

50376
1984
157

50376
1984
157

N° d'ordre : 641

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

par

Bernard BAILLEUL

LA CANCÉROGÉNÈSE PAR LE 4-NITROQUINOLÉINE 1-OXYDE

ÉTUDE DES MODIFICATIONS DES ACIDES NUCLÉIQUES PAR LE CANCÉROGÈNE ULTIME



Soutenue le 30 Novembre 1984, devant la Commission d'Examen

Président : Monsieur G. BISERTE

Rapporteurs : Madame M.H. LOUCHEUX

Monsieur M. DAUNE

Monsieur M. LENG

Examineurs : Monsieur J. LHOMME

Monsieur C. HOUSSIER

Monsieur J. KREMBEL

Monsieur G. DIRHEIMER

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, COR-
DONNIER, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN,
GLACET, GONTIER, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG,
LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU,
ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

ANCIENS PRESIDENTS DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET
TECHNIQUES DE LILLE

MM. M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences Economiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie animale
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BRASSELET Jean-Paul	Géométrie et topologie

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CAYATTE Jean-Louis	Sciences économiques
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean-Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CROSNIER Yves	Electronique
M. CURGY Jean-Jacques	Biologie
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences économiques
M. DE MASSON D'AUTUME Antoine	Sciences économiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertziennne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertziennne
M. DUBUS Jean-Paul	Spectrométrie des solides
M. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.P.A.)
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographi-
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphé-
	riques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GREGORY Pierre	I.P.A.
M. GREMY Jean-Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean-Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.P.A.)
M. JOURNAL Gérard	Spectroscopie hertziennne

M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.P.A.)
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MONTEL Marc	Physique du solide
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PASZKOWSKI Stéphan	Analyse numérique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean-François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROBINET Jean-Claude	E.U.D.I.L.
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STAROSWIECKI Marcel	Informatique
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
Mme TJOTTA Jacqueline	Mathématiques
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétique
M. WALLART Francis	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique
M. WATERLOT Michel	Géologie générale
Mme ZINN Justin Nicole	Algèbre

A MA FAMILLE.

Ce travail a été effectué à l'Institut de Recherche sur le Cancer de Lille et à l'Unité 124 I.N.S.E.R.M., où Monsieur le Professeur G. BISERTE a bien voulu m'accueillir. Je tiens à le remercier pour la confiance qu'il m'a témoignée et également pour avoir bien voulu présider le Jury de cette thèse.

Madame M.H. LOUCHEUX, Maître de Recherche au C.N.R.S. a suivi la progression de ce travail avec le plus grand intérêt. J'apprécie depuis mon entrée dans son laboratoire, son aide constante et ses nombreux conseils, qui m'ont permis de mener à bien ce travail. Je tiens à lui exprimer de tout coeur, mes remerciements. Je suis heureux de la compter parmi mes Juges.

Monsieur le Professeur, M. DAUNE et M. LENG, Directeur de Recherche au C.N.R.S. ont bien voulu juger ce travail et en être les rapporteurs, je les en remercie vivement.

Je tiens à remercier également Messieurs les Professeurs, J. LHOMME, C. HOUSSIER, J. KREMBEL et G. DIRHEIMER, d'avoir accepté de siéger à ce Jury.

Mes remerciements s'adressent aussi à tous mes camarades de laboratoire pour leur aide et leur sympathie. Qu'ils soient assurés de toute mon amitié.

C'est aussi un plaisir pour moi d'avoir eu Madame ZOUITINA-GALIEGUE comme proche collaboratrice pendant tout ce travail, je tiens à lui témoigner ma sympathie.

J'adresse mes remerciements à tous ceux qui ont permis la réalisation de ce travail

Monsieur C. DENIS pour les illustrations

Madame M. MOISON pour la frappe de ce manuscrit

Madame R. CARETTE pour l'impression

Madame M.T. GARET pour le travail photographique.

Dans ces pages, mes amis, en tout hommage, y ont tous une place. Un en particulier grâce auquel je régis avec beaucoup plus de fortune, depuis de nombreuses années, les motivations de mon existence. Qu'il trouve ici ma reconnaissance.

Ce travail a été rendu possible grâce à l'aide de la Ligue Nationale Française contre le Cancer, de la Fondation pour la Recherche Médicale, et de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale auxquels j'adresse mes remerciements.

TABLE DES MATIERES

<u>INTRODUCTION</u>		p. 1
<u>REMARQUES PRELIMINAIRES</u>		p. 2
<u>PREMIERE PARTIE : GENERALITES, les concepts de la cancéro- génèse chimique</u>		p. 7
I - <u>Les propriétés biologiques des cancérogènes chimiques</u>		p. 8
a) Le pouvoir cancérogène et mutagène		p. 8
b) Le métabolisme des cancérogènes chimiques : le concept des Miller		p. 11
- L'activation et la détoxication		p. 11
- Les cancérogènes ultimes et leurs propriétés électrophiles		p. 15
II - <u>Les lésions sur l'ADN et leurs conséquences</u>		p. 21
a) La visualisation des lésions		p. 21
b) La formation des composés de substitution base - cancérogène		p. 22
c) Les perturbations structurales de l'ADN indui- tes par les lésions		p. 26
- Le modèle insertion dénaturation		p. 27
- Les modèles externes		p. 27
d) Les conséquences biologiques de la fixation des cancérogènes sur l'ADN		p. 31
- La réplication		p. 31
- La méthylation		p. 32
- La réparation		p. 33
III - <u>Les tendances actuelles</u>		p. 36
<u>OBJECTIFS</u>		p. 39

DEUXIEME PARTIE : RESULTATS, la cancérogénèse par le
4-nitroquinoléine 1-oxyde. Etude des modifications des
acides nucléiques par le cancérogène ultime

	p. 40
I - <u>Le modèle de cancérogène ultime du 4NQO</u>	p. 41
a) Le diAc-4HAQO et l'Ac-4HAQO : les adduits obtenus in vitro avec les nucléosides	p. 42
b) L'Ac-4HAQ, un dérivé d'hydrolyse du diAc-4HAQO	p. 52
c) Etude des adduits obtenus par action de l'Ac-4HAQO et de ceux obtenus in vivo par action du 4HAQO	p. 66
d) Conclusion	p. 92
II - <u>Identification structurale des composés de substitution de l'ADN par l'Ac-4HAQO</u>	p. 93
a) Les principaux adduits base-quinoléine	p. 94
1) Le dGuo-C8-AQO	p. 94
2) Le r.o. dGuo-C8-AQO	p. 94
3) Le dGuo-N2-AQO	p. 95
4) Le dAdo-N ⁶ -AQO	p. 95
b) Le dosage des adduits sur l'ADN	p. 138
1) Dosage par spectrophotométrie d'absorption de l'adduit sur le C8 de la guanine	p. 138
2) Analyse quantitative en clhp des trois principaux adduits après hydrolyse enzymatique	p. 138
c) Conclusion	p. 148
III - <u>Etudes conformationnelles du poly(dG-dC).poly(dG-dC) modifié par l'Ac-4HAQO</u>	p. 151
a) Conformations du poly(dG-dC).poly(dG-dC) modifié par l'Ac-4HAQO	p. 152
b) Etude de la transition B --> Z, induite par NaCl, du poly(dG-dC).poly(dG-dC) modifié par l'Ac-4HAQO	p. 169
c) Etude de la conformation de l'adduit dGuo-C8-AQO en ¹ H RMN	p. 171
d) Conclusion	p. 177

<u>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	p. 180
--	--------

BIBLIOGRAPHIE

Dans le texte, les publications apparaissent aux pages suivantes :

Publication n° 1	p. 45
Publication n° 2	p. 54
Publication n° 3	p. 67
Publication n° 4	p. 96
Publication n° 5	p. 108
Publication n° 6	p. 144
Publication n° 7	p. 153

A B R E V I A T I O N S

Dérivés de la quinoléine

4NQO	4-Nitroquinoléine 1-oxyde
4HAQO	4-Hydroxyaminoquinoléine 1-oxyde
Ac-4HAQO	4-Acétoxyaminoquinoléine 1-oxyde
diAc-4HAQO	O,O'-Diacétyl-4-hydroxyaminoquinoléine 1-oxyde
4AQO	4-Aminoquinoléine 1-oxyde
4AQ	4-Aminoquinoléine
Ac-4HAQ	4-Acétoxyaminoquinoléine.

Autres cancérogènes

2AAF	2-Acétylaminofluorène
2AF	2-Aminofluorène
N-AAAF	N-Acétoxy-2-acétylaminofluorène
N-OH-AAF	N-Hydroxy-2-acétylaminofluorène
N-OH-AF	N-Hydroxy-2-aminofluorène
1NA	1-Naphtylamine
2NA	2-Naphtylamine

Adduits

dAdo-N ⁶ -AQO	3-(Désoxyadenosin-N ⁶ -yl)-4-aminoquinoléine 1-oxyde
dGuo-C8-AQO	N-(Désoxyguanosin-8-yl)-4-aminoquinoléine 1-oxyde
dGuo-N ² -AQO	3-(Désoxyguanosin-N ² -yl)-4-aminoquinoléine 1-oxyde
r.o.dGuo-C8-AQO	1(-1'-désoxyriboside)-1- [6-(2,5-diamino-4-oxopyrimidinyl)] -3-(4-quinoléinyl 1-oxyde) urée
dGuo-C8-AAF	N-(Désoxyguanosin-8-yl)-2-acétylaminofluorène
dGuo-C8-AF	N-(Désoxyguanosin-8-yl)-2-aminofluorène

Acides nucléiques

ADN	Acide désoxyribonucléique
G,C,T,A	Guanine, Cytidine, Thymine, Adénine
poly G	Acide polyriboguanilylique
poly A	Acide polyriboadénylique
poly(dG-dC) . poly(dG-dC)	Acide poly-désoxyguanylique-désoxycytidylique . poly-désoxyguanylique-désoxycytidylique

Techniques

clhp	Chromatographie liquide haute performance
RMN	Résonance magnétique nucléaire
Tr	Temps de rétention
UV	Ultra-Violet
Σ	Coefficient d'extinction molaire

I N T R O D U C T I O N

Un des buts de la recherche fondamentale en cancérogénèse chimique est de connaître les conséquences des perturbations induites par les cancérogènes dans la vie cellulaire.

La grande majorité des travaux dans ce domaine est axée sur l'acide désoxyribonucléique, c'est-à-dire sur l'évènement mutagène qui peut rendre compte des phénomènes de cancérisation. Ainsi, la connaissance des modifications chimiques et structurales de l'ADN, l'appréhension des impacts biologiques de l'interaction du cancérogène avec la macromolécule, la prédiction des effets mutagènes de chaque lésion, la localisation des zones préférentielles d'attaque et de mutation, constituent les thèmes de recherche d'un grand nombre de laboratoires dispersés dans le monde entier.

L'ensemble de ces recherches n'a pas encore abouti à l'élaboration d'une théorie générale expliquant de façon claire l'induction d'une tumeur par un cancérogène chimique. Certains concepts sont cependant tout à fait admis, comme la métabolisation des substances cancérogènes par la cellule et l'interaction de formes activées avec les macromolécules cellulaires, particulièrement l'ADN.

C'est dans ce contexte que s'intègre le travail que nous avons abordé au laboratoire : l'étude des modifications chimiques et structurales de l'ADN par un cancérogène, le 4-nitroquinoléine 1-oxyde.

REMARQUES PRELIMINAIRES

Dans notre approche de la cancérogénèse chimique par le 4NQO, nous nous intéresserons uniquement à l'étude de l'évènement moléculaire de l'initiation. Nous sommes cependant parfaitement conscients que l'induction d'une tumeur est un phénomène pléiotrope qui fait intervenir en particulier les étapes d'initiation et de promotion (BERENBLUM, 1975). Actuellement on sait que la promotion se divise en plusieurs évènements (WEINSTEIN, 1981).

Le travail qui est présenté ici a été réalisé avec Sylvie ZOUTTINA-GALIEGUE.

Nos objectifs étaient identiques et nous avons fait un travail d'équipe. Ceci explique que, dans la présentation de notre thèse, certaines parties soient communes comme les Généralités et le chapitre II de la partie "Résultats".

De même, nous avons préféré donner des conclusions et perspectives communes qui nous permettent de faire une synthèse de l'ensemble des travaux que nous avons réalisés au laboratoire sur le 4NQO.

Nous avons regroupé ci-après toutes les publications scientifiques, les posters et les participations à des congrès, du laboratoire concernant ce sujet.

PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

- GALIEGUE, S.

Interaction entre le DNA et un cancérrogène : le O,O'-diacétyl-4-hydroxy-aminoquinoléine 1-oxyde.

Thèse de 3ème Cycle, Lille, 27 octobre 1978.

- BAILLEUL, B.

Etude de la fixation du O,O'-diacétyl-4-hydroxyaminoquinoléine 1-oxyde sur le DNA à l'aide des nucléosides puriques.

Thèse de 3ème Cycle, Lille, 18 octobre 1979.

- GALIEGUE, S., LECOCQ, G. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H.

In vitro DNA reaction with a carcinogen, the O,O'-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide. Changes of stability of modified DNA.

Biochim. Biophys. Acta, 1980, 609, 383-391.

- GALIEGUE, S., BAILLEUL, B. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H.

Reactivity of the O,O'-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide with DNA. Comparison with in vivo-reacted DNA.

Europ. J. Cancer, 1980, 16, 1283-1287.

- BAILLEUL, B., GALIEGUE, S. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H.

Adducts from the reaction of O,O'-diacetyl or O-acetyl derivatives of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide with purine nucleosides.

Cancer Res., 1981, 41, 4559-4565.

- GALIEGUE, S., BAILLEUL, B., LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. & J. LAVAL

In vitro enzymatic recognition of DNA modified by O,O'-diacetyl or O-acetyl derivatives of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide.

Carcinogenesis, 1982, 3, 435-438.

- BAILLEUL, B., GALIEGUE, S., DEMEUNYNCK, M., LHOMME, M.F., LHOMME, J. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H.

Identification of 4-acetoxyaminoquinoline from the hydrolysis of 1-acetoxy-4-acetoxyimino-1,4-dihydroquinoline. In vitro and in vivo properties.

Chem. Biol. Interact., 1983, 43, 87-98.

- GALIEGUE-ZOUITINA, S., BAILLEUL, B. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H.
In vitro DNA reaction with a possible ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide : the 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide. Enzymatic degradation of the modified DNA.
Carcinogenesis, 1983, 4, 249-254.

- PFOHL-LESZKOWICZ, A., GALIEGUE-ZOUITINA, S., BAILLEUL, B., LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. & DIRHEIMER, G.
Enzymatic methylation of DNA and poly(dG-dC).poly(dG-dC) modified by 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide, the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide.
FEBS Lett., 1983, 163, 1, 85-88.

- GALIEGUE-ZOUITINA, S., BAILLEUL, B. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H.
Guanyl-C8-arylation of DNA by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide : A spectrophotometric titration.
Anal. Biochem., 1984, 138, 454-457.

- BAILLEUL, B., GALIEGUE-ZOUITINA, S. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H.
Conformation of poly(dG-dC).poly(dG-dC) modified by O-acetyl derivative of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide.
Nucleic Acids Res., 1984, 12, 7915-7926.

- GALIEGUE-ZOUITINA, S., BAILLEUL, B. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H.
Adducts from in vivo action of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide and from in vitro reaction of 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide with DNA and polynucleotides.
Cancer Research, sous presse.

- BAILLEUL, B., GALIEGUE-ZOUITINA, S., PERLY, B. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H.
Structural identification of the purine ring-opened form of N-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide.
Acceptée à Carcinogenesis.

- GALIEGUE-ZOUITINA, S., BAILLEUL, B., GINOT, Y.M., PERLY, B., VIGNY, P. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H.
N²-guanyl and N⁶-adenyl arylation of DNA by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide.
Soumise à Cancer Research.

CONGRES ET POSTERS

- GALIEGUE, S., BAILLEUL, B., LECOCQ, G. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H.
Etude de l'initiation de la cancérogénèse chimique par le 4-nitroquinoléine-1-oxyde (4NQO). Mécanisme d'action.
Forum des Jeunes, Orléans, Septembre 1979.

- GALIEGUE, S., LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. & HOUSSIER, C.
Electro-optical studies on orientation of the O,O'-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide covalently bound to DNA.
International Conference on Molecular Electrooptics, Troy (New York),
14-26 juillet 1980.

- BAILLEUL, B., GALIEGUE, S. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H.
Guanyl-C⁸-arylamination of DNA by the ultimate carcinogen of 4NQO.
British Biophysical Society, Londres, décembre 1980.

- BAILLEUL, B., GALIEGUE, S. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H.
Structure d'un composé d'addition entre le cancérogène ultime du 4-nitroquinoléine-1-oxyde (4NQO) et la désoxyguanosine.
Forum des Jeunes, Paris-Créteil, juillet 1981.

- LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H., GALIEGUE, S., BAILLEUL, B., LHOMME, J., LHOMME, M.F. & DEMEUNYNCK, M.
La cancérogénèse chimique par le 4-nitroquinoléine-1-oxyde (4NQO).
Colloque DGRST "Aspects fondamentaux de la Cancérogénèse".
Le Kleebach, septembre 1981.

- PFOHL-LESZKOWICZ, A., GALIEGUE-ZOUITINA, S., BAILLEUL, B., LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. & DIRHEIMER, G.
Enzymatic methylation of DNA and poly(dG-dC).poly(dG-dC) modified by 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide, the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide.
European Environmental Mutagen Society, Montpellier, septembre 1983.

Je prie mes lecteurs de bien vouloir accepter l'emploi, tout au long de mon manuscrit, de termes anglais que l'usage a francisé avec plus ou moins de bonheur. Cela est vrai par exemple pour le mot "aduit" et aussi pour les noms des composés chimiques utilisés dans la thèse. La traduction correcte semblait trop lourde et ne permettait pas une comparaison aisée avec la littérature anglo-saxonne.

PREMIERE PARTIE

GENERALITES

Les concepts de la cancérogénèse chimique

I. LES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES CANCEROGENES CHIMIQUES

a) Le pouvoir cancérogène et mutagène

A l'heure actuelle il semble bien démontré que la plupart des cancers chez l'Homme sont d'origine chimique. 80 % des cancers humains sont dus à des facteurs d'environnement (MILLER, 1970 ; MILLER, 1978). Le terme "environnement" est à prendre dans un sens très général et comprend des éléments de notre mode de vie, certaines habitudes sociales ou alimentaires. De nombreuses études épidémiologiques ont permis depuis la moitié de ce siècle d'attirer l'attention sur les innombrables phénomènes de pollution (HIGGINSON, 1969 ; HIGGINSON et al., 1977). Depuis les observations par l'anglais POTT en 1775 de la fréquence anormalement élevée des tumeurs du scrotum chez les ramoneurs et par le docteur allemand REHN en 1895 des cancers professionnels de la vessie dus à certaines amines aromatiques, la liste des cancérogènes chez l'Homme s'est allongée. Elle ne comprenait cependant qu'une vingtaine de produits en 1978 (TOMATIS et al., 1978). Cette liste, représentée sur le tableau A, reste incomplète : un certain nombre de composés actuellement suspectés cancérogènes chez l'Homme pourraient y trouver place. Citons par exemple les dérivés de pyrolyse des protéines (SUGIMURA et al., 1981) et un certain nombre de dérivés d'amines aromatiques (KRIEK, 1979) en particulier le 2,4-diaminoanisole et le 2,4-diaminotoluène qui sont utilisés comme additifs dans les colorants des cheveux (DYBING et al., 1981). Il reste cependant très difficile, voire même impossible, d'avoir des preuves irréfutables de l'action cancérogène chez l'Homme d'un composé chimique (HAY, 1982). De nombreux tests (PURCHASE et al., 1976) ont été mis au point pour évaluer le pouvoir cancérogène des composés suspects, les plus rapides et les plus significatifs restant toujours ceux qui mesurent le pouvoir mutagène des produits chimiques chez la Bactérie (tests de AMES et de DEVORET). La grande majorité des cancérogènes sont en effet mutagènes. Cependant, quoique ces tests à court terme soient très sensibles et utiles, ils sont difficilement extrapolables à l'Homme. D'autres tests ont été proposés qui pourraient permettre d'améliorer l'évaluation des risques, mais ils sont encore longs et très complexes (WEINSTEIN, 1981).

Les composés chimiques cancérogènes sont principalement des substances organiques de synthèse, dont le nombre a atteint 4 millions depuis 1945 (MILLER et al., 1979). De plus, il existe des composés chimiques organiques naturels, dont la quantité est difficile à évaluer (environ 100.000).

- Agents chimiques

Sites de formation de la tumeur

Composé naturel

Aflatoxine foie

Composés industriels

4-aminobiphényle vessie
 benzène système hématopoïétique
 benzidine vessie
 (4,4'-diaminobiphényle)
 chlorure de vinyle foie
 disulfure de chloroéthyle poumons, larynx
 éther dichlorométhylrique poumons
 2-naphtylamine vessie

Composés d'origine médicale

chlor amphénicol système hématopoïétique
 cyclophosphamide vessie
 diéthylstilbestrol utérus, vagin
 melphalan système hématopoïétique
 N,N-Bis (2-chloroéthyl)-2-naphtylamine vessie
 oxymétholone foie
 phénacétine rein
 phénytoïne tissu lymphoréticulaire (ganglions)

Classes de composés

amiante poumons, plèvre, péritoine
 arsenic peau, poumons, foie
 cadmium poumons, prostate
 chrome poumons, cavité nasale
 nickel poumons, cavité nasale

Mélange de composés

fumée de cigarette poumons, appareil urinaire, pancréas
 goudrons, suie poumons, peau
 huiles isopropyliques larynx, cavité nasale

TABLEAU A Liste des agents chimiques chez l'Homme (TOMATIS et al., 1978).

Dans le cas du 4NQO qui est un composé de synthèse, le pouvoir mutagène a été mis en évidence sur les champignons par OKABAYASHI en 1953 avant que ne soit montré son pouvoir cancérigène (voir la revue : ENDO et al., 1971). C'est en 1957 que cette propriété du 4NQO a été montrée chez la Souris (NAKAHARA et al., 1957). Les organes cibles sont les voies respiratoires, principalement le poumon (MORI et al., 1961) et les voies digestives : pancréas, estomac (HAYASHI et al., 1971 ; MORI, 1967). Comme dans le cas de la plupart des composés chimiques, le pouvoir cancérigène du 4NQO est lié à la structure de cette molécule. Certains auteurs, après avoir testé de nombreux dérivés quinoléiques, ont attribué la spécificité d'action du 4NQO à la présence du groupement nitro en position 4 et de la fonction N-oxyde en position 1 (NAKAHARA et al., 1958 ; KAWAZOE et al., 1967). Le 4NQO a été très étudié comme modèle de mutagène et de cancérigène. De nombreux auteurs ont décrit l'induction, par ce composé, de substitutions de paire de bases (ISHIZAWA et al., 1970 et 1971 ; PRAKASH et al., 1974a et 1974b ; ROSENKRANZ et al., 1979) et de mutations par décalage du cadre de lecture ; ces dernières sont plus rares (HARTMAN et al., 1971 ; ROSENKRANZ et al., 1979). Les substitutions de paire de bases sont à 90 % des transitions G.C. --> A.T. Des transversions G.C. --> T.A. sont également observées à une fréquence dix fois plus faible. Les mutations sur les paires de bases A.T. sont rares, ceci correspond probablement au fait que la guanine est la cible "privilégiée" du 4NQO (IKENAGA et al., 1975).

Actuellement, on a tendance à élargir le terme "mutagène" à tout ce qui provoque un changement héréditaire dans la séquence nucléotidique de l'ADN ou un changement dans le contenu génétique de la cellule, par perte, duplication, réarrangements de nucléotides, de gènes ou de chromosomes. Ce qui est essentiel, c'est que l'altération ait lieu dans le matériel génétique. La mutation somatique apparaît alors comme un cas particulier et, dans ce cas, le lien direct entre les cancérigènes chimiques et la modification du contenu génétique a pu être prouvé. En effet, récemment, une preuve irréfutable apportée par l'équipe de BARBACID aux U.S.A. (REDDY et al., 1982) est venue étayer la théorie des mutations somatiques de la cancérigénèse. Ces auteurs ont montré que dans le cas du cancer de la vessie chez l'Homme, un gène important était activé par le seul fait d'une mutation ponctuelle sur ce gène. Ce dernier (ras) fait partie de la classe des oncogènes qui sont des gènes dont l'expression anormale au sein de la cellule est un événement important

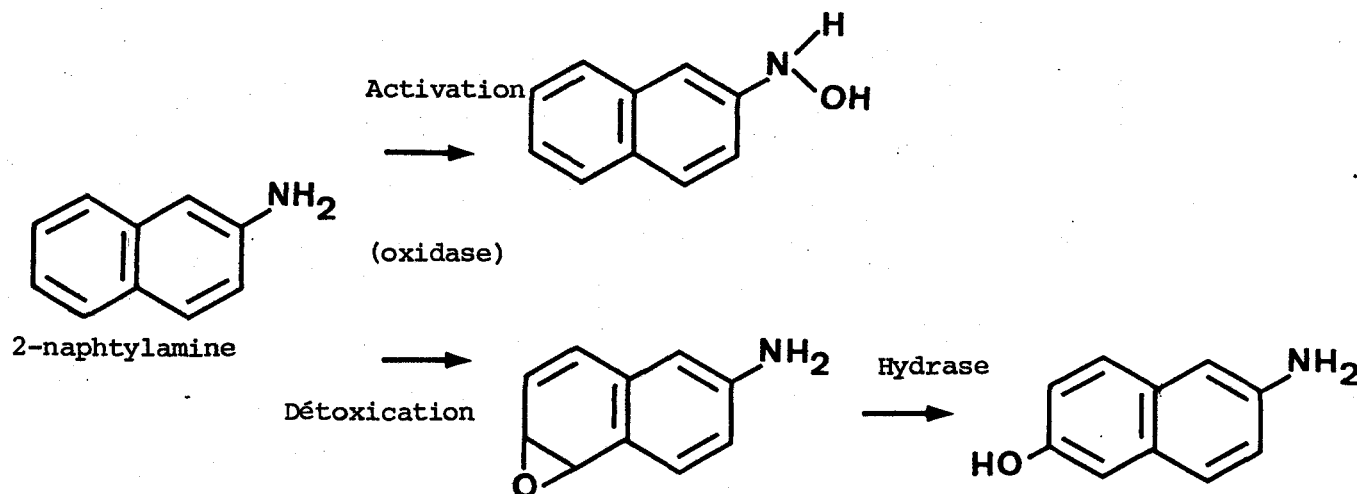
dans la transformation en cellule cancéreuse (GILDEN et al., 1983).

b) Le métabolisme des cancérogènes chimiques : le concept des MILLER

L'activation et la détoxification

La notion de métabolisme des cancérogènes chimiques par les systèmes enzymatiques de la cellule est maintenant parfaitement établie. Cette hypothèse avait été clairement énoncée par J.A. MILLER en 1970. Mis à part les agents alkylants qui sont directement actifs, les autres composés ne sont pas cancérogènes par eux-mêmes. Après l'entrée du précancérogène dans la cellule, celui-ci peut être activé en cancérogène intermédiaire puis finalement converti en un ou plusieurs cancérogènes ultimes très réactifs. La plupart des réactions enzymatiques impliquées dans les premières étapes de ce métabolisme sont oxydatives et ont tout d'abord lieu dans le réticulum endoplasmique. Une métabolisation a lieu également dans la membrane nucléaire (MILLER et MILLER, 1979). A côté des voies métaboliques d'activation on trouve des voies de détoxification qui transforment le cancérogène en composés inactifs. Chez l'eucaryote, les systèmes enzymatiques effecteurs de ces réactions sont inégalement répartis dans les différents organes. Le foie qui est un organe impliqué dans le catabolisme de nombreux composés endogènes, possède la plupart des systèmes d'activation et de détoxification. Ces enzymes sont également présentes dans le rein, le poumon, le transit gastro-intestinal (WEISBURGER et al., 1975). Les principaux systèmes enzymatiques impliqués sont des oxydases qui font intervenir le cytochrome P450 (LOTLIKAR et al., 1981) et aussi des époxyde-hydrases.

A l'heure actuelle il existe des composés cancérogènes pour lesquels le métabolisme est parfaitement connu. Citons tout d'abord deux chefs de file dans la famille des amines aromatiques : le 2AAF, hépato-cancérogène chez le Rat (DE BAUN et al., 1970 ; MILLER, 1978 ; BELAND et al., 1980) et la 2NA responsable de cancers de la vessie en particulier chez l'Homme (WEISBURGER et al., 1973 ; BOYLAND et al., 1966 ; RADOMSKI, 1979). De nombreuses voies métaboliques ont été identifiées pour ces deux composés. Le schéma ci-après illustre la première étape de métabolisation de la 2NA :



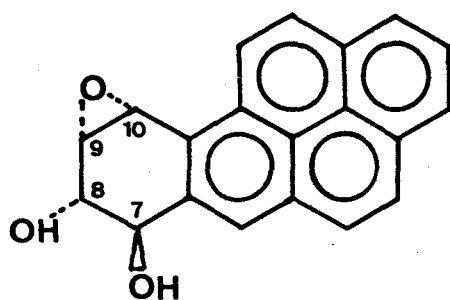
Ainsi, dans le cas des amines aromatiques, la première étape du métabolisme consiste en une C-hydroxylation (voie de détoxication) et une N-hydroxylation (voie d'activation). L'étape de N-hydroxylation peut être suivie de la formation de dérivés de conjugaison de la N-hydroxylamine avec l'acide glucuronique. On a observé la formation de :

- N-glucuronides dans le cas des N-hydroxylamines aromatiques non acétylées de la 2NA et du N-4 biphenyle (KADLUBAR et al., 1977),
- O-glucuronides dans le cas des N-hydroxylamines acétylées du fluorène, du stilbène, du phénanthrène et du biphenyle (IRVING et al., 1977).

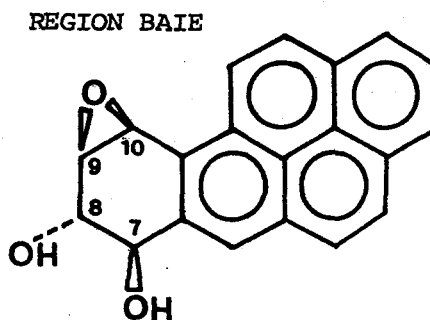
Ces formes conjuguées sont élaborées dans le foie et jouent un grand rôle dans la cancérogénèse extra-hépatique induite par ces composés, donc dans le transport vers les organes cibles. En effet, ces glucuronides, stables à pH neutre, sont hydrolysés à pH faiblement basique dans le cas des O-glucuronides et dans le cas des N-glucuronides, à pH 5, dans l'urine. Cette dernière réaction explique l'induction de cancer de la vessie par la 2NA et le 4-amino-biphenyle (MILLER, 1978). La N-hydroxylamine est libérée dans la vessie et est métabolisée *in situ* en réactifs ultimes. Diverses réactions entrent en jeu pour cette famille de cancérogènes au cours de l'étape ultime d'activation qui est une estérification : transfert de groupement acétyle (KING et al., 1981), désacétylation, sulfonation. Par exemple dans le cas du 2AAF, la sulfonation par une sulfotransférase est la voie majeure d'activation dans le foie de Rat.

D'autres composés ont été bien étudiés et leur métabolisme mieux connu ces dernières années. Citons l'aflatoxine B₁ qui est métabolisée

en donnant lieu à la formation d'époxydes (SWENSON et al., 1977), le safrole dont les voies métaboliques sont multiples (WISLOCKI et al., 1976 ; JANIAUD et al., 1977). Les hydrocarbures aromatiques polycycliques ont été très étudiés dans ce domaine. Leur activation consiste en la formation de diols, puis de diol-époxydes. Il a été montré que les 7,8-diol-9,10 époxydes du benzo(a) pyrène étaient les formes métaboliques impliquées *in vivo* (SIMS et al., 1974 ; DAUDEL et al., 1975). De plus, KING et al. en 1976 ont montré qu'il existait une stéréospécificité d'action, la forme active majeure étant le dérivé anti (voir schéma ci-dessous) :



FORME ANTI



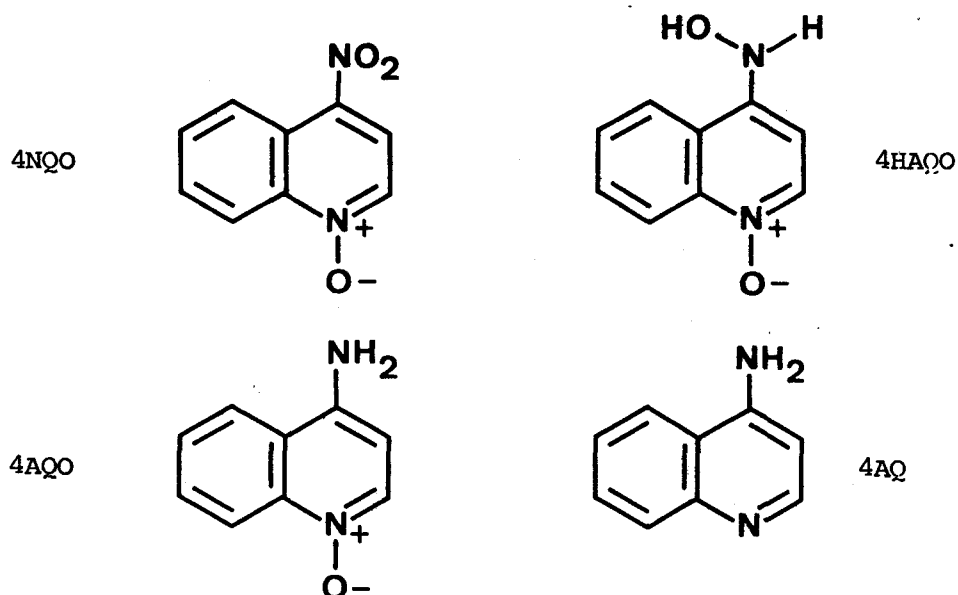
FORME SYN

Plus récemment VIGNY et al. ont montré l'intervention de diol-époxydes de la région non-baie dans le cas du benz (a)anthracène (VIGNY et al., 1980).

On peut concevoir que la présence du (ou des) système(s) enzymatique(s) capable(s) d'activer un produit cancérigène dans un organe ou un organisme soit reliée aux risques de cancer dans l'organe ou l'organisme en question. Cependant, de nombreux autres facteurs entrent en jeu, et il apparaît que la spécificité d'action d'un cancérigène chimique ne peut être reliée uniquement à un problème de métabolisation de la substance. En réalité, à l'heure actuelle, on sait peu de choses sur les facteurs qui déterminent le pouvoir cancérigène, la spécificité d'organe et d'espèce. C'est ce qu'a décrit récemment E.K. WEISBURGER (1981) dans le cas des amines aromatiques. Par contre, dans le cas des hydrocarbures aromatiques polycycliques, il semble que la métabolisation soit un évènement crucial puisque le facteur déterminant pour le

pouvoir cancérigène est lié à la spécificité de substrat du système des mono-oxygénases à cytochrome P450 (GELBOIN et TS'O, 1978). C'est ainsi que le benzo(e)pyrène et le benz (a)anthracène ne sont pas, ou très faiblement, cancérigènes, car ce sont de mauvais substrats pour ce système enzymatique. Dans le cas des agents alkylants, c'est la vitesse de réparation d'une lésion spécifique sur l'ADN : le O⁶-alkylguanine qui est mise en cause (GOTH et al., 1974).

Dans le cas du 4NQO la conversion en N-hydroxy-métabolite semble nécessaire à l'expression du pouvoir cancérigène. La première étape d'activation du 4NQO est donc une réduction du dérivé nitré en l'hydroxylamine correspondante : le 4HAQO. Ainsi, en 1962, OKABAYASHI et YOSHIMOTO montraient, à l'aide d'expériences sur des Bactéries, que le 4NQO était réduit par voie enzymatique en trois composés principaux : le 4-hydroxyaminoquinoléine 1-oxyde (4HAQO), le 4-aminoquinoléine 1-oxyde (4AQO) et le 4-aminoquinoléine (4AQ). Nous avons représenté sur le schéma ci-dessous la formule du 4NQO et de ces trois dérivés.



SHIRASU (1963 ; et al., 1963) testant le pouvoir cancérigène de chacun de ces composés, montrent que seul le 4HAQO est cancérigène. Ils émettent l'hypothèse que ce dérivé pourrait bien être le cancérigène précurseur, hypothèse qui est rapidement confirmée ; en effet, non seulement le 4HAQO présente, du point de vue de la cancérigénèse, toutes les propriétés du 4NQO, mais, de plus, son pouvoir cancérigène est plus important (ENDO et al., 1963 ; HOZUMI, 1969). La première étape de l'activation était donc bien démontrée : le 4NQO est réduit en 4HAQO (cancérigène intermédiaire) ; les réactions de réduction du précancérigène en 4AQO et 4AQ constituent l'étape de détoxification. Les Bactéries possèdent les enzymes nécessaires à la transformation du 4NQO en 4HAQO (OKABAYASHI et al., 1962).

Les études sur la deuxième étape d'activation du 4NQO seront développées dans le paragraphe suivant.

Les cancérigènes ultimes et leurs propriétés électrophiles

Comme nous l'avons déjà souligné, l'activation des cancérigènes chimiques conduit à des formes réactives appelées cancérigènes ultimes. Ces composés sont des électrophiles puissants capables de former des liaisons covalentes avec les nucléophiles cellulaires et en particulier l'ADN (MILLER, 1970). Du fait de la très grande diversité des molécules cancérigènes, il est impossible d'imaginer une relation entre leur structure propre et leur activité. C'est la nature électrophile des formes ultimes réactives qui constitue le trait commun à tous les cancérigènes. Les espèces réactives postulées sont très diverses ; nous en avons représenté quelques exemples dans la figure 1.

Les formes ultimes des cancérigènes chimiques contiennent des atomes pauvres en électrons qui vont substituer, sans intervention d'enzyme, des sites riches en électrons des macromolécules cellulaires. Dans les acides nucléiques, les sites des bases qui sont substitués *in vivo* par les cancérigènes ultimes sont les atomes : N7, N3, O⁶, C8 et N² de la guanine, N1, N3, N7 et N⁶ de l'adénine, N3 de la cytosine, O⁴ et N3 de la thymine (IRVING, 1973 ; SARMA et al., 1975). Dans les protéines il existe également des atomes nucléophiles. C'est d'ailleurs sur les protéines que MILLER avait observé pour la première fois la fixation covalente d'un métabolite du N,N-diméthyl-4-amino azobenzène (jaune de beurre) (MILLER et al., 1953).

Les métabolites ultimes sont difficiles à isoler du fait de leur très grande réactivité. Cependant, il est important de pouvoir les identifier, car l'étude de leurs propriétés chimiques aide à comprendre de quelle manière

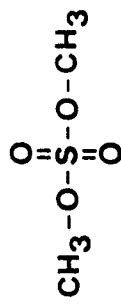
ESPECES REACTIVES
POSTULEES

CANCEROGENES
ULTIMES

CANCEROGENES
INTERMEDIAIRES

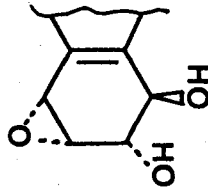
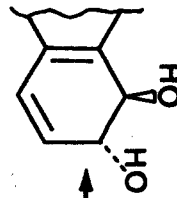
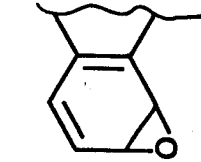
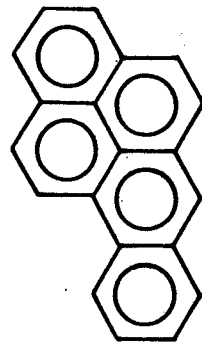
PRECANCEROGENES

AGENTS ALKYLANTS : cas du diméthylsulfate



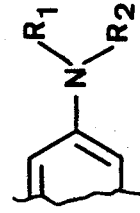
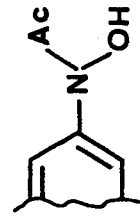
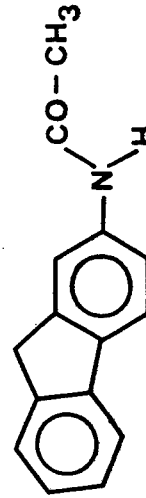
"CH₃⁺"

HYDROCARBURES AROMATIQUES : cas du benzo(a)pyrène



réaction
substitution nucléophile
type II

AMINES AROMATIQUES : cas du 2-acétylaminofluorène



R₁ = H, Ac

R₂ = O-Ac, O-Glu, O-SO₃⁻

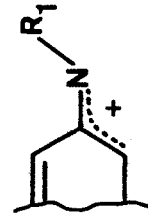
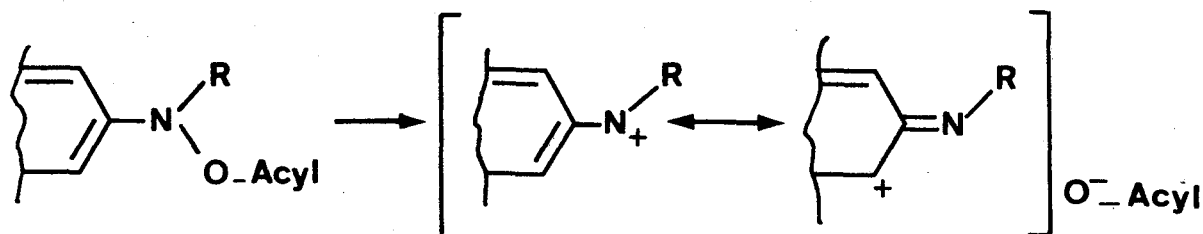


Figure 1 : Métabolisations et espèces réactives pour trois classes de cancérogènes.

les cancérogènes interagissent avec l'ADN. Ainsi les études faites dans la série des agents alkylants montrent que la nature des produits de réaction de ces substances en différents sites des polynucléotides varie avec la structure des groupes alkyles ou aryles (SINGER, 1976 ; O'CONNOR et al., 1979). Les cancérogènes ultimes peuvent avoir plusieurs sites électrophiles. Par exemple dans le cas des amines aromatiques, l'espèce réactive postulée est un ion acylnitrénium dont la charge est délocalisée sur le cycle aromatique (SCRIBNER et al., 1970 ; 1973 ; DEMEUNYNCK, 1984). Le schéma ci-dessous en donne l'illustration.



