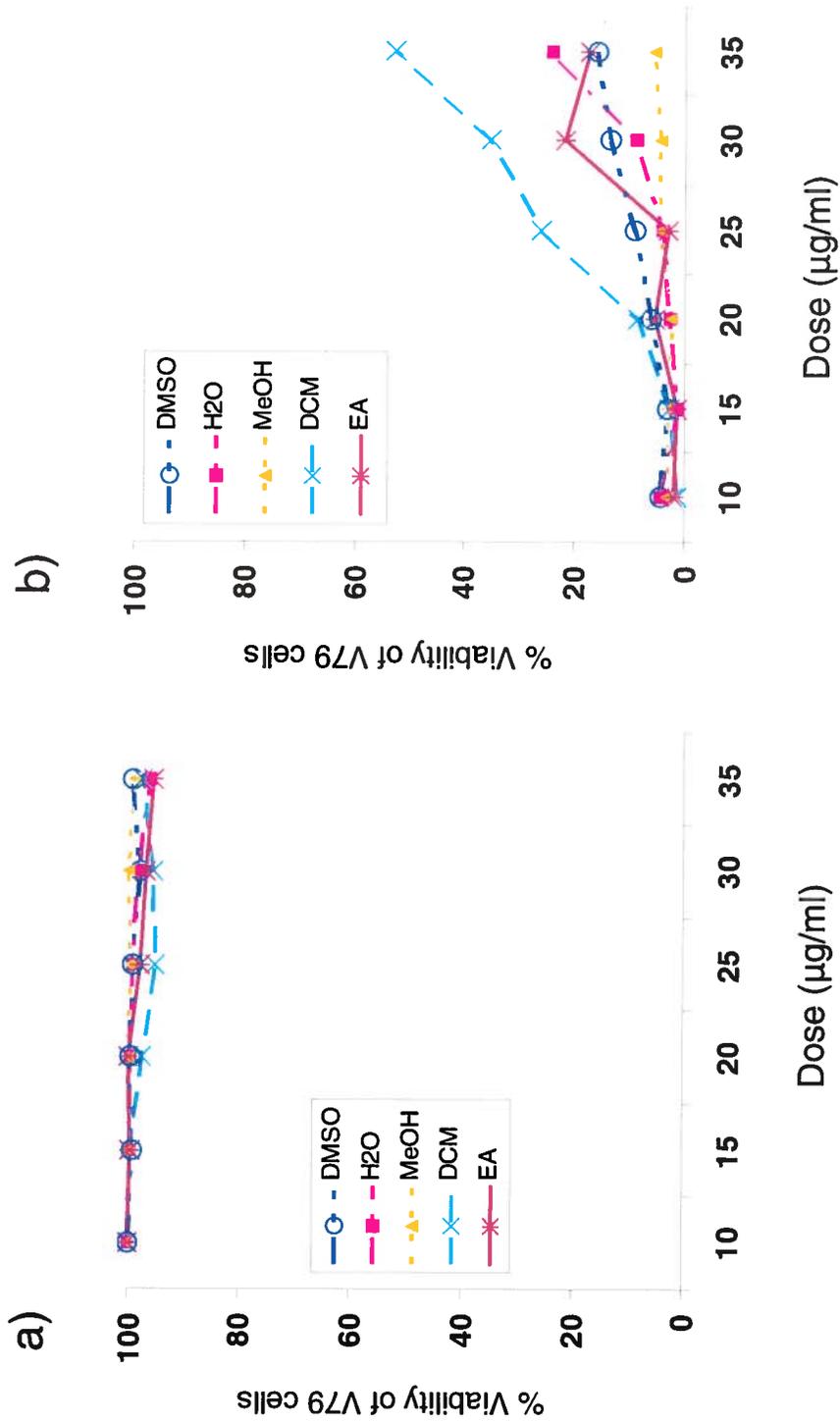


Figure 14: a) Percentage of viability and b) percentage of apoptosis of V79 cells exposed 3h to DMSO, H₂O, MeOH, DCM, and EA extracts. The dose refers to quantity of TPM or DPM (µg) per ml of medium.