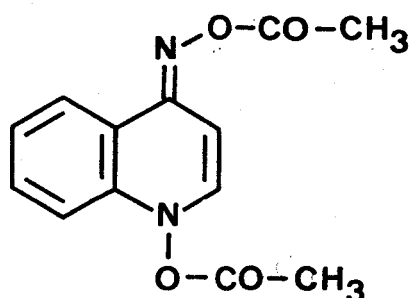
En général l'étude de la dernière étape d'activation d'un cancérogène chimique peut être orientée de deux façons différentes :

- une voie de recherche s'attache à la mise en évidence des enzymes capables d'activer le cancérogène intermédiaire.
- une autre démarche consiste à tester la réactivité avec les nucléophiles de l'ADN de composés synthétiques considérés comme modèles de la forme ultime postulée.

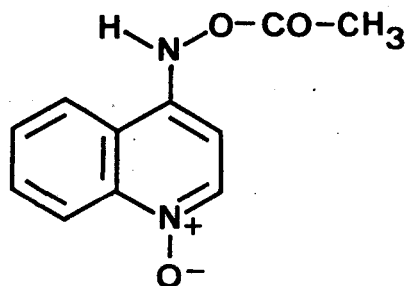
Les deux méthodes doivent être couplées à l'identification des composés de substitution base-cancérogène (adduits) sur l'ADN, dans un système *in vivo*.

Dans le cas du 4NQO, au moment où nous débutons notre étude, la première étape de l'activation de ce cancérogène était très bien connue. Le problème restait beaucoup plus complexe quant aux métabolites ultimes. Une première approche basée sur des études *in vitro* avait été réalisée en 1968 par ENOMOTO et al.. Ces auteurs avaient montré que le dérivé diacétylé synthétisé à partir du 4HAQO (diAc-4HAQO, KAWAZOE et al., 1967) réagissait de façon

covalente sur l'ADN, l'ARN et les protéines, sans activation enzymatique. Ils avaient alors émis l'hypothèse que l'action cancérigène du 4HAQO *in vivo* dépendait de son estérification. Le diAc-4HAQO est un composé électrophile. Reprenant la théorie des MILLER et faisant l'analogie avec le 2AAF dont les formes activées sont principalement des esters du N-OH-2AAF, ENOMOTO et al. proposaient alors d'utiliser le diAc-4HAQO comme modèle de cancérigène ultime du 4NQO. Un certain nombre de travaux ont été réalisés sur ce composé diacétylé pour étudier ses propriétés chimiques (KAWAZOE et al., 1967 ; ARAKI et al., 1969). Plus récemment ces auteurs ont montré qu'un dérivé monoacétylé pouvait être obtenu à partir du diAc-4HAQO (KAWAZOE et al., 1980a ; 1980b). Ce dérivé monoacétylé a, lui aussi, été proposé comme métabolite ultime du 4NQO (BAILLEUL, 1979 ; KAWAZOE, 1981). C'est avec ces deux modèles de cancérigène ultime que nous avons abordé l'étude de la cancérigénèse chimique par le 4NQO (voir schéma ci-dessous) :



diAc-4HAQO



Ac-4HAQO

Un autre dérivé du 4NQO, le 4-nitrosoquinoléine 1-oxyde, réagit directement sur l'ADN ; de plus, il est cancérigène au site d'injection (TAKAHASHI et al., 1978). Cependant, ce composé ne peut pas être considéré comme un cancérigène ultime du 4NQO, les composés de substitution formés *in vitro* étant différents de ceux observés *in vivo*. Ces auteurs ont proposé que le 4-nitrosoquinoléine 1-oxyde serait métabolisé en 4HAQO, ce qui expliquerait son pouvoir cancérigène.

Dans les années 70-75, l'équipe de TADA a recherché l'enzyme responsable de l'activation du 4HAQO dans des cellules de Levure. Les

différentes étapes de ces travaux sont décrites dans un des chapitres d'une revue récente de T. SUGIMURA sur le 4NQO (TADA Mar., 1981). Il a été suggéré par ces auteurs que l'enzyme responsable de l'activation du 4HAQO *in vivo* serait une aminoacyl-tRNA synthétase, ATP dépendante et sérine dépendante : une séryl-tRNA synthétase (TADA et al., 1974 ; 1975). L'étape finale de l'activation du 4NQO est donc une N-hydroxyestérification, comme dans le cas des amines aromatiques. Les TADA ont d'ailleurs postulé que certaines aminoacyl-tRNA synthétases pourraient participer à l'activation d'autres dérivés N-hydroxylés (TADA Mar., 1981).

La figure 2 montre l'activation métabolique du 4NQO. Nous pouvons remarquer la similitude de structure des deux dérivés monofonctionnels du 4HAQO : l'Ac-4HAQO et l'aminoacyl-4HAQO. Ceci nous permet de penser que le choix de l'Ac-4HAQO comme modèle d'étude *in vitro* de la cancérogénèse chimique par le 4NQO doit être adéquat.

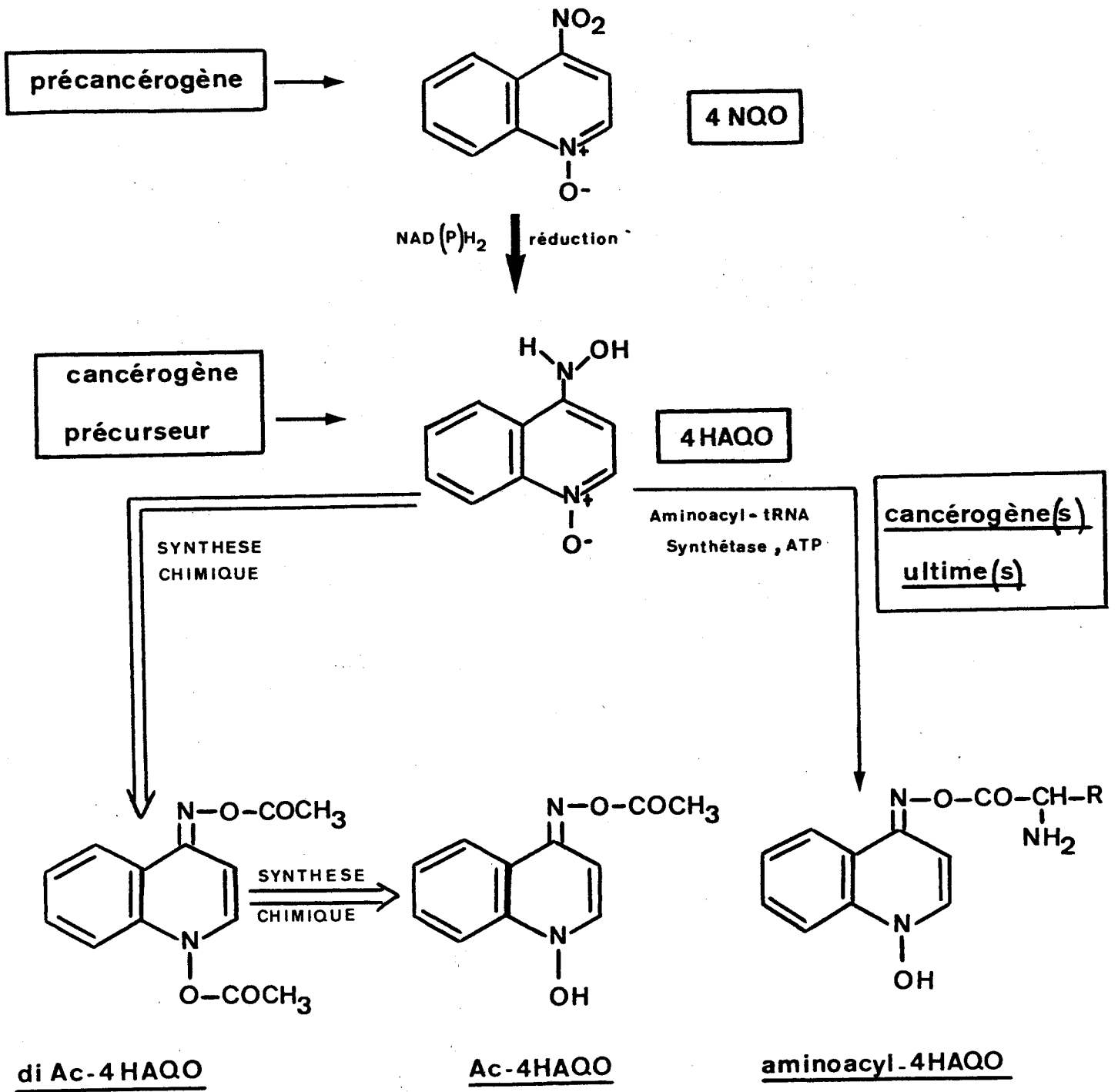


Figure 2
Activation métabolique du 4NQO

II. LES LÉSIONS SUR L'ADN ET LEURS CONSÉQUENCES

a) La visualisation des lésions

Les cancérogènes ultimes sont des électrophiles qui interagissent par liaison covalente avec l'ADN. Nous décrivons dans ce paragraphe les différentes techniques de visualisation de cette interaction.

Il faut distinguer les méthodes de visualisation des lésions induites sur l'ADN *in vivo* de celles produites *in vitro*, par réaction du cancérogène ultime avec la macromolécule. Nous désignons ici par le terme "*in vivo*" l'action du précancérogène dans des cellules en culture. Dans ce cas, la modification covalente de l'ADN est de l'ordre d'un résidu de cancérogène pour 10^4 à 10^5 paires de bases et parfois moins. Les méthodes de détection de ces lésions nécessitent donc une très grande sensibilité.

L'utilisation d'un cancérogène marqué avec un isotope radioactif est une technique universelle, mais elle reste coûteuse. Dans certains cas, ce sont les propriétés spectroscopiques du cancérogène, comme la fluorescence, qui permettent de visualiser la fixation covalente du cancérogène *in vivo*. Citons les travaux de l'équipe de Paul VIGNY sur le benzo(a)pyrène et le benz (a)anthracène (DAUDEL et al., 1975 ; VIGNY et al., 1980). C'est d'ailleurs en utilisant les propriétés de fluorescence du 4NQO que nous avons tout d'abord visualisé la fixation du noyau quinoléique sur l'ADN, *in vivo* (GALIEGUE, 1978 ; et al., 1980).

Une technique très sensible a été mise au point : elle utilise les propriétés immunologiques des cancérogènes (voir pour revue : POIRIER, 1981). Cette méthode possède de multiples avantages : une sensibilité supérieure à celle fournie par la méthode utilisant les isotopes, une grande reproductibilité et un moindre coût. Son utilisation permet également d'obtenir des renseignements sur la localisation des lésions (dans les différents compartiments cellulaires, ou sur les molécules d'ADN) quand elle est couplée à la microscopie électronique. Citons pour exemple le travail de De MURCIA et al. en 1979 sur le DNA de Col E₁ modifié par le N-AAAF.

Récemment une méthode enzymatique de marquage au phosphore 32 des adduits obtenus après hydrolyse de l'ADN a été décrite. Elle permet de visualiser de très faibles modifications de l'ADN *in vivo*. Il est possible de détecter par cette méthode un nucléotide modifié pour 10^7 à 10^8 nucléotides (GUPTA et al., 1982).

La visualisation des lésions sur l'ADN modifié *in vitro* par le

cancérogène ultime peut être faite à l'aide de techniques physicochimiques. En effet, dans ce cas, il est possible de modifier 1 à 10 % des nucléotides. Certaines techniques physicochimiques permettent de visualiser le cancérogène fixé sur l'ADN (par exemple les spectrophotométries d'absorption et de fluorescence), d'autres fournissent des informations sur la déformation de la double hélice induite par les lésions. Citons par exemple la technique de mesure des températures de fusion, le dichroïsme circulaire, la viscosité et le dichroïsme et la biréfringence linéaires. Il existe d'autres techniques de caractérisation des ADN modifiés *in vitro* comme la cinétique de déroulement à la formaldéhyde et l'étude de l'hydrolyse par une enzyme spécifique de l'ADN en simple brin.

La véritable preuve de la fixation covalente du cancérogène sur la macromolécule reste cependant l'isolement des adduits après hydrolyse de l'ADN modifié.

Prenons maintenant l'exemple du 4NQO. C'est MATSUSHIMA et al. et TADA et al. en 1967 qui ont les premiers mis en évidence la fixation covalente du résidu de quinoléine sur les macromolécules cellulaires de Rat et de Souris traités par le 4NQO et le 4HAQO, en utilisant les propriétés fluorescentes de ces dérivés. Les travaux d'IKEGAMI et al. (1969/1970) ont ensuite permis de préciser que ce cancérogène se fixe *in vivo* principalement sur les bases puriques. Par la suite l'équipe des TADA a en effet montré la présence de quatre composés de substitution, trois sur la guanine et un sur l'adénine, dans les hydrolysats d'ADN de différentes cellules (Homme, Rat et E. Coli), traitées au 4NQO tritié (TADA et al., 1971 ; 1976). Ces auteurs ont également étudié la fixation covalente de la quinoléine sur les homopolyribonucléotides, en employant le 4HAQO activé par la séryl-tRNA synthétase de Levure. Ils ont mis en évidence une réaction notable sur le poly G et le poly A, mais très faible ou inexistante sur les homopolyribonucléotides pyrimidiques.

b) La formation des composés de substitution base-cancérogène

L'identification du site de fixation du cancérogène sur les bases de l'ADN apporte une aide précieuse en cancérogénèse chimique et en particulier dans les études physicochimiques. Depuis l'énoncé du concept des MILLER, de nombreux adduits ont été identifiés. Tout récemment HEMMINKI en 1983 a regroupé toutes ces études dans une revue présentant les composés de

substitution connus pour les différentes classes de cancérrogènes chimiques. Les sites d'attaque principaux dans le cas des amines aromatiques sont présentés dans le tableau B. On constate tout d'abord que ce sont les bases puriques qui sont modifiées, les sites principaux étant le C8 de la guanine et les azotes exocycliques de ces deux bases. Cependant le N-hydroxy-1-naphtylamine se fixe principalement sur le O⁶ de la guanine (KADLUBAR et al., 1978). Le 4-acétylaminostilbène réagirait également en cette position, mais pour donner un composé mineur.

Dans le cas de l'aminofluorène, deux composés de substitution sur le C8 ont été identifiés, l'un étant acétylé sur l'azote du cancérrogène et l'autre pas (voir schéma page 20). Chez le Rat la forme principale est toujours la forme désacétylée, que le composé administré soit acétylé (2AAF) ou non (2AF) (KRIEK, 1972 ; WESTRA et al., 1976). En effet, *in vivo* le jeu des acétylases et des désacétylases rend compte des quantités respectives des formes ultimes qui vont réagir (BELAND et al., 1980).

La fixation du 4NQO sur les bases puriques de l'ADN a été montrée (TADA et al., 1976) et, des quatre composés identifiés, seul celui sur l'adénine a fait l'objet d'études spectroscopiques (KAWAZOE et al., 1975). Ces auteurs ont proposé deux sites de fixation possibles sur cette base : soit le N⁶, soit le N1, sans trancher entre ces deux possibilités.

Le tableau B ne mentionne pas certains composés mineurs qu'il ne faut cependant pas négliger. Citons par exemple les composés d'ouverture du cycle imidazole du dGuo-C8-AF (KRIEK et WESTRA, 1980 ; VISSER et WESTRA, 1981), et du dGuo-C8-NA (KADLUBAR et al., 1980), ainsi que l'adduit sur le N7 de la guanine postulé par TARPLEY et al. (1982) dans le cas de certaines amines aromatiques, dont le N-AAAF, ces composés entraînant la dépurination de la base modifiée.

L'identification et la détermination du taux relatif de chaque composé de substitution sur l'ADN, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, se fait essentiellement par hydrolyse de la macromolécule, suivie d'une analyse chromatographique. La méthode d'analyse la plus utilisée est la clhp couplée ou non à l'emploi d'isotopes radioactifs. Deux techniques d'hydrolyse de l'ADN sont possibles : l'hydrolyse enzymatique et l'hydrolyse acide. La première méthode aboutit à l'obtention des nucléosides modifiés ; la macromolécule est dégradée par une endonucléase (la DNase I), des exonucléases (les phosphodi-estérases) et une phosphatase alcaline; la digestion s'effectue à 37°C pendant

COMPOSE	Source	non identifié	GUANINE			ADENINE		REFERENCES
			N1	N ² O ⁶	C8	N1	N ⁶	
pourcentage des adduits								
(N-hydroxy-)2-acétaminophénantène acétate ^a sulfate ^a	<i>In vitro</i> , ADN			20 ^a		80 ^a	SCRIBNER et NAIMY, (1975). Cancer Res., 35 : 1416-1421	
	<i>In vitro</i> ADN			60 ^a		40 ^a	KRIEK, (1971). Chem. Biol. Interaction, 3 : 19-28 ; WESTRA (1974) in : Abstracts 11th Int. Cancer Congress, vol 2. Casa editrice Ambrosiana, Milano, p. 38.	
(N-hydroxy-)4-acétylamino-biphényle	<i>In vitro</i> , foie		b	c				
2-Acétylamino-fluorène	<i>In vitro</i> foie		20	80			KRIEK, (1972). Cancer Res., 32 : 2042-2048.	
(N-Acétoxy)-4-acétamidostilbène	<i>In vitro</i> nucléo- sides		c		c	c	SCRIBNER et al., (1979). Chem. Biol. Interaction, 26 : 27-55.	
(N-hydroxy)-4-acétylamino-4'- fluorobiphényle	<i>In vitro</i> foie		b	c			KRIEK et HENGVELD, (1979) Chem. Biol. Interaction, 21 : 175-201.	
2-Amino-6-méthyl-dipyrido-(1,2-a : 3',2'-d) imidazole	<i>In vitro</i> ADN			100			SUGIMURA et al., (1980). In : Holmsted: B, Lauwerys R, Mercier M, Roberfroid M (eds) Mechanisms of toxicity and hazard evaluation. Elsevier. North Holland, Amsterdam, pp 205-217.	
	<i>In vitro</i> ADN			100				
3-Amino-1 méthyl-5H pyrïdo (4,3-b) indole	<i>In vitro</i> ADN	40	15	45			BELAND et al., (1980). Chem. Biol. Interactions, 31 : 1-17.	
N-Benzoyloxy-N-méthyl-4-amino- azobenzène	<i>In vitro</i> ADN	40	10	50			TARPLEY et al., (1980). Cancer Res., 40 : 2493-2499.	
N-méthyl-4-aminoazobenzène	<i>In vitro</i> foie				90		KADLUBAR et al., (1978). Cancer Res., 38 : 3628-3638.	
(N-hydroxy-)1-naphtylamine	<i>In vitro</i> ADN	10					KADLUBAR et al., (1980). Carcinogenesis, 1 : 139-150.	
(N-hydroxy-)2-naphtylamine	<i>In vitro</i> ADN	5	30	50		15		

a) données calculées

b) adduit mineur

c) adduit majeur

TABLEAU B. Adduits des cancérrogènes de la classe des amines aromatiques (HEMINKI, 1983).

une durée relativement longue. Dans la plupart des cas la totalité des lésions n'est pas visualisable, car il reste souvent 10 à 15 % de cancérogène fixé sur des oligonucléotides que les enzymes n'arrivent pas à dégrader. De plus, certains composés de substitution peuvent être instables dans les conditions de l'hydrolyse enzymatique, en particulier lors de l'action de la phosphatase alcaline (KRIEK et al., 1980). Ceci entraîne une imprécision dans les résultats obtenus. Récemment certains auteurs ont comparé, dans le cas de l'ADN modifié par le N-AAAF, les valeurs des taux de fixation des composés de substitution obtenues par hydrolyse enzymatique et hydrolyse par l'acide trifluoroacétique. Cette dernière méthode a semblé plus convenable pour doser les adduits formés par le N-AAAF sur l'ADN. En effet, le pourcentage global d'ADN hydrolysé est alors plus important et les adduits libérés ne sont pas dégradés (TANG et al., 1983).

La connaissance des mécanismes réactionnels impliqués dans l'interaction des cancérogènes avec l'ADN peut aider à comprendre la nature et le nombre des composés de substitution formés. La substitution sur le C8 de la guanine n'est observée que dans le cas des amines aromatiques. L'agent électrophile postulé dans ce cas, est un intermédiaire de type acylnitrenium (MILLER, 1970 ; SCRIBNER et al., 1970 et 1973) qui préfère comme cible le C8 de la guanine. D'autre part, l'existence d'une délocalisation de la charge vers le cycle aromatique a été décrite dans le cas des arylamines par SCRIBNER et al. (1975). Ceci permet de rendre compte de l'attaque d'un autre intermédiaire, de type carbénium, en d'autres sites des bases, en particulier les azotes exocycliques. Cette délocalisation électronique n'est pas la même d'un composé à un autre, ce qui explique les différentes proportions respectives d'arylation et d'arylamination obtenues pour les différentes amines aromatiques (SCRIBNER et al., 1975).

Un autre facteur déterminant l'orientation de la réaction base-cancérogène est la réactivité des sites nucléophiles des bases, qui varie de manière importante avec l'environnement. Par exemple la réactivité du cancérogène ultime *in vitro* sera modifiée selon que la réaction aura lieu sur l'ADN natif ou dénaturé, ou sur les nucléosides isolés. La structure globale de l'ADN natif (hélice B ou hélice Z), modifie également la réactivité des sites nucléophiles. D'autre part ces atomes sont différemment accessibles dans la double hélice ; par exemple dans l'hélice B le C8 de la guanine est dans le grand sillon et le N² dans le petit.

Les lésions sur l'ADN semblent fortement impliquées dans les premières étapes de la cancérogénèse chimique, on les appelle lésions "pré-mutagènes" car elles permettent d'expliquer dans certains cas le pouvoir mutagène des cancérogènes. Par exemple, la fixation sur certains atomes impliqués dans les liaisons hydrogène des paires de bases complémentaires peut entraîner une modification de l'appariement de ces bases. Lors de la réplication une base non adéquate peut être incorporée en face de la lésion. Il apparaît alors une mutation directe, par mauvais appariement. C'est le cas de la substitution sur le O⁶ de la guanine par les agents alkylants (SINGER, 1975). Les dérivés d'ouverture du cycle purique obtenus à partir des composés de substitution sur le C8 de la guanine pourraient également être responsables *in vivo* de mauvais appariements, comme l'a proposé KRIEK dans le cas du dérivé d'ouverture du dGuo-C8-AF (KRIEK, 1979).

Il existe actuellement des preuves directes de l'effet mutagène des lésions sur l'ADN induites par les cancérogènes chimiques. FUCHS et al. ont modifié de l'ADN *in vitro* par le N-AAAF et l'ont ensuite introduit dans des Bactéries, où ils ont alors observé des mutations par déplacement du cadre de lecture. Ainsi une lésion prémutagène peut devenir une mutation stable et héréditaire (FUCHS et al., 1981). Tout récemment MARSHALL et al. (1984) ont modifié *in vitro* un oncogène par le cancérogène ultime du benzo(a)pyrène ; ils ont ensuite observé, après transfection du gène modifié dans des cellules eucaryotes, la transformation de ces cellules. Ce dernier résultat donne une base expérimentale à la théorie uniciste de DULBECCO (1982).

c) Les perturbations structurales de l'ADN induites par les lésions

Les distorsions dans la structure de l'ADN provoquées par les lésions peuvent avoir des conséquences fonctionnelles, et il semble important de connaître ces changements conformationnels pour comprendre le processus d'initiation au niveau moléculaire. Nous avons décrit dans le chapitre précédent la formation des lésions sur l'ADN. Il est probable que pour chaque cancérogène et chaque site substitué de l'ADN, il existe une modification spécifique de la structure de la macromolécule. En effet, l'interaction du cancérogène avec la double hélice de l'ADN varie de manière importante avec l'encombrement stérique et la répartition électronique du composé chimique. Il est donc difficile de comparer entre elles les modifications induites par différents cancérogènes. Nous allons décrire quelques modèles connus.

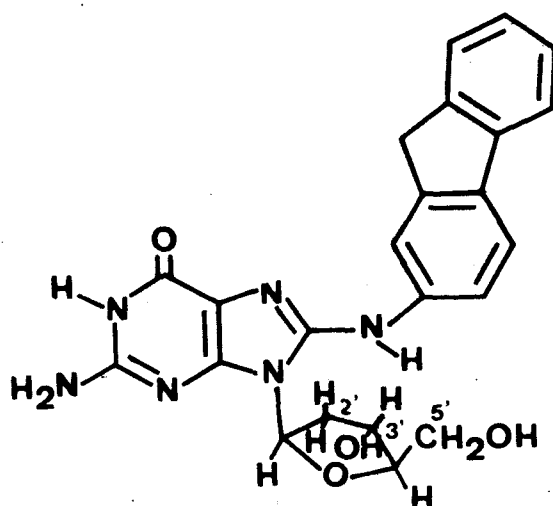
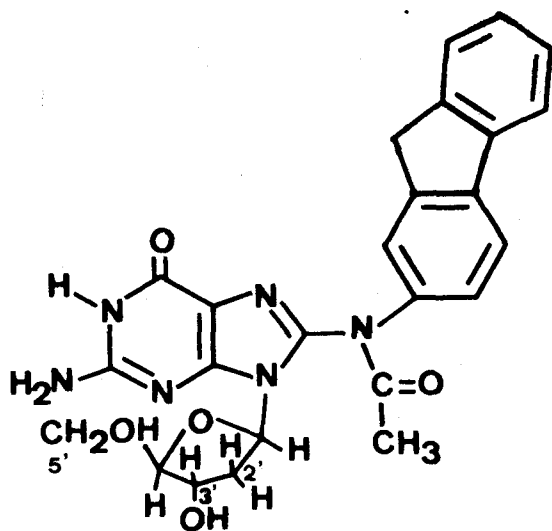
Le modèle insertion-dénaturation

Dans le cas du dGuo-C8-AAF, les auteurs ont proposé un modèle d'insertion-dénaturation (FUCHS et al., 1976) ou déplacement de base (GRUNBERGER et WEINSTEIN, 1976), le cancérogène fixé sur le C8 de la guanine étant inséré dans la double hélice entre les plans des bases, la guanine se trouvant rejetée à l'extérieur. Ceci induit une distorsion importante de la double hélice. C'est ce que prévoyaient d'autres auteurs (NELSON et al., 1971 ; LEVINE et al., 1974). Ce modèle a été élaboré à partir d'études physicochimiques et enzymatiques de l'ADN modifié *in vitro* par le N-AAAF. Citons la mesure des températures de fusion (FUCHS et al., 1971), la cinétique de déroulement à la formaldéhyde (FUCHS et DAUNE, 1974), les dichroïsmes linéaire (FUCHS et al., 1976) et circulaire (LEFEVRE et al., 1978), la sensibilité à l'attaque par une endonucléase spécifique des simples brins (FUCHS, 1975 ; YAMASAKI et al., 1977b ; KRIEK et SPELT, 1979). Des techniques immunologiques ont aussi été utilisées (SPODHEIM-MAURIZOT et al., 1979b). La plupart de ces études ont été faites également avec des dérivés halogénés du fluorène, en position 7. Dans le cas du dérivé fluoré, l'insertion du cancérogène est observée ; au contraire, le dérivé iodé ne peut pas s'insérer à cause de l'encombrement important de l'atome d'iode. Dans ce cas, les auteurs proposent un modèle externe (DAUNE et al., 1981).

Les modèles externes

La fixation de l'aminofluorène induit une distorsion plus faible de la double hélice comparativement à celle décrite dans le cas de l'insertion-dénaturation et un modèle extérieur a été postulé, comme celui décrit pour le dérivé iodé du N-AAAF (FUCHS et al., 1973 et 1976 ; EVANS et al., 1980 ; LENG et al., 1980 ; DAUNE et al., 1981). Dans ce modèle le fluorène est couché dans le grand sillon de l'ADN. La guanine modifiée reste appariée avec la cytosine et elle est normalement empilée entre les paires de bases adjacentes. Ce modèle a été étudié avec les mêmes techniques que celles que nous venons de décrire. Les méthodes qui ont permis d'observer des différences de conformation significatives entre les deux adduits C8 du fluorène sont les études de la sensibilité à l'endonucléase S_1 , de la modification de la structure du poly (dG-dC). poly (dG-dC), et de la conformation des nucléotides modifiés. Nous aborderons chacun de ces points avant de décrire les autres modèles externes.

Le schéma récapitulatif présenté ci-dessous montre les résultats obtenus pour les deux adduits du fluorène formés sur le C8 de la guanine.



dGuo-C8-AAF

dGuo-C8-AF

Conformation préférentielle de la liaison sucre-base

syn

anti

Modèle sur l'ADN

insertion-dénaturation

externe

Structure du poly(dG-dC). poly(dG-dC) modifié

forme Z

forme B

Sensibilité à l'endonucléase S_1

++

±

Pourcentage de l'adduit sur l'ADN *in vitro*

80 % par action du N-AAAF

100 % par action du N-OH-AF

Pourcentage de l'adduit sur l'ADN *in vivo*

20 % par action du 2AAF

70 % par action du 2AF

Obtention de l'adduit sur le désoxyribonucléotide

oui

non

L'ADN modifié par le N-OH-AF est très peu sensible à l'attaque par la nucléase S_1 , comparativement à celui modifié par le N-AAAF (KRIEK et SPELT, 1979).

E. SAGE dans l'équipe de M. LENG, a montré que sur le poly (dG-dC).poly(dG-dC) la fixation du N-AAAF induisait au voisinage de la lésion la structuration du polymère en forme Z, tandis que le polymère modifié par le N-OH-AF restait en forme B (SAGE et al., 1980). Quoiqu'obtenus sur un polymère de synthèse, ces résultats sont en accord avec les deux modèles décrits. Leur extrapolation à l'ADN nécessite la détermination de la conformation des deux nucléotides modifiés, car l'orientation relative des résidus base et sucre au niveau du lien N-glycosidique joue un rôle très important dans l'organisation structurale de l'ADN. Des données expérimentales (EVANS et al., 1980 ; LENG et al., 1980) ainsi que des calculs théoriques (BROYDE et al., 1983) indiquent que le dGuo-C8-AAF adopte préférentiellement la conformation syn, structure qui, rappelons-le, est adoptée par les nucléotides puriques dans l'hélice Z (WANG et al., 1979) et par le nucléotide modifié du modèle insertion-dénaturation (NELSON et al., 1971). Par contre, le dGuo-C8-AF adopte la conformation anti qui, d'après EVANS et al. (1980) est stabilisée par une liaison hydrogène entre le groupe NH de l'aminofluorène et le groupe 5'OH de l'ose. La conformation anti est celle adoptée par tous les nucléotides dans l'hélice B, que ce soit sur l'ADN ou sur le poly (dG-dC).poly (dG-dC). Il a été possible de construire un modèle moléculaire de l'ADN contenant la modification dGuo-C8-AF, le noyau fluorène étant localisé dans le grand sillon. Cette structure ne présente pas de déformation importante de la double hélice (EVANS et al., 1980).

Un modèle similaire a été proposé pour l'ADN, contenant le N-AAAF fixé sur le N^2 de la guanine. Le cancérigène est externe à la double hélice mais il est couché dans le petit sillon. Ce modèle est compatible avec la très faible excision de ce nucléotide par la nucléase S_1 (FUCHS, 1975 ; YAMASAKI et al., 1977b). Dans le cas du benzo(a)pyrène, il semble que le cancérigène soit également localisé dans le petit sillon (GEACINTOV et al., 1978 ; GRUNBERGER et al., 1978 ; PULKRABEK et al., 1977). Le site de fixation est également dans ce cas le N^2 de la guanine. Plus récemment, KADLUBAR et al. ont également proposé pour l'adduit majeur du 1-NA, sur le O^6 de la guanine, un modèle externe : le cancérigène est alors situé dans le grand sillon (KADLUBAR et al., 1981b). Des modèles graphiques générés par ordinateur ont été réalisés

sur ces trois derniers adduits par BELAND (1978). Les conclusions de cet auteur sont en accord avec celles que nous venons de décrire.

En résumé, ces résultats montrent que le changement de conformation de l'ADN provoqué par la fixation du cancérogène varie à la fois avec la nature du noyau fixé et avec le site de fixation. Il nous semble important d'insister sur le fait que c'est la conformation autour de la liaison sucre-base qui régit la structure de la double hélice et que toute perturbation à ce niveau s'accompagne d'une déformation de l'hélice. Les deux adduits amino-fluorène sur le C8 de la guanine en sont un exemple : la présence ou l'absence du groupement acétyle sur l'azote fixé au C8 de la guanine détermine la conformation de la liaison sucre-base du nucléotide correspondant et donc de l'ADN.

Les études de mutagénèse effectuées dans l'équipe du Professeur M. DAUNE ont permis de montrer que les deux lésions dGuo-C8-AAF et dGuo-C8-AF induisent chez la Bactérie deux types de mutations. L'adduit dGuo-C8-AAF induit principalement des mutations par déplacement du cadre de lecture, dans des séquences riches en paires G-C (FUCHS et al., 1981). L'adduit dGuo-C8-AF induit, par contre, des mutations par substitution de base (DAUNE, communication orale). Ce résultat est en accord avec les prédictions de SCRIBNER et al. (1979a) qui avaient proposé une corrélation entre le type de déformation induite et la nature de la mutation.

D'autres études de mutagénèse ont également pu montrer qu'à chaque lésion dGuo-C8-AAF ne correspondait pas forcément une mutation. FUCHS en 1984 a montré que le spectre de mutation différait de façon importante du profil de fixation du cancérogène N-AAAF sur l'ADN, après avoir introduit l'ADN de plasmide, modifié *in vitro*, dans les Bactéries. Il en conclut que les mutations observées à des fréquences élevées en des points particuliers de la macromolécule ne sont pas dues à une plus forte réactivité du cancérogène dans ces zones, mais seraient plutôt la conséquence de la très grande spécificité des mécanismes qui prennent en charge les lésions prémutagènes (FUCHS et al., 1983).

Dans le cas du 4NQO, aucune étude physicochimique conformationnelle du type de celles que nous avons décrites n'était réalisée quand nous avons entrepris notre travail. Les seules approches physicochimiques étaient des études d'interaction entre le 4NQO et l'ADN d'une part (MALKIN et al., 1966 ;

NAGATA et al., 1966 ; OKANO et al., 1969) et entre le 4NQO et les mono- et dinucléotides d'autre part (WINKLE et al., 1978 et 1979). L'interaction du 4NQO avec l'ADN - qui n'a lieu qu'avec l'ADN natif - (MALKIN et al., 1966) est de type complexe à transfert de charge (OKANO et al., 1969), principalement avec la désoxyguanosine (PAUL et al., 1970 et 1971). Ces auteurs ont postulé une intercalation du plan du 4NQO dans la double hélice. Cette hypothèse a été confirmée plus récemment par d'autres équipes qui ont précisé la géométrie de l'empilement base-4NQO à l'aide d'études en R.M.N. du ^{13}C et de ^1H , dans des mini hélices obtenues avec des dinucléotides complémentaires (WINKLE et al., 1978 et 1979 ; ORNSTEIN et al., 1979). ORNSTEIN et REIN (1979) suggèrent que l'intercalation du 4NQO ou de ses métabolites précéderait la formation de la liaison covalente entre le cancérigène et l'ADN *in vivo*. Mais ceci n'a pas été vérifié expérimentalement.

d) Les conséquences biologiques de la fixation des cancérigènes sur l'ADN

Les changements conformationnels de l'ADN induits par les lésions peuvent avoir pour conséquence de modifier certaines fonctions biologiques de la macromolécule. Nous allons nous intéresser à trois d'entre elles : la réplication, la méthylation et la réparation.

La réplication

Un des effets des lésions sur l'ADN est parfois d'affecter sa fonction de matrice. MOORE et al. en 1982 ont étudié l'effet des lésions induites par l'aminofluorène (dGuo-C8-AF et dGuo-C8-AAF) sur la réplication d'un ADN de phage, *in vitro*. Ils ont observé un blocage de la T_4 -ADN polymérase au niveau des lésions : la polymérase arrête la synthèse du brin complémentaire un nucléotide avant la lésion lorsque celle-ci est acétylée, alors qu'elle incorpore un nucléotide en face de la base modifiée non acétylée, avant de s'arrêter. Récemment FUCHS et al. (1984), à partir d'autres études, ont conclu qu'*in vivo* la lésion non acétylée n'affectait pas la fonction de matrice de l'ADN et ne bloquait donc pas la réplication. Dans ces deux types d'expériences, les auteurs ont expliqué leurs résultats par la conformation différente adoptée par ces deux composés : la lésion acétylée, en conformation syn, bloque la polymérase, alors que la lésion non acétylée reste en conformation anti, ce qui rend l'appariement encore possible.

L'équipe de TADA a observé, également *in vitro*, les deux types d'arrêt de réplication cités par MOORE et al. dans le cas des lésions induites par le 4NQO (YOSHIDA et al., 1984). Ces auteurs observent également un arrêt de la polymérase un nucléotide après la lésion. Actuellement il n'est pas possible de corrélérer ces trois types d'arrêts de la réplication avec les trois adduits 4NQO-guanine proposés par ces auteurs.

Dans le cas des méthylations induites par le diméthylnitrosamine il semble, au contraire, que la réplication ne soit pas bloquée (ABANOBI et al., 1980).

La méthylation

Depuis quelques années l'étude de la régulation de l'expression des gènes d'eucaryotes s'est beaucoup développée et en particulier une nouvelle composante de cette régulation : la méthylation enzymatique de l'ADN. Il a été postulé que la méthylation post-répllicative du C5 de la cytosine dans des séquences C.G, jouerait un rôle dans la régulation de l'expression des gènes et dans la différenciation cellulaire (voir pour revue : RIGGS et JONES, 1983). En général, l'hypométhylation est associée à l'activité du gène ; cependant il semble que ce soit une condition nécessaire mais non suffisante pour induire l'expression. De nombreux auteurs se sont demandé si les cancérigènes chimiques n'induiraient pas des modifications dans cette fonction importante qu'est la méthylation. Dans une revue publiée en 1983 WILSON et JONES ont décrit la méthylation *in vitro* d'ADN modifié par différents cancérigènes : des agents alkylants, l'aminofluorène et le benzo(a)pyrène. Ils constatèrent que ces agents chimiques inhibaient la réaction de méthylation, par des mécanismes différents. De nombreux autres travaux sont en accord avec ces résultats (BOEHM et al., 1981a ; 1981b ; COX, 1980 ; SALAS et al., 1978 ; PFOHL-LESZKOWICZ et al., 1981 ; SHIVAPURKAR et al., 1984 ; WILSON et al., 1984 ; PFEIFER et al., 1984). Mais tout récemment (1984) le travail de KRAWICZ et LIEBERMAN est venu nuancer cet élan général : ils n'ont observé aucune variation dans la méthylation de l'ADN de cellules en culture traitées par les U.V. et deux cancérigènes chimiques : le MNU et le N-AAF. D'autres expériences ont également conduit à des résultats différents : on peut observer dans certains cas une hyperméthylation d'ADN modifié (BOEHM et al., 1983b ; PFOHL-LESZKOWICZ et al., 1983b ; 1984).

En conclusion, quoiqu'il faille rester encore prudent, il semble que les agents cancérigènes pourraient causer des changements "héréditaires" dans la méthylation de l'ADN, dans certaines cellules. On peut facilement concevoir l'importance de certains événements moléculaires comme par exemple l'induction, par le cancérigène, d'une modification de la méthylation dans les zones de régulation d'un oncogène, entraînant de ce fait son expression accrue. SAULE et al. ont détecté une augmentation de l'expression d'un oncogène (myc) dans des cellules de Caille traitées par le 3-méthylcholanthrène et ont relié cela à l'hypométhylation observée sur ce gène (SAULE et al., 1984). Cependant ils n'ont pas localisé précisément les zones hypométhylées.

La réparation

L'étude de la réparation de l'ADN a fait l'objet de nombreux travaux. Ses mécanismes sont mis en jeu dans la cellule lors de la division et lors de l'agression par le milieu extérieur. *In vitro* les mécanismes les plus étudiés ont été ceux impliqués dans l'excision-réparation des lésions, qu'elles soient induites par les U.V., les agents alkylants ou d'autres cancérigènes (voir pour revues : LAVAL, 1978 ; CLEAVER, 1978). Cette réparation est très fidèle. Elle n'est cependant pas le seul mécanisme, en particulier il existe un système de fonctions induites, décrit sous le terme de réparation SOS (pour revue, voir les numéros 8 et 9 du tome 64 de Biochimie, 1982). Ces fonctions SOS permettent la répllication de l'ADN modifié, sans arrêt au niveau de la lésion, et ont ainsi un effet très mutagène. Ces mécanismes ont été démontrés chez le procaryote. L'existence de processus analogues chez l'eucaryote n'est pas encore véritablement prouvée, mais il existe un faisceau d'arguments allant en ce sens (RADMAN, 1980). On connaît actuellement un certain nombre d'autres mécanismes de réparation qui interviennent chez l'eucaryote lorsque l'ADN doit être répliqué et qui sont parfois infidèles. Ces phénomènes sont connus sous le nom de "réparation post-répllicative", par exemple la réparation par recombinaison (CLEAVER, 1978). Il semble donc que la répllication puisse avoir pour conséquence l'apparition de mutations, lorsque les lésions n'ont pas été réparées et persistent sur l'ADN.

De nombreux auteurs ont étudié *in vivo* le temps de demi-vie de différents composés de substitution pour divers cancérigènes de la classe des amines aromatiques. Ils ont constaté des différences dans l'élimination de ces

divers adduits (GUPTA et al., 1984). Dans le cas des composés de substitution du fluorène il est parfaitement établi que les formes persistantes sont celles qui causent une faible déformation de la double hélice ; c'est le cas du dGuo-C8-AF et du dGuo-N²-AAF, le composé dGuo-C8-AAF étant réparé le plus rapidement (KRIEK, 1972 ; WESTRA et al., 1976 ; HOWARD et al., 1981). Cependant l'excision rapide du dGuo-C8-AAF n'est pas complète, 30 à 50 % de ces adduits persisteraient et seraient ensuite éliminés de la même manière que les lésions externes. SAGE en 1981 a émis l'hypothèse que les résidus rapidement excisés seraient ceux qui ont provoqué une distorsion importante dans la double hélice (modèle d'insertion-dénaturation), les autres seraient fixés dans des zones structurées en forme Z. Dans ce cas, le noyau fluorène se trouve à l'extérieur de l'hélice et n'induit pas de dénaturation locale.

Dans le cas du N-méthyl-4 aminoazobenzène, la lésion sur le C8 de la guanine est réparée plus rapidement que celle sur le N² (TARPLEY et al., 1980). De même l'adduit sur le N² de la guanine dans le cas du biphényle est une lésion persistante (KRIEK et HENGEVELD, 1978).

L'étude de la réparation par excision des lésions induites par le 4NQO a été abordée par IKENAGA et al. en 1977, sur des cellules humaines normales. Ils ont observé, comme dans le cas d'E. Coli (IKENAGA et al., 1975), que l'excision des trois adduits stables (deux sur la guanine et un sur l'adénine) se faisait à une vitesse identique : environ 60 % en 24 heures. Par contre, l'adduit-guanine instable semble être réparé plus rapidement. Dans une revue récente sur ce problème, IKENAGA et TAKEBE (1981b) proposent qu'un certain pourcentage de ce composé instable pourrait produire *in vivo* des sites apuriniques, conduisant à des cassures simple brin, soit spontanément, soit par action d'enzyme. Ces cassures simple brin seraient réparées par un mécanisme similaire à celui impliqué dans la réparation des lésions induites par les radiations ionisantes. Cela permettrait de comprendre les résultats de REGAN et SETLOW (1974) qui ont observé que les lésions induites par le 4NQO seraient excisées par deux mécanismes différents :

- un mécanisme rapide, s'effectuant par excision de 3 à 4 nucléotides, qui répare principalement les lésions dues aux radiations ionisantes et aux agents alkylants,
- un mécanisme lent, le nombre de nucléotides excisés étant de l'ordre de 100. C'est le cas de la réparation des dimères pyrimidiques et des lésions induites par le 2AAF.

L'équipe de SETLOW a fait une autre approche plus précise du mécanisme lent, en cultivant des cellules humaines en présence des deux cancérogènes : 2AAF et 4NQO. Ils ont montré que l'enzyme qui est saturée par une quantité importante de cancérogène est différente pour les deux composés. Ceci suggère que les processus de réparation ne sont pas identiques dans chaque cas. Des différences sont également observées lorsque l'on fait la comparaison avec les U.V. (AHMED et SETLOW, 1981).

III. LES TENDANCES ACTUELLES EN CANCEROGENESE CHIMIQUE

C'est en appliquant la corrélation cancérogène-mutagène aux zones codantes de l'ADN que l'on a longtemps essayé d'expliquer les modifications morphologiques de la cellule cancéreuse (théorie de la mutation somatique). Ainsi il semblait possible d'imaginer la synthèse d'une ou plusieurs protéines anormales qui pourraient être responsables de la déstabilisation de l'équilibre cellulaire et induiraient alors les phénomènes néoplasiques, génétiquement transmissibles.

Aujourd'hui des événements nouveaux ont sensiblement modifié cette approche. Deux d'entre eux nous paraissent particulièrement importants. Premièrement la mise en évidence du polymorphisme de l'ADN, en relation avec la séquence nucléotidique (WANG et al., 1979 ; GUPTA G. et al., 1980) et deuxièmement l'élaboration d'une théorie unificatrice qui fait intervenir lors de la cancérogénèse, qu'elle soit virale ou chimique, une étape commune importante, celle de la modification de l'expression d'un "gène de cancer ou oncogène" (BISHOP, 1983 ; COOPER, 1982). L'accumulation de résultats concernant cette étape cruciale a permis de montrer que la modification aussi bien qualitative que quantitative de l'oncogène pouvait être responsable de la transformation (CHANG et al., 1982 ; KLEIN et al., 1984). Le premier fait marquant dans ce domaine fut la mise en évidence par l'équipe de Mariano BARBACID d'une relation entre une mutation G \rightarrow T dans la séquence codante d'un oncogène et la tumeur de la vessie chez l'Homme (REDDY et al., 1982). Cette mutation modifie qualitativement la protéine, au niveau du douzième acide aminé, qui, initialement glycine, devient une valine.

Il semble très probable que les cancérogènes chimiques puissent modifier la régulation de l'expression d'un gène, et différents mécanismes peuvent être proposés, comme par exemple une mutation dans les séquences de contrôle de ce gène, ou bien une modification de la structure de l'ADN dans cette même zone. Il existe en effet des séquences dans le génome qui peuvent être reconnues de par la structure qu'elles adoptent, plutôt que par l'enchaînement de leurs bases, cette reconnaissance jouant un rôle important dans les processus biologiques mettant en jeu le génome cellulaire. Ainsi pendant longtemps il a été difficile d'imaginer un mécanisme de reconnaissance spécifique de certaines séquences de l'ADN par les protéines, les informations structurales fournies par le modèle d'hélice B de WATSON et CRICK étant trop peu précises. Aujourd'hui la situation a complètement changé. Il est actuellement

possible, à partir d'études aux rayons X d'oligonucléotides de synthèse, de mettre en évidence d'importantes fluctuations des paramètres géométriques de l'hélice reliées à la séquence des bases. En particulier, l'hélice d'enroulement gauche de l'ADN a été caractérisée à partir d'un oligonucléotide $d(CpG)_3$ (WANG et al., 1979). Le polymorphisme de l'ADN était né. Cette structure "Z" ne peut être adoptée que dans les séquences purines-pyrimidines alternées (NEUMANN et al., 1979 ; WANG et al., 1984 ; NORDHEIM et RICH, 1983a). De ce fait, puisque ces séquences adoptent préférentiellement la structure B, énergétiquement plus favorable, la conformation Z devra être stabilisée par différents facteurs qui ont été étudiés sur un polymère de synthèse, le poly (dG-dC) . poly (dG-dC) :

- l'environnement de la macromolécule : le solvant (éthanol), certains ions (Na^+ , Mg^{2+}) (POHL et al., 1972a ; ARNOTT et al., 1980, CRAWFORD et al., 1980) et les polyamines (KLEVAN et al., 1982).
- les modifications chimiques de certaines bases : la substitution du C-8 de la guanine (LAFER et al., 1981), ou du C-5 de la cytosine par le Brome ou par un groupement méthyle (BEHE et FELSENFELD, 1981). Ce dernier facteur est à relier avec le rôle joué par la méthylation enzymatique des séquences CG de l'ADN dans la régulation de l'expression des gènes.
- la tension infligée le long de la chaîne polynucléotidique par le super enroulement négatif dans l'ADN circulaire (PECK et al., 1982 ; SINGLETON et al., 1982 ; NORDHEIM et al., 1983b).

La stabilisation de la forme Z peut se faire aussi par interaction avec des protéines spécifiques de la structure d'enroulement gauche (NORDHEIM et al., 1982b).

L'utilisation d'anticorps spécifiques de la forme Z a prouvé l'existence de fragments en hélice gauche dans les chromosomes (MORGENEGG et al., 1983 ; NORDHEIM et al., 1982b ; ROBERT-NICOUD et al., 1984). De plus, l'étude de génomes de petite taille que sont ceux des virus, a conduit des auteurs à imaginer le rôle crucial probablement joué par la structuration de l'ADN en forme Z. Ainsi dans le cas du "Simian virus 40" (SV 40) NORDHEIM et RICH en 1983b ont montré que les séquences purine-pyrimidine sont localisées dans des zones génétiquement très actives, appelées séquences "enhancer". Ces séquences sont responsables de la très grande capacité de transcription de certains gènes viraux. Les mêmes auteurs ont pu observer que ces zones sont

structurées en hélice gauche lorsque le mini-chromosome du SV40 est sous forme de super-hélice . De plus, les mutations dans ces séquences "enhancer" modifiant l'enchaînement purine-pyrimidine, inhibent de manière importante la survie du virus en réduisant le pouvoir de transcription de son génome (NORDHEIM et RICH, 1983b ; KOLATA, 1983).

La fixation des cancérogènes sur l'ADN modifie parfois de manière importante l'équilibre forme B-forme Z, comme cela a été décrit pour le N-AAAF. Au laboratoire nous nous sommes intéressés à l'effet du 4NQO sur cette transition B --> Z (BAILLEUL et al., 1984). D'après YU il existerait une interférence entre ces modifications de structure de l'ADN et l'activité de transcription des gènes (YU, 1977).

OBJECTIFS

Le 4NQO a fait l'objet de nombreux travaux concernant ses propriétés biologiques (pouvoirs mutagène et cancérigène, spécificité d'espèce et d'organe) mais la structure des lésions qu'il induit, leur conformation dans l'ADN et leur reconnaissance par les enzymes cellulaires n'ont pas été étudiées. Trois revues générales sur ce précancérigène existent actuellement (ENDO et al., 1971 ; NAGAO et al., 1976 ; SUGIMURA, 1981).

Dans le cadre de notre étude de l'initiation de la cancérogénèse chimique, notre démarche a consisté, tout d'abord, à proposer un modèle de cancérogène ultime du 4NQO. Nous avons étudié sa réactivité avec les nucléosides et l'ADN. Une comparaison "*in vivo-in vitro*" nous a ensuite permis de vérifier la validité de ce modèle.

Nous avons alors entrepris de déterminer les sites de fixation de la quinoléine sur les bases nucléiques, et d'appréhender la conformation des lésions induites par le cancérogène dans la macromolécule.

DEUXIEME PARTIE

RESULTATS

LA CANCEROGENESE PAR LE 4-NITROQUINOLEINE 1-OXYDE. ETUDE

DES MODIFICATIONS DES ACIDES NUCLEIQUES PAR LE CANCEROGENE

ULTIME

CHAPITRE I - LE MODELE DE CANCEROGENE ULTIME DU 4NQO

Nous rapporterons, dans ce premier chapitre, les arguments favorables au modèle de cancérogène ultime, l'Ac-4HAQO. D'une part, nous discuterons la visualisation des lésions, le mécanisme de formation des adduits et le rôle de la fonction N-oxyde dans le pouvoir cancérogène du 4NQO, d'autre part, nous terminerons cette étude par la comparaison des adduits obtenus *in vitro* après réaction de l'Ac-4HAQO et *in vivo* après action du 4HAQO sur des cellules d'ascites.

a) Le diAc-4HAQO et l'Ac-4HAQO : les adduits obtenus *in vitro* avec les nucléosides

ENOMOTO et al. (1968), qui ont proposé le diAc-4HAQO comme modèle de cancérogène ultime, n'ont pas poursuivi leurs travaux dans ce domaine. Ils ont montré que le spectre de fluorescence de l'ADN modifié par le diAc-4HAQO était identique à celui obtenu par TADA et al. (1967) et MATSUHIMA et al. (1967) avec l'ADN extrait de cellules d'ascites traitées au 4HAQO. Ce travail a été confirmé au laboratoire (GALIEGUE et al., 1980).

Nous avons pu observer la fixation covalente de la quinoléine sur les bases puriques par action du diAc-4HAQO sur les nucléosides. D'autre part, lorsque nous avons repris l'hypothèse d'ENOMOTO, un certain nombre de travaux sur la forme ultime du 4NQO *in vivo* avaient été entrepris par l'équipe de TADA (TADA et al., 1975), qui avait postulé que la forme active *in vivo* serait le séryl-4HAQO. Il était donc important de savoir si l'existence du diAc-4HAQO, dérivé bifonctionnel comme cancérogène ultime, était compatible avec le mécanisme faisant intervenir le séryl-4HAQO, qui est, lui, un dérivé monofonctionnel.

Nous nous sommes donc rapidement intéressés à un dérivé monofonctionnel : l'Ac-4HAQO (BAILLEUL, 1979). Cette approche a été faite en collaboration avec le laboratoire du Professeur J. LHOMME (DEMEUNYNCK, 1979). Nous avons vérifié la formation du dérivé monoacétylé du 4HAQO, qui était décrit dans la littérature (KAWAZOE et al., 1980), et nous avons réalisé, pour ce composé, des études de réactivité sur les nucléosides identiques à celles effectuées avec le diAc-4HAQO. Les résultats nous ont permis, d'une part, de considérer le dérivé monoacétylé comme un modèle de cancérogène ultime et, d'autre part, de proposer un mécanisme réactionnel pouvant rendre compte de la fixation covalente du cancérogène sur les nucléosides.

Ces hypothèses ont été étayées par l'identification structurale d'un des composés de substitution. Ce composé a été obtenu par action de l'Ac-4HAQO sur la désoxyguanosine ; il a également été identifié sur l'ADN de cellules traitées au 4HAQO. Nous reviendrons en détail sur ce point (voir chapitre II).

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication (n° 1) :

Adducts from the reaction of O,O'-diacetyl or O-Acetyl derivatives of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide with purine nucléosides.
Cancer Research, 1981.

Ces deux modèles de cancérogènes ultimes ont été confirmés par réaction sur l'ADN lui-même (GALIEGUE et al., 1983). En effet, les adduits obtenus, après hydrolyse enzymatique de l'ADN modifié par le diAc-4HAQO ou l'Ac-4HAQO et caractérisés par chromatographie, sont identiques.

Ces résultats ont été confirmés par les études de mécanisme réactionnel réalisées dans l'équipe du Professeur J. LHOMME (DEMEUNYNCK, 1981 ; TOHME, 1983).

- La formation de l'Ac-4HAQO a été obtenue en employant des nucléophiles moins complexes que le dithiothréitol, comme les amines, les thiols, les bases hydroxylées ou les alcools.

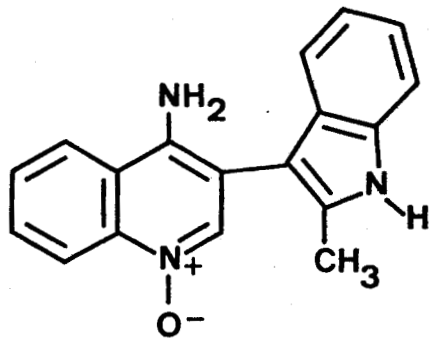
- La réaction de l'Ac-4HAQO sur les nucléophiles modèles a également été décrite. Par exemple le méthylindole et l'amino-2 pyridine réagissent avec l'Ac-4HAQO ; les produits obtenus sont liés au carbone 3 de la quinoléine (voir schéma ci-après : 1 et 2).

- Récemment l'existence de l'agent nitrénium, lors du départ de la fonction acétoxy de l'Ac-4HAQO a pu être prouvée (DEMEUNYNCK, 1984).

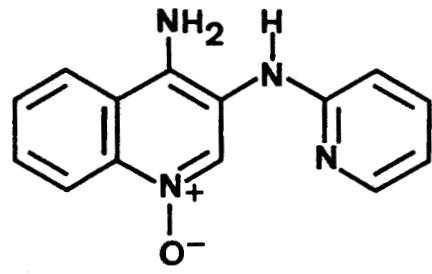
C'est également dans ce laboratoire qu'a été décrite l'obtention d'un autre dérivé monoacétylé du 4HAQO, lors de l'hydrolyse du diAc-4HAQO dans des conditions particulières. Ce composé, le 1-acétoxy-4-hydroxyimino-1,4-dihydroquinoléine, est très réactif (DEMEUNYNCK et al., 1981 ; 1983). Aucune réaction de ce composé sur les nucléophiles n'a cependant été décrite.

TOHME (1983) indique que le diAc-4HAQO peut réagir de manière bifonctionnelle avec l'adénine pour conduire à un système pentacyclique (voir schéma ci-après : 3). Cependant, l'existence d'un dérivé bifonctionnalisés du 4HAQO n'a jamais été montrée *in vivo*.

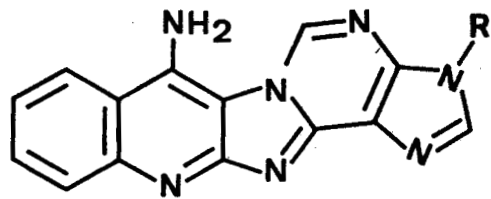
Nous avons représenté sur le schéma ci-dessous la structure des composés obtenus par l'équipe du Professeur J. LHOMME.



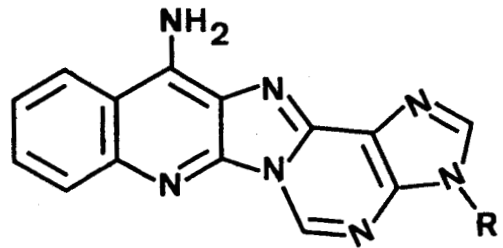
1



2



OU



3

[CANCER RESEARCH 41, 4559-4565, November 1981]
0008-5472/81/0041-0000\$02.00

Adducts from the Reaction of *O,O'*-Diacetyl or *O*-Acetyl Derivatives of the Carcinogen 4-Hydroxyaminoquinoline 1-Oxide with Purine Nucleosides¹

Bernard Bailleul,² Sylvie Galiègue, and Marie-H. Loucheux-Lefebvre³

Institut de Recherches sur le Cancer de Lille et Unité 124 de l'INSERM, BP 311, 59020 Lille Cédex, France

ABSTRACT

The diacetyl derivative of 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide (4-HAQO), the proximate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide, was reacted *in vitro* with purine nucleosides to give five adducts (three with guanosine and two with adenosine). The same nucleoside modifications were also obtained with a monoacetyl derivative of 4-HAQO which is probably 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide.

The structure of the major adduct (the so-called dG III) was identified as *N*-(deoxyguanosin-C⁸-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide. The isolation of this adduct from the 4-HAQO-modified DNA *in vivo* provides strong support for the hypothesis that the acetyl derivatives of 4-HAQO constitute a good model for the ultimate carcinogen.

INTRODUCTION

The potent carcinogenic action of 4-NQO⁴ was first demonstrated by Nakahara *et al.* (12). A metabolite of 4-NQO, 4-HAQO, has been considered as the proximate carcinogen by Shirasu (14). Indeed, the reductive pathway which yields 4-HAQO seemed to be essential for the carcinogenic mechanism of 4-NQO (15, 16). Therefore, it is tempting to compare 4-HAQO and acetylaminofluorene, a carcinogenic arylamine which is activated to DNA-binding species by sequential *N*-hydroxylation and *O*-esterification (9). Enomoto *et al.* (1) reported that diAc-4-HAQO reacted covalently and nonenzymatically with DNA at neutrality. The synthesis and the chemical structure of diAc-4-HAQO were described by Kawazoe and Araki (5). Unfortunately, no additional work concerning this approach was published. More especially, no adduct obtained from the *in vitro* reaction with this model of ultimate carcinogen was ever isolated.

More recently, Tada and Tada (18) showed that an enzymatic system could be responsible of the activation of 4-HAQO. This enzyme was identified as a seryl-tRNA synthetase (19, 20). The authors postulate that 4-HAQO may be acylated by this

enzyme to give a seryl-4-HAQO.

Tada and Tada (21) made a comparison between the adducts obtained after hydrolysis of 2 DNA's modified in different ways by exposure to 4-HAQO. First, DNA was modified using the enzymatic system that they described and containing the seryl-tRNA synthetase; another modified DNA was isolated from *Escherichia coli* and mammalian cells. The adducts, identified by chromatographic analysis, are identical; this result is in fair agreement with the hypothesis of Tada and Tada concerning the role of the seryl-tRNA synthetase. Among the adducts that they obtained, 3 were identified, the so-called quinoline-adenine adduct II, quinoline-guanine adduct I, and quinoline-guanine adduct II. The chemical structure of only one of them was described by Kawazoe *et al.* (6) as either 3-(*N*⁶-adenyl)-4-aminoquinoline 1-oxide or 3-(*N*¹-adenyl)-4-aminoquinoline 1-oxide.

From another point of view, an important feature in the identification of the 4-NQO ultimate carcinogen was observed by Araki, who obtained a monoacetyl derivative of 4-HAQO, namely, Ac-4-HAQO, from the reaction between DTT and diAc-4-HAQO in DMSO as a solvent. Since then, a few details concerning the identification of the monoacetyl derivative have been published by Kawazoe *et al.* (7). This compound was not isolated, but the reaction mixture (in which it is obtained) reacted nonenzymatically to give a covalently bound adduct with polyadenylate (Araki, cited in Ref. 11, p. 154). The confirmation of these results would mean that there exists an ultimate carcinogen which is a monoester of 4-HAQO.

Previously, DNA's modified by the diacetyl derivative have been studied. It was demonstrated that covalent binding between this diacetyl derivative and DNA takes place. It alters the local structure of the DNA as evidenced by melting curve analysis (3). Moreover, we carried out a comparative fluorescence study between the *in vitro* diAc-4-HAQO-treated DNA and the *in vivo* 4-HAQO- and 4-NQO-modified DNA. For all 3 DNA's, the fluorescence spectra exhibit similar features. That supports the proposal that diAc-4-HAQO constitutes a valid model for the ultimate carcinogen (2).

In this paper, we have studied both diAc-4-HAQO and monoAc-4-HAQO. More especially, (a) we first controlled the existence of the monoacetyl derivative; (b) then, we studied the reactivity of the monoacetyl and diacetyl derivatives with purine nucleosides which are the preferential modified sites of 4-NQO-reacted DNA (4); (c) we observed by HPLC an exact correlation between the adducts obtained with the diacetyl and monoacetyl derivatives; and (d) we carried out the identification and the characterization of the major adduct obtained by the reaction between the monoacetyl derivative and deoxyguanosine, the so-called dG III.

Lastly, evidence is presented that dG III is present in the *in*

¹ This work was supported in part by the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Grant 78.7.2628) and by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Action Thématique "Cancérogénèse Chimique" Grant 79-109).

² Recipient of a fellowship from the Ligue Nationale Française contre le Cancer.

³ To whom requests for reprints should be addressed.

⁴ The abbreviations used are: 4-NQO, 4-nitroquinoline 1-oxide; 4-HAQO, 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide; diAc-4-HAQO, *O,O'*-diacetyl derivative of 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide; Ac-4-HAQO, 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide; DTT, dithiothreitol; DMSO, dimethyl sulfoxide; HPLC, high-performance liquid chromatography; dG I, II, and III, adducts of deoxyguanosine; NMR, nuclear magnetic resonance; 4-MeHAQO, 4-methylhydroxyaminoquinoline 1-oxide.

Received November 25, 1980; accepted July 7, 1981.

B. Bailleul et al.

in vivo-modified DNA. The enzymatic degradation of the *in vivo* 4-HAQO-modified DNA and chromatographic analysis of the hydrolysate allowed the identification of one peak as the adduct dG III.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. 4-NQO was obtained from Fluka AG (CH-9470; Buchs, Switzerland). DiAc-4-HAQO was synthesized from 4-HAQO (1) as described previously (5) and stored in a desiccator over P₂O₅ in the dark at -20°.

4-[N-2-³H]HAQO (specific activity, 941 mCi/mmol) was obtained from Amersham (France); 4-HA[2-³H]QO (specific activity, 18.43 mCi/mmol) was prepared in our laboratory.

[U-¹⁴C]Guanosine, [U-¹⁴C]Adenosine, and [U-¹⁴C]deoxyguanosine were obtained from Amersham. Deoxyguanosine, guanosine, adenosine, and DTT were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.).

N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide was purchased from Pierce Chemical Co. (Rockford, Ill.).

Instrumentation. Electron mass spectra were recorded with a Riber Mag 10-10. UV absorption measurements were carried out using a Cary 118 C spectrophotometer. Proton NMR spectra were recorded at 90 MHz on a Perkin-Elmer R-32 spectrometer associated with a Nicolet Nic-298 computer. HPLC separations were carried out on a Waters system consisting of a U6K injector, two 6000 A pumps, a Model 660 solvent programmer, and a Model 440 dual-wavelength detector (254 and 365 nm). Radioactivity of the peaks was determined with a Nuclear Chicago 300 scintillator counter.

Preparation of Ac-4-HAQO. DiAc-4-HAQO (30 mg) and DTT (18 mg) were dissolved in 300 μ l of DMSO-d₆; immediately afterward, a first NMR spectrum of this solution was recorded at 35°. Then, the reaction was studied by further NMR examinations as a function of time.

Reactivity of DiAc-4-HAQO and Ac-4-HAQO with Nucleosides. Nucleoside solutions (guanosine, 2.8 mCi/mol; adenosine, 2.8 mCi/mol; deoxyguanosine, 2.8 mCi/mol) were made in 2 mm sodium citrate buffer (pH 7) with a molar concentration of 0.35 μ mol/ml. Reaction was obtained in the case of diAc-4-HAQO by addition of 1.8 mg of diAc-4-HAQO dissolved in 200 μ l of ethanol to 1 ml of nucleoside solutions. Incubation was carried out at 37° in the dark for 45 min. For determination of the covalent binding of Ac-4-HAQO to purine nucleosides, incubation was obtained by addition of 1.5 mg of Ac-4-HAQO in 18 μ l of DMSO to 1 ml of nucleoside solutions.

Analysis of the reaction products of diAc-4-HAQO and mono-Ac-4-HAQO with the ribonucleoside and the deoxyribonucleoside were carried out by means of HPLC. A C₁₈- μ Bondapak column was used with a methanol:water gradient (see "Results"). The flow rate was 2 ml/min.

Isolation and Characterization of dG III. Sephadex LH-20 analysis of the Ac-4-HAQO-deoxyguanosine reaction allowed the isolation of dG III. The flow rate of this column (2 x 28 cm) was about 1 ml of water per min.

For preparation of silyl derivatives of the dG III adduct, 10 to 50 μ g were dissolved in 100 μ l of anhydrous pyridine:bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide containing 1% trimethylchlorosilane (1:1) and heated at 75° for 30 min.

Preparation of *in Vivo*-modified DNA. 4-HAQO-modified DNA was prepared as described previously following the method of Ikegami et al. (4). Approximately 10⁶ ascites tumor cells (HZ line) were injected i.p. into 3-month-old male Wistar rats weighing about 300 g. Seven days after transplantation, acidic 0.9% NaCl solution of 0.034 M 4-HA[2-³H]QO in HCl was injected i.p. The rats were decapitated 2 hr later. The ascitic fluid was drained, and the cells were harvested by centrifugation (5 min at 1500 rpm). Cells were washed in a 0.25 M: 0.88 M sucrose gradient containing 10% phosphate-buffered saline in order to remove contaminating PBC. Then DNA was extracted (2).

Enzymatic Hydrolysis of *In Vivo*-modified DNA to Nucleosides.

Three mg of the 4-HAQO-modified DNA (11,800 cpm/mg) were dissolved (\approx 2 mg/ml) in 5 mM Tris-HCl; 5 mM MgCl₂:2 mM CaCl₂ buffer, pH 7.4. The sample was incubated with 150 μ g of bovine pancreatic DNase I (Boehringer-Mannheim, specific activity, 1000 units/mg) and 150 μ g of snake venom phosphodiesterase (Boehringer-Mannheim; specific activity, 1.5 units/mg), and hydrolysis was performed at 37°C during 24 hr. The dephosphorylation of the products of hydrolysis was then performed with alkaline phosphatase from *E. coli* (Boehringer-Mannheim; specific activity, 20 units/mg); the pH of the incubation mixture was adjusted to 8, and 100 μ g of the enzyme were added. The mixture was then kept at 37° for 17 hr.

Column Chromatography of the 4-HAQO-modified Nucleosides. Bio-Gel P2 (minus 400 mesh) column chromatography was performed using a column (0.6 x 60 cm) equilibrated with 2 mM sodium citrate buffer, pH 7.0. Flow rate was 5 ml/hr. Fractions of 1 ml were collected, and radioactivity was measured.

RESULTS

Identification of Ac-4-HAQO

The existence of Ac-4-HAQO was verified by using proton NMR spectroscopy (Chart 1). The NMR spectrum of the mixture of diAc-4-HAQO and DTT in DMSO at $t = 0$ corresponds to the superposition of the spectra of the diacetyl derivative (2 acetyl peaks at 2.16 and 2.38 ppm and the quinoline proton resonances) (5) and of DTT.

With time, the NMR spectrum exhibits some evolution as shown in Chart 1. This is characteristic of the transformation of the diAc-4-HAQO in a unique compound containing one of

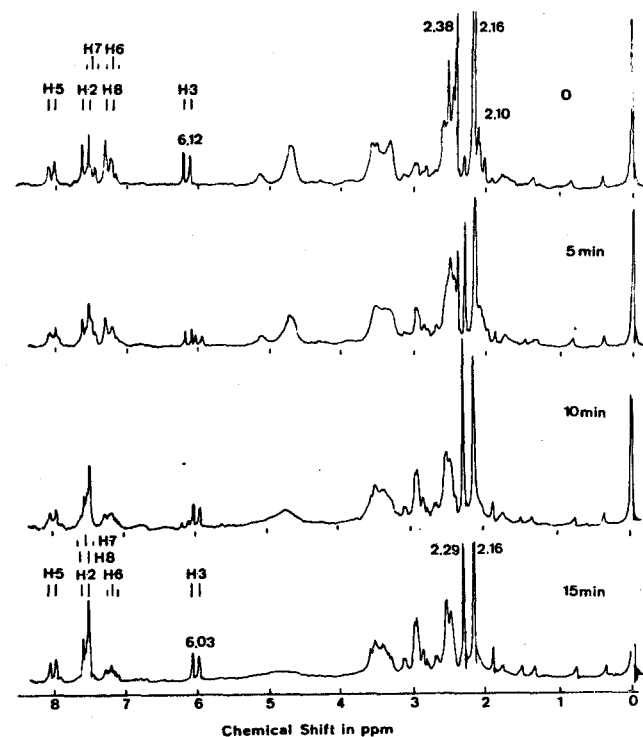


Chart 1. Proton NMR spectra of Ac-4-HAQO formation. DiAc-4-HAQO (30 mg) and DTT (21 mg) (HS-CH₂-CHOH-CHOH-CH₂-SH) were dissolved in 0.3 ml of DMSO-d₆. Chemical shifts are relative to tetramethylsilane, internal standard.

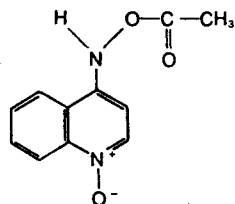
Adduct between Ultimate Carcinogen of 4-NQO and Guanine

the 2 acetyl functions of the diAc-4-HAQO, and it is evidenced by the following observations. At $t = 0$, protons 2 and 3 of the quinoline ring constitute an AB system, and the doublet located at 6.12 ppm is corresponding to proton 3 of diAc-4-HAQO. Moreover, proton 8 is characterized by a doublet at 7.3 ppm. After 15 min, the H-3 doublet is always observed with the same integrated value but with a small high-field shift at 6.03 ppm, and the H-8 doublet shifts downfield at 7.6 ppm. These results were assumed by Kawazoe *et al.* (7) as corresponding to the formation of Ac-4-HAQO. Concerning the CH_3 resonances, 2 acetoxy functions are observed at $t = 0$: at 2.38 ppm; and, in a high-field complex, absorption bands at about 2.15 ppm, respectively.

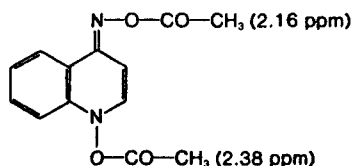
Indeed, these high-field resonances correspond to one acetoxy function at 2.16 ppm superimposed with the DTT sulfhydryl resonances at 2.10 ppm. The integrated value of the sulfhydryl peak at 2.10 ppm decreases with time, and a new band appears at 2.29 ppm due to the initiation of a thioacetyl function (8). Moreover, for $t = 15$ min, the 2.38-ppm acetyl peak completely disappears, and the resonance of the other acetyl remains at the same value (2.16 ppm). Furthermore, the integration value of the 6 aromatic protons is not modified during the reaction.

The very high reactivity of the monoacetyl derivative claimed by Araki was evidenced by an experimental feature. The 2.16-ppm resonance disappears when D_2O is added to the reaction mixture to give a new peak located at 1.9 ppm and corresponding to an acetic acid resonance.

From these observations, we claim that a monoacetyl derivative was formed by transfer of one acetyl group from the quinoline ring to the sulfur atom of DTT. It corresponds to the compound:



which is the Ac-4-HAQO. These results (Ref. 7; this work) allow the assignments of the 2 acetyl NMR peaks of diAc-4-HAQO:



Unfortunately, it was impossible to do an extraction of the monoacetyl derivative from the reaction mixture. Further works are in progress in order to synthesize this compound.

Reactivity of DiAc-4-HAQO with Purine Nucleosides

Although the purine bases were demonstrated by Ikegami *et al.* (4) to be the privileged sites of attack of 4-NQO, we also have studied the reaction with the pyrimidine bases by using the diAc-4-HAQO model. However, in this case, our methods

did not permit us to detect any adduct in the limits of accuracy of the experiments.

Analysis by HPLC of the reaction products of diAc-4-HAQO with [$U\text{-}^{14}\text{C}$]guanosine revealed 3 new ^{14}C -labeled peaks besides the guanosine, the so-called G I, G II, and G III. These products together accounted for about 1% of the [^{14}C]guanosine in the reaction with a diAc-4-HAQO:guanosine molar ratio of 2 (Chart 2A) and were not present in control preparations in which [^{14}C]guanosine was treated only with solvent. These 3 compounds are considered to be 3 quinoline-guanosine adducts.

HPLC analysis of the reaction with adenosine revealed 2 products that accounted for 0.6% of the adenosine incubated with a diAc-4-HAQO:adenosine molar ratio of 2 (Chart 2C). These 2 quinoline-adenosine adducts are called A I and A II.

The quantitative result that we obtain with the nucleosides is in fair agreement with the results previously obtained with DNA. The extent of binding is 1 and 2.60% for the native and the denatured DNA, respectively (3).

Reactivity of Ac-4-HAQO with Purine Nucleosides

HPLC analysis of the reaction mixture is shown in Chart 2. In the 2 cases [adenosine (Chart 2D) and guanosine (Chart 2B)], the same chromatographic patterns as that obtained with the diAc-4-HAQO can be observed. This means that in both cases, with diAc-4-HAQO as with Ac-4-HAQO, the same adducts were formed. However, most significantly in the case of Ac-4-HAQO, the fixation percentage is very much higher than with the diacetyl derivative. This difference is essentially due to the very high yield obtained for the G III adduct. It is about 15 times greater than in the case of the diacetyl derivative.

Preparation and Isolation of the Major Deoxyguanosine Adduct

Chromatography of the reaction mixture of Ac-4-HAQO, and [$U\text{-}^{14}\text{C}$]deoxyguanosine was carried out on Sephadex LH 20. Two new ^{14}C -containing peaks were observed (Chart 3) besides that of the unmodified [^{14}C]deoxyguanosine. The first peak was due to the minor adducts, the so-called dG I and dG II. The peak which was eluted just after the deoxyguanosine peak was identified by HPLC, after concentration of the solution, as being essentially the adduct dG III. Then, hydrolysis products from Ac-4-HAQO were eluted. UV spectrometry at 254 nm allows determination of the unmodified deoxyguanosine, the adducts, and the hydrolysis products. We have used this chromatographic separation to prepare the major adduct in large quantities, as described below.

Unlabeled deoxyguanosine (40 μM , 11 mg) in 5 ml of 2 mM citrate buffer, pH 7, was incubated with Ac-4-HAQO (73 μM , 16 mg) in 260 μl of DMSO for 40 min at 37° under nitrogen and chromatographed on Sephadex LH 20. The eluants containing dG III (elution volume, 150 to 180 ml) were pooled and concentrated to one-half their volume at room temperature under vacuum. dG III separated as a yellow flocculent precipitate; after centrifugation, it was washed 3 times with water and dried in a vacuum; 1.5 mg (3.5 μM) of dG III were obtained. HPLC analysis of this compound gave an unique peak with a retention time of 11.6 min (chromatographic conditions as in Chart 2).

B. Bailleul et al.

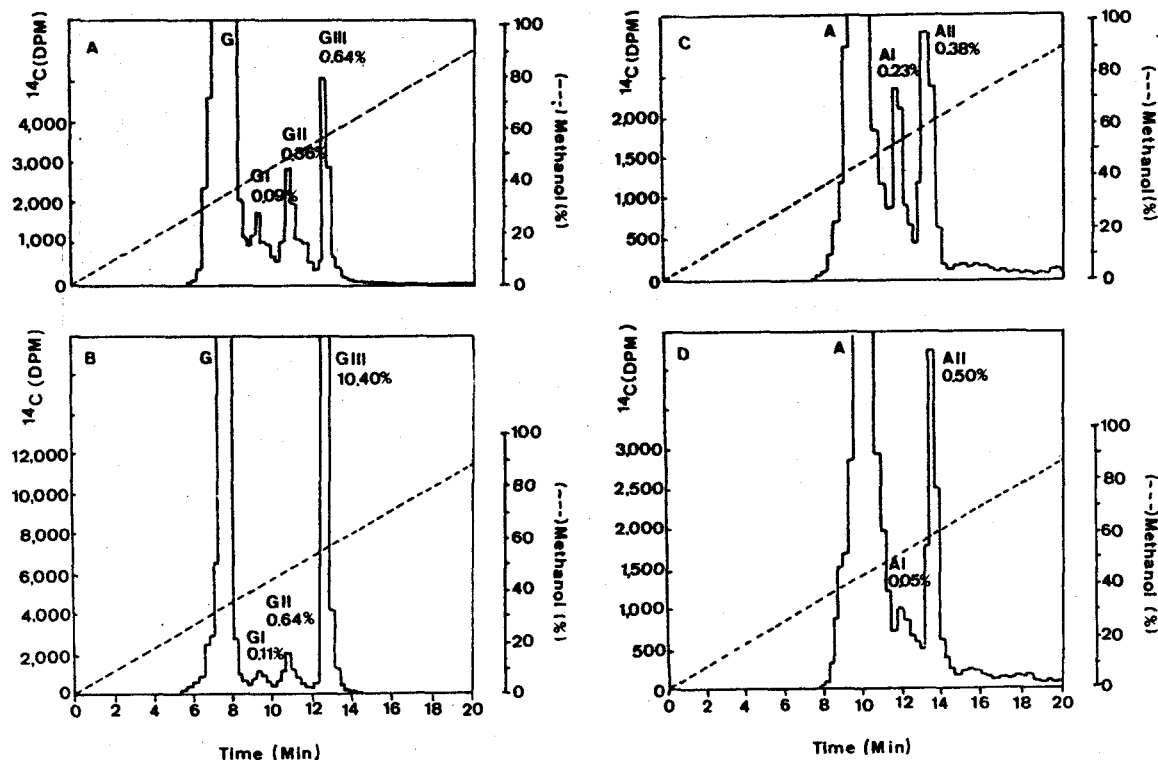


Chart 2. Reactions of diAc-4-HAQO and Ac-4-HAQO with guanosine and adenosine. Chromatographies with linear gradient (during 20 min) from water to 95% methanol:water were made by collection of aliquots (500 μ l) and 14 C radioactivity measurements. A, guanosine plus diAc-4-HAQO; B, guanosine plus Ac-4-HAQO; C, adenosine plus diAc-4-HAQO; D, adenosine plus Ac-4-HAQO. G I, G II, and G III, guanosine derivatives; A I, A II, adenosine derivatives.

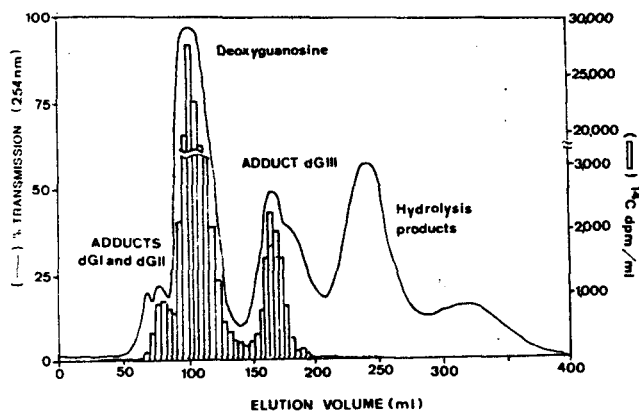


Chart 3. Elution profile from a Sephadex LH 20 column of the reaction Ac-4-HAQO-[U- 14 C]deoxyguanosine. The fraction which is eluted after deoxyguanosine was identified as dG III. This fraction contained 9 to 10% of the 14 C applied to the Sephadex column.

Identification of the Major Adduct dG III as N-(Deoxyguanosin-C⁸-yl)-4-aminoquinoline 1-Oxide

Concerning the structure of this adduct, a preliminary suggestion was made by Tada and Tada (17) in 1971; they suspected C-8 of guanine to be a possible site of fixation of the carcinogen in the case of one of the quinoline-guanine adducts. Therefore, in our laboratory, some initial investigations were carried out to verify this hypothesis. Indeed, treatment of [8- 3 H]guanosine with diAc-4-HAQO resulted in a product, G III,

with virtually no radioactivity. On the other hand, the 2 other guanine adducts obtained from this reaction, G I and G II, had lost practically none of their label. This result suggests that, for these 2 adducts, the C⁸ carbon of the guanine was not implicated in the binding with the carcinogen.

Confirmation of this hypothesis concerning dG III was provided by the following experiments.