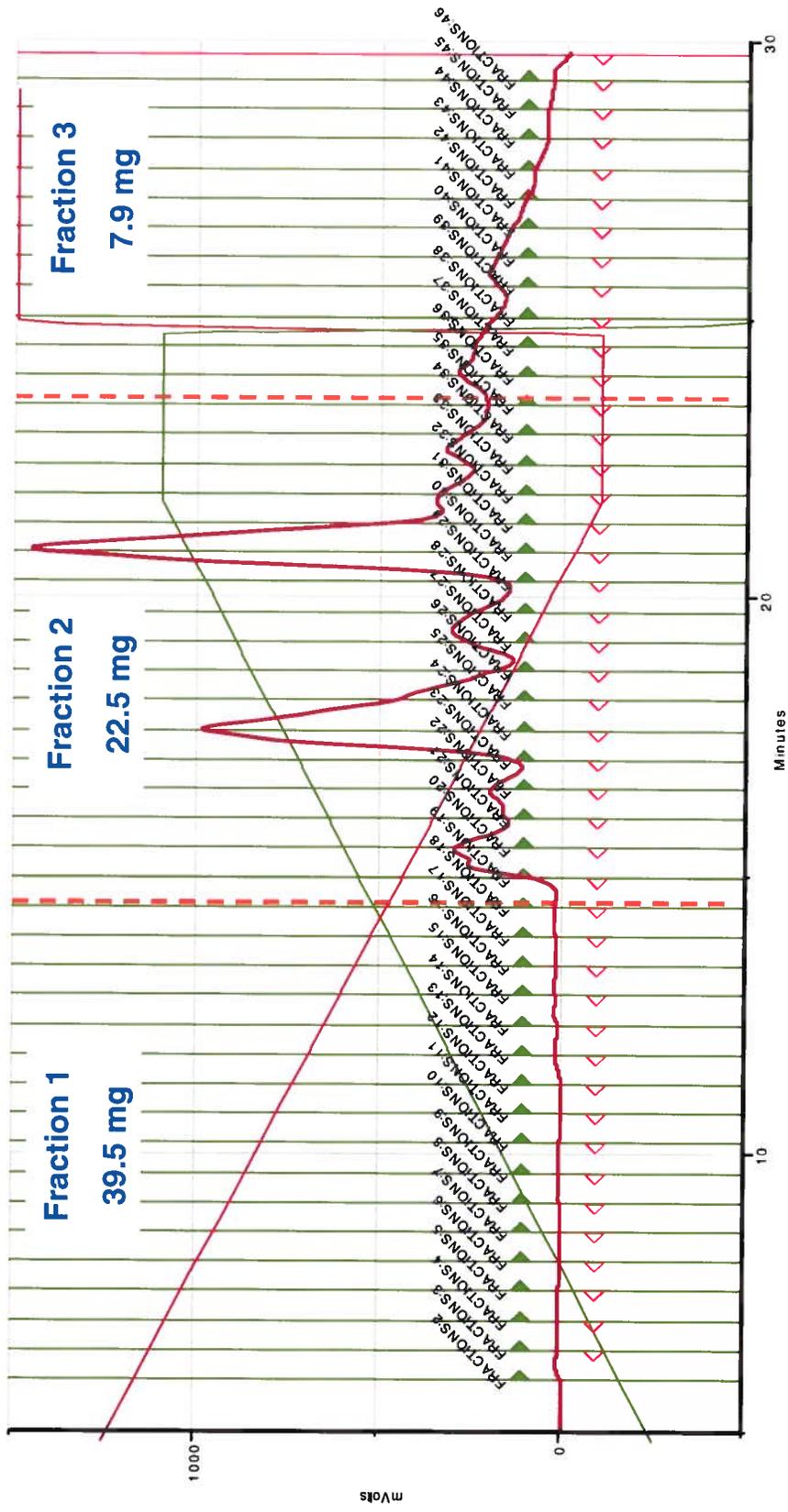


Figure 15 : Profil UV de l'extrait DMSO obtenu par LC-UV/MS préparatif et représentant l'endroit du spectre UV où a eu lieu le fractionnement en trois principales fractions.