The molecular weight of dG III was obtained by mass spectroscopy of the trimethylsilylation products of the nucleoside adduct. Silylation gave a product with molecular ions at $m/e = 785$ and 713 which are the expected values for the penta- and tetra(trimethylsilyl)deoxyguanosyl-aminoquinoline 1-oxide adducts, respectively.

The absorption spectra of dG III in aqueous solution at different pH's (Chart 4) were recorded. The spectra at pH 7 (in sodium citrate) and pH 13 (in 1 N NaOH) exhibit maxima at 365 and 440 nm, respectively. The latter is identical to those of 4-HAQO and 4-Me-HAQO at pH 13 (7). A logical interpretation of this result is that in these 3 compounds the electron delocalization of the quinoline ring is the same. In the case of the 2 reference compounds (4-HAQO, 4-Me-HAQO), this electron delocalization is due to the electron donor effect of the anion of the quinoline hydroxy group at high pH (N^4-O^-). This observation (i.e., the similarity of the UV spectra) suggests that for dG III the substitution of the guanine may occur on N⁴ of the quinoline ring; indeed, the ionization of the N¹-O⁶ guanine bond in alkali may induce, on the quinoline ring, such a delocalization effect by charge transfer.

The partition coefficients of dG III were determined according

Adduct between Ultimate Carcinogen of 4-NQO and Guanine

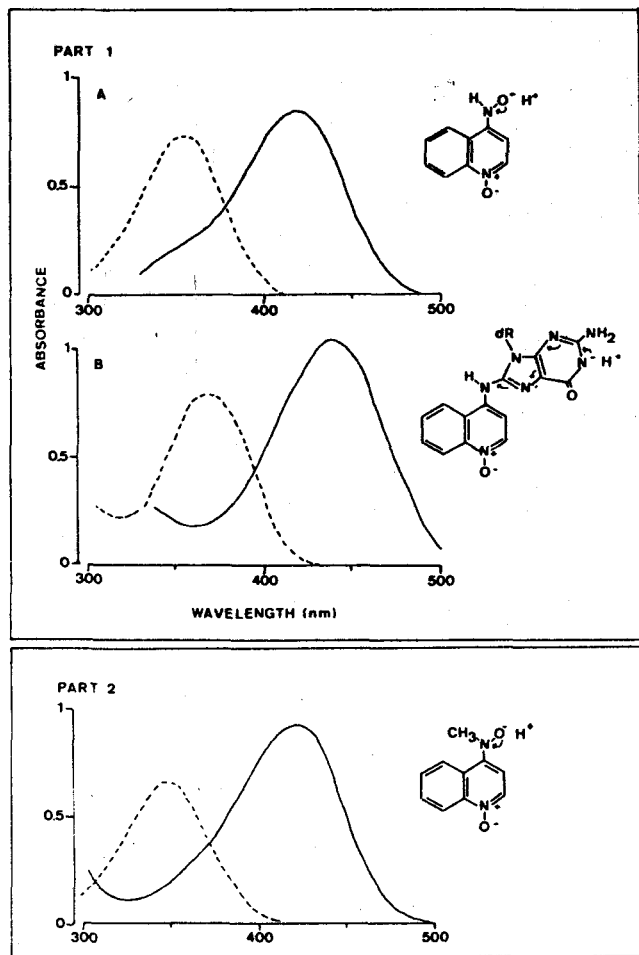


Chart 4. Part 1, UV spectra of 4-HAQO (A) and dG III adduct (B) in neutral (---, 2 mM sodium citrate, pH 7) and alkaline (—, 1 N NaOH) media. The concentrations of 4-HAQO and dG III adduct are, respectively, 20 and 50 $\mu\text{g/ml}$. Part 2, UV spectra of 4-Me-HAQO given by Kawazoe *et al.* (7). The 3 formulae correspond to the basic forms of 4-HAQO, dG III, and 4-Me-HAQO.

to the method of Moore and Koreeda (10). They were calculated for partition between aqueous buffers and *n*-butyl alcohol: ethyl ether at pH 1 and 11. Our results (2 pKa's were detected corresponding to acidic and alkaline conditions) are in fair agreement with the lack of substitution on either the N^1 or the O^2 atoms of guanine residues.

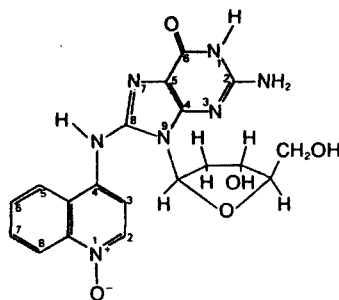
A comparative analysis of the 90-MHz proton NMR spectra of dG III, diAc-4-HAQO, and deoxyguanosine was carried out. The spectrum of dG III was recorded in DMSO- d_6 without and with DCI. Indeed, in DMSO, the quinoline-ring protons appeared as broad resonances which became sharper when DCI was added. Such a phenomenon can probably be explained by the presence of 2 tautomeric forms for the quinoline ring [4-HAQO (a) and 1-hydroxy-4-hydroxyimino-1,4-dihydroquinoline (b) as described in the case of 4-HAQO (7)], which both with DCI give the same delocalized cation. Moreover, we checked the stability of the compound since it is well known that such C^8 -guanine adducts are generally acid labile. We found that, during the recording of the spectrum, dG III was stable under our conditions.

Guanine Protons. The N^1 and N^2 protons appeared as broad

absorption bands at 10.6 and 6.3 ppm, respectively. These protons are exchangeable and are not observed in DMSO:DCI solutions. The C^8 proton expected at about 8 ppm is not observed, in agreement with a substitution on this atom.

Quinoline Protons. In DMSO:DCI, the resonance of each ring proton can be obtained; their assignments are shown in Table 1. In DMSO, due to the existence of the 2 tautomeric forms, the absorption bands are broad. The integration in this region corresponds to the correct number of ring protons for an unsubstituted quinoline ring. The N^4 -H is never observed whatever the solvent. In DMSO:DCI, this proton is exchanged; in DMSO, its resonance band is too broad (because it is a proton bound to a nitrogen atom and is due to the existence of 2 tautomeric forms).

Since all of our results are in good agreement with a C^8 substitution of the guanine base through the N^4 of the quinoline ring, the following formula can be proposed for the dG III adduct:



N-(Deoxyguanosin- C^8 -yl)-4-aminoquinoline 1-oxide

Hydrolysis of 4-HAQO-modified Nucleic Acid to Nucleosides and dG III Recovery

In vivo 4-HA[2- ^3H]QO-modified DNA (11,800 cpm/mg) was submitted to enzymatic hydrolysis (see "Materials and Methods"), and the chromatographic analysis of the enzymatic digest on a Bio-Gel P2 revealed a series of separated tritiated derivatives. Among these different compounds, the last eluted compound was identified as dG III. Indeed, the dG III that we prepared *in vitro* (see before), the last eluted compound on P2, and the mixture of these 2 products have the same retention times on the P2 chromatogram and in HPLC analysis. Moreover, the $A_{254}:A_{365}$ ratio obtained by the double UV detection that we used in HPLC analysis had the same value in the 3 cases, *i.e.*, 1.8.

The percentage of dG III in the DNA can be estimated at about $20 \pm 5\%$ (S.D.), since the radioactivity which corresponds to this fraction is one-fifth of the total radioactivity recovered after P2 chromatography. Such an intermediate value for dG III recovery from the DNA seems to indicate that this compound does not constitute a major adduct in the global DNA modification induced by the 4-NQO.

DISCUSSION

In this work devoted to the reactions of 2 esters of 4-HAQO, diAc-4-HAQO and Ac-4-HAQO, with purine nucleosides, similar adducts were identified in both cases. The results first suggest that the 2-O-ester functions of the diAc-4-HAQO were lost during adduct formation, as evidenced by dG III which

Table 1

Ninety-MHz proton NMR data of dG III

Spectra were recorded either in DMSO- d_6 or in DMSO- d_6 plus DCl. Concentrations were 1.5 mg dGIII in 0.3 ml solvent. Shifts are given in ppm taking tetramethylsilane as internal reference. The corresponding protons and the multiplicity of resonances are indicated in parentheses. Quinoline-ring protons are not resolved in DMSO due to a probable prototropic tautomerism of quinoline.

In DMSO- d_6		In DMSO- d_6 + DCl	
Resonances (ppm)	Assignment	Resonances (ppm)	Assignment
10.6 (1, s) ^a	NH (deoxyguanosine)	9.35 (1, d)	H-2 (quinoline)
8.4 (3)	H (quinoline)	9.2 (1, m)	H-5 (quinoline)
7.8 (3)	H (quinoline)	8.6 (1, d)	H-3 (quinoline)
6.5 (1, m)	H-1' (deoxyguanosine)	8.5 (1, m)	H-8 (quinoline)
6.3 (2, s)	NH ₂ (deoxyguanosine)	8.25 (1, m)	H-7 (quinoline)
5.5-2.0	OH-3', OH-5', H-3' H-2', H-5', H-4' (deoxyguanosine)	8.05 (1, m)	H-6 (quinoline)
		6.0 (1, m)	H-1' (deoxyguanosine)

^a s, singlet; d, doublet; m, multiplet.

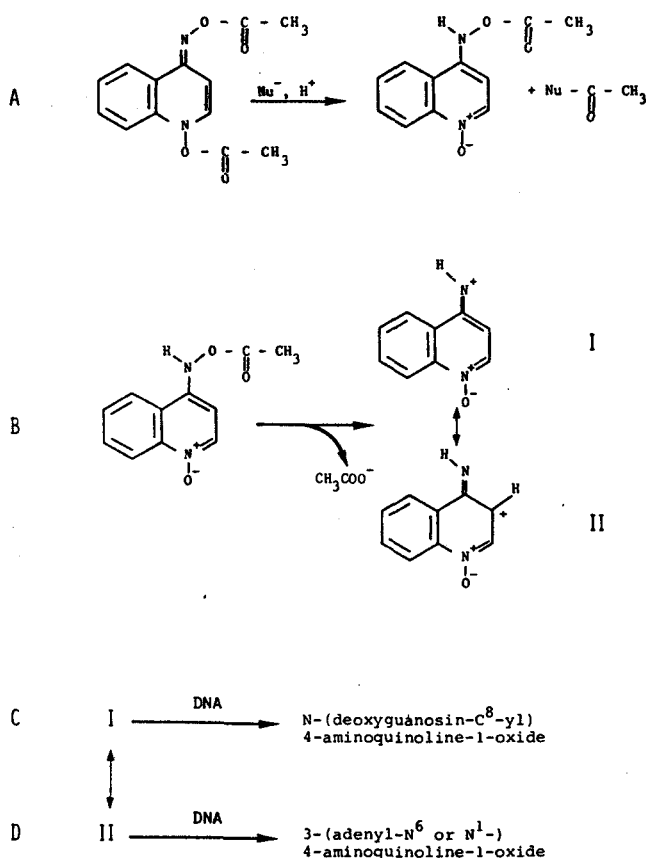


Chart 5. Reaction of diAc-4-HAQO and Ac-4-HAQO with DNA. Hypothetical mechanisms. C and D represent one of possible adduct formations from I and II.

does not contain any acetyl or acetoxy group, whatever the ester used for its preparation.

Furthermore, we showed that one O-ester function of diAc-4-HAQO (N^1 of the quinoline ring) is able to give an acetylation by nucleophilic displacement, e.g., with DTT. The products of this reaction are the acetylated nucleophile and Ac-4-HAQO (Chart 5A).

It is tempting to establish an analogy between Ac-4-HAQO and the ultimate carcinogens of the arylamide series. For

example, in the well-known case of acetoxyacetylaminofluorene, the covalent binding of the fluorene ring to DNA is obtained by displacement of the unique O-ester function (9). In the same manner, Ac-4-HAQO, by loss of its acetate group, would give an aryl nitrenium ion which would react with DNA (Chart 5, B, and C). The assumption of the existence of a 4-quinolinium ion is in agreement with the dG III adduct formation (Chart 5C). Moreover, the existence of 3-quinoline carbocation as a contributing resonance form can be considered in the light of results previously obtained by Kawazoe *et al.* (6), who demonstrated the binding of the carcinogen with adenine through C-3 of the quinoline ring (Chart 5D). This result was obtained (6) from a reaction mixture of polyadenylate and 4-HAQO to which an enzymatic activation system isolated by Tada and Tada (17, 20) was added. It is interesting to point out that in this case the ultimate carcinogen is postulated to be a seryl-4-HAQO. Therefore, an analogy between this seryl-4-HAQO and Ac-4-HAQO, which are both monofunctional forms of 4-HAQO, is quite possible. Thus, the hypothesis that a monoester of 4-HAQO is a probable ultimate carcinogen of 4-NQO is strongly strengthened. Yet the reaction sequence, proposed for the adduct formation, does not represent the unique way of diAc-4-HAQO decomposition.

Thus, 2 ultimate carcinogens exist. It is noteworthy that Regan and Setlow (13) have shown that there are 2 repair mechanisms for lesions induced by 4-NQO. At present, however, there is no evidence to suggest a correlation between these 2 facts.

Finally, it is interesting to note that the recovery of the adduct dG III from the *in vivo*-modified DNA is a significant result. Nevertheless, fixation of the quinoline ring onto C^8 of the guanine does not seem to constitute a major pathway, since we found that it represented 20%. This is a minimum figure since we are able to show that dG III decomposes partially during the enzymatic degradation of the modified DNA's. This degradation is the subject of further study. It would be interesting to study the lifetime of the adducts in the intact DNA *in vivo*. We have to be able to undertake these investigations with the help of HPLC and tritium and ^{14}C labeling of the compounds.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Professor G. Biserte for stimulating discussions and

Adduct between Ultimate Carcinogen of 4-NQO and Guanine

constant help. We thank C. Denis and P. Ricard for excellent technical assistance. The authors are grateful to Professor J. Carnduff for reading of the English text.

REFERENCES

1. Enomoto, M., Sato, K., Miller, E. C., and Miller, J. A. Reactivity of the diacetyl derivative of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide with DNA, RNA and other nucleophiles. *Life Sci.*, 17 (Part 2): 1025-1032, 1968.
2. Galiègue, S., Bailleul, B., and Loucheux-Lefebvre, M. H. Reactivity of the O,O'-diacetyl derivative of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide with DNA. Comparison with *in vivo* reacted DNA. *Eur. J. Cancer*, 16: 1283-1287, 1980.
3. Galiègue, S., Lecocq, G., and Loucheux-Lefebvre, M. H. *In vitro* DNA reaction with a carcinogen: the O,O'-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide. Changes of stability of modified DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 609: 383-391, 1980.
4. Ikegami, S., Nemoto, N., Sato, S., and Sugimura, T. Binding of ¹⁴C labeled 4-nitroquinoline-1-oxide to DNA *in vivo*. *Chem.-Biol. Interact.*, 1: 321-330, 1969.
5. Kawazoe, Y., and Araki, M. Studies on chemical carcinogens. V. O,O'-Diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide. *Gann*, 58: 485-487, 1967.
6. Kawazoe, Y., Araki, M., Huang, G. F., Okamoto, T., Tada, M., and Tada, M. Chemical structure of Q A II, one of the covalently bound adducts of carcinogenic 4-nitroquinoline-1-oxide with nucleic acid bases of cellular nucleic acids. *Chem. Pharm. Bull.*, 23: 3041-3043, 1975.
7. Kawazoe, Y., Ogawa, O., and Huang, G. F. Structure of carcinogenic 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide derivatives. *Tetrahedron*, 36: 2933-2938, 1980.
8. Middaugh, R. L., and Drago, R. S. Use of carbon-13 proton coupling constants in the assignment of proton signals in the N.m.r. spectrum of S-methyl thioacetate. *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2575-2576, 1963.
9. Miller, E. C. Some current perspectives on chemical carcinogens in humans and experimental animals: presidential address. *Cancer Res.*, 38: 1479-1496, 1978.
10. Moore, P. D., and Koreeda, M. Application of the change in partition coefficient with pH to the structure determination of alkyl substituted guanines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 73: 459-464, 1976.
11. Nagao, M., and Sugimura, T. Molecular biology of the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide. *Adv. Cancer Res.*, 23: 132-169, 1976.
12. Nakahara, W., Fukuoka, F., and Sugimura, T. Carcinogenic action of 4-nitroquinoline-N-oxide. *Gann*, 48: 129-137, 1957.
13. Regan, J. D., and Setlow, R. B. Two forms of repair in the DNA of human cells damaged by chemical carcinogens and mutagens. *Cancer Res.*, 34: 3318-3325, 1975.
14. Shirasu, Y. Further studies on carcinogenic action of 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide. *Gann*, 54: 487-495, 1963.
15. Sugimura, T., Okabe, K., and Endo, H. The metabolism of 4-nitroquinoline-1-oxide. I—Conversion of 4-nitroquinoline-1-oxide to 4-aminoquinoline-1-oxide by rat liver enzymes. *Gann*, 56: 489-501, 1965.
16. Sugimura, T., Okabe, T., and Nagao, M. The metabolism of 4-nitroquinoline-1-oxide. III. An enzyme catalyzing the conversion of 4-nitroquinoline-1-oxide to 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide in rat liver and hepatomas. *Cancer Res.*, 26: 1717-1721, 1966.
17. Tada, M., and Tada, M. Interaction of a carcinogen, 4-nitroquinoline-1-oxide, with nucleic acids: chemical degradation of the adducts. *Chem.-Biol. Interact.*, 3: 225-229, 1971.
18. Tada, M., and Tada, M. Enzymatic activation of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide and its interaction with cellular macromolecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46: 1025-1032, 1972.
19. Tada, M., and Tada, M. Requirement of L-serine for enzyme activation of carcinogen, 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide. *Gann*, 65: 281-284, 1974.
20. Tada, M., and Tada, M. Seryl-tRNA synthetase and activation of the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide. *Nature (Lond.)*, 255: 510-512, 1975.
21. Tada, M., and Tada, M. Main binding sites of the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide in nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 454: 558-566, 1976.

b) L'Ac-4HAQ, un dérivé d'hydrolyse du diAc-4HAQO

Nous nous étions intéressés dans la première phase de nos travaux à l'hydrolyse du diAc-4HAQO, dans les conditions (de réaction) que nous employions pour le faire réagir sur l'ADN ou sur les nucléosides. L'un des objectifs était en particulier de suivre le devenir de chacune des fonctions acétoxy du diAc-4HAQO (BAILLEUL, 1979).

Nous avons pu montrer qu'un composé monoacétylé ne possédant pas de fonction N-oxyde (Ac-4HAQ), était formé lors de l'hydrolyse du diAc-4HAQO. Il a été caractérisé à l'aide de la RMN et de la spectrométrie de masse. Sa synthèse chimique a également été faite à partir du 4-hydroxyaminoquinoléine.

L'existence de ce dérivé monoacétylé, stable, dans les composés d'hydrolyse du diAc-4HAQO était surprenante et nous a amené à nous poser un certain nombre de questions. En particulier :

- L'Ac-4HAQ, joue-t-il un rôle dans le mécanisme de formation des adduits avec l'ADN ?
- La fonction N-oxyde en position 1 est-elle nécessaire pour que le 4NQO présente un pouvoir cancérigène ?
- Par quel mécanisme l'Ac-4HAQ est-il formé dans l'hydrolysate ?

Nous avons pu répondre en partie à ces questions. Les résultats et les conclusions de l'étude qui y correspond ont fait l'objet d'une publication (n° 2) :

Identification of 4-acetoxyaminoquinoline from the hydrolysis of 1-acetoxy-4-acetoxyimino-1,4-dihydroquinoline, *in vitro* and *in vivo* properties.

Chem. Biol. Interactions (1983).

Le diAc-4HAQO s'hydrolyse dans l'eau suivant deux mécanismes : d'une part, par un mécanisme probablement radicalaire aboutissant à l'Ac-4HAQ et, d'autre part, par un mécanisme faisant intervenir un nucléophile conduisant à l'Ac-4HAQO (voir publication n° 1). Ce dernier composé réagit rapidement avec les nucléophiles, ceci explique la formation des adduits; par contre, l'Ac-4HAQ est stable et ne réagit pas avec les nucléophiles. Ces résultats permettent de comprendre que le taux de fixation sur les bases de l'ADN soit plus faible avec le diAc-4HAQO qu'avec l'Ac-4HAQO (GALIEGUE-ZOUITINA et al., 1983).

La différence de réactivité des deux dérivés monoacétylés :

l'Ac-4HAQ et l'Ac-4HAQO a été expliquée (DEMEUNYNCK, 1984) ; la fonction N-oxyde en position 1 favorise et stabilise le départ de la fonction acétoxy en position 4. La fonction N-oxyde est donc importante pour la formation des adduits et par conséquent pour le pouvoir cancérigène du 4NQO.

Chem.-Biol. Interactions, 43 (1983) 87-98
Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd.

87

IDENTIFICATION OF 4-ACETOXYAMINOQUINOLINE FROM THE HYDROLYSIS OF 1-ACETOXY-4-ACETOXYIMINO-1,4-DIHYDROQUINOLINE, IN VITRO AND IN VIVO PROPERTIES

B. BAILLEUL^a, S. GALIÈGUE^a, M. DEMEUNYNCK^b, M.F. LHOMME^b, J. LHOMME^b
and M.H. LOUCHEUX-LEFEBVRE^{a,*}

^a*Institut de Recherches sur le Cancer de Lille et Unité INSERM no. 124, BP 311, F-59020 Lille Cédex* and ^b*Laboratoire de Chimie Organique Biologique, ERA CNRS no. 827, Université de Lille I, F-59655 Villeneuve d'Ascq (France)*

(Received February 10th, 1982)

(Accepted June 28th, 1982)

SUMMARY

4-Acetoxyaminoquinoline (Ac-4-HAQ) (1) was identified as a hydrolysis product of 1-acetoxy-4-acetoxyimino-1,4-dihydroquinoline (diAc-4-HAQO). The reaction allowing the obtention of (1) obeys to a reduction mechanism implying the N₁-O cleavage. The carcinogenic properties of (1) observed by Sato et al. (*Japan J. Exp. Med.*, 40 (1970) 475) in mice were studied in rats with the in vivo system we used previously with 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) and 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide (4-HAQO). In rats (1) does not covalently bind DNA. It was, therefore, possible to propose an interpretation of the results obtained by Enomoto et al. (*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 136 (1971) 1206) who injected diAc-4-HAQO s.c. to mice and rats. Compound 1 could be responsible for the carcinogenic effects observed through the following pathway: (1) should be formed by hydrolysis of diAc-4-HAQO and reactivated by an enzymatic system to N-oxide derivative, the 4-acetoxyaminoquinoline-1-oxide (Ac-4-HAQO), which constitutes an ultimate carcinogen model of 4-NQO.

Key words: 4-Nitroquinoline-1-oxide — 4-Nitroquinoline — 4-Acetoxyaminoquinoline — 1-Acetoxy-4-acetoxyimino-1,4-dihydroquinoline — Carcinogenesis

*To whom correspondence should be addressed.

Abbreviations: Ac-4-HAQ, 4-acetoxyaminoquinoline; Ac-4-HAQO, 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide; diAc-4-HAQO, 1-acetoxy-4-acetoxyimino-1,4-dihydroquinoline; 4-ClQ, 4-chloroquinoline; 4-HAQO, 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide; HPLC, high pressure liquid chromatography; 4-NQ, 4-nitroquinoline; 4-NQO, 4-nitroquinoline-1-oxide; NMR, nuclear magnetic resonance.

0009-2797/83/0000-0000/\$03.00

© 1983 Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd.

Printed and Published in Ireland

INTRODUCTION

It is now widely recognized that an important and perhaps crucial event in the carcinogenic process is attack on the DNA molecule by the so-called ultimate carcinogens.

In the case of 4-NQO, a synthetic carcinogen, the first step of its metabolic pathway involves reduction to 4-HAQO [1]. Recent studies [2] have shown that mono- and di-acetate derivatives of 4-HAQO could be considered as ultimate carcinogens of 4-NQO. They bind covalently to nucleic acids and nucleosides, and a derivative coupled via C-8 to a guanine residue was identified as a product of a reaction with deoxyguanosine.

Nakahara et al. [3] elucidated the structure specificity of 4-NQO using selected derivatives and concluded that both the NO₂ group at position 4 and the oxide at position 1 of the quinoline ring are necessary for carcinogenicity. On the other hand, Mori et al. [4] suggested from their findings on 4-nitroquinoline (4-NQ) that the N-oxide group may not be essential for the carcinogenicity of 4-NQO derivatives in mice. This result was supported by Sato et al. [5] who injected into mice a monoacetyl derivative of 4-hydroxyaminoquinoline; by multiple injections, they induced sarcomas at the injection site as with diAc-4-HAQO and a single injection provoked a high incidence of s.c. and lung adenomas.

The present work is devoted to the identification and the carcinogenic potential of Ac-4-HAQ (Scheme I (1)) which is a compound formed during the hydrolysis of diAc-4-HAQO. Compound 1 was injected i.p. as previously described [6] in rats and the ratio of fixation on DNA was determined and compared with the *in vivo* 4-HAQO modified DNA [6]. Our results offer an explanation of the results of Enomoto et al. [7] who observed a carcinogenic activity of diAc-4-HAQO for mice but not for rats, although 4-NQO and 4-HAQO exhibit a carcinogenic potential in both mice and rats.

MATERIALS AND METHODS

Materials

diAc-4-HAQO. This was synthesized from 4-HAQO [8] as previously described [9]. It was stored in a dessicator over P₂O₅ in the dark at -20°C. 4-NQO was obtained from Fluka (CH-9470 Buchs, Schweiz) and 4-N[2-³H]QO from Amersham/France (spec. act., 941 mCi/mmol). DiAc-4-HA[2-³H]QO prepared from commercial 4-N[2-³H]QO exhibits a specific activity of 18.4 mCi/mmol. Specifically acetyl-labelled diAc-4-HAQO was obtained by modification of Kawazoe's synthesis [9]. 4-HAQO (100 mg, 0.57 mM), Ac₂O (0.36 ml, 3.4 mM) and AcOH (0.5 ml, 8.7 mM) were placed in 10-ml conical tube under N₂. The initial suspended compound dissolved after 10 min of bubbling. The reaction mixture was poured into 80 ml of ice-water with vigorous stirring. Mixture was cooled to -10°C with ice-acetone mixture. The resulting precipitate was collected using Kawazoe's

method. Di[³H]Ac-4-HAQO (spec. act., 6.72 mCi/mmol) was synthesized with 25 mCi of Ac₂O (Amersham/France).

Hydrolysis of diAc-4-HAQO. This was obtained by addition of 1 vol. diAc-4-HAQO dissolved in ethanol (9 mg/ml) to 4 vol. 2 mM sodium citrate buffer (pH 7). The incubation was carried out at 37°C, in darkness for 45 min. Analysis of the reaction products were carried out by means of high pressure liquid chromatography (HPLC). A μ Bondapak C 18 column was used with linear gradient (during 20 min) from water to 95% methanol water. The flow rate was 2 ml/min. The injection volumes were 100 μ l, for analytic HPLC and 1 ml for semi-analytic HPLC.

4-Hydroxyaminoquinoline. This was synthesized from 4-chloroquinoline and hydroxylamine hydrochloride in methanol with potassium carbonate as described by Hamana and Funakoshi [10]. The mixture was warmed for 3 h. Potassium chloride was filtered and 4-hydroxyaminoquinoline crystallized from the filtrate [m.p. 260–262°C (decomposition), litt. 262–263°C. UV (EtOH) λ_{\max} 230 ($\epsilon = 24\ 500$) 332 nm ($\epsilon = 27\ 500$). IR (nujol, HCl) 3160 (br), 1640, 1620, 1600, 1550 cm⁻¹. Mass spectrum: *m/e*: M⁺ 160 (64), 144 (100), 129 (36), 116 (32), 102 (19). NMR (CD₃OD): 7.1 (d, 1 H, C₃H, J = 6.8 Hz) 7.5–8 (m, 3 H), 8.2 (m, 1 H) 8.4 (d, 1 H, C₂H, J = 6.8 Hz)].

Ac-4-HAQ. This was synthesized from Ogawa et al. [11]. A stoichiometric mixture of 4-hydroxyaminoquinoline and imidazole was added to acetic anhydride (in excess) dimethylformamide solution with magnetic stirring. After 3 h the mixture was poured into an iced sodium bicarbonate saturated solution and Ac-4-HAQ crystallized. The precipitate was washed with water and crystallized from methylene chloride (60% yield) [m.p. 176–177°C; litt. 175–178°C. UV (EtOH) λ_{\max} 254 ($\epsilon = 22\ 500$), 348 nm ($\epsilon = 27\ 700$). IR (nujol) 3440, 1730, 1620, 1550, 1510, 1350, 1250, 1210 cm⁻¹. Mass spectrum: *m/e*: M⁺ 202 (28), 160 (54), 144 (100), 129 (27), 116 (51), 102 (21)].

Methods

Electron mass spectra were recorded with a Riber Mag 10-10. Proton NMR spectra were recorded on 270 MHz Bruker. IR spectra were obtained with a Perkin Elmer 177 G. HPLC separations were carried out on a Waters system consisting of a U6K injector, two 6000 A pumps, a model 660 solvent programmer and a model 440 dual wavelength detector (254 nm, 365 nm). Radioactivity of the peaks was determined with a Nuclear Chicago 300 scintillator counter.

RESULTS

Solvolysis of diAc-4-HAQO

With unlabelled diAc-4-HAQO. Studies of hydrolysis of diAc-4-HAQO were carried out by means of HPLC. Just after the dissolution of diAc-4-

90

HAQO in 2 mM citrate buffer-ethanol mixture the chromatographic pattern observed at 365 nm is characterized by an unique peak which was identified as diAc-4-HAQO (Fig. 1). When this solution is incubated at 37°C the peak intensity decreased and its magnitude allowed evaluation of the half lives

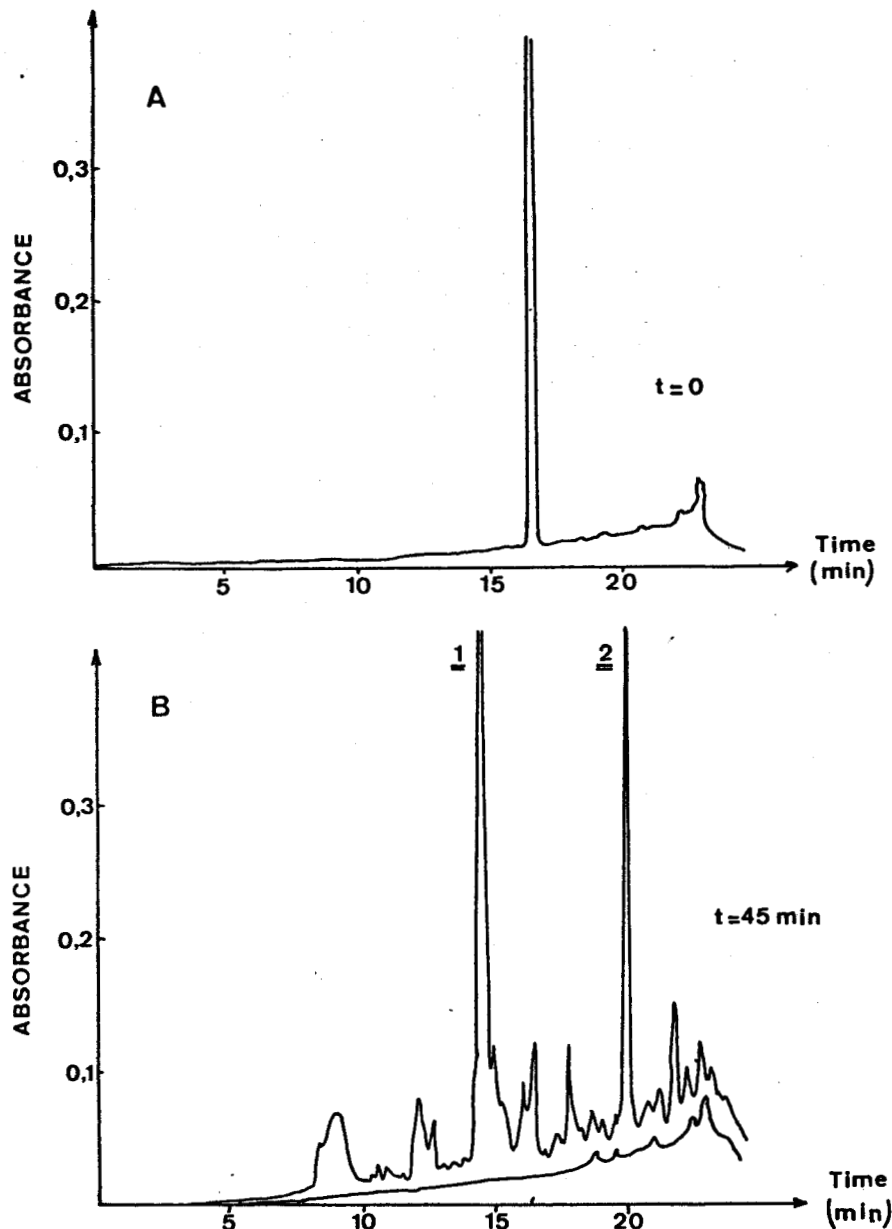


Fig. 1. Solvolysis of diAc-4-HAQO in 2 mM citrate buffer (pH 7) $t = 0$ (A) and $t = 45$ min (B). HPLC chromatograms with linear gradient (during 20 min) from water to 95% methanol/water mixture using a 365 nm detector.

($t_{1/2}$) were 12 min, 45 min and 80 min, in solutions containing 20%, 50% and 67% of ethanol, respectively. The decrease of the diAc-4-HAQO peak was paralleled by the appearance of other compounds; for example, as shown (Fig. 1) the HPLC profile detected at 365 nm corresponding to a solution injected after an incubation at 37°C for 45 min exhibits 17 peaks. Two hydrolysis products seem to be formed in major yield, the compounds called 1 and 2.

An assay of reaction with DNA was carried out using such diAc-4-HAQO hydrolysis products: no modification of DNA was observed. Therefore these products were no more studied, since they are unable to covalently bound DNA.

With diAc-4-HA[2-³H]QO. As previously, the hydrolysis of diAc-4-HA-[2-³H]QO was followed by HPLC but, in this case, using as detection the labelled products. So it was possible to evaluate the amount of every hydrolysis product. In Table I is indicated the calculated yield of every hydrolysis product (elution profiles, Fig. 2). We can observe that a good correlation exists between the two methods (UV absorption and radioactivity detections). Compounds 1 and 2 correspond to the main hydrolysis products since they constitute 24% and 16% of hydrolysis compounds, respectively. Moreover, the radioactivity at the void volume shows that the quinoline H-2 proton is implicated in a hydrolysis mechanism. Indeed, the void volume does not contain quinolines as evidenced by the lack of optical density at 365 nm. The product corresponding to the peak at $R_t = 9$ min is probably the one which is formed in the H-2 dependent

TABLE I
YIELDS OF HYDROLYSIS PRODUCTS FROM diAc-4-HA[2-³H]QO

Retention time (min)	Radioactivity (dpm) 10 ⁻³	Yield of the radioactivity (precision value 10%)
1.6- 2.4	1067	21.2
8 - 9.5	35	0.7
11 -11.3	75	1.5
12.5-13	130	2.6
15	1193	24
15.2-15.4	90	2
16.6-17.2	327	6.5
17.9	347	6.9
18.9	262	5.2
20	805	16
21.2	130	2.6
21.7	478	9.5
22.3	70	1.4
Total	5013	108
Injection	4650	100

92

hydrolysis mechanism. Indeed the UV and radioactivity measurements of this peak are very different due to the very weak intensity of the radioactivity.

With $di[{}^3H]Ac-4-HAQO$. The elution profile obtained by 3H -radioactivity

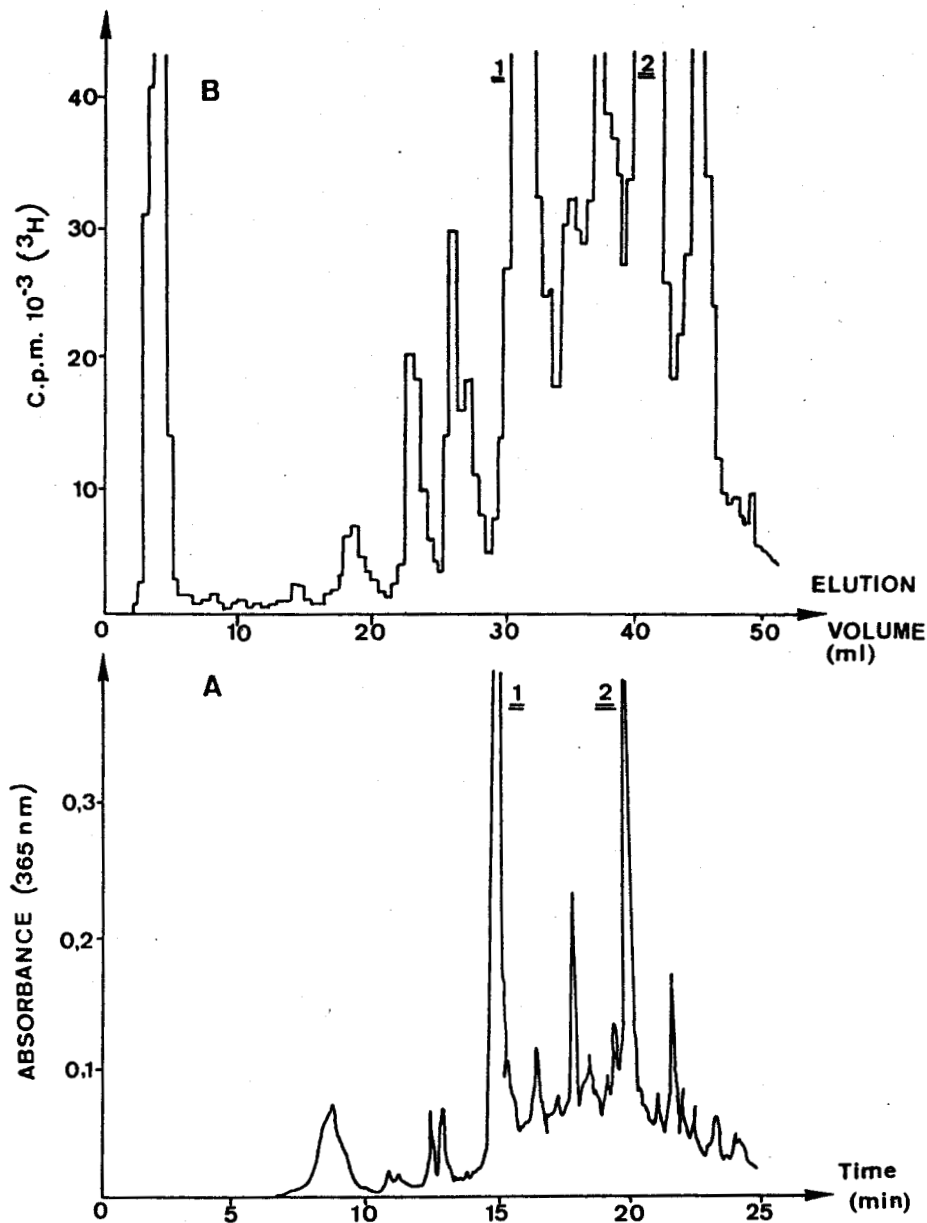


Fig. 2. Solvolysis of $diAc-4-HA[2-{}^3H]QO$ in 2 mM citrate buffer during 45 min. HPLC chromatograms with linear gradient (during 20 min) from water to 95% methanol/water mixture using a 365 nm detector (A) and 3H -radioactivity measurement of 500- μ l aliquots (B).

measurements of di[³H]Ac-4-HAQO hydrolysis exhibits 5 peaks as shown in Fig. 3.

Peak I, corresponding to a void volume was attributed to acetic acid produced by the hydrolysis of diAc-4-HAQO. Such an attribution is in

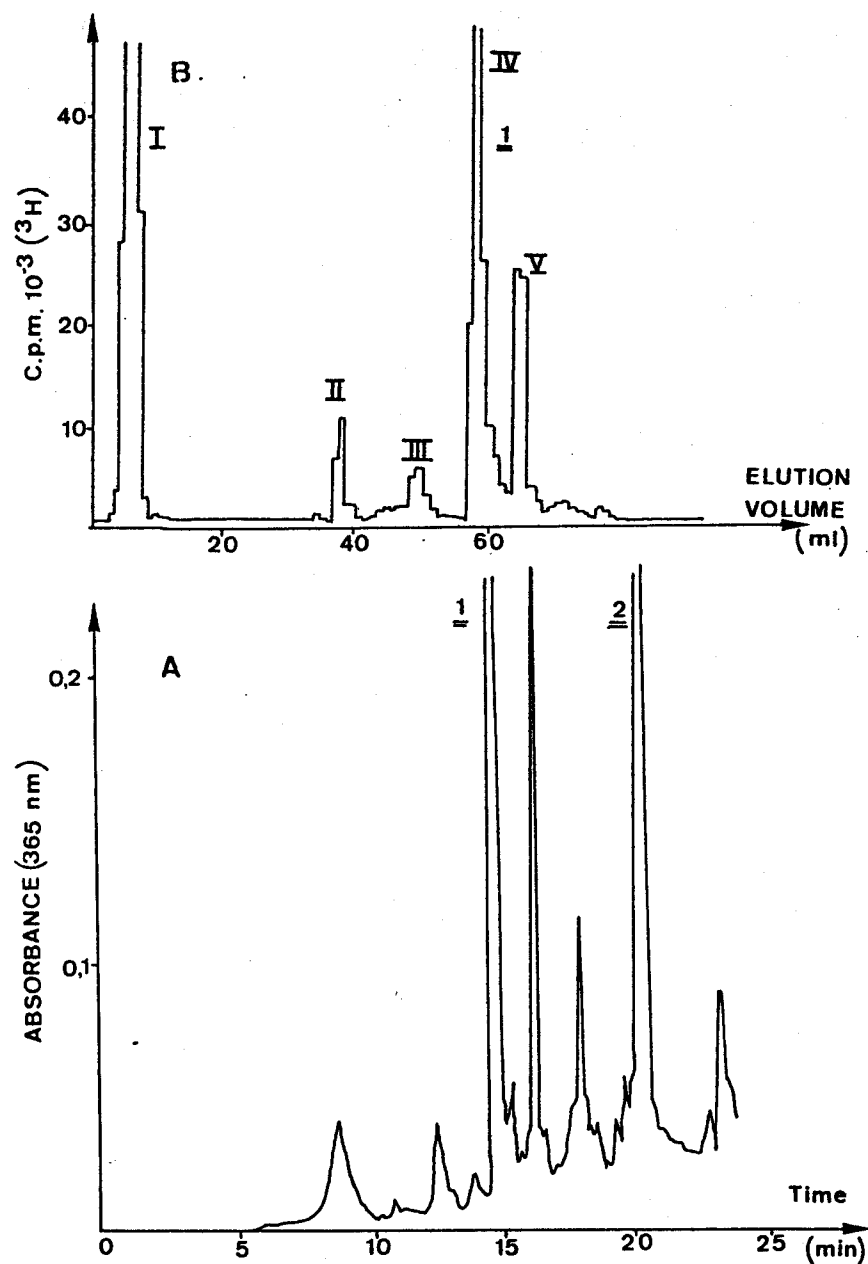


Fig. 3. Solvolysis of di[³H]Ac-4-HAQO in 2 mM citrate buffer during 45 min. 365 nm detection (A) and ³H-radioactivity measurements (B) were obtained as in Fig. 2.

good agreement with the profile obtained by UV detection since no peak is observed at void volume at 365 nm. Araki et al. [12] gave previously a proof of the formation of acetic acid by warming diAc-4-HAQO in various solvents. In water, 1.7 eq-mole of acetic acid is obtained from 1 eq-mole of diAc-4-HAQO. Identical results were obtained by radioactivity detected HPLC analysis.

Peaks II and III correspond to two minor compounds.

Peak IV is observed at an identical retention time (15 min) to that of (1) (cf. Fig. 2, hydrolysis of diAc-4-HA[2-³H]QO). Its yield was calculated on the hypothesis that this product is monoacetylated: one finds 27%, that is about the same value that this obtained for 1 (24%). This is an attractive result as it allows us to affirm that an acetylated derivative is recovered among the diAc-4-HAQO hydrolysis compounds.

The last peak, V, corresponds to a minor fraction of non-hydrolyzed di[³H]Ac-4-HAQO.

Determination of the structure of (1) as acetoxyminoquinoline

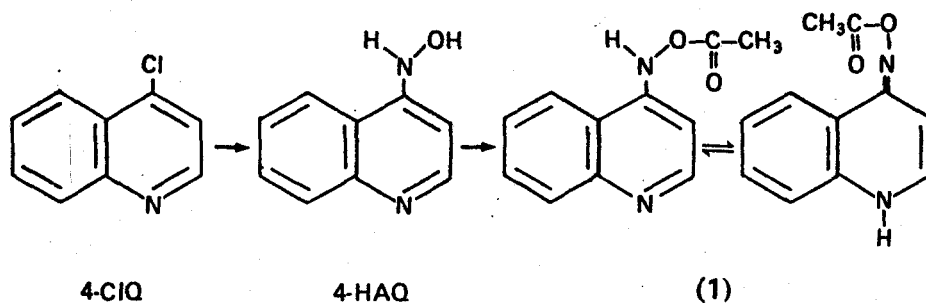
Compound 1 was prepared by diAc-4-HAQO hydrolysis and isolated by semi-analytic HPLC. Its stability was checked at 37°C in a 2 mM citrate buffer (pH 7). The HPLC profile characterized by a single peak, is the same at $t = 0$ and at $t = 60$ h.

Identification of (1) as acetoxyminoquinoline (Ac-4-HAQ). The mass of (1) obtained by mass spectroscopy is in agreement with the presence of an acetoxyl group. The molecular ion ($M^+ = 202$) obtained by electron impact corresponds to Ac-4-HAQ. Moreover two fragments at $m/e = 160$ ($M-42$) and $m/e = 144$ ($M-58$) correspond to the loss of acetyl and acetoxyl groups, respectively.

(i) The IR spectrum shows a band at 1730 cm^{-1} , corresponding to a $C = O$ stretching. This clearly indicates the presence of an acetoxyl function as previously observed with diAc-4-HAQO which exhibits two bands at 1750 and 1805 cm^{-1} corresponding to the acetoxyl functions located on N-4 and N-1, respectively [9].

(ii) The 270 MHz proton nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum was recorded and the assignments of different resonances determined [NMR (d_6 -DMSO): 2.12 (s, 3 H, CH_3), 6.07 (d, 1 H, $J = 7.5\text{ Hz}$, H-3) 7.13 (t, 1 H, $J = 7.5\text{ Hz}$, H-6) 7.23 (d, 1 H, $J = 7.5\text{ Hz}$, H-5) 7.29 (d, 1 H, $J = 7.5\text{ Hz}$, H-2) 7.43 (t, 1 H, $J = 7.5\text{ Hz}$, H-7) 7.94 (d, 1 H, $J = 7.5\text{ Hz}$, H-8) 11.05 (1 H for NH)]. Their identification was obtained doing a comparison with the NMR spectra of diAc-4-HAQO and 4-HAQO under the same conditions. The spectral data given by Kawazoe et al. [13] for several quinoline compounds were also used.

A comparison with the results we obtained with diAc-4-HAQO which exhibits two CH_3 resonances, allows us to assign the peaks at 2.16 and 2.38 ppm to the acetoxyl groups located in N-4 and N-1, respectively. Moreover, the CH_3 proton resonance of the acetoxyminoquinoline-1-oxide [2] a prototype of carcinogen of 4-NQO was observed, as expected, at 2.16 ppm.



Scheme I.

Therefore, all these results are in excellent agreement with the proposed structure of (1) as acetoxyaminoquinoline.

Chemical synthesis of acetoxyaminoquinoline (1). In a previous work, Sato et al. [5] synthesized (1) by reduction of diAc-4-HAQO with H_2 -Pd in ethyl ether. A value of 1745 cm^{-1} was reported for the carbonyl stretching vibration of the product. This value differs significantly from the 1730 cm^{-1} band which we observe for our hydrolysis product. We therefore carried out the preparation of an authentic sample of (1) using a different and unambiguous route.

4-HAQ was quantitatively obtained from 4-chloroquinoline (4-ClQ) by treatment with hydroxylamine hydrochloride in methanol in the presence of potassium carbonate. 4-HAQ was subsequently acetylated by acetic anhydride. The yield of the reaction could be significantly improved by using imidazole as a catalyst and operating in dimethylformamide at room temperature.

The product thus obtained was identical to the acetoxyaminoquinoline (1) previously described and furnished by the hydrolysis of diAc-4-HAQO, as evidenced by the mass, NMR, UV and IR spectra. In particular it revealed a vibration at 1730 cm^{-1} in the IR spectrum registered in nujol. Indeed this compound possesses the same spectral data (IR, NMR) as the product recently described [11,14] and prepared according to Sato et al. [5], i.e., by catalytic reduction of diAc-4-HAQO.

Comparison of the action of 4-HAQO and Ac-4-HAQ in vivo in rats

Ac-4-HA[2- 3H]Q prepared by hydrolysis of diAc-4-HA[2- 3H]QO (cf. Materials and Methods), isolated and purified by HPLC, was injected as previously described and DNA was extracted [6]. A small amount of radioactivity was detectable in this DNA (spec. act. 100 cpm/mg). This result can be seen in Table II in which the specific activity of the in vivo 4-HA[2- 3H]QO, HCl modified-DNA was also given [2]. One can see that the [3H]DNA specific activity is one hundred times more important with 4-HA[2- 3H]QO, HCl than with Ac-4-HA[2- 3H]Q. Moreover, no significant difference could be observed in the radioactivity per mg of the modified-DNA when the injected quantity of Ac-4-HA[2- 3H]Q was increased.

96

TABLE II

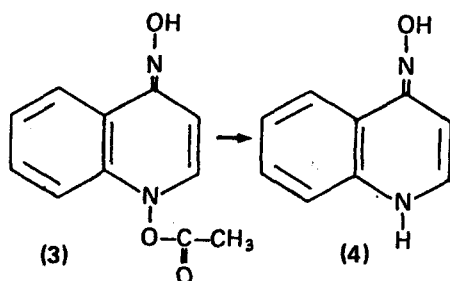
SPECIFIC ACTIVITY OF THE IN VIVO MODIFIED-DNA BY 4-HA[2-³H]QO HCl AND Ac-4-HA[2-³H]QO. 0.5 ml OF THE SOLUTION OF CARCINOGEN IN PHYSIOLOGICAL SALINE SOLUTION WAS INJECTED i.p. TO RATS BEARING A ZAJDELA ASCITE TUMOR

	Spec. radioact. (mCi/mmol)	Time after carcinogen injection (h)	μ M	DNA spec. act. (cpm/mg DNA)
4-HA[2- ³ H]QO, HCl	18.4	2	15	11 800
Ac-4-HA[2- ³ H]Q	18.4	2	{ 1.5 5	{ 100 120

DISCUSSION

As previously proposed by us [2], an ionic mechanism can explain the formation of some adducts with DNA bases, producing 2 mol of acetic acid/mol of diAc-4-HAQO in water. Since the yield of (1) we obtained by the hydrolysis of diAc-4-HAQO (27%) is in agreement with the results of Araki et al. [12] who observed the formation of 1.7 eq-mole of acetic acid from the hydrolysis of 1 eq-mole of diAc-4-HAQO, it is possible that two mechanisms are involved (i) an ionic mechanism, responsible for the decomposition of about 70% of diAc-4-HAQO in citrate buffer-ethanol (v/v, 8 : 2) solutions and (ii) a reduction mechanism, allowing for the formation of (1). A radical pathway, as proposed by Araki et al. [12] for the thermal decomposition of diAc-4-HAQO could be operative or other routes may also be suggested.

As far as this particular unusual reduction to (1) is concerned, we observed a similar reaction implying the N₁-O cleavage, in the chemistry of the monoacetyl derivative (3), which can be considered as a simplified model of diAc-4-HAQO [15].



Scheme II.

Treatment of (3) in different conditions of pH and solvent resulted in the significant formation of product (4), the yields being dependent on the reaction conditions. For example, about 15% of (4) was obtained by neutral hydrolysis of (3) in a 2 mM citrate buffer at room temperature. We are investigating the mechanism of this reduction.

Considering the *in vivo* carcinogenic properties of Ac-4-HAQ, the assays of Sato et al. [5] and our own show that Ac-4-HAQ is carcinogenic in mice but probably not in rats. This result is comparable with those of Enomoto et al. who studied the different actions of diAc-4-HAQO in mice and rats [7]. These authors tested the carcinogenicity of diAc-4-HAQO and 4-HAQO by subcutaneous injection to mice and rats. The induction of sarcomas is obtained in both mice and rats with 4-HAQO. However, a significant difference is observed for diAc-4-HAQO: it is much more active in mice than in rats. Since it is now well known [6,8,16] that diAc-4-HAQO, as electrophilic compound, is able to covalently bind to DNA, it is difficult to understand why the action of s.c. injection is not alike in rats and in mice, as evidenced by Enomoto et al. [7]. Thus it is possible that, in rats, and also in mice, the diacetyl derivative, diAc-4-HAQO, does not reach the DNA target. More especially a hydrolysis of diAc-4-HAQO could rapidly take place with formation of Ac-4-HAQ with a yield of about 25%. The formation of (1) as a step in the carcinogenic action of subcutaneous injection of diAc-4-HAQO is thus more likely. Compound 1 would be activated by an enzymatic system which would be present in mice but not in rats. Therefore, a possible mechanism of activation of the Ac-4-HAQ would be its transformation to *N*-oxide derivative the Ac-4-HAQO which constitutes a model for the ultimate carcinogen [2].

It is important to distinguish between the compounds characterized by the presence of a *N*-oxide function such as 4-NQO and the compounds without the *N*-oxide function such as 4-NQ. Indeed, the second series need activation to the *N*-oxide derivative by an enzyme system which appears to exist in mice but not in rats.

Lastly, our results indicate that there is not a simple correlation between the ability of a compound to form tumours at the injection site and its being characterized as an ultimate carcinogen. Data on the absorption and metabolism processes of the injected compound are needed to assess the interpretation of the results.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors express appreciation to Professor G. Biserte for discussions and advice. We thank Professor B.P. Roques (NMR), M. Ricard (MS) and C. Denis (IR) for their help, and Professor John Carnduff for reading of the English text. This work was supported by the DGRST and the INSERM (Cancérogénèse chimique, 78.7.2628 and 77.79.109). One of us (B.B.) is fellow of the Ligue Française contre le Cancer.

REFERENCES

- 1 T. Sugimura, K. Okabe and H. Endo, The metabolism of 4-nitroquinoline-1-oxide. I. Conversion of 4-nitroquinoline-1-oxide to 4-aminoquinoline-1-oxide by rat liver enzymes, *Gann*, 56 (1965) 489.

- 2 B. Bailleul, S. Galiègue and M.H. Loucheux-Lefebvre, Adducts from the reaction of O,O'-diacetyl or acetyl derivatives of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide with purine nucleosides, *Cancer Res.*, 41 (1981) 4559.
- 3 W. Nakahara, F. Fukuoka and S. Sakai, The relation between carcinogenicity and chemical structure of certain quinoline derivatives, *Gann*, 49 (1958) 33.
- 4 K. Mori, M. Kondo, M. Tamura, H. Ichimura and A. Ohta, Induction of sarcoma in mice by a new carcinogen, 4-nitroquinoline, *Gann*, 60 (1969) 663.
- 5 K. Sato, T. Saito and M. Enomoto, Development of sarcomas in mice at site of injection with a new carcinogen, monoacetyl derivative of 4-hydroxyaminoquinoline, *Japan J. Exp. Med.*, 40 (1970) 475.
- 6 S. Galiègue, B. Bailleul and M.H. Loucheux-Lefebvre, Reactivity of the O,O'-diacetyl derivative of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide with DNA. Comparison with in vivo reacted DNA, *Eur. J. Cancer*, 16 (1980) 1283.
- 7 M. Enomoto, E.C. Miller and J.A. Miller, Comparative carcinogenicity of 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide and its diacetyl derivative in mice and rats (35459), *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 136 (1971) 1206.
- 8 M. Enomoto, K. Sato, E.C. Miller and J.A. Miller, Reactivity of the diacetyl derivative of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide with DNA, RNA and other nucleophiles, *Life Sci.*, 17, part II (1968) 1025.
- 9 Y. Kawazoe and M. Araki, Studies on chemical carcinogens. V. O,O'-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide, *Gann*, 58 (1967) 485.
- 10 M. Hamana and K. Funakoshi, Preparation of 2- and 4-substituted quinoline from 1-(2-quinolyl)- and 1-(4-quinolyl)pyridinium salt, *Yaugaku Zasshi*, 84 (1964) 42.
- 11 O. Ogawa, Y. Kawazoe and H. Sawanishi, Studies on chemical carcinogens. XVIII. Acetylation of carcinogenic 4-(N-hydroxy-N-methylamino)-quinoline-1-oxide, *Chem. Pharm. Bull. (Japan)*, 28 (1980) 3029.
- 12 M. Araki, Y. Kawazoe and C. Nagata, Studies on chemical carcinogens. IX. Homolytic degradation of O,O'-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide (1-acetoxy-4-acetyloxyimino-1,4-dihydroquinoline), *Chem. Pharm. Bull. Tokyo*, 17 (1969) 1344.
- 13 Y. Kawazoe, O. Ogawa and G.F. Huang, Structure of carcinogenic 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide derivatives, *Tetrahedron*, 36 (1980) 2933.
- 14 Y. Kawazoe and O. Ogawa, On acetylation of 4-(N-hydro-N-methylamino)-quinoline-1-oxide, *Heterocycles*, 14 (1980) 1093.
- 15 M. Demeunynck, M.F. Lhomme and J. Lhomme, 1-Acetoxy-4-hydroxyimino-1,4-dihydroquinoline, a reactive intermediate derived from the potent carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide, *Tetrahedron Lett.*, 22 (1981) 3189.
- 16 S. Galiègue, G. Lecocq and M.H. Loucheux-Lefebvre, In vitro DNA reaction with a carcinogen: the O,O'-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide. Changes of stability of modified-DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, 609 (1980) 383.

c) Etude des adduits obtenus par action de l'Ac-4HAQO et de ceux obtenus *in vivo* par action du 4HAQO

Les études de réactivité de l'Ac-4HAQO sur les nucléosides (BAILLEUL et al., 1981) et sur l'ADN (GALIEGUE et al., 1983) ont permis de montrer l'existence d'un certain nombre d'adduits sur les bases pures. Nous avons abordé l'étude des adduits formés *in vivo* et *in vitro* sur l'ADN. Les adduits obtenus après hydrolyse enzymatique suivie de chromatographie clhp de l'ADN modifié par action du 4HAQO sur des cellules d'ascites, ont été comparés à ceux obtenus à partir de l'ADN modifié *in vitro* par l'Ac-4HAQO. De plus, grâce aux réactions sur le poly (dA-dT).poly (dA-dT) et le poly (dG-dC).poly (dG-dC), nous avons pu dénombrer les adduits guanine et adénine. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication (article n° 3) :

Adducts from *in vivo* action of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide and from *in vitro* reaction of 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide with DNA and polynucleotides.

Cancer Research, sous presse.

Cet article décrit également nos connaissances actuelles en ce qui concerne la structure des adduits. Ces travaux sont discutés dans le chapitre II.

Bien que le système (tumeur d'ascites) que nous employons comme modèle *in vivo* soit très criticable, il est tout à fait justifié dans notre cas puisque nous pouvons affirmer que la métabolisation du 4HAQO dans ce type de cellules conduit à une modification de l'ADN identique à celle observée avec le modèle *in vitro*.

PUBLICATION n° 3

Adducts from *in vivo* action of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide and from *in vitro* reaction of 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide with DNA and polynucleotides.

Sylvie GALIEGUE-ZOITINA, Bernard BAILLEUL and Marie-H. LOUCHEUX-LEFEBVRE.

*Unité 124 de l'INSERM, Institut de Recherches sur le Cancer de Lille,
Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France.*

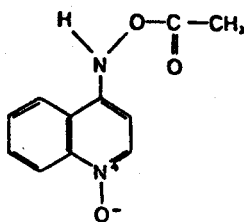
Cancer Research, sous presse.

ABSTRACT

In vivo 2-[³H]-labeled 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide (4-HA[2-³H]QO)-modified DNA and *in vitro* 2-[³H]-labeled 4-acetoxyaminoquinoline-1-oxide (Ac-4 HA[2-³H]QO)-modified DNA were enzymatically hydrolysed and the hydrolysates were analysed by high performance liquid chromatography (HPLC). The two patterns were compared and we showed that all of the HPLC peaks which were recovered from *in vivo*-modified DNA were present in the hydrolysate of *in vitro*-modified DNA. Therefore we used the *in vitro* Ac-4 HA[2-³H]QO-modified DNA to investigate the quinoline-purine adducts which are characteristics of the mode of action of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO). By comparison with the enzymatic hydrolysates of Ac-4 HA[2-³H]QO-modified poly(dA-dT).poly(dA-dT) and poly(dG-dC).poly(dG-dC) three NQO-adducts were enumerated on the modified DNA : one out of them was previously characterized as a C⁸-guanyl adduct. We proved that the two other are a guanine -and an adenine-adduct respectively. A quinoline derivative was identified in the hydrolysates of the *in vivo* and *in vitro* modified DNA's : the 4-aminoquinoline 1-oxide, the origin of which was postulated to be a degradation compound of one (or more) adduct(s). Moreover the presence of two degradation compounds of the C⁸-guanyl adduct was shown, in mild alkaline conditions. We suspected an imidazole ring-opened form.

INTRODUCTION

It is generally thought that the covalent reaction between DNA and ultimate carcinogens may constitute an important event in the carcinogenic process (14). In the case of 4-NQO² (for reviews, see 15, 17) 4-HAQO has been considered as the proximate carcinogen and Ac-4-HAQO was proved to be an attractive model to study *in vitro* the carcinogenesis by this compound (1, 6) :



Concerning the NQO-adducts, Ikegami *et al.* (10) and after them Tada and Tada (19, 20) showed the presence of guanine-adducts and adenine-adducts after enzymatic or chemical degradation of *in vivo* 4-NQO-modified DNA. It is now possible with more sensitive separation and detection techniques (for example, HPLC) to reinvestigate the NQO-adducts in order to do their complete chemical characterization. Indeed, we recently studied the *in vitro* DNA modification (6) ; after enzymatic hydrolysis of the modified DNA we enumerated some different products the structure of

²The abbreviations used are : 4-NQO, 4-nitroquinoline 1-oxide ; 4-HAQO, 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide ; 4-AQO, 4-aminoquinoline 1-oxide ; Ac-4-HAQO, 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide ; diAc-4-HAQO, 0,0'-diacetyl derivative of 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide ; 4-HA[2-³H]QO, [2-³H] labeled 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide ; Ac-4-HA[2-³H]QO, [2-³H] labeled 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide ; HPLC, high performance liquid chromatography ; dGuo-C8-AQO, N-(deoxyguanosin-C⁸-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide ; 4-AQO, 4-aminoquinoline 1-oxide.

one of them being totally elucidated (1). It is a C⁸-guanyl adduct we call dGuo-C8-AQO. It accounts for about 30 % of the total modification of the native DNA (7).

This paper at first is devoted to the comparison between the HPLC profiles of enzymatic hydrolysates of the *in vivo* and *in vitro* modified DNA's. Two modified DNA's were considered : the *in vivo* 4-HA[2-³H]QO-modified DNA from ascite cells (H.Z. line) and the *in vitro* Ac-4-HA[2-³H]QO-modified DNA. All the peaks obtained from the *in vivo* modified DNA were recovered from the *in vitro* modified DNA. The second part of this paper gives some informations on the main HPLC compounds using a comparison between the enzymatic hydrolysates of three samples modified *in vitro* by Ac-4-HA[2-³H]QO : native DNA, poly(dA-dT), poly(dA-dT) and poly(dG-dC). poly(dG-dC). The dGuo-C8-AQO we characterized previously (1) was recovered and we observed its degradation towards two products in mild alkaline conditions. The existence of another guanine-adduct -we called dGuo-2-AQO- and of an adenine-adduct was established. Finally, another compound was characterized as a quinoline derivative, the 4-aminoquinoline 1-oxide, 4-AQO, which probably arised from the degradation of one (or more) adduct(s).

MATERIALS AND METHODS

CHEMICALS

4-N[2-³H]QO was obtained from Amersham (specific activity, 941 mCi/mmol). 4-HA[2-³H]QO was prepared as previously described (4) and exhibited a specific activity of 18.43 mCi/mmol. Ac-4-HA[2-³H]QO was prepared from O,O'-diacetyl derivative of 4-HA[2-³H]QO (5, 1). 4-aminoquinoline 1-oxide (4-AQO) was synthesized (as a reference standard compound) as previously described (16) by catalytic hydrogenation of 4-NQO with palladium-charcoal in alcohol. The compound exhibited the same characteristics (melting point, UV spectrum) as described in the literature by Sugimura *et al.* (18) and Hoshino *et al.* (9). dGuo-C8[2-³H]AQO was prepared as previously described (1) by reaction between deoxyguanosine and Ac-4-HA[2-³H]QO.

Native DNA was obtained from chicken erythrocytes. It had the following characteristics : $S_{20,w}^{\circ}$, 22S ; hyperchromicity at 260 nm, 41 %. The polynucleotides poly(dG-dC), poly(dG-dC) and poly(dA-dT).poly(dA-dT) were purchased from P.L. Biochemicals : all the enzymes (bovine pancreatic DNase I, snake venom phosphodiesterase, calf spleen phosphodiesterase, alkaline phosphatase of calf intestine) were purchased from Boehringer-Mannheim (FRG).

PREPARATION OF *IN VITRO* AC-4-HA[2-³H]QO-MODIFIED DNA AND POLYNUCLEOTIDES

Native DNA and polynucleotides were modified by the ultimate carcinogen Ac-4-HA[2-³H]QO in the following manner :

the reactions were performed in a 2mM sodium citrate buffer, at pH 7 ; approximately 1 mg of polymer (concentration = 0.5 mg/ml) was incubated at 37°, for 0.25 hr, under a nitrogen atmosphere, in the dark and in the presence of the equivalent amount of Ac-4-HA[2-³H]QO, solubilized in dimethylsulfoxide. The modified DNA was purified by diethyl-ether extractions and extensive ethanol-precipitations (0.1 volume of NaCl 5M and 2 volumes of precooled ethanol were added to each DNA solution. The DNA precipitated after shaking). The amount of bound quinoline ring was calculated as previously described (6) : it was 2.5 %, 3.3 % and 2 % of modified bases for the modified DNA, poly(dG-dC).poly(dG-dC) and poly(dA-dT).poly(dA-dT), respectively.

PREPARATION OF *IN VIVO* 4-HA[2-³H]QO-MODIFIED DNA

The *in vivo* modified DNA was prepared as follows : approximately 10⁶ ascite tumor cells (H.Z. line) were injected i.p. into 3-month-old male Wistar rats of about 300 g. Seven days after transplantation, acidic 0.9 % NaCl solution of 0.034 M 4-HA[2-³H]QO in HCl was injected i.p. (0.5 ml/rat). The rats were killed by decapitation 1 or 2 hr later. The ascitic fluid was drained and the cells were harvested by centrifugation (5 min at 1500 rev/min). Cells were washed in a 0.25 M/0.88 M sucrose gradient containing 10 % PBS in order to remove contaminating red blood cells. Then DNA was extracted using the Marmur's method (13). We obtained a modified DNA sample with 0.04 % of modified

base pairs (2 molecules of carcinogen for 10.000 nucleotides).

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF THE MODIFIED DNA TO NUCLEOSIDES AND CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF THE HYDROLYSATE

In vitro Ac-4-HA[2-³H]QO- and *in vivo* 4-HA[2-³H]QO- modified DNA's were hydrolyzed in the following conditions :
1 mg of modified DNA was solubilized (concentration : 2 mg/ml) in a buffer Tris-HCl 5mM, MgCl₂ 2mM, CaCl₂ 2mM, pH 7.4 and incubated at 37° for 2 hr with 45 µg of DNase I ; then 45 µg of each phosphodiesterase were added for an additional incubation of 17 hr at 37°. The pH was adjusted to 8.0, 35 µg of alkaline phosphatase were added and the dephosphorylation of the hydrolysis products was performed during 7 hr. Thus, the total incubation time was 26 hr.

Chromatography on Biogel P₂ (minus 400 mesh) was performed using a column (0.6 x 60 cm) equilibrated with 2mM sodium citrate buffer (pH 7). The flow rate was 4 ml/hr. Fractions of 1 ml were collected and the radioactivity measured. Each P₂ titrated fraction was collected, concentrated and its analysis was carried out by HPLC. A C18 µBondapak column was used, with a methanol/water linear gradient (during 20 min) from water to 95 % methanol/water. The flow rate was 2 ml/min. Conditions in which the water was acidified with H₃PO₄ (pH 2.8) were also used.

INSTRUMENTATION

HPLC separations were carried out on a Waters system consisting in a U6K injector, two 6 000 A pumps, a Model

660 solvent programmer and a Model 440 dual-wavelength detector (254 and 365 nm). Radioactivity of the peaks was determined using a Beckman LS 2800 scintillator counter.

RESULTS

I - COMPARATIVE CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF THE ENZYMIC HYDROLYSATES OF *IN VIVO* 4-HA[2-³H]QO- AND *IN VITRO* AC-4-HA[2-³H]QO-MODIFIED DNA'S

The samples of *in vivo* 4-HA[2-³H]QO-modified DNA and *in vitro* Ac-4-HA[2-³H]QO-modified native DNA were incubated with the enzymes, at 37°, for 26 hr. The hydrolysates were analysed on a Biogel P₂ minus 400 mesh column. The UV detection at 254 nm (not shown) exhibited four peaks corresponding to the four deoxyribonucleosides as expected after the hydrolysis. The chromatographic radioactive patterns are shown in Chart 1. In both cases similar profiles were obtained. There were five distinct tritiated fractions we called A, B, C, D and E. They were corresponding to the same elution volumes for *in vivo* and *in vitro* modified DNA. Moreover, the percentage of each fraction was almost the same in both cases. The compound corresponding to the peak E was previously proved by HPLC to be the dGuo-C8-AQO (5).

For *in vitro* and *in vivo* modified DNA's each other P₂ fraction was collected, concentrated and submitted to HPLC analysis. We used an absorbance detection at two wavelengths : 254 nm, characteristic wavelength of both nucleosides and quinoline ring and 365 nm, characteristic wavelength of the quinoline moiety. Moreover the quinoline was also detected by tritiated radio-activity measurements of 500 µl aliquots.

The fractions B and C which were the quantitatively less important were firstly studied. The study of the P₂ fraction B was difficult because its UV characterization at 254 nm was completely hindered by the three deoxyribonucleosides (dA, dT and dC) which were present in this fraction. Some tentative separations of the unlabeled nucleosides on a Sephadex LH-20 column were hopeless. However we observed that the two HPLC radioactive profiles (not shown) exhibited two peaks which were recovered whatever the origin *-in vivo* or *in vitro*- of the modification of DNA. The P₂ fraction C of the *in vivo* and *in vitro* modified DNA's contained only one compound which was the same in both cases (HPLC profiles not shown). Its percentage was very weak : about 6 % and 8 % of the total radioactivity of *in vivo* and *in vitro* modified DNA respectively.

The Chart 2 shows the HPLC tritiated profiles of the quantitatively more important P₂ fractions A and D for *in vivo* (parts a and c) and *in vitro* (parts b and d) modified DNA's. In the case of the P₂ fraction A, two identical compounds were recovered from the *in vivo* and *in vitro* modified DNA's, we called A₁ and A₂. Another peak, A₃, was only detected in the hydrolysate of the *in vitro* modified DNA. The P₂ fraction D was composed in both cases of four major compounds called D₁, D₂, D₃ and D₄ which were well individualised on the UV profiles at 365 and 254 nm. On the tritiated profile, the two peaks corresponding to D₃ and D₄ were not so well separated, due to the very similar retention

time of the three compounds D_2 , D_3 and D_4 . We also detected in this fraction two minor radioactive peaks with retention time at about 15 min. So we can claim that all the HPLC radioactive peaks obtained from the hydrolysates of the *in vivo* modified DNA were also recovered from the *in vitro* modified DNA, with the same chromatographic characteristics (identical retention times on Biogel P_2 and HPLC ; identical ratios Δ of the absorbances at 254 and 365 nm in neutral and acidic conditions in HPLC). We will now focus our attention on the HPLC profiles obtained from the *in vitro* modified DNA and we will consider the more quantitatively important P_2 fractions, that is A and D. In the case of fraction D, the corresponding sub-fractions will be studied by comparison with the HPLC profiles obtained with modified polynucleotides.

II - HPLC ANALYSIS OF THE HYDROLYSATES OF DNA AND POLYNUCLEOTIDES MODIFIED *IN VITRO* BY AC-4-HA[2- 3 H]QO. (A AND D P_2 FRACTIONS).

The two compounds A_1 and A_2 (see Chart 2) (which are accounting for about 15 % of the total radioactivity of DNA) were identified as two degradation products of the dGuo-C8-AQO. Indeed, when incubated at 37° during 48 hr in the conditions of the enzymatic hydrolysis the dGuo-C8-A[2- 3 H]QO gave a P_2 chromatographic tritiated pattern which exhibited two major peaks : the non-hydrolyzed dGuo-C8-AQO and a A fraction which contained A_1 and A_2 . HPLC analysis showed that whatever the conditions in which the HPLC profiles were recorded (neutral and acidic media) the two hydrolysis

compounds were recovered at the same retention times than A_1 and A_2 when obtained from the DNA hydrolysate.

Three samples, native DNA, poly(dA-dT).poly(dA-dT), poly(dG-dC).poly(dG-dC) were modified *in vitro* with Ac-4-HA[2-³H]QO, enzymatically hydrolysed and submitted to the chromatographic analysis. The HPLC profiles (absorbance at 365 nm : detection of the quinoline moiety) of the three P_2 fractions D are shown in Chart 3. The part a, which is corresponding to the modified DNA, exhibits four peaks as mentioned previously, D_1 , D_2 , D_3 , D_4 and another compound (D_5). By using the Dische's method (3) we showed that the two compounds D_1 and D_3 which contained the quinoline moiety also contained a deoxyribosyl residue, indicating that they are adducts. The D_5 component arised from the degradation of the adduct D_1 ; indeed the stability of this isolated adduct was checked by HPLC and allowed to follow the appearance of this product with a retention time of about 15 min. D_2 was identified as a quinoline compound, the 4-aminoquinoline 1-oxide (4-AQO). Indeed, D_2 comigrated with the reference standard ($R_t = 10.5$ min) with an identical ratio Δ , which is 1.5 and 8.8 in near neutral and acidic media, respectively. The possible origin of 4-AQO in the DNA hydrolysates will be discussed below. We can only observe here that it was not recovered from modified poly(dA-dT).poly(dA-dT). Any information was obtained about the D_4 compound ($R_t = 11.8$ min ; $\Delta = 2.3$). The observation of the HPLC profile of the modified

poly(dG-dC).poly(dG-dC) (see Chart 3b) indicated that the compounds D₁, D₂, D₄ and D₅ were recovered from this modified polymer. Their retention times and their ratios Δ were identical to those of the equivalent compounds obtained from the DNA hydrolysate. Chart 3c indicated that the P₂ fraction D obtained after hydrolysis of the modified poly(dA-dT).poly(dA)dT) contained only one component which was the D₃ compound we recovered from the modified DNA. Indeed, the retention time and Δ values were exactly the same and the two isolated D₃ compounds (either from modified poly(dA-dT).poly(dA-dT) or from modified DNA) comigrated in HPLC.

As we previously mentioned, D₁ and D₃ are quinoline-adducts. We previously checked the reactivity of the four deoxyribonucleosides with Ac-4HAQO and we showed that any reaction was obtained with deoxycytidine and deoxythymidine when positive reaction was obtained with deoxyguanosine and deoxyadenosine (1). Moreover in their previous works about the NQO-adducts, Ikegami *et al.* (10) and Tada and Tada (19, 20) indicated that 4-NQO reacted preferentially with guanine and adenine in nucleic acids *in vivo*. So, we can claim that D₁ is a guanyl adduct, we call dGuo-2-AQO and that D₃ is an adenyl adduct we call dAdo-AQO.

DISCUSSION

In this study an important observation was done : the main NQO-adducts (the dGuo-C8-AQO, the dGuo-2-AQO and the dAdo-AQO) which are formed on *in vivo* 4-HAQO-modified DNA are recovered from the *in vitro* Ac-4-HAQO-modified DNA. The *in vivo* system we used (ascite cells) is open to criticism. Nevertheless, in terms of metabolisation of 4NQO, the fact that the same three main adducts were recovered from this *in vivo* system and from the *in vitro* material is strengthening the choice of Ac-4-HAQO as a ultimate carcinogen model in our studies of chemical carcinogenesis by 4-NQO.

Another important feature is the identification of the two hydrolysis products arising from the decomposition of the dGuo-C8-AQO during enzymatic hydrolysis. With regard to the total radioactivity of the modified DNA, these two compounds were recovered as about 16 % (*in vitro*) and 20 % (*in vivo*). This finding explains the fact that the percentage of dGuo-C8-AQO (13 %) was under-evaluated when determined from an enzymatic hydrolysis, as compared to the determination we recently made from a spectrophotometric titration of the C⁸-guanyl adduct on a non-hydrolysed modified DNA (6). Using this spectrophotometric determination we found that a modified native DNA and a modified single-stranded DNA contained respectively 30 % and 70 % of dGuo-C8-AQO. Taking in account the degradation of this adduct in its titration after enzymatic hydrolysis,

we obtain the same values of 30 % and 70 %. The nature of the hydrolysis products of dGuo-C8-AQO may be discussed at the light of the results previously obtained by Kriek and Westra (12) with the C⁸-guanyl adduct of amino-fluorene (AF). They observed its hydrolysis through the guanine 7-8 bound at basic pH, in the presence of cationic ions such as Mg⁺⁺ and Mn⁺⁺. The presence of alkaline phosphatase in the medium increased the hydrolysis. Due to the chemical similarity between the C⁸-guanyl adducts of 4-NQO and AF, an identical reaction may be hypothesized with dGuo-C8-AQO during its hydrolysis since it is performed in the same conditions (basic pH, Mg⁺⁺ and alkaline phosphatase). Studies were carried out very recently in our laboratory about this problem, and effectively we identified an imidazole ring-opened form we called : r.o. dGuo-C8-AQO (2).

Let us now discuss about the origin of 4-AQO in the DNA hydrolysates. The presence of a quinoline derivative could be explained by different hypothesis. First it may be possible that before hydrolysis physical interaction between some material and DNA occurs (intercalated, in grooves etc...) because of incomplete purification of DNA. We tested this hypothesis by making a phenol extraction of the *in vitro* Ac-4-HAQO modified DNA after the extensive ethanol precipitations (see MATERIALS AND METHODS). No release of 4-AQO was observed in the phenolic fraction. This result excluded the hypothesis of an incomplete

purification of DNA but was reminiscent of a decomposition of the guanine adducts during and after the enzymatic hydrolysis with breaking of the quinoline-base bond. In their investigations on the NQO-adducts Tada and Tada (19, 20) showed that there were three guanine adducts, one of them being very quickly decomposed during the chemical hydrolysis of their modified DNA, leading to a release of 4-AQO. Though our hydrolysis conditions were milder than these ones of Tada and Tada, it is possible that this phenomenon occurred. It is also possible that more than one guanine adduct were decomposed to release 4-AQO, during and after the enzymatic hydrolysis. For example, we think that after the enzymatic hydrolyses and during the chromatographic P_2 separation, some interactions with the Biogel P_2 could lead to the emergence of degradation compounds (4-AQO and others) which were then recovered in the different P_2 fractions. We rapidly tested this hypothesis by making a direct HPLC analysis of the total enzymatic hydrolysate of an *in vitro* Ac-4-HAQO modified DNA. The 4-aminoquinoline 1-oxide was still detected but in a smaller amount, indicating a possible bad effect of the P_2 column chromatography.

By comparison between the amounts of the three adducts (evaluated by the intensities of the three HPLC peaks at 365 nm) we observed that the dGuo-2-AQO seemed to be the major adduct formed on the Ac-4-HAQO-modified DNA. The same direct HPLC analysis of an *in vitro* modified poly(dG-dC).

poly(dG-dC) indicated the presence on this polymer of the two main guanine-adducts : the dGuo-C8-4AQO and the dGuo-2-AQO.

In conclusion we pointed out that Ac-4-HAQO is a very adequate model to study the *in vitro* carcinogenesis by 4-NQO. The decomposition of different adducts was elucidated [the C⁸-guanyl adduct led to r.o. dGuo-C8-AQO ; one (or more) guanine adduct(s) led to 4-AQO]. Moreover we established the existence of a second guanine adduct, dGuo-2-AQO, which seemed to be a major one for *in vitro* modified DNA. The yield of the dGuo-2-AQO formation is secondary structure DNA dependent, like the dGuo-C8-AQO (7) but at the opposite a greater extent of this guanine-adduct was observed on the native DNA (6). In other words, the double helix facilitates its formation. The identification of the structure of the dGuo-2-AQO was just achieved in our laboratory and all the data we obtained about this adduct strongly support its characterization as 3-(deoxyguanosin-N²-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide : dGuo-N2-AQO (8). We also investigated the structure of the dAdo-AQO. We showed that it is the same compound than the adenine adduct QA II previously isolated by Kawazoe *et al.* (11) but while these authors proposed either the N¹ or the N⁶ of adenine our data strongly support the structure of dAdo-AQO as the 3-(deoxyadenosin-N⁶-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide : dAdo-N6-AQO (8). Chart 4 illustrates our actual knowledge about the DNA-NQO adducts.

REFERENCES

1. Bailleul, B., Galiègue, S. and Loucheux-Lefebvre, M.H. Adducts from the reaction of O,O'-diacetyl or O-acetyl derivatives of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide with purine nucleosides. *Cancer Res.*, 41: 4559-4565, 1981.
2. Bailleul, B., Galiègue-Zouitina, S., Perly, B. and Loucheux-Lefebvre, M.H. Structural identification of the purine ring-opened form of N-(deoxyguanosin-C⁸-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide, submitted.
3. Dische, Z. and Borenfreund, E. A new spectrophotometric method for the detection and determination of keto sugars and trioses. *J. Biol. Chem.*, 192: 583-587, 1951.
4. Enomoto, M., Sato, K., Miller, E.C. and Miller, J.A. Reactivity of the diacetyl derivative of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide with DNA, RNA and other nucleophiles. *Life Sci.*, 17 (Part 2): 1025-1032, 1968.
5. Galiègue, S., Lecocq, G. and Loucheux-Lefebvre, M.H. *In vitro* DNA reaction with a carcinogen : the O,O'-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide. Changes of stability of modified DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 609: 383-391, 1980.
6. Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B. and Loucheux-Lefebvre, M.H. *In vitro* DNA reaction with a ultimate carcinogen model of 4-nitroquinoline-1-oxide : the 4-acetoxyaminoquinoline-1-oxide. Enzymatic degradation of the modified DNA. *Carcinogenesis*, 4: 249-254, 1983.
7. Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B. and Loucheux-Lefebvre, M.H. Guanyl-C⁸-arylation of DNA by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline-1-oxide : a spectrophotometric titration. *Analyt. Biochem.*, 138: 454-457, 1984.

8. Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B., Perly, B., Ginot, Y.M., Vigny, P. and Loucheux-Lefebvre, M.H. N²-guanyl and N⁶-adenyl aminarylation of DNA by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide. (to be submitted)
9. Hoshino, H., Fukuoka, F., Okabe, K. and Sugimura, T. The metabolism of 4-nitroquinoline-1-oxide. II - *In vivo* conversion of subcutaneously injected 4-nitroquinoline 1-oxide to 4-aminoquinoline-1-oxide and 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide in Rats. *Gann*, 57: 71-74, 1966.
10. Ikegami, S., Nemoto, N., Sato, S. and Sugimura, T. Binding of ¹⁴C-labeled 4-nitroquinoline 1-oxide to DNA *in vivo*. *Chem. Biol. Interactions*, 1: 321-330, 1969-1970.
11. Kawazoe, Y., Araki, M., Huang, G.F., Okamoto, T., Tada, Mit. and Tada, Mar. Chemical structure of QA II, one of the covalently bound adducts of carcinogenic 4-nitroquinoline 1-oxide with nucleic acid bases of cellular nucleic acids. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 23: 3041-3043, 1975.
12. Kriek, E. and Westra, J.G. Structural identification of the pyrimidine derivatives formed from N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-aminofluorene in aqueous solution and alkaline pH. *Carcinogenesis*, 1: 459-468, 1980.
13. Marmur, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.*, 3: 208-210, 1961.
14. Miller, E.C. Some current perspectives on chemical carcinogens in humans and experimental animals : presidential address. *Cancer Res.*, 38: 1479-1496, 1976.
15. Nagao, M. and Sugimura, T. Molecular biology of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Adv. Cancer Res.*, 23: 132-169, 1976.

16. Ochiai, E., Ohta, A. and Nomura, H. Über das 4-hydroxyamino-chinolin-N-oxid. Chem. Pharm. Bull. (Tokyo) 5: 310-312, 1967.
17. Sugimura, T. Carcinogenesis. A Comprehensive Survey : The Nitro-quinolines, Vol. 6, Raven Press, New York, pp. 1-159, 1981.
18. Sugimura, T., Okabe, K. and Endo, H. The metabolism of 4-nitro-quinoline-1-oxide. I - Conversion of 4-nitroquinoline 1-oxide to 4-aminoquinoline 1-oxide by Rat liver and hepatomas. Cancer Res., 26: 1717-1721, 1966.
19. Tada, Mit. and Tada, Mar. Interactions of a carcinogen, 4-nitro-quinoline 1-oxide, with nucleic acids : chemical degradation of the adducts. Chem. Biol. Interactions, 3: 225-229, 1971.
20. Tada, Mit. and Tada, Mar. Main binding sites of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide in nucleic acids. Biochim. Biophys. Acta, 454: 558-566, 1976.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Professor G. Biserte for his constant help during this work and Doctor N. Helbecque for help in the preparation of 4-aminoquinoline 1-oxide. We acknowledge C. Denis for excellent technical assistance.

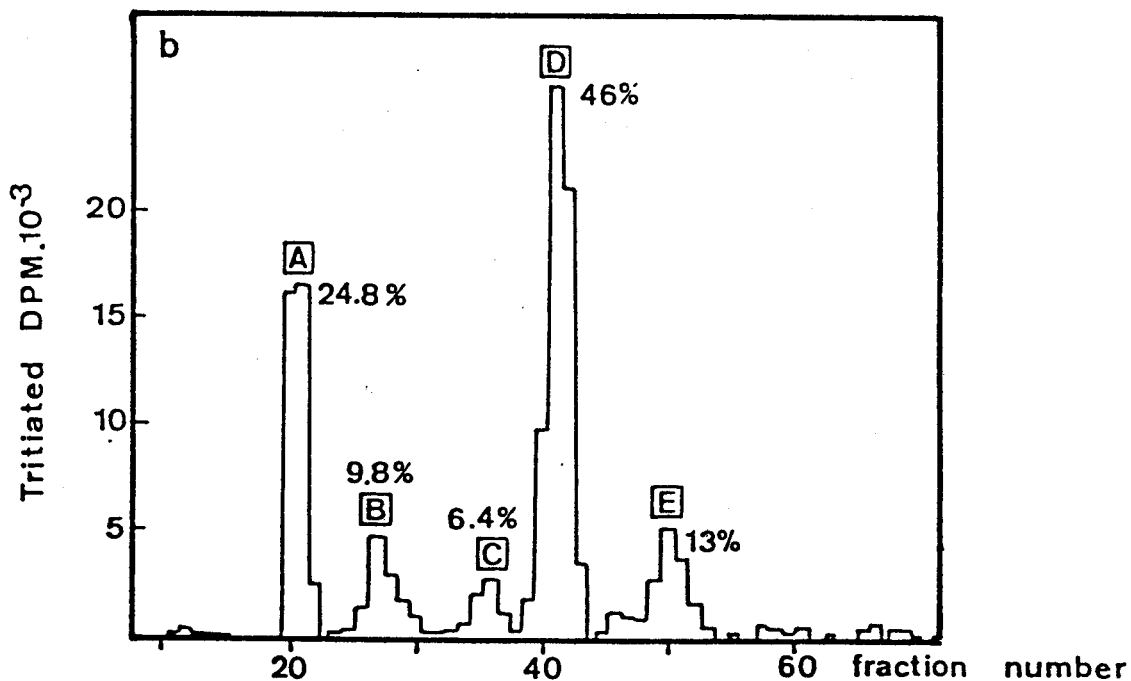
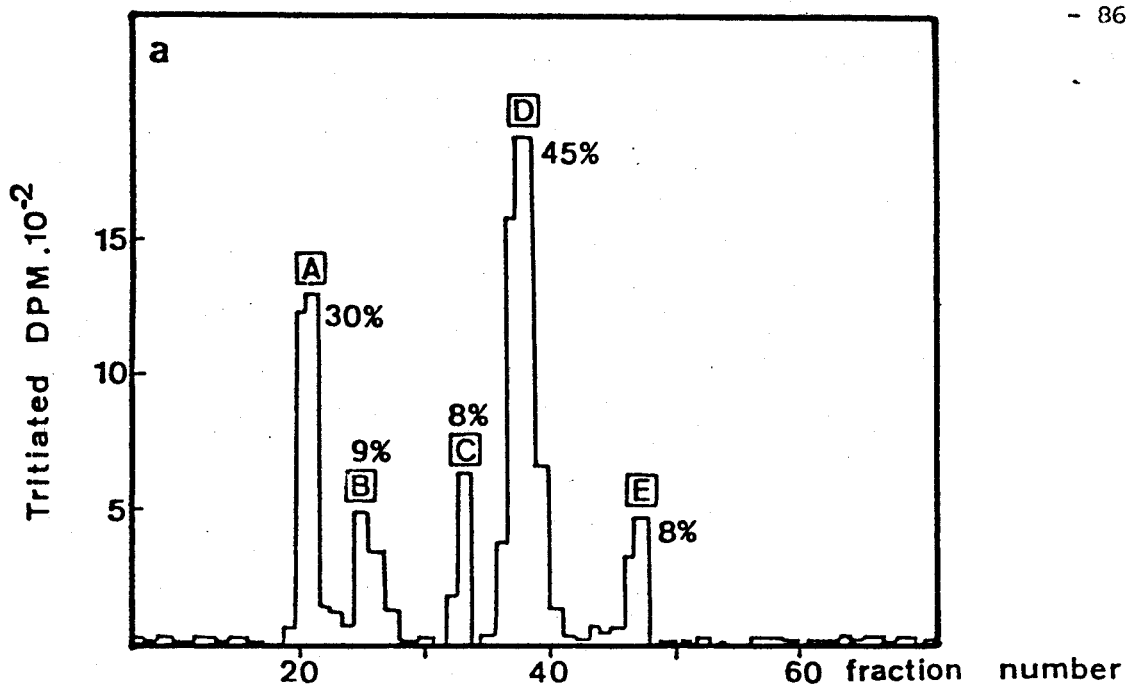


Chart 1. P₂ minus 400 mesh tritiated elution profiles of the DNA hydrolysates, in a 2 mM sodium citrate buffer, pH 7. The flow rate was 4 ml/hr, fractions of 1 ml were collected and the radioactivity was measured. a, *in vivo* 4-HA[2-³H]QO-modified DNA, with 0.02 % of modified bases ; 1 ml of a 60 mM solution was applied to the column. b, *in vitro* Ac-4-HA[2-³H]QO-modified DNA, with 2.5 % of modified bases. 1 ml of a 3 mM solution was applied to the column.

Chart 2. HPLC tritiated elution profiles of the P₂ fractions A and D of the DNA hydrolysates. Chromatographies were carried out with linear gradient (during 20 min) from water to 95 % methanol-water, collection of aliquots of 0.5 ml was made and the radioactivity was measured. Each tritiated peak gave absorbance signals at 254 and 365 nm and was characterized by its ratio Δ of the absorbance at these two wavelengths. a and c, P₂ fractions A and D of *in vivo* 4-HA[2-³H]QO-modified DNA ; b and d, P₂ fractions A and D of *in vitro* Ac-4-HA[2-³H]QO-modified DNA.

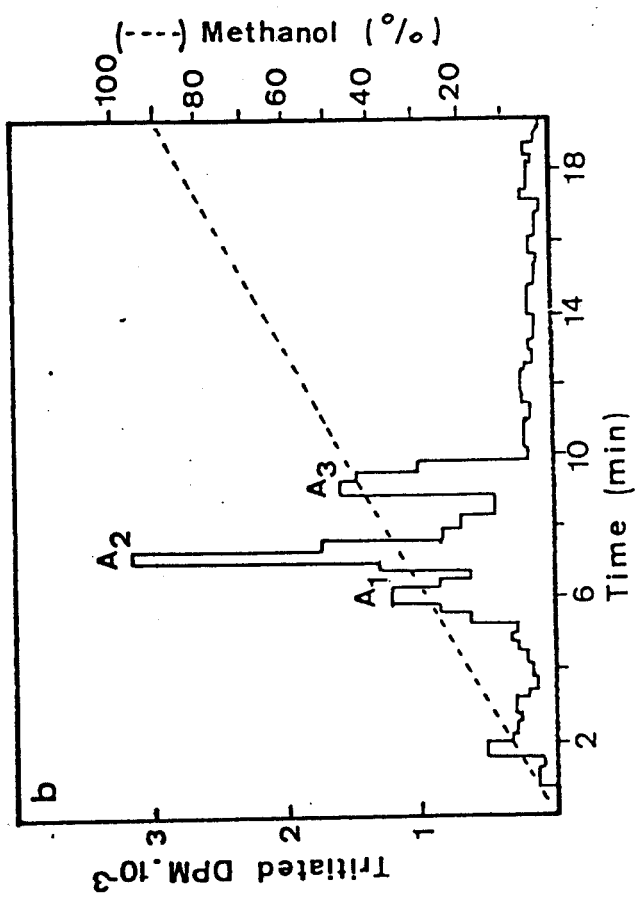
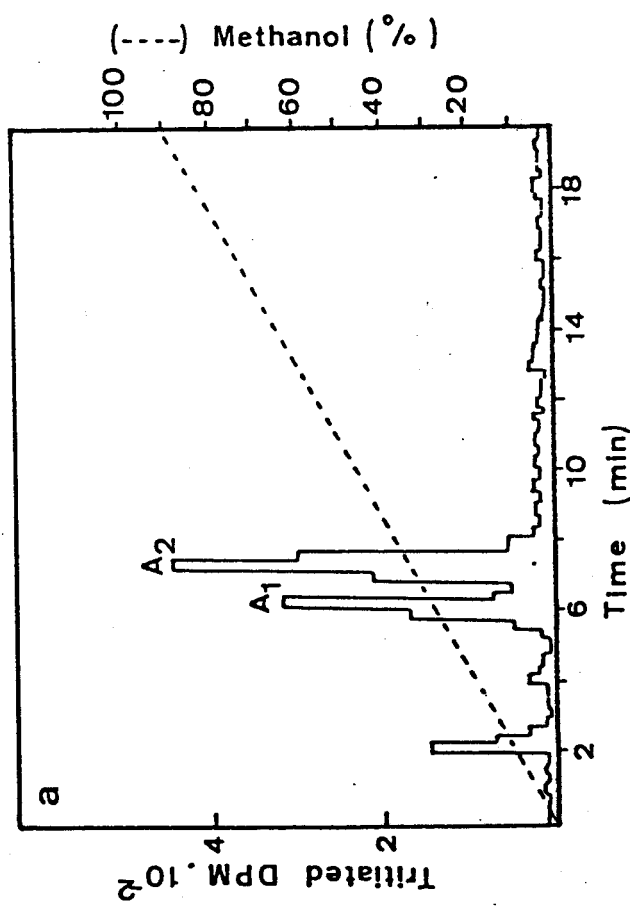
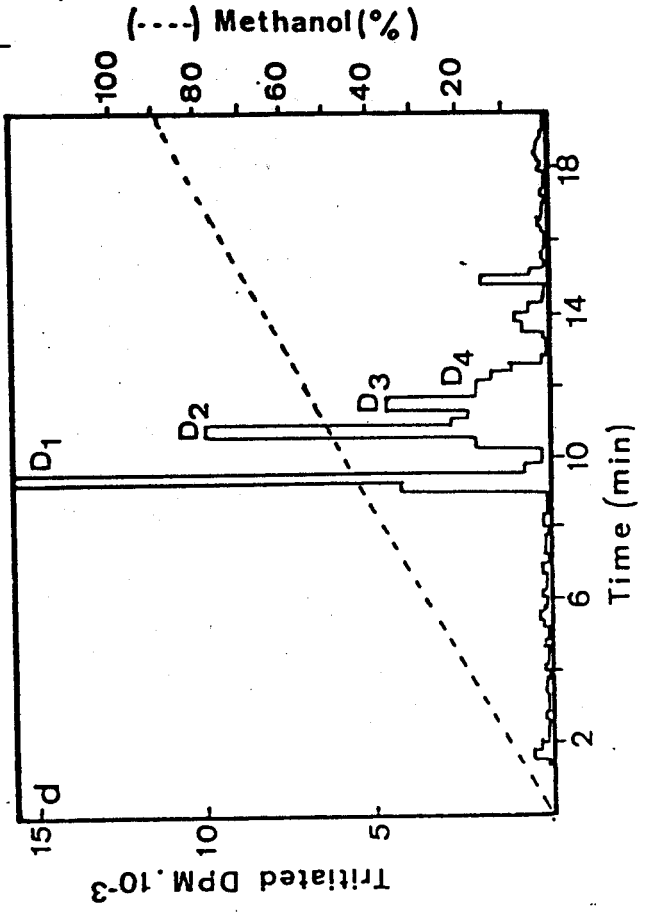
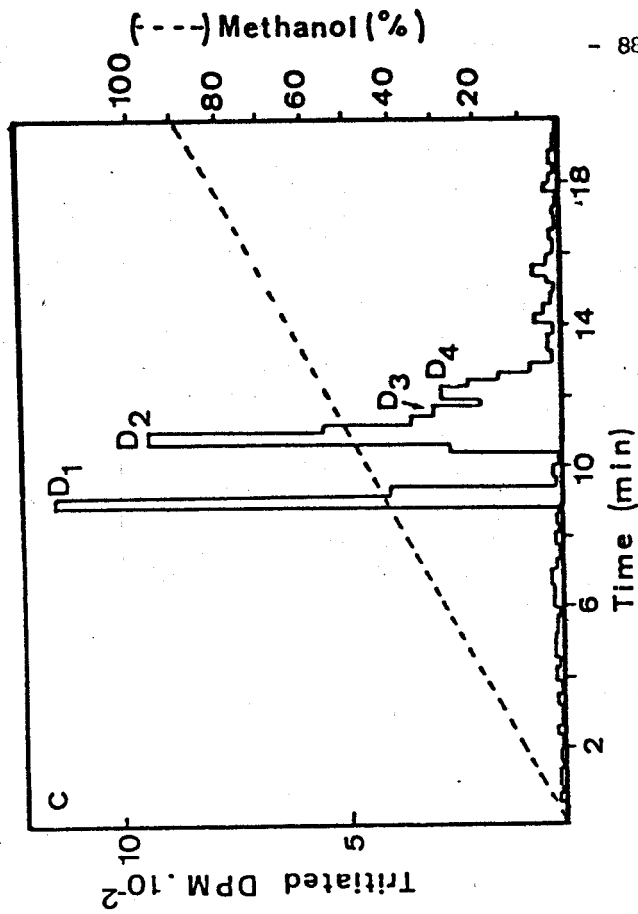
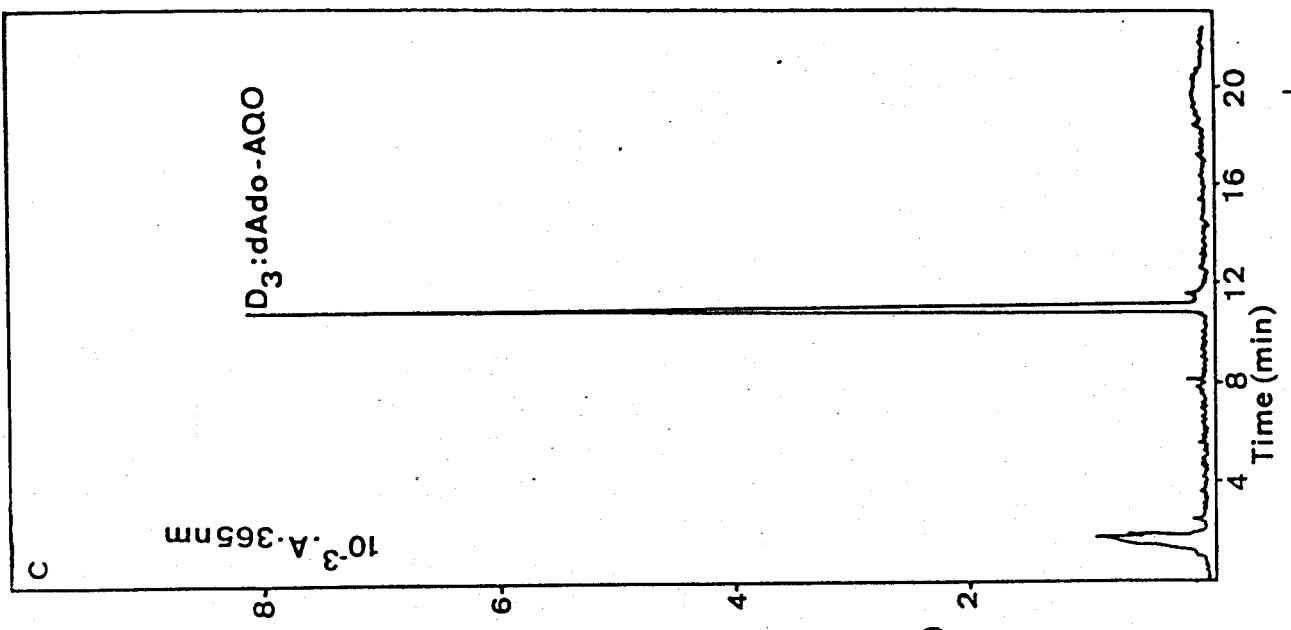
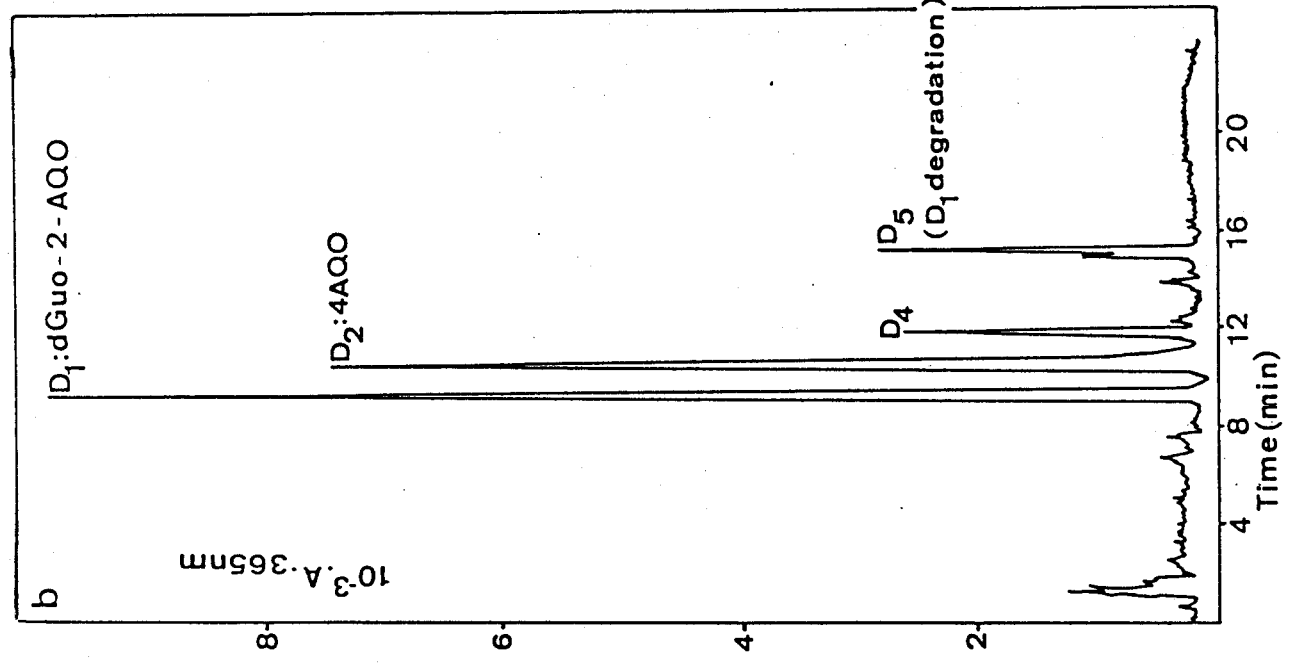
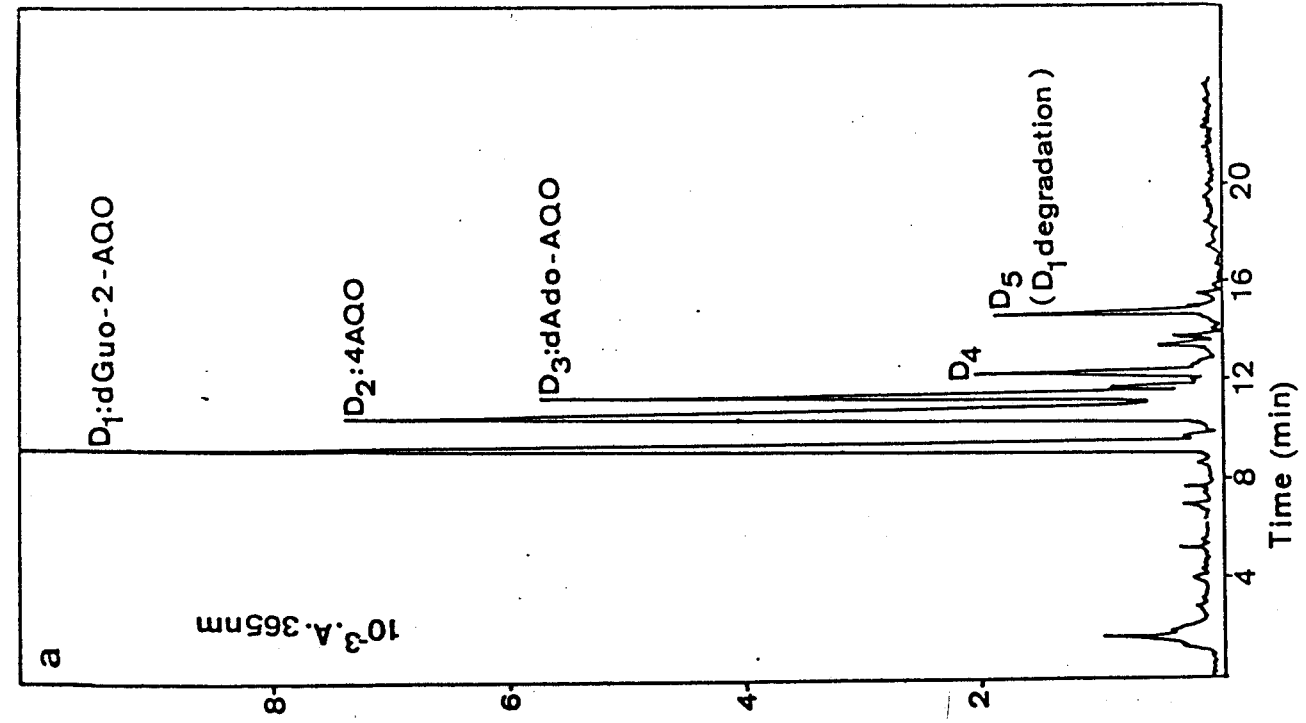


Chart 3. HPLC elution profiles of the P₂ fractions D of hydrolysates of *in vitro* modified-DNA and polynucleotides : absorbance detection at 365 nm. Chromatographies were carried out with linear gradient (during 20 min) from water to 95 % methanol-water. Each peak was characterized by its retention time R_t and its ratio Δ. a, DNA with 2.5 % of modified bases ; b, poly(dG-dC).poly(dG-dC) with 3.3 % of modified bases ; c, poly(dA-dT).poly(dA-dT) with 2 % of modified bases.



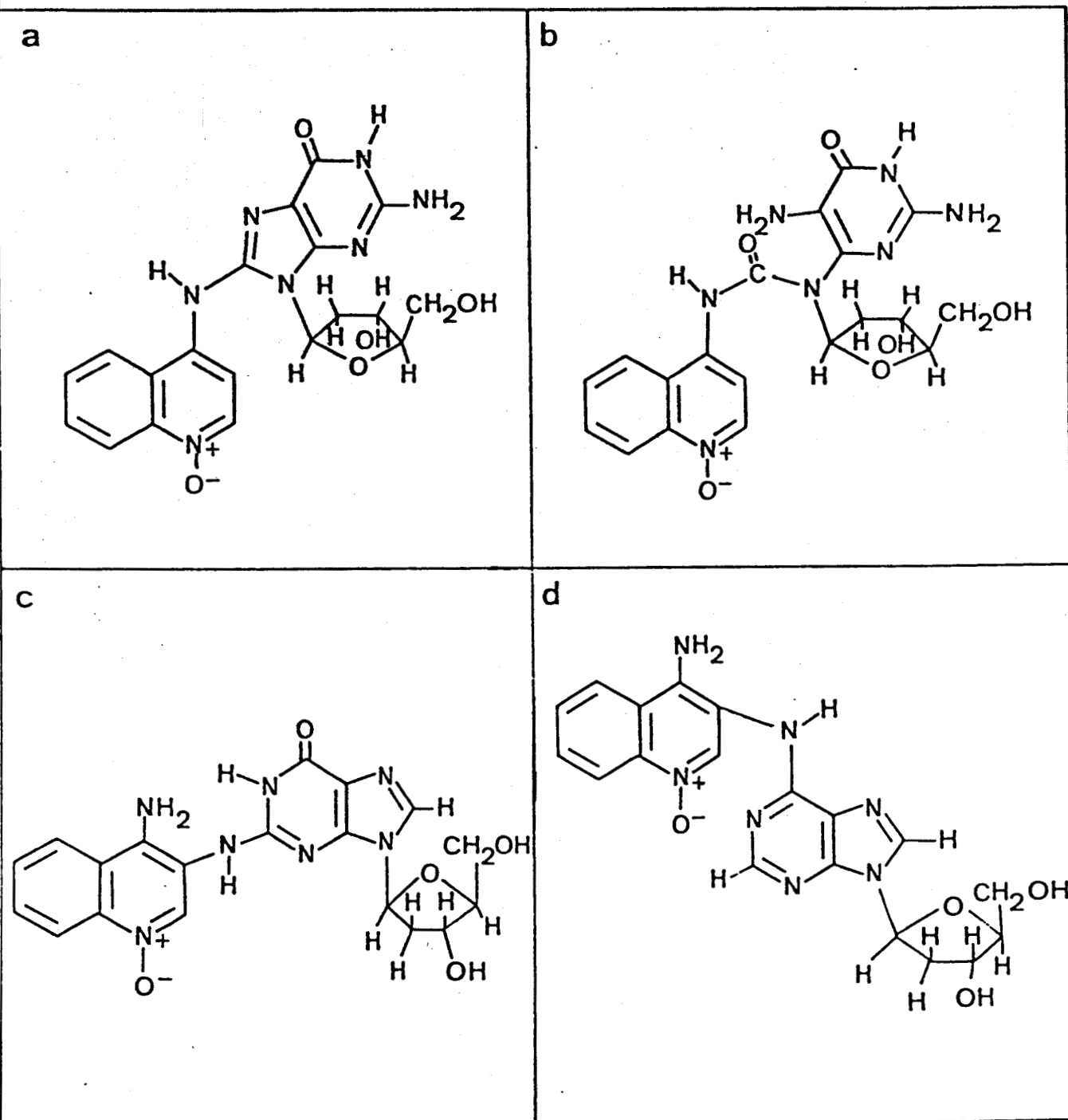


Chart 4. Chemical structures of the main actually known DNA-NQO adducts. a : dGuo-C8-AQO (1), b : r.o. dGuo-C8-AQO (2), c : dGuo-N2-AQO (8), d : dAdo-N6-AQO (8, 11).

d) Conclusion

L'étude des modèles acétylés du 4HAQO a été abordée au laboratoire par des approches différentes. Nos objectifs étaient de prouver que les lésions sur l'ADN produites *in vitro* par l'Ac-4HAQO étaient identiques à celles observables *in vivo* après action du 4NQO ou de son métabolite intermédiaire, le 4HAQO. Cet objectif a été atteint. Nous avons également pu proposer un mécanisme réactionnel, permettant d'expliquer la formation des adduits. Ce mécanisme fait intervenir la fonction acétoxy en position 4 ; la fonction N-oxyde en position 1 joue également un rôle primordial dans la formation de l'agent réactif.

L'identification structurale des composés de substitution des bases par la quinoléine, et les études conformationnelles de l'ADN modifié peuvent donc être entreprises à l'aide du modèle acétylé du 4HAQO.

Le chapitre suivant décrit les travaux qui ont permis de déterminer la structure des principaux adduits formés sur l'ADN.

CHAPITRE II - IDENTIFICATION STRUCTURALE DES COMPOSES DE

SUBSTITUTION DE L'ADN par l'Ac-4HAQO

Nous allons décrire dans ce chapitre les résultats concernant la structure des principaux adduits obtenus sur l'ADN avec l'Ac-4HAQO. Ces structures ont été déterminées principalement à l'aide des techniques de résonance magnétique nucléaire du proton et de la spectrométrie de masse.

a) Les principaux adduits base-quinoléine

1) Le dGuo-C8-AQO

L'étude de la réactivité de l'Ac-4HAQO avec la désoxyguanosine a permis de faire la synthèse de l'adduit dGuo-C8-AQO (dGIII). Nous avons pu déterminer sa structure ; ce composé correspond à la fixation de la quinoléine sur le C8 de la guanine.

Les autres adduits (dGI, dGII, dAI et dAII) décrits lors de l'action de l'Ac-4HAQO sur les nucléosides puriques sont obtenus avec des rendements très faibles (environ 0,5 %) et il n'a pas été possible de poursuivre l'identification de ces adduits.

Ce travail a fait l'objet d'une publication (voir publication n° 1, page 45) :

Adducts from the reaction of O,O'-diacetyl or O-acetyl derivatives of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide with purine nucleosides. Cancer Research, 1981.

Le composé dGuo-C8-AQO est également obtenu sur l'ADN modifié par l'Ac-4HAQO ou le diAc-4HAQO. Cependant, lors de l'hydrolyse enzymatique et en particulier lors de l'action de la phosphatase alcaline (pH 8), ce composé est instable et il s'hydrolyse (GALIEGUE-ZOUITINA et al., 1983). Nous avons abordé la structure de ce composé.

2) Le r.o. dGuo-C8-AQO

L'instabilité du cycle imidazole, en milieu basique, avait été décrite pour un certain nombre d'adduits sur le C8 de la guanine (SPODHEIM-MAURIZOT et al., 1979a; KRIEK et al., 1980 ; KADLUBAR et al., 1980), mais également sur le N7 de cette même base (HERTZOG et al., 1982). Ces composés

semblent avoir une importance dans la cancérogénèse. Deux types de composés d'ouverture du cycle imidazole (r.o.) ont été observés, soit par rupture de la liaison C8-N7, soit par rupture de la liaison C8-N9. Nous avons donc abordé l'étude de la structure du composé obtenu à partir de l'incubation du dGuo-C8-AQO en milieu basique. Ces résultats sont actuellement soumis à la revue Carcinogenesis (voir publication n° 4) :

Structural identification of the purine ring-opened form of N-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide.

3) Le dGuo-N2-AQO

L'hydrolyse enzymatique de l'ADN modifié *in vitro* par l'Ac-4HAQO a montré la présence d'un deuxième adduit formé sur la guanine : dGuo-N2-AQO (publication n° 3). En hydrolysant de grandes quantités d'ADN modifié, nous avons pu préparer une quantité suffisante de cet adduit pour en déterminer la structure. Ce composé correspond à l'attaque du carbénium sur le N² de la guanine.

4) Le dAdo-N⁶-AQO

Cet adduit a été préparé de la même manière que le dGuo-N2-AQO, par hydrolyse de grandes quantités d'ADN modifié. Sa structure correspond à l'attaque du carbénium sur le N⁶ de l'adénine. Ce composé est retrouvé à un faible taux dans l'ADN *in vitro* et *in vivo*; il est le même que celui proposé en 1975 par KAWAZOE et al.

Le travail effectué sur ces deux adduits est actuellement soumis pour publication à la revue Cancer Research (publication n° 5) :

N²-guanyl and N⁶ adenyl arylation of DNA by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide.

PUBLICATION n° 4

Structural identification of the purine ring-opened form of N-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide.

Bernard BAILLEUL^{*}, Sylvie GALIEGUE-ZOITINA^{*}, Bruno PERLY^{**} and Marie-Henriette LOUCHEUX-LEFEBVRE^{*}

* Unité INSERM n° 124, Institut de Recherches sur le Cancer de Lille,
59045 Lille Cédex, France

** Département de Physicochimie, Section de Chimie Moléculaire, C.E.N. de
Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cédex, France.

Abstract

Alkaline pH treatment of N-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide forms two quinoline derivatives. The two compounds were analyzed together by mass and 500 MHz ¹H-n.m.r. spectroscopies and were identified as two 7,8-guanine ring-opened rotamers : 1-(1'-deoxyriboside)-1-[6-(2,5-diamino-4-oxo-pyrimidinyl)]-3-(4-quinolinyl 1-oxide) urea.

Abbreviations : Ac-4-HAQO, 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide ; 4-NQO, 4-nitroquinoline 1-oxide ; h.p.l.c., high performance liquid chromatography ; n.m.r., nuclear magnetic resonance ; r.o. dGuo-C8-AQO, 1-(1'-deoxyriboside)-1-[6-(2,5-diamino-4-oxo-pyrimidinyl)]-3-(4-quinolinyl 1-oxide) urea ; dGuo-C8-AQO, N-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide.

Previous studies in our laboratory showed that the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) binds covalently to DNA in vivo and that the 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide (Ac-4-HAQO) constitutes a good model for the ultimate carcinogen of 4NQO (1,2). The 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide (4-HAQO) was considered as the proximate carcinogen by Shirasu (3). Concerning the NQO adducts, one structure was proposed for an adenine adduct (4) and we previously described a guanine adduct as the N-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide (dGuo-C8-AQO) (5). The latter product was recovered after enzymatic hydrolysis of in vitro Ac-4-HAQO-modified DNA and in vivo 4-HAQO-modified DNA (5). The amount of dGuo-C8-AQO, spectroscopically determined on non hydrolyzed DNA (6) represents 30 % of the total bound carcinogen in the case of in vitro native modified DNA. Its instability interfered with its quantitative determination in DNA (2,7) because decomposition occurs during enzymatic hydrolysis and alkaline phosphatase treatment at pH 8 (2).

The instability of N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-aminofluorene was also described during enzymatic hydrolysis and alkaline phosphatase treatment at pH 9 (8) and in aqueous solution at alkaline pH (9). Kriek and Westra showed that the 2-aminofluorene modified nucleoside was hydrolyzed in alkali, with formation of a 7,8-guanine ring-opened derivative (10). This imidazole ring-opened compound represented ~ 10 % of the C8 guanyl adduct in liver DNA of rats treated with N-hydroxy-2-aminofluorene (11, 12). A pyrimidine derivative was also described with C8-adduct of N-hydroxy-2-naphthylamine. In this case the hydrolysis occurred through the 9,8-guanine bond and in neutral conditions (13).

In this paper, the alkaline hydrolysis study of dGuo-C8-AQO was carried out. The structural identification of the ring-opened guanine compound is presented.

For this study dGuo-C8-AQO and Guo-C8-AQO were prepared as already described (5). Ultra-violet absorption spectra were recorded on a Cary 219 spectrophotometer. H.p.l.c. separations were carried out on a Waters system consisting of a U6K injector, two 6000A pumps, a Model 660 solvent programmer and a Model 440 Dual-wavelength detector (254 and 365 nm). A C18 μ -Bondapak column was used, with a methanol/water linear gradient (during 20 min) from water to 95 % methanol/water. Electron impact mass spectra were recorded with a THOMSON THN 208, double focalisation : sample deposited on a filament with fast heating (0.5 s, 110°C) and introduced in ionization chamber.

¹H n.m.r. spectra were recorded in DMSO-d₆ at 60 ± 1° using a Bruker WM500 spectrometer in the Fourier transform mode. Chemical shifts were given in ppm using the solvent signal (DMSO-d₅ = 2.5 ppm) as a reference. Infrared absorption spectra in KBr discs were recorded with a IR TF 7199 Nicolet spectrometer.

The kinetic UV study of alkaline treatment (pH 12) of dGuo-C8-AQO is shown in Figure 1. The absorption spectrum is time-dependent. At t = 0 it exhibits a maximum at 440 nm the intensity of which decreases with time and parallels the arising of a band located at 365 nm. Two isosbestic points are observed at 395 nm and 320 nm.

This spectral change observed during the ring-opening process was expected. Indeed the spectra at pH 7 and at pH 12 of dGuo-C8-AQO exhibit their maxima at 365 nm and 440 nm respectively. The latter is due to the ionization of the N1-O⁶ guanine bond which induces on the quinoline ring such a delocalization effect by charge transfer, via the imidazole ring (5). In the ring-opened derivative, this cannot be done ; then the spectrum of this compound exhibits maxima at 365 nm, to both pH 7 and 12. The half-life values of dGuo-C8-AQO at different alkaline pH solutions were calculated and are presented in table 1. The optimum pH for the hydrolysis is near pH 10. We think that the higher value of half-life observed in NaOH 0.1M than in pH 10 is due to this charge transfer and in this case the imidazole ring-opening should occur in the unionized form. As described by Kriek and Westra with N-hydroxy-2-aminofluorene (10), the reaction is catalyzed by alkaline phosphatase and Mn²⁺ ions. We obtain a similar result (Table 1). This explains the fact that the percentage of dGuo-C8-AQO was underevaluated when determined from an enzymatically hydrolyzed DNA (2).

The h.p.l.c. chromatographic profile of dGuo-C8-AQO after alkaline treatment shows the presence of two compounds (Fig. 2) which exhibit very similar h.p.l.c. characteristics (retention time, ratio Δ of the optical densities at 254 and 365 nm). The structural identification was done with the two products together ; we called this products ring opened dGuo-C8-AQO (r.o. dGuo-C8-AQO). By similitude we called r.o. Guo-C8-AQO the similar hydrolysis adduct with guanosine.

Because of some difficulties we met with r.o. dGuo-C8-AQO, the mass spectrometry study was carried out with r.o. Guo-C8-AQO. Silylation gave a product with molecular ion at m/e = 963 and 891 which were consistent with a r.o. Guo-C8-AQO with 7 and 6 sites available for silylation respectively.



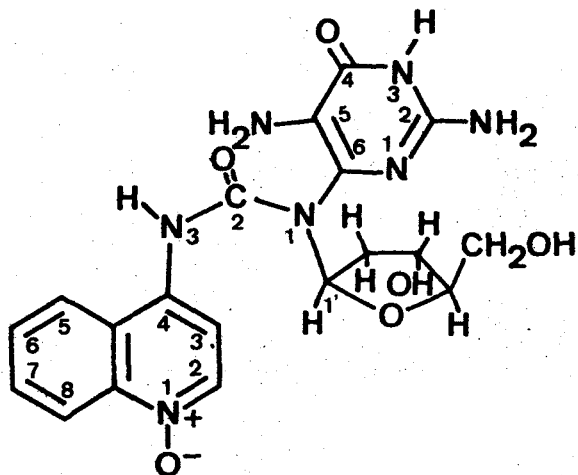
Guo-C8-AQO showed one less sites for silylation and a molecular weight less 18 (5). These data suggested a purine ring-opened derivative obtained by water hydrolysis giving a new potential site of silylation. The i.r. spectra of dGuo-C8-AQO and r.o. dGuo-C8-AQO were compared. The ring opened derivative showed one additionnal band at 1770 cm^{-1} . This wavenumber seems high for a carbonyl band, however any other interpretation cannot be proposed.

The proton n.m.r. spectra of r.o. dGuo-C8-AQO was recorded in DMSO-d_6 and $\text{DMSO-d}_6 + \text{DCl}$ (Fig. 3). The quinoline protons appear as a complex absorption band at $\delta = 7.5-8.5$ in DMSO-d_6 , the assignments of which are easily done in $\text{DMSO-d}_6 + \text{DCl}$.

The assignment as H-1' proton resonance of two distinct quartets around 6.35 and 5.65 ppm was obvious since the coupling constants were calculated to be $J(1'-2') = 5.6 \text{ Hz}$ and $J(1'-2'') = 8.7 \text{ Hz}$ in the two cases (see fig. 3). These results strengthen the hypothesis of the presence of two different forms of r.o. dGuo-C8-AQO (see h.p.l.c.) Kriek and Westra observed also two chemical shifts of H-1' in the two probable stereoisomers of pyrimidine derivative of N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-aminofluorene (10). Recent data indicated that the ring-opened 7-methylguanine exists as isomers with restricted rotation about the amide bond (14). We think that the existence of rotamers about the secondary amide bond may induce by the carbonyl group or quinoline ring an important chemical shift of deoxyribosyl protons in the two r.o. dGuo-C8-AQO forms. The exchangeable protons of the deoxyribose (OH-3' and OH-5') appears also as four resonance bands between 4.3 and 4.8 ppm.

The protons below 7 ppm who disappear after exchange in D_2O were attributed to the NH (7.8 and 8.0 ppm) and NH_2 (7.3 ppm) groups. The NH_2 absorption band corresponds probably to overlapping of both 2- NH_2 and 5- NH_2 of pyrimidine ring. Indeed the n.m.r. spectrum of r.o. dGuo-C8-AQO recorded at lower temperature (25°) showed an upfield shift of the two NH_2 absorption band which appears then clearly as two broad absorption bands (see insert Fig. 3).

Since all of our results were in good agreement with an imidazole ring-opening through the 7,8-guanine bond, the following formula can be proposed for the r.o. dGuo-C8-AQO.



1-(1'-deoxyriboside)-1-[6-(2,5-diamino-4-oxo-pyrimidinyl)]-3-(4-quinolinyl 1-oxide) urea.

The biological importance of this purine ring-opened derivatives of aromatic amines has not yet been studied. Moreover in the case of alkylating agents and aflatoxin B₁, the persistence of these adducts in vivo may play a critical role in the carcinogenesis (14, 15).

Acknowledgements

We thank Professor G. Biserte for his constant help, C. Denis for excellent technical assistance and M. Moison for careful preparation of the manuscript.

REFERENCES

1. Galiègue, S., Bailleul, B. and Loucheux-Lefebvre, M.H. (1980), Reactivity of the O,O'-diacetyl derivative of carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide with DNA, Comparison with in vivo reacted DNA. *Eur. J. Cancer*, 16, 1283-1287.
2. Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B. and Loucheux-Lefebvre, M.H. (1983), In vitro DNA reaction with an ultimate carcinogen model of 4-nitroquinoline 1-oxide : the 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide. Enzymatic degradation of the modified DNA, *Carcinogenesis*, 4, 249-254.
3. Shirasu, Y. (1963), Further studies on carcinogenic action of 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide, *Gann.*, 54, 487-495.
4. Kawazoe, Y., Araki, M., Huang, G.F., Okamoto, T., Tada, Mit. and Tada, Mar. (1975), Chemical structure of QAI, one of the covalently bound adducts of carcinogenic 4-nitroquinoline 1-oxide with nucleic acid bases of cellular nucleic acids, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 23, 3041-3043.
5. Bailleul, B., Galiègue, S. and Loucheux-Lefebvre, M.H. (1981), Adducts from the reaction of O,O'-diacetyl or O-acetyl derivatives of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide with purine nucleosides, *Cancer Res.*, 41, 4559-4565.
6. Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B. and Loucheux-Lefebvre, M.H. (1984), Guanyl-C8-arylation of DNA by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide : a spectrophotometric titration, *Anal. Biochem.*, 138, 454-457.
7. Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B. and Loucheux-Lefebvre, M.H. (1984), Adducts from in vivo action of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide and from in vitro reaction of 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide with DNA and polynucleotide, *Cancer Res.* (accepted for publication).
8. Kriek, E. and Westra, J.G. (1981), Formation of N-2-fluorenylhydroxylamine adducts of DNA in vivo and in vitro and some of their properties, *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 58, 139-142.
9. Spodheim-Maurizot, M., Dreux, M., Saint-Ruf, G. and Leng, M. (1979), Alkaline stability of guanosine and some of its derivatives modified by the carcinogen N-acetoxy-acetylaminofluorene, *Nucleic Acids Res.*, 7, 2347-2356.
10. Kriek, E. and Westra, J.G. (1980), Structural identification of the pyrimidine derivatives formed from N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-aminofluorene in aqueous solution at alkaline pH, *Carcinogenesis*, 1, 459-468.

11. Rio, P., Bazgar, S. and Leng, M. (1982), Detection of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene-DNA adduct in rat liver measured by radioimmunoassay. *Carcinogenesis*, 3, 225-227.
12. Visser, A. and Westra, J.G. (1981), Partial persistency of 2-aminofluorene and N-acetyl-2-aminofluorene in rat liver DNA, *Carcinogenesis*, 2, 737-740.
13. Kadlubar, F.F., Unruh, L.E., Beland, F.A., Straub, K.M. and Evans, F.E. (1980), In vitro reaction of the carcinogen, N-hydroxy-2-naphthylamine with DNA at the C8 and N² atoms of guanine and at N⁶ atom of adenine, *Carcinogenesis*, 1, 139-150.
14. Kadlubar, F.F., Beranek, D.T., Weis, C.C., Evans, F.E., Cox, R. and Irving, C.C. (1984), Characterization of the purine ring-opened 7-methylguanine and its persistence in rat bladder epithelial DNA after treatment with the carcinogen N-methylnitrourea, *Carcinogenesis*, 5, 587-592.
15. Lin, J.K., Miller, J.A. and Miller, E.C. (1977), 2,3-dihydro-2-(guan-7-yl)-3-hydroxy-aflatoxin B₁, a major acid hydrolysis product of aflatoxine B₁-DNA or ribosomal RNA adducts formed in hepatic microsomal-mediated reactions and rat liver in vivo, *Cancer Res.*, 37, 4430-4438.

Reaction conditions	pH	$T_{\frac{1}{2}}$ (h)
0.05 M sodium bicarbonate	8.8	1.5
+ 0.16 mM Mn ²⁺ maleate complex	8.8	0.9
0.05 M sodium bicarbonate	9.4	0.8
+ alkaline phosphatase	9.4	0.6
0.05 M sodium bicarbonate	10.5	0.6
0.1 M sodium hydroxide	12.5	2.7

Table 1 : Half-life values of the alkaline hydrolysis of N-(deoxyguanosin-8-yl)
-4-aminoquinoline 1-oxide.

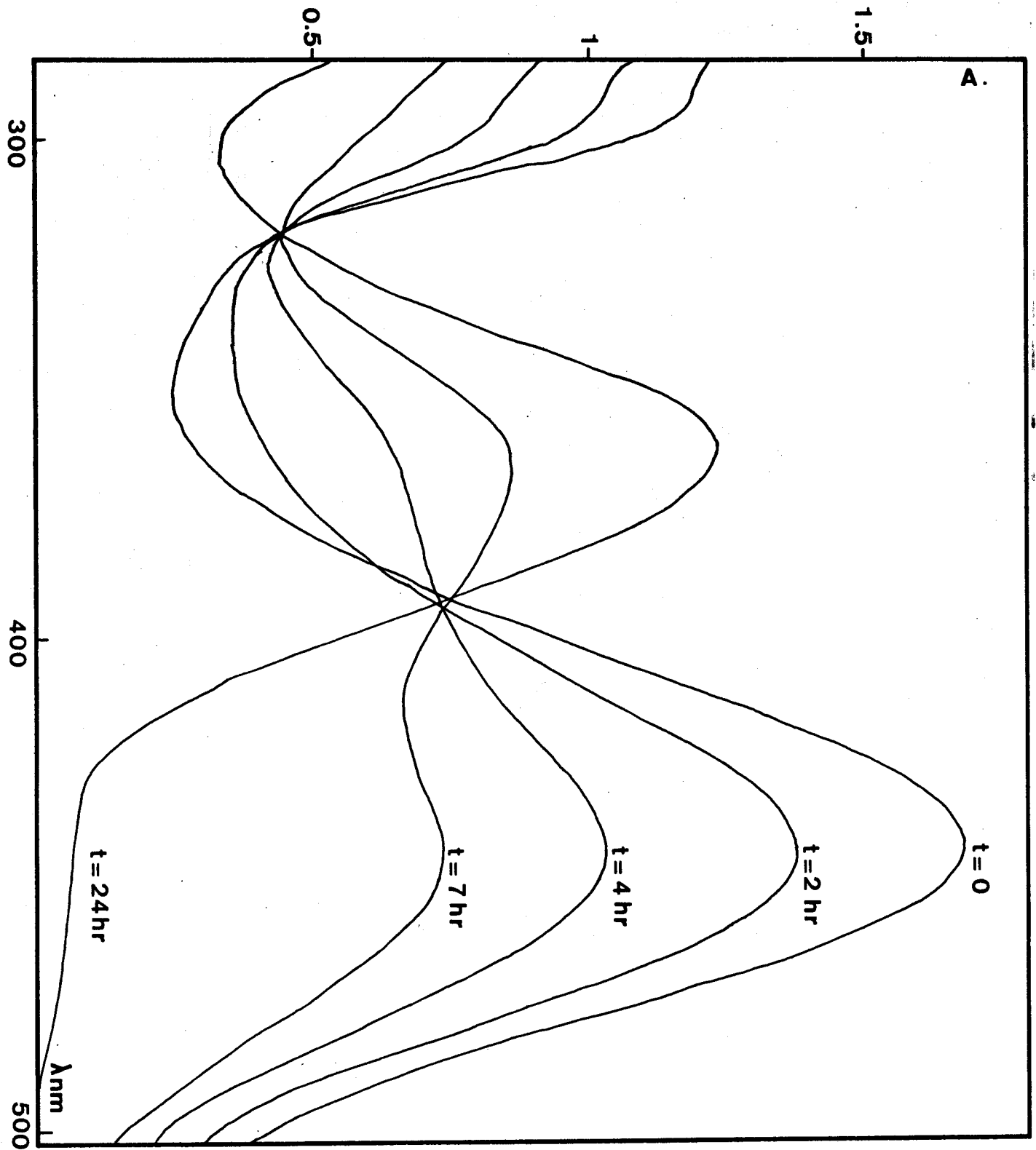


Figure 1. Evolution of ultraviolet absorption spectra of dGuo-C8-AQO during alkaline treatment at 37° in NaOH 0.1 M.

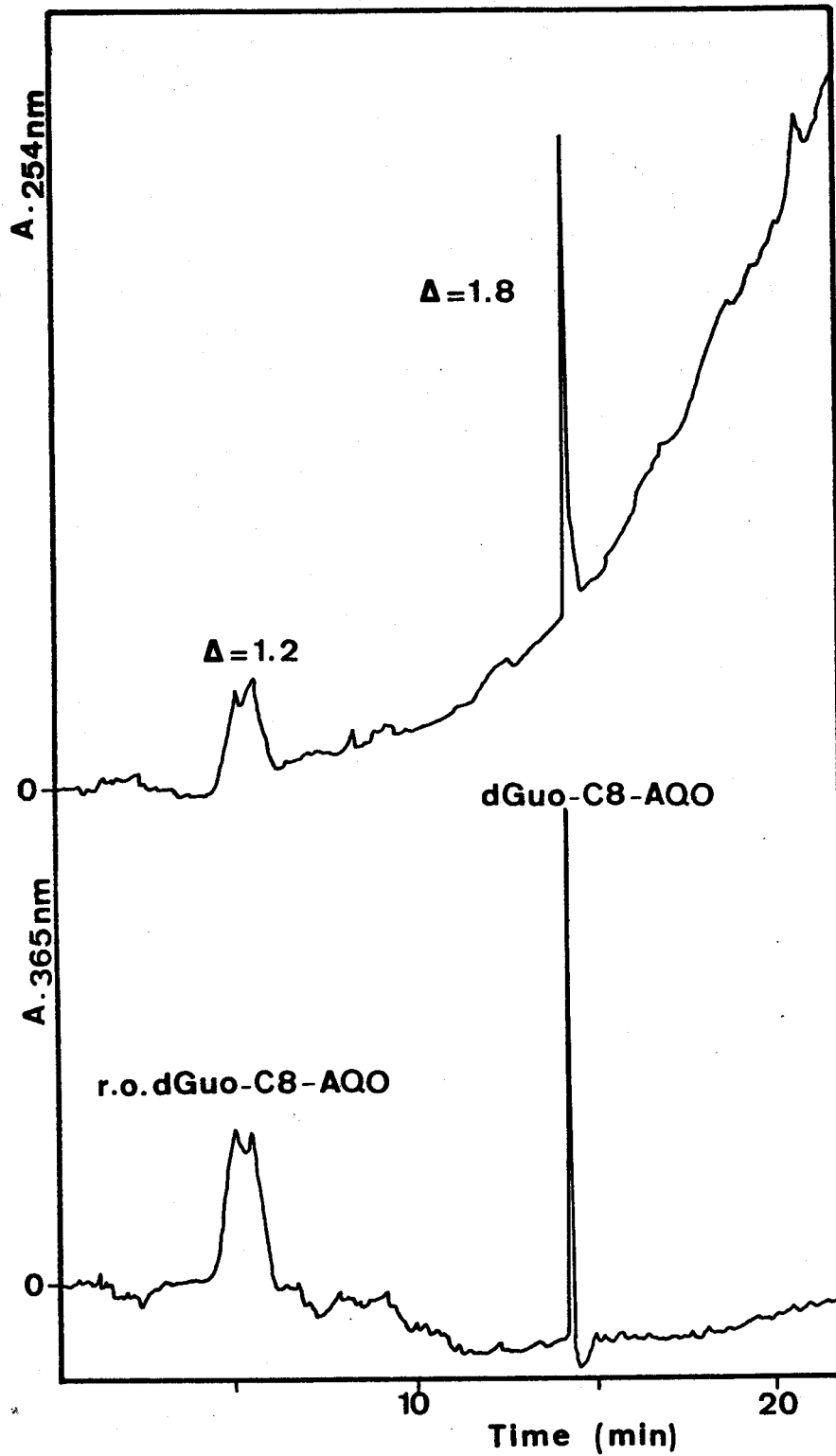
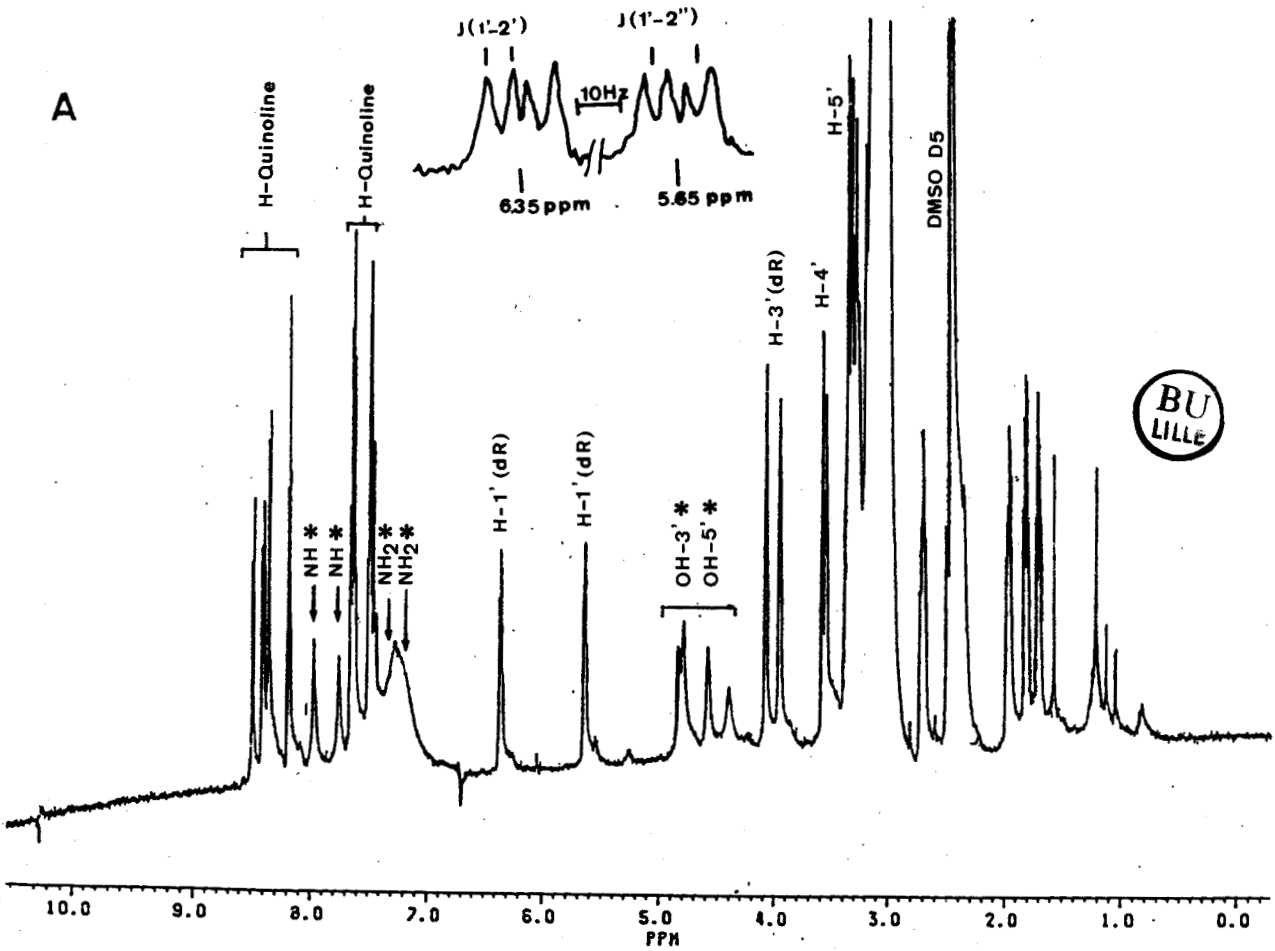
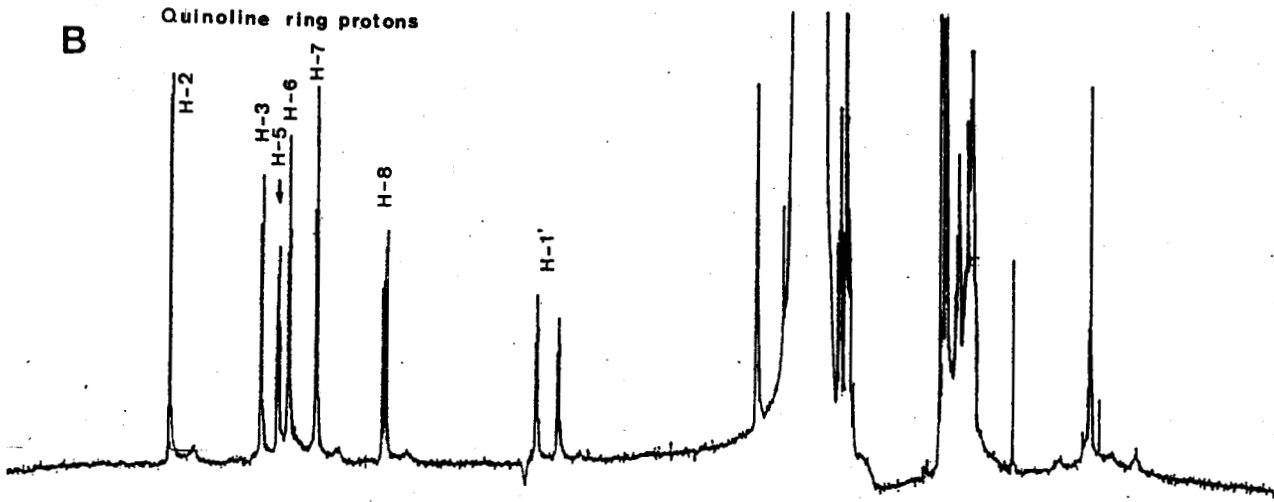
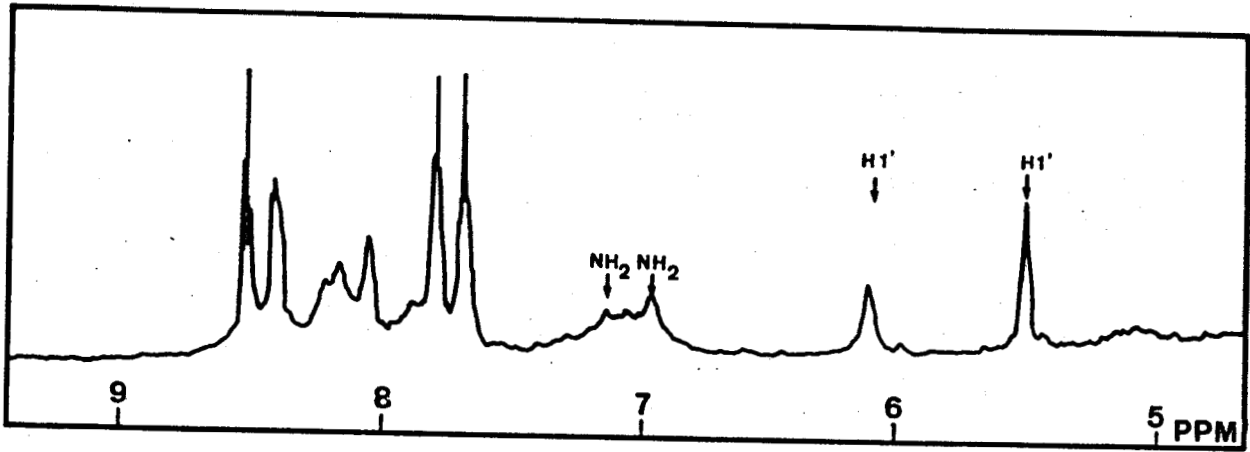


Figure 2. h.p.l.c. chromatographic profile of C8-deoxyguanosyl adduct after treatment at 37° in NaOH 0.1 M during 4 hours. Two derivatives are present in the peak with a retention time of about 5.2 minutes.



PUBLICATION n° 5

N^2 -guanyl and N^6 -Adenyl arylation of DNA by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide.

Sylvie GALIEGUE-ZOUITINA⁺, Bernard BAILLEUL⁺, Yves-M. GINOT[°], Bruno PERLY⁺⁺, Paul VIGNY^{*} and Marie-H. LOUCHEUX-LEFEBVRE⁺.

+ U. 124 INSERM, Institut de Recherches sur le Cancer
59045 Lille Cédex.

* Institut Curie. Section de Physique et Chimie
11, rue Pierre et Marie Curie - 75231 Paris Cédex 05.

° Service de Biophysique, Faculté de Médecine de Créteil
94010 CRETEIL, Cédex.

++ Département de Physicochimie, Section de Chimie Moléculaire, C.E.N. de
Saclay, 91191 Gif-sur-Yvette Cédex.

ABSTRACT

High quantities of chicken erythrocyte DNA were modified in vitro by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide, the 4-acetoxylaminoquinoline 1-oxide. After enzymatic hydrolysis of the modified DNA, the three main adducts were separated and isolated by semi-preparative HPLC : dGuo-2-AQO, dAdo-AQO, dGuo-C8-AQO (S. Galiègue-Zouitina et al, Cancer Res., in press). We previously identified dGuo-C8-AQO as N-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide (B. Bailleul et al, Cancer Research (1981) 41:4559-4565). In this paper the structures of dGuo-2-AQO and dAdo-AQO were identified as the 3-(deoxyguanosin-N²-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide and the 3-(deoxyadenosin-N⁶-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide, respectively.

INTRODUCTION

It is clear that during the tumorigenesis process induced by chemicals, DNA constitutes a critical target (23) and the knowledge of the adducts structures seems to be helpful in the understanding of the mechanisms involved. The heterocyclic aromatic amine 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)¹ is a potent carcinogen (26) the action of which is mediated by covalent binding of its ultimate metabolite to DNA (25,35). We proved in our laboratory that the 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide (Ac-4-HAQO) constitutes a very adequate model for the study of the carcinogenesis by 4-NQO (6, 1, 8). The conversion of Ac-4-HAQO to a quinoline-nitrenium ion and/or a quinoline-carbocation during its reaction with DNA was postulated by us (1) and by Kawazoe (13) and strong support for this mechanism was given by chemical studies (4). We very recently made the evaluation of the main lesions induced on DNA in vivo and in vitro by this carcinogen as two guanine-adducts and an adenine-adduct (8).

¹ The abbreviations used are : 4-NQO, 4-nitroquinoline 1-oxide ; 4-AQO, 4-aminoquinoline 1-oxide ; Ac-4-HAQO , 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide ; di-Ac-4-HAQO, 0,0'-diacetyl - 4 -hydroxyaminoquinoline 1-oxide ; HPLC, high performance liquid chromatography ; dGuo - C8-AQO, N-(deoxyguanosin - 8-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide ; dGuo-N2-AQO, 3-(deoxyguanosin-N²-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide ; dAdo-N6-AQO, 3-(deoxyadenosin-N⁶-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide ; Ado, adenosine ; Ac-4-HA[2-³H]QO, [2-³H]labeled 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide. AAF, acetylaminofluorene ; BP, benzo(a)pyrene.

One of the guanine-adducts was previously identified in our laboratory as N-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide (dGuo-C8-AQO) and was postulated to be formed through the nitrenium ion (1). This adduct is DNA-structure-dependent : it accounts for 30 % and 70 % of the total DNA modification for native and denaturated DNA, respectively (7).

This paper is devoted to the identification of the chemical structures of the other guanine-adduct, dGuo-2-AQO, and of the adenine-adduct, dAdo-AQO, which were isolated after enzymatic hydrolysis of great quantities of Ac-4-HAQO-modified DNA. These two adducts were shown in other works from our laboratory to depend on the DNA structure ; indeed dGuo - 2 - AQO is the major adduct on native DNA (8) and is practically inexistant on denaturated DNA (6) ; at the contrary, the single-stranded DNA structure favours the formation of the adenine-adduct (6). Kawazoe et al proposed in 1975 the structure of a NQO-adenyl adduct they called (QAII) as being the 3-(adenin-(N1 or N⁶)-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide (15). We show here that QAII and dAdo-AQO are corresponding to the same adduct and we precise the binding of the quinoline ring on the N⁶ of adenine moiety.

MATERIALS AND METHODS

CHEMICALS

The carcinogen 4-NQO was obtained from Fluka AG (Buchs, Switzerland). Ac-4-HAQO was prepared as previously described (1) from diAc-4-HAQO (14). The Ac-4-HA [2-³H]QO was the same as previously used (8). [³H]labelled Ac-4-HAQO was used to prepare the tritiated adducts in order to perform the partitioning experiments.

The DNA from chicken erythrocytes was the same as already used (8) and was a gift of P^rMichel DAUNE. All the enzymes (bovine pancreatic DNase I, snake venom phosphodiesterase, calf spleen phosphodiesterase, alkaline phosphatase from calf intestine) were purchased from Boehringer-Mannheim (F.R.G.).

Preparation of the dGuo-2-AQO and dAdo-AQO adducts from in vitro Ac-4-HAQO-modified DNA.

420 mg of chicken erythrocytes DNA (a solution of 0.75 mg/ml in a 2 mM sodium citrate buffer, pH 7) were modified by the ultimate carcinogen Ac-4-HAQO (4 % of modified bases) and enzymatically hydrolysed to nucleosides as previously described (8). The hydrolysate (total volume : 280 ml, 1,5 mg of hydrolysed material per ml) was directly applied to a semi-preparative HPLC column (μ Bondapack C18) with successive chromatographies of 2 ml hydrolysate. The HPLC

chromatographic conditions were an unlinear gradient methanol-phosphate/EDTA buffer (1.5 mM NaH₂PO₄, 0.4 mM EDTA, pH6), from 15 % during 12 min. to 30 % methanol. We used a detection in absorbance at 254 nm and 365 nm ; this latter wavelength is characteristic of the quinoline ring . For each chromatography the two adducts were collected and the solvent was immediatly evaporated under vacuum. The purity of the two compounds was checked by analytical HPLC chromatography on a μ Bondapak C18 column, in the methanol-water conditions previously used (6,8). The buffer salt was then eliminated from the total preparation by a single semi-preparative chromatography in the same conditions. Determination of the amount of each adduct was performed by measurement of the absorbance at 365 nm of each compound dissolved in water. (The ϵ 365 nm values were about 7500 and 8000 for dGuo-2-AQO and dAdo-AQO, respectively). We prepared about 550 γ of dGuo-2-AQO and about 250 γ of dAdo-AQO.

Weak quantities of [³H] labeled dGuo-2-AQO and dAdo-AQO were prepared using the same procedure, in order to perform the partitionning experiments which were carried out according to the method of Moore and Koreeda (24).

INSTRUMENTATION

HPLC separations were carried out on a Waters system consisting of a U6K injector, two 6000 A pumps, a Model 660 solvent programmer and a Model 440 dual-wavelength detector (254 nm and 365 nm). The

determinations of radioactivity for the partitioning experiments were made using a Beckman LS 2800 scintillator counter. The absorption spectra (normal and differential) were carried out using a Cary 219 recording spectrophotometer, in the 500 - 220 nm range. $^1\text{H-NMR}$ spectra were resolved in DMSO-d_6 at $60 \pm 1^\circ$ and at $20 \pm 1^\circ$, using a Bruker WM 500 spectrophotometer, in the Fourier Transform mode. In the case of dGuo-2-AQO resolution enhancement was further achieved by multiplication of the original FID'S by an unshifted sine-bell window. Spectra were calculated in the absolute value mode. Chemical shifts are given in ppm using the solvent signal ($\text{DMSO-d}_6 = 2.5$ ppm) as reference.

The 252-Cf Plasma Desorption Mass Spectrometry (PDMS) was previously used in the field of nucleic acids (19) and of their molecular modifications by physical or chemical agents (39). The 252-Cf PDMS apparatus we used has been described in a previous publication (19). The geometrical arrangement has been slightly modified and the californium source is now located behind the thin mylar target film on which the molecules are deposited. Fission fragments from the source pass through the film and produce ions as it front surface. The positive (or negative) ions are accelerated by a 7 to 10 Kv accelerator voltage and travel down a flight tube to the microchannel electron multiplier detector. The length of the flight tube is adjustable from 23 to 100 centimeters. The times of flight spectra are measured by means of standard nuclear electronics which include two timing discriminators, a one-start-multistop module (5), coupled with a multichannel analyser and to an IBM computer so that the spectra can be stored on disk for subsequent analysis.

Mass calibration is achieved by using peaks of H^+ , Na^+ , K^+ present in the lower part of the mass spectra, and according to the expression : $time = a\sqrt{m} + b$. Mass spectra presented here correspond to a ~ 60 min. acculumation time recording, without background subtraction, and with a 93 cm flight tube length. In one case, a 53 cm length allowed dimer of molecular ion to be observed.

5 to 10 μg of the purified samples were dissolved in 100 μl of methanol and the solution was evaporated on a thin aluminized mylar foil.

The major ionisation mode in this technique appears to be a proton transfer and an ion-dipole attachment that give respectively $(M+H)^+$ and $(M+X)^+$, where X is an alkali ion. As the most naturally abundant is sodium, ions such as $(M+Na)^+$, $(M+2Na-H)^+$ are often observed and characteristic of these spectra (21,20).

RESULTS

1) Isolation and preparation of the two DNA-NQO adducts, dGuo-2-AQO and dAdo-AQO.

After enzymatic hydrolysis to nucleosides of the Ac-4-HAQO - modified DNA, fractions of 2 ml of the total hydrolysate were submitted to the semi-preparative HPLC column. The chart 1 shows the elution profile obtained at 365 nm. The three major well separated peaks were corresponding to the three main adducts. Comparative HPLC analytical chromatographies of the three compounds in the conditions where the three main adducts were already characterized (8) allowed us to assign the first major peak as the dGuo-2-AQO, the second major one as the dAdo-AQO and the third as the dGuo-C8-AQO. We also recovered on this chromatographic profile the 4-aminoquinoline 1-oxide, 4-AQO, which was recovered in our precedent work (8). Another peak, we called I.H.M. (Incompletely Hydrolysed Material) was assumed to be a mixture of di-or/and tri-nucleotides and/or oligonucleotides containing the carcinogen (6). The peak at $R_T = 21'30$ was attributed to a compound which was recovered from modified DNA and poly(dG-dC).poly(dG-dC) ; nothing is known about this compound (8).

In regard to the respective amounts of the three main adducts the elution profile indicated that the dGuo-2-AQO was the major adduct, as already observed (8). Due to the instability of the guanine-adduct during the enzymatic hydrolysis, part of it was degraded during

its isolation. Indeed, we studied by analytical HPLC the stability of the isolated dGuo-2-AQO in the conditions of enzymatic hydrolysis : it appeared that after 20 hours of incubation, part of the adduct was decomposed.

After being controlled in purity by analytical HPLC (see Materials and Methods) the two adducts were dried under vacuum and submitted to chemical and spectroscopic analysis.

II Identification of dGuo-2-AQO as 3-(deoxyguanosin-N²yl)-4-aminoquinoline 1-oxide (dGuo-N²-AQO).

A first rapid investigation on this adduct was performed by absorption spectroscopy, in the quinoline ring band. Chart 2 shows the recording of the absorption spectra of the compound in acidic (HCl 0.1N, pH 1.5), neutral (2mM sodium citrate buffer, pH7) and basic (NaOH 0.1N, pH 12.6) conditions, in the 500-300 nm range. These spectra were characteristic of the bound 4-aminoquinoline 1-oxide (4-AQO). Indeed the maximum of the band which was centered at 360 nm in neutral and basic conditions was totally shifted at 330 nm, with a shoulder at 350 nm. This is characteristic of the 4-AQO form and was previously described by Sugimura et al (36) and Hoshino et al (9).

The solvent partitioning between aqueous buffers and butanol-1, at different pH's (from 1 to 11) was carried out and our results (Chart 3) indicate that there were two pKa's corresponding to acidic and alkaline conditions, in fair agreement with the lack of substitution on either the N1 or the O⁶ atoms of guanine residue. By differential absorption experiments we observed that for acidic pH's the ionizable species was corresponding to the alone ionization of the 4-amino group of the quinoline moiety.

The mass spectrum of dGuo-2-AQO (Chart 4, a) was carried out using 252-Cf Plasma Desorption Mass Spectrometry. The Table I gives the assignments of the peaks. Despite the extremely low stability of the adduct, molecular weight is reflected in the positive ion mass spectrum through the formation of ions of $m/z^+ = 426, 448, 470$ and $m/z^- = 424$ in the negative ionization mode (the negative spectrum is not shown). The major fragment ions are provided by the breakage of the N-glycosidic bond, and loss of deoxyribose ($m/z^+ = 332, 354, 376$).

Close to each of these ions, one can observe peaks that are 16 uma below: such is the case of peaks $m/z^+ = 294, 316$ and 338 in the positive mode and $m/z^- = 292$ in the negative mode. They correspond to the loss of the oxygen atom of 4-AQO, a phenomenon which has been also observed in the 252-Cf PDMS spectrum of another adduct, dGuo-C8-AQO. The guanine moiety is also observed ($m/z^+ = 174, 196, 218$). Three fragments ions ($m/z^+ = 137, 159, 181$) could be assigned to the deaminated guanine moiety. Such a breakage which has been already observed in the case of other N^2 -guanyl adducts (30,40), though obtained with a different desorption technique, may indicate that guanine was substituted on the exocyclic amino group N^2 . It has to be noticed that such a deamination is not observed in the PDMS spectrum of free guanosine. The fact that the presence of complementary ions such as $(4\text{-AQO} + \text{NH} + 2\text{H})^+$ or 4-AQO alone is not observed is probably due to rearrangements or ultimate degradation.

Complete structural characterization was obtained from the $^1\text{H-NMR}$ study. (Chart 5, part a). Assignments were based on comparisons with NMR spectra of 4-AQO (16) and dGuo (30) in DMSO-d_6 . Firstly, one observes the loss of two signals : i) the N^2 amino group protons of deoxyguanosine (expected at 6.37 ppm) and ii) the C-3 proton of quinoline which is normally coupled in 4-AQO with the C-2 proton. The NMR spectrum contains the resonances of all the protons of the molecule and their assignments are given Table II. The 3'OH and 5'OH protons were observed on the spectra recorded at 20° , at 5.0 and 5.3 ppm. (data not shown).

These results and the comments added in Table II strongly support the characterization of dGuo-2-AQO as 3-(deoxyguanosin - N^2 -yl)-4-aminoquinoline 1-oxide.

III Identification of dAdo-AQO as 3-(deoxyadenosin- N^6 -yl)-4-aminoquinoline 1-oxide (dAdo- N^6 -AQO).

In the same manner as for dGuo- N^2 -AQO, the recording of the absorption spectra of the adenine-adduct, in the 500-300 nm range in acidic, neutral and basic conditions allowed us to observe the 4-AQO form bound to the adenosine moiety (spectra not shown).

From the solvent partitioning of dAdo-AQO at different pH's (from 1 to 11) the lack of an ionizable species at alkaline pH was observed (Chart 3), with the presence of an ionizable function at acidic pH.

The recording of the differential absorption spectra as a function of pH (from 0.3 to 7) for dA, 4-AQO and dAdo-AQO allowed us to distinguish the ionization of the 4-amino group of the quinoline

moiety and the protonation of the N7 of adenine (spectra not shown).

The mass spectrum in the positive mode of dAdo-AQO is shown in Chart 4,b and assignments listed in Table I. They provide evidence of the presence of this adduct. Molecular weight is clearly observed through the formation of $(M + Na)^+$ ion in the positive mode ($m/z^+ = 432$). As in the case of dGuo-N2-AQO, the major fragment ions come from the breakage of the N-glycosidic bond ($m/z^+ = 292, 316$ and 338). The loss of the oxygen atom of 4-AQO is observed on these fragment ions, in the positive ($m/z^+ = 278, 300, 322$ and 344) and in the negative ionization mode ($m/z^- = 276$). Adenosine and adenine moieties are not seen. Three peaks ($m/z^+ = 121, 165, 187$) could be assigned to deaminated base ions, but this is to be considered with caution. This could indicate a substitution of the adenine moiety on its exocyclic amino group N⁶.

Structural identification was achieved from the proton N M R study (chart 5, part b). Assignments were based on comparisons with NMR spectra of 4-AQO (16), Ado (37) and QA_{II} (for the quinoline protons only) which was an (N1 or N⁶) adenine-adduct previously characterized by Kawazoe et al (15), in DMSO- d₆. Firstly, one observes the loss of two signals : i) the N⁶-amino group protons of deoxyadenosine (expected at 7.28 ppm) and ii) the C-3 proton of quinoline with the loss of the couplage with the Q C-2 proton. The NMR spectrum contained the resonances of all the protons of the molecule and their assignments are given Table III.

Taken together, our data and the comments added in Table III strongly support the characterization of dAdo-AQO as 3-(deoxyadenosin-N⁶-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide.

DISCUSSION

This paper gave the structural identification of two main adducts of the carcinogen 4-NQO, the N²-guanyl adduct (dGuo-N²-AQO) and the N⁶-adenyl adduct (dAdo-N⁶-AQO). These two compounds were formed by fixation of the nucleoside moiety on the C3 of the quinoline ring and this is in good agreement with the hypothesis of the formation of a C³-quinoline carbocation as a reactive intermediate during the reaction of Ac-4-HAQO with DNA (1, 4, 13). Another adduct (dGuo-C⁸-AQO) was previously shown to be formed through a nitrenium ion (1). As we showed very recently, these three main adducts were also recovered from in vivo-modified DNA (8).

The formation of N⁶-adenyl adduct in DNA was evidenced for different aromatic amines, (33, 34, 12, 38) and some polycyclic hydrocarbons (29). As been previously proposed for the N⁶-adenine adducts of 2-naphthylamine (12) and N-methyl-4-amino-azobenzene (38), the formation of this lesion could constitute a promutagenic event due to the possible tautomeric equilibrium between the N⁶-amino and N⁶-imino structures. In the N⁶-imino form, the modified deoxyadenosine could mispair with deoxycytidine, resulting in a transition mutation (A.T → G.C). 4-NQO is a potent mutagen, and even if the mutations induced by this carcinogen have been shown to affect rarely the A.T sites (10), due to the weak percentage of adenine-adducts (about 10 %) it is not impossible that such mispairing may account for the mutagenicity of 4-NQO.

In the last few years, the exocyclic nitrogen atom N² of guanine has been shown to be a major site of substitution in DNA by ultimate carcinogenic derivatives of polycyclic hydrocarbons (22, 41)

and for one aromatic amine, the N-OH-4-acetylamino-4'-fluorobiphenyl (17,18). Due to their persistence in target tissues (18, 38, 40) N²-guanyl adducts have been suggested to play a central role in the initiation of neoplasia. But although N²-guanyl substitution by polyaromatic carcinogens might sterically interfere with normal base pairing it is not readily apparent how such adducts would cause direct mispairing and result in a mutation. Kadlubar hypothesised that N²-guanyl substitution induces a conformational change of the modified nucleoside from "anti" to "syn", which would permit mispairing with an opposite guanine during DNA replication and would explain the carcinogen-induced transversions. (11). Since this model was proposed in the case of the N²-guanyl-AAF and N²-guanyl-BP adducts, it is not obviously universal. In the case of 4-NQO the mutations have been shown to be largely G.C.→A.T. transitions with also a few transversion-mutations (28, 31). Scribner et al predicted the blockage of the polymerase by N²-adducts during the replication of modified DNA (32). Very recently Yoshida et al (42) showed that the NQO-guanine adducts blocked the E.Coli DNA polymerase elongation in vitro, by three different manners (one nucleotide before the lesion, at position opposite and at one base beyond guanine). But any correlation with the structure of the guanine lesions was not described by these authors.

In conclusion we showed that the main lesion induced by 4-NQO in vivo and in vitro is a N²-guanyl adduct (50 %), the others being a C8-guanyl adduct (≈30 %), a N⁶-adenyl adduct (≈10 %) and some minor compounds (10 %). Physicochemical investigations are actually initiated in our laboratory to determine the modification of DNA induced by each of the adducts. For example, we very recently proved that the N²-guanyl adduct impaired the induction of the Z form, on a modified poly(dG-dC).poly(dG-dC) (2).

REFERENCES

1. Bailleul, B., Galiègue, S., and Loucheux-Lefebvre, M.H. Adducts from the reaction of 0,0'-diacetyl or 0-acetyl derivatives of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide with purine nucleosides. *Cancer Res.*, 41 : 4559-4565, 1981.
2. Bailleul, B., Galiègue-Zouitina, S. and Loucheux-Lefebvre, M.H. Conformations of poly(dG-dC).poly(dG-dC) modified by the 0-acetyl derivative of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide. *Nucleic Acids Res.*, 12, in press, 1984.
3. Della-Negra, S., Ginot, Y.M., Le Beyec, Y., Spiro, M. and Vigny P., Fast heavy ions induced desorption mass spectrometry : future applications in the area of molecular modifications of nucleic acids induced by physical or chemical agents. *Nucl. Instr. Meth.* 198 : 159-163, 1982.
4. Demeunynck, M. Contribution à l'étude du mode d'action de substances cancérigènes : réactivité d'esters d'oximes et d'hydroxylamines en série quinoléine. Thesis, Lille (France), 1984.
5. Festa, E. and Sellem, R., A multistop time-to-digital converter. *Nucl. Instr. Meth.*, 188 : 99-104, 1981.
6. Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B. and Loucheux-Lefebvre, M.H. In vitro DNA reaction with an ultimate carcinogen model of 4-nitroquinoline 1-oxide : the 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide. Enzymatic degradation of the modified DNA, *Carcinogenesis*, 4 : 249-254, 1983.
7. Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B. and Loucheux-Lefebvre, M.H. Guanyl-C⁸-arylamination of DNA by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide : a spectrophotometric titration. *Analyt. Biochem.*, 138 : 454-457, 1984.

8. Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B. and Loucheux-Lefebvre, M.H. Adducts from *in vivo* action of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide and from *in vitro* reaction of 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide with DNA and polynucleotides. *Cancer Res.*, in press.
9. Hoshino, H., Fukuoka, F., Okabe, K. and Sugimura, T. The metabolism of 4-nitroquinoline 1-oxide II. *In vivo* conversion of subcutaneously injected 4-nitroquinoline 1-oxide to 4-aminoquinoline 1-oxide and 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide in Rats. *Gann*, 57 : 71-74, 1966.
10. Ishisawa, M. and Endo, H. Mutagenic effect of carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide, in bacteriophage T₄. *Mutat. Res.*, 9 : 134-137, 1970.
11. Kadlubar, F.F. A transversion mutation hypothesis for chemical carcinogenesis by N²-substitution of guanine in DNA. *Chem. Biol. Interact.* 31 : 255-263, 1980.
12. Kadlubar, F.F., Unruh, L.E., Beland, F.A., Straub, K.M. and Evans, F.E. *In vitro* reaction of the carcinogen, N-hydroxy-2-naphthylamine, with DNA at the C-8 and N² atoms of guanine and at the N⁶ atom of adenine. *Carcinogenesis*, 1 : 139-150, 1980.
13. Kawazoe, Y., Molecular Mechanism of chemical modification of Cellular nucleic acid bases by 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide. *Natl. Canc. Inst. Monograph*, 58 : 183-184, 1981.
14. Kawazoe, Y. and Araki, M. Studies on chemical carcinogens .V. O,⁰-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide. *Gann*, 58 : 485-487, 1967.
15. Kawazoe, Y. Araki, M., Huang, G.F., Okamoto, T., Tada, Mit. and Tada, Mar. Chemical structure of QAI, one of the covalently bound adducts of carcinogenic 4-nitroquinoline 1-oxide with nucleic acid bases of cellular nucleic acids. *Chem. Pharm. Bull.*, (Tokyo), 23 : 3041-3043, 1975.

16. Kawazoe, Y., Ogawa, O. and Huang, G.F., Studies on chemical carcinogens - XVII - Structure of carcinogenic 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide derivatives, *Tetrahedron*. 36 : 2933-2938, 1980.
17. Kriek, E. On the mechanism of action of carcinogenic aromatic amines .II. Binding of N-hydroxy-N-acetyl-4-aminobiphenyl to rat liver nucleic acid *in vivo*. *Chem. Biol. Interact.*, 3 : 19-28, 1971.
18. Kriek, E. and Hengeveld, G.M. Reaction products of the carcinogen N-hydroxy-4-acetylamino-4-fluorobiphenyl with DNA in liver and kidney of the rat. *Chem. Biol. Interact.*, 21 : 179-201, 1978.
19. Le Beyec, Y., Della-Negra, S., Deprun, C., Vigny, P. and Ginot, Y.M. Mass determination of molecules of biological interest by fast heavy ions induced desorption mass spectrometry. *Revue Phys. Appl.*, 15 : 1631-1637, 1980.
20. Mac Farlane, R.D., 252-Cf-Plasma desorption mass spectrometry, in "Biochemical applications of mass spectrometry". Chap. 38 : 1209-1218, G. Waller Ed., 1980.
21. Mac Farlane, R.D. and Torgerson, D.F., Californium - 252 Plasma desorption Mass Spectroscopy. *Science*, 191 : 920-925, 1976.
22. Meehan, T., Straub, K. and Calvin, M. Benzo(a)pyrene diol epoxide covalently binds to deoxyguanosine and deoxyadenosine in DNA. *Nature (Lond)*. 269 : 725-727, 1977.
23. Miller, E.C. Some current perspectives on chemical carcinogens in humans and experimental animals : presidential address. *Cancer Res.* 38 : 1479-1496, 1976.
24. Moore, P.D. and Koreeda, M. Application of the change in partition coefficient with pH to the structure determination of alkyl substituted guanosines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 73 : 459-464, 1976.

25. Nagao, M. and Sugimura, T. Molecular biology of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide. *Adv. Cancer Res.* 23 : 132-169, 1976.
26. Nakahara, W., Fukuoka, F. and Sugimura, T. Carcinogenic action of 4-nitroquinoline 1-oxide. *Gann*, 48 : 129-137, 1957.
27. Phillips, D.H., Miller, J.A., Miller, E.C. and Adams, B. Structures of the DNA adducts formed in mouse liver after administration of the proximate hepatocarcinogen 1'-Hydroxyestragole. *Cancer Res.*, 41 : 176-186 1981.
28. Prakash, L., Stewart, J.W. and Sherman, F. Specific induction of transitions and transversions of G.C base pairs by 4-nitroquinoline 1-oxide in iso-1-cytochrome c mutants of yeast. *J. Mol. Biol.*, 85 : 51-65, 1974.
29. Rayman, M.P. and Dipple, A. Structure and activity in chemical carcinogenesis. Comparison of the reactions of 7-bromomethylbenz (a) anthracene and 7-bromomethyl-1,2-methylbenz (a) anthracene with deoxyribonucleic acid *in vitro*. *Biochemistry*, 12 : 1202-1207, 1973.
30. Robertson, K.A. Alkylation of N² in deoxyguanosine by dehydroretronecine, a carcinogenic metabolite of the pyrrolizidine alkaloid monocrotaline. *Cancer Res.*, 42 : 8-14, 1982.
31. Rosenkranz, H.S. and Poirier, L.A. An evaluation of the mutagenicity and DNA modifying activity in microbial Systems of carcinogens and non carcinogens. *J. Natl. Cancer Inst .*, 62 : 873-892, 32.
32. Scribner, J.D., Fisk S.R. and Scribner, N.K. Mechanisms of action of carcinogenic aromatic amines, an investigation using mutagenesis in bacteria. *Chem. Biol. Interact.*, 26 : 11-25, 1979.

33. Scribner, J.D. and NAIMY, N.K. Reactions of esters of N-hydroxy-2-acetamidophenanthrene and adenine and guanine of DNA. *Cancer Res.*, 35 : 1416-1421, 1975.
34. Scribner, N.K., Smith, D.L., Schram, K.H., Mc Closkey, J.A. and Scribner, J.D. Reactions of the carcinogens N-acetoxy-4-acetamidostilbene with nucleosides. *Chem. Biol. Interact.*, 26 : 27-46, 1979.
35. Sugimura, T. *Carcinogenesis. A Comprehensive Survey : the Nitroquinolines.* Raven Press, New-York, 6 : 1-159, 1981.
36. Sugimura, T., Okabe, K. and Endo, H. The metabolism of 4-nitroquinoline 1-oxide. I. Conversion of 4-nitroquinoline 1-oxide to 4-aminoquinoline 1-oxide by Rat liver and hepatomas. *Cancer Res.*, 26 : 1717-1721, 1966.
37. Townsend, L.B. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in the Study of Nucleic Acid components and certain related derivatives. in : *Synthetic Procedures in Nucleic Acid Chemistry, Physical and Physicochemical characterization*, 2 : 260-360, Zorbach W.W. and Tipson R.S., Eds, 1970.
38. Tullis, D.L., Straub, K.M. and Kadlubar, F.F. A comparison of the carcinogen-DNA adducts formed in rat liver *in vivo* after administration of single or multiple dose of N-methyl-4-aminoazobenzene. *Chem. Biol. Interact.*, 38 : 15-27, 1981.
39. Vigny, P., Spiro, M., Gaboriau, F., Le Beyec, Y., Della-Negra, S., Cadet, J. and Voituriez, L., 252-Cf-Plasma desorption mass spectrometry of covalently bound nucleic acid adducts : Psoralen-nucleosides photoadducts. *Int. J. Mass Spectr. Ion Phys.*, 53 : 69-83, 1983.
40. Westra, J.G., Kriek, E. and Hittenhausen, H. Identification of the persistently bound form of the carcinogen N-acetyl-2-amino fluorene to rat liver DNA *in vivo*. *Chem. Biol. Interact.*, 15 : 149-164, 1976.

41. Wiebers, J.L., Abbott, P.J., Coombs, M.M. and Livingston, D.C. Mass Spectral Characterization of the major DNA-carcinogen adduct formed from the metabolically activated carcinogen 15,16-dihydro-11-methylcyclopenta (a) phenanthren-17-one. *Carcinogenesis*, 2 : 637-643, 1981.
42. Yoshida, S., Koiwai, O., Suzuki, R. and Tada, Mar. Arrest of DNA elongation by DNA polymerases at guanine adducts on 4-hydroxyamino-quinoline 1-oxide-modified DNA Template. *Cancer Res.*, 44 : 1867-1870, 1984.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Professeur G. BISERTE for his constant help.

We acknowledge C. DENIS for excellent technical assistance, and S. DELLA NEGRA, Y. Le BEYEC, C. DEPRUN for the PDMS experiments.

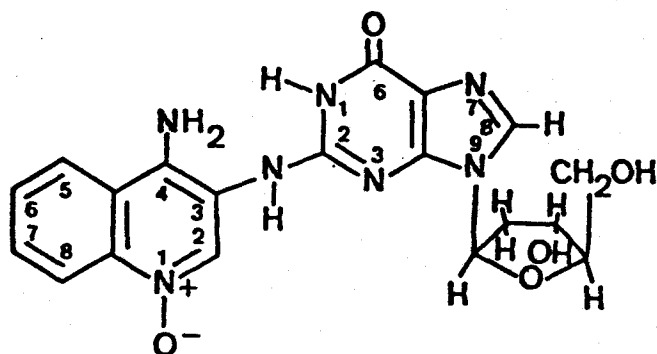
Table I - 252-Cf-Plasma Desorption Mass Spectrometry data for dGuo-2-AQO and d Ado-AQO.

	dGuo-2-AQO	dAdo-AQO
<u>Quasi-molecular ions</u>		
(M - H) ⁻	424	
(M + H) ⁺	426	
(M + Na) ⁺	448	432
(M + 2Na - H) ⁺	470	
(2M + 3Na - 2H) ⁺	917 (a)	
<u>Loss of oxygen</u>		
(M - 16 - H) ⁻	408	
(M - 16 + H) ⁺	410	
(M - 16 + Na) ⁺	432	
(M - 16 + 2Na - H) ⁺	454	
(2(M-16) + 3Na - 2H) ⁺	885 (a)	
(2M - 16 + 3Na - 2H) ⁺	901 (a)	
<u>Loss of deoxyribose : dRib.</u>		
(M - dRib.) ⁻	308	292
(M - dRib. + H + Na) ⁺	332	316
(M - dRib. + 2Na) ⁺	354	338
(M - dRib. + 3Na - 2H) ⁺	376	
(M - dRib. - 16) ⁻	292	276
(M - dRib. - 16 + 2H) ⁺	294	278
(M - dRib. - 16 + H + Na) ⁺	316	300
(M - dRib. - 16 + 2Na) ⁺	338	322
(M - dRib. - 16 + 3Na - H) ⁺		344
<u>Base moiety : B</u>		
(B + 2H + Na) ⁺	174	
(B + H + 2Na) ⁺	196	
(B + 3Na) ⁺	218	
<u>Deaminated base</u>		
(B - NH + 3H) ⁺	137 (b)	121 (b)
(B - NH + 2H + Na) ⁺	159 (b)	
(B - NH + H + 2Na) ⁺	181 (b)	165 (b)
(B - NH + 3Na) ⁺		187 (b)

(a) These peaks were observed with a 53 cm flight tube length.

(b) These assignments need to be confirmed by another mass spectrometry data set.

Table II. NMR study of dGuo-N²-AQO.



Chemical shifts (ppm)	Assignments (Q means quinoline) (G means guanine)	Multiplicity (f)
8.83	Q-C2H (a)	s
8.49	Q-C8H (b)	m
8.34 (c)	Q-C5H (b) + G-N ² H (d)	m
7.82	G-C8H (e)	s
7.73	Q-C7H (b)	m
7.61	Q-C6H (b)	m
6.72	Q-4NH ₂ (d)	s
6.06	H1'	m
4.44	H3'	m
3.69	H4'	m
3.42	H 5' or 5''	m
3.32	H 5'' or 5'	m
2.80	H 2' or 2''	m
2.15	H 2'' or 2'	m

(a) non-exchangeable proton. It is expected at 8.12 ppm in 4-AQO (16) but it is shifted downfield to 8.83 ppm because of the presence of the guanyl substituent. The signal is broad due to the quadrupolar effect of N².

(b) The chemical shift of this quinoline proton is very near to this one observed in 4-AQO (16).

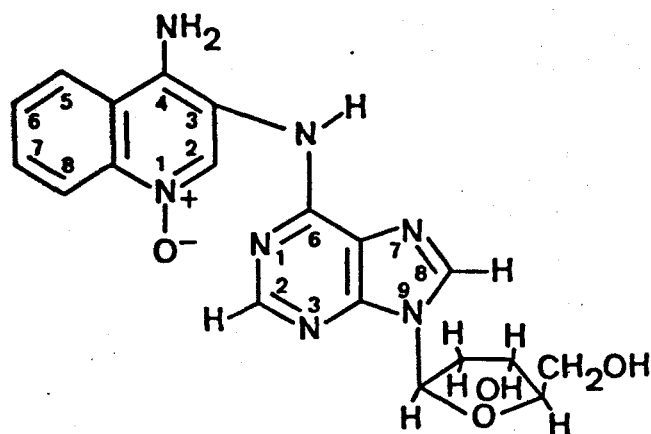
(c) The intensity of this band is about two fold that this expected for one proton (see for example the Q-C8H resonance at 8.49 ppm). This signal is in fact an overlapping of the resonances of two protons, and we observed that one of them was exchangeable. We think it is the guanyl N² proton since the cyclic N1-H peak, expected near 10-11 ppm (30) is generally broader than the resonance observed here. This assignment, in addition to the absence of the 2-NH₂ signal of guanine give undoubtedly the site of substitution as the exocyclic aminogroup.

(d) exchangeable protons.

(e) The same chemical shift is observed for the dGuo-C8 proton (30).

(f) s, singlet ; m ; multiplet.

Table III. NMR study of dAdo-N6-AQO



Chemical shifts (ppm)	Assignments (A means adenine) (Q means quinoline)	Multiplicity (e)
8.59	Q-C2H (a)	s
8.53	Q-C8H (b)	m
8.49 (c)	A-C8 H (c)	s
8.37	Q-C5 H (b)	m
8.32	A-N ⁶ H (d)	s
8.25	A-C2 H (d)	s
7.78	Q-C7 H (b)	m
7.65	Q-C6 H (b)	m
6.61	Q-4 NH ₂ (b)	s
6.41	H1'	m
4.45	H3'	u
3.93	H4'	u
3.67	H 5' or 5''	m
3.55	H 5'' or 5'	m
2.31	H 2'' or 2'	m
2.77	H 2' or 2''	m

(a) This proton is expected at 8.12 ppm in 4-AQO (16) but it is shifted downfield to 8.59 ppm due to the presence of the adenylyl substituent. Exactly the same shift was observed for QAII (15).

(b) The chemical shift of this quinoline proton is very near to those of 4-AQO (16) and exactly the same as in QAII (15).

(c) The same chemical shift is observed for the dAdo C8 proton (37).

(d) These assignments indicate that the substitution occurs at N⁶ of adenine. We compared the chemical shift of the C2H proton (8.25 ppm) with the values obtained for this proton in the case of 1-methyl deoxyadenosine : 8.7 ppm, 3-methyladenine : 7.9 ppm and N⁶-methyladenosine : 8.2 ppm, as it was made by Phillips et al (27) for the study of another N⁶ adenylyl adduct. Moreover N1 or N3 substituted adenine should lead to an imino group on the C6 of adenine (tautomeric forms) and the chemical shifts of such group are known to be found near 9.5 to 11 ppm. These two comparisons led us to assign the signal at 8.32 ppm to a N⁶H.

(e) s, singlet ; m, multiplet ; u, unresolved.

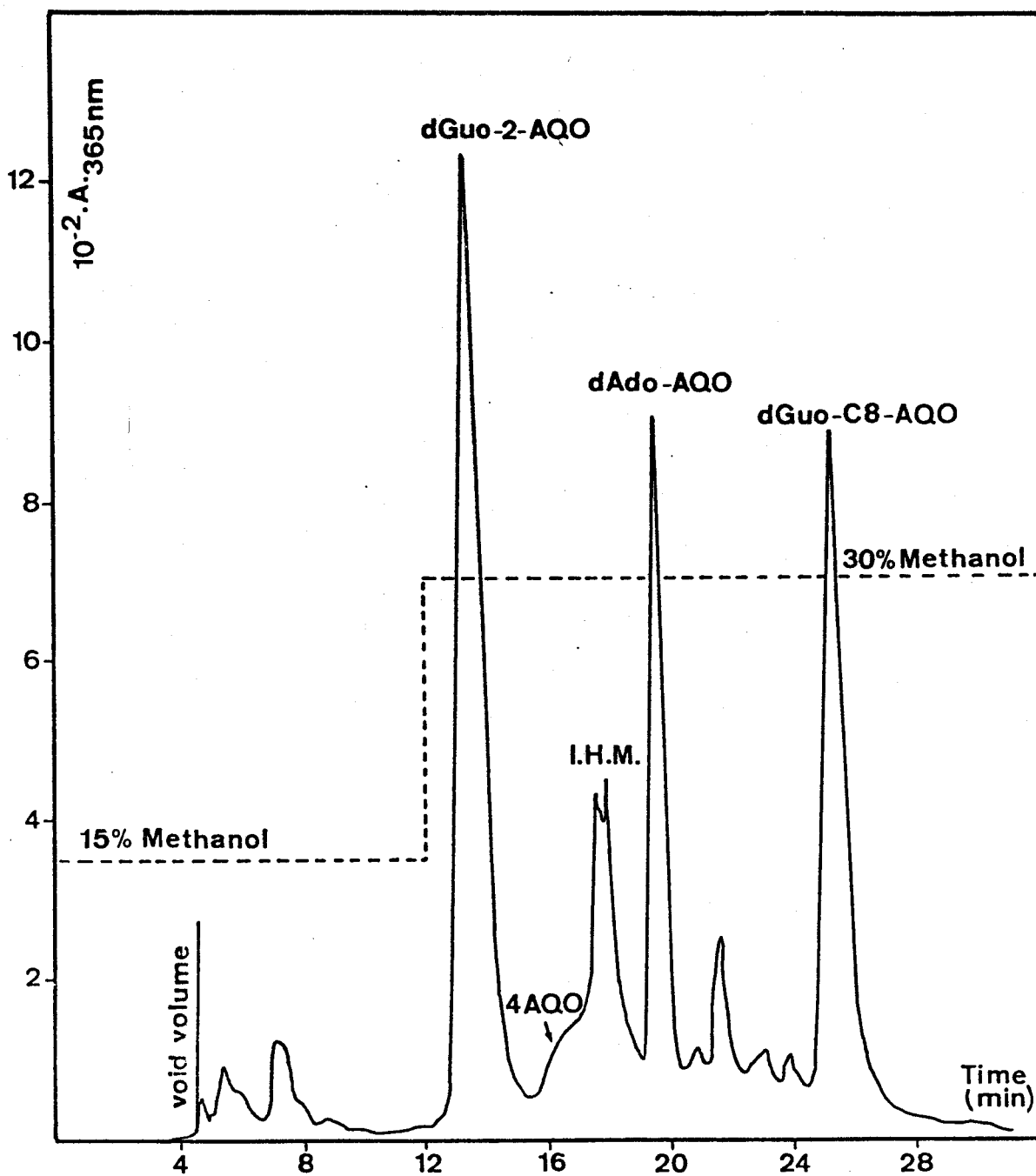


Chart 1 : Semi-preparatives HPLC elution profile of 3 mg of hydrolyzed-modified DNA - Absorbance detection at 365 nm. Chromatographies were carried out with an unlinear gradient during 12 min from a phosphate/EDTA buffer (1.5 mM NaH₂ PO₄, 0.4 mM EDTA, pH6) to 30 % methanol in the buffer, during 20 min. The two compounds dGuo-2-AQO and dAdo-AQO were collected for each chromatography and dried under vacuum. We obtained about 550 µg of dGuo-2-AQO and about 250 µg of dAdo-AQO.

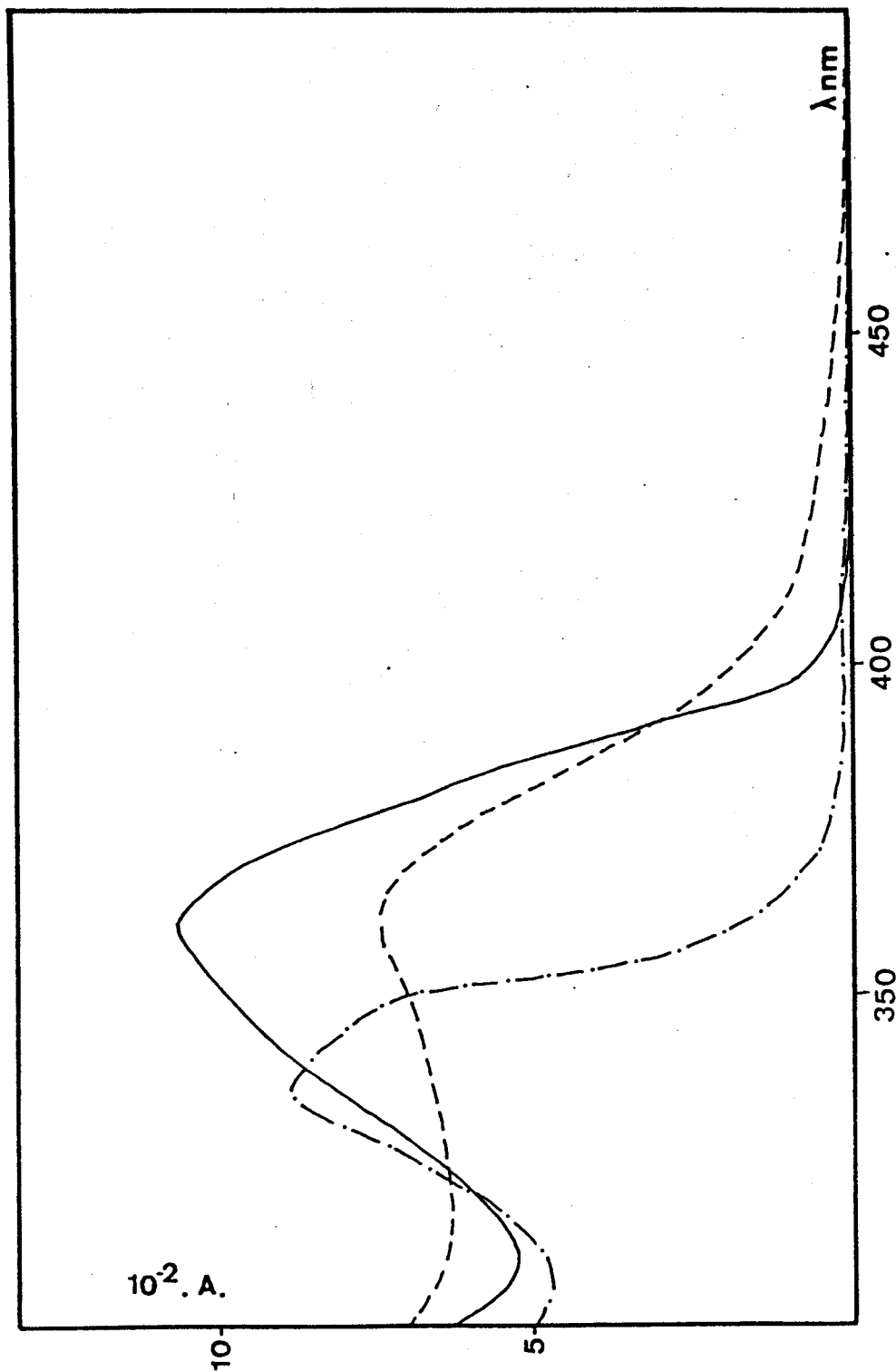


Chart 2 : UV spectra of dGuo-N2-AQO adduct in 2mM sodium citrate buffer (pH 7.3 ; —) or 0.1 N H Cl (pH 1.5 ; -.-) or 0.1 N NaOH (pH 12.3 ; ---).

The concentration was : 5.6 μ g/ml. The extinction coefficients are : at pH 7.3, $\epsilon_{360} = 8000$; at pH 1.5 , $\epsilon_{336} = 6830$; at pH 12.3, $\epsilon_{360} = 5300$.

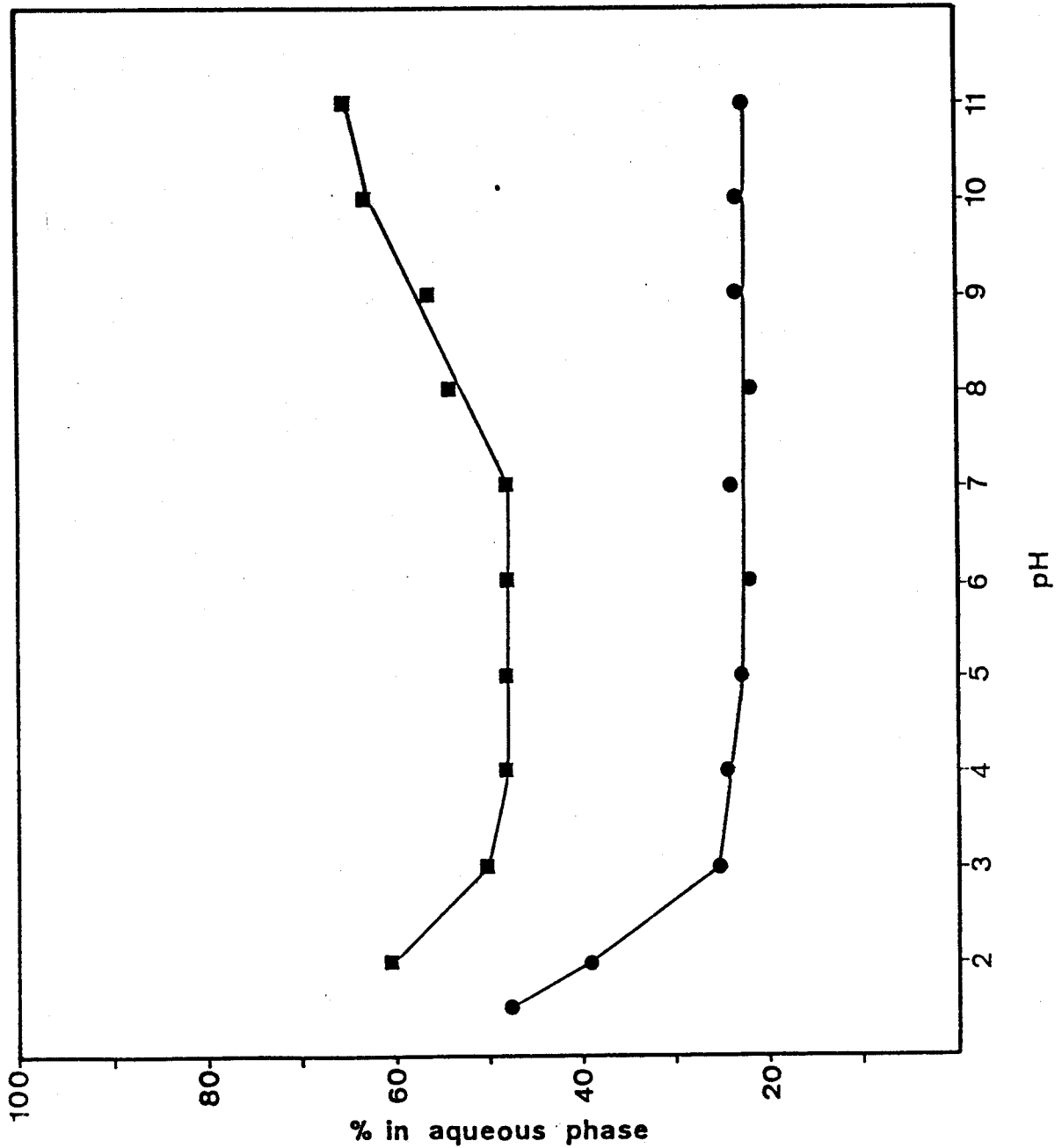


Chart 3 : Partition of tritiated dGuo-2-AQQ (■) and tritiated dAdo-AQQ (●) between aqueous buffers, pH 1-14 (24) and n-butanol. The percentage of each adduct in aqueous phase was determined by counting 100 μ l aliquots of the tritiated solutions.

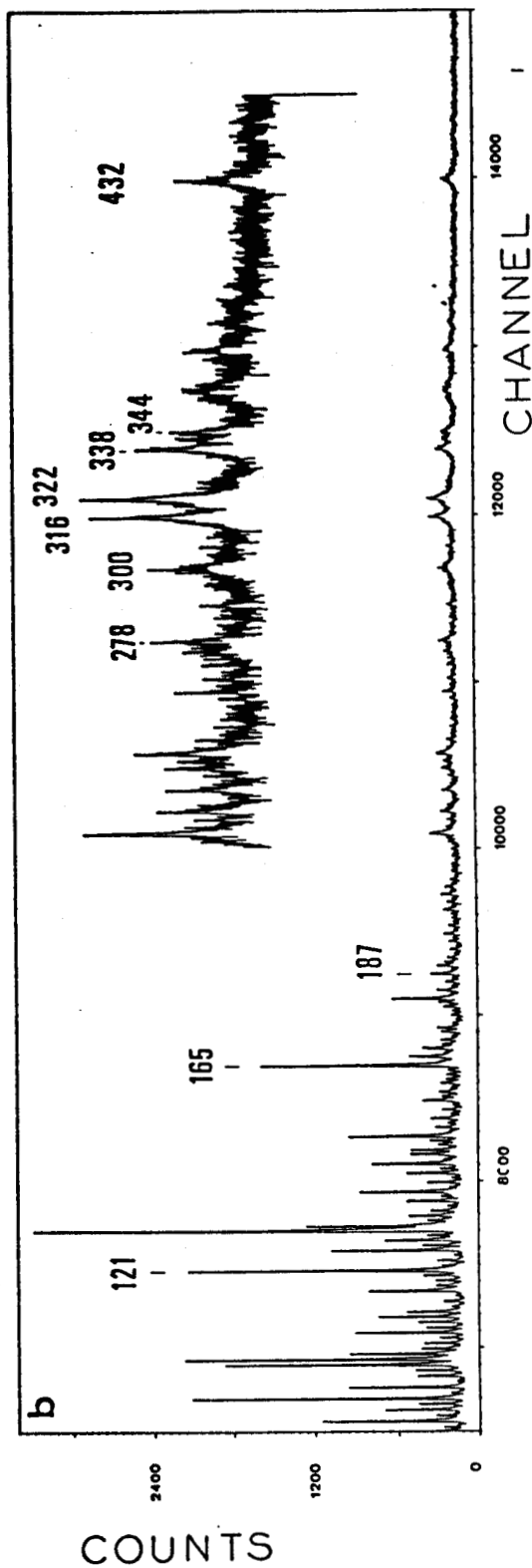
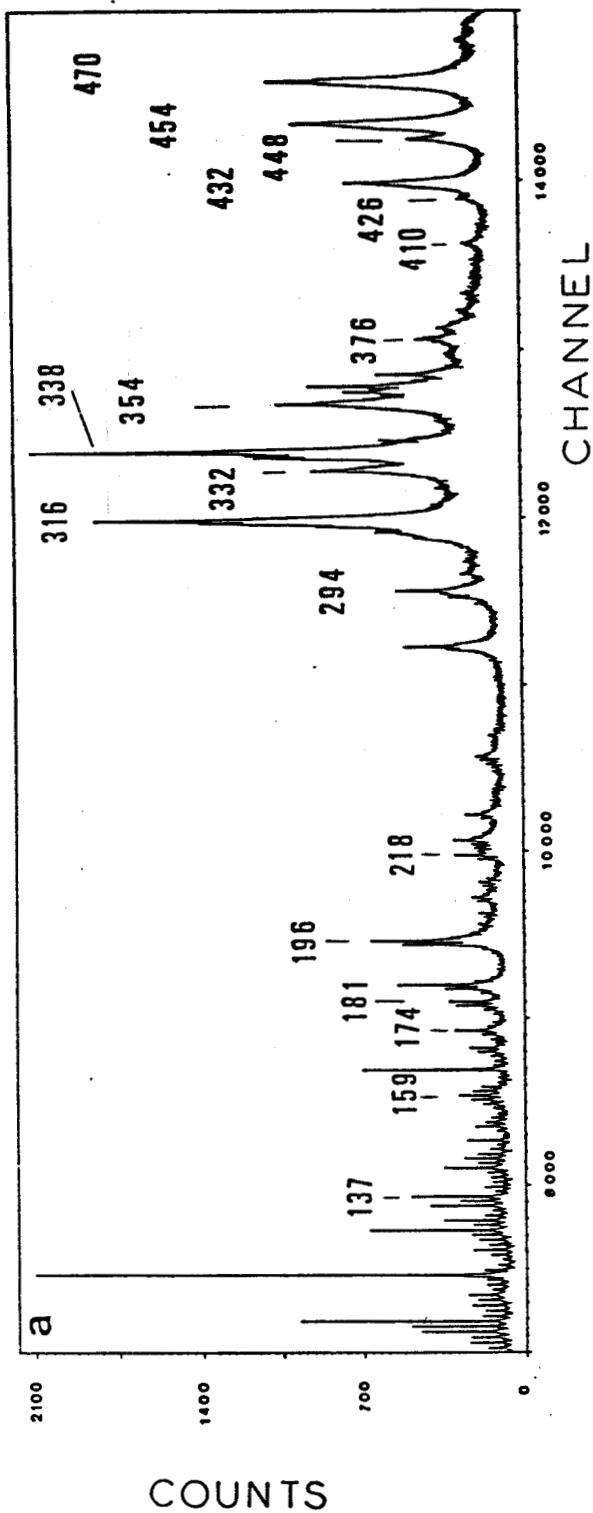
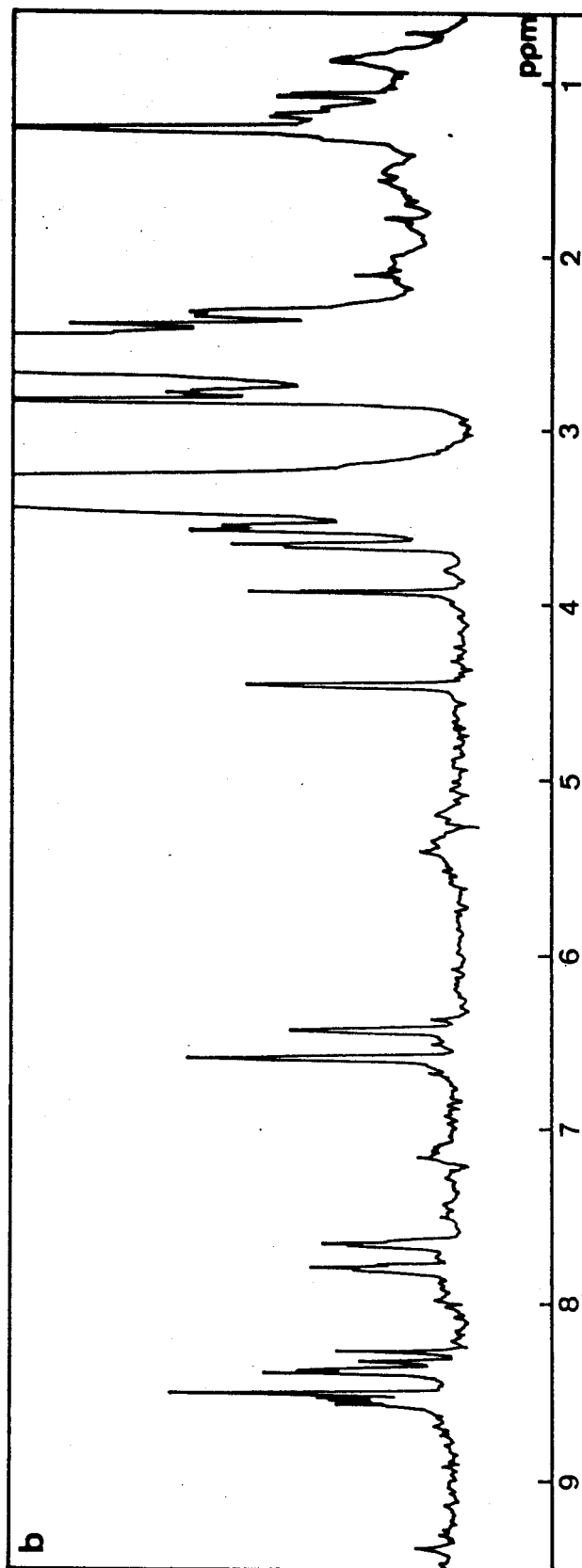
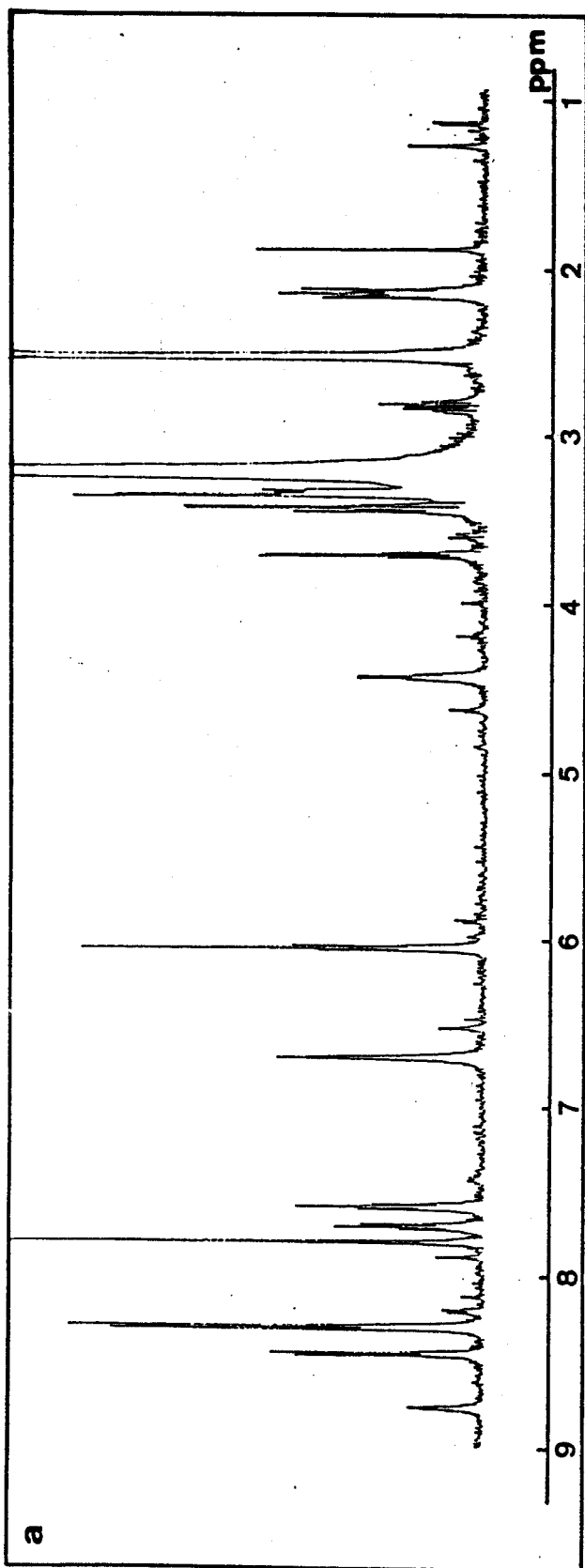


Chart 4 : 252-Cf time of flight mass spectra in the positive ionization mode of (a) dGuo-2-AQO, (b) dAdo-AQO. In the upper part of this spectrum, the scale is 6 times higher. The presence of each adduct is evidenced by observation of molecular ions and characteristic fragment ions (see Table I).

Chart 5 : 500 MHz NMR spectra of dGuo-2-AQO (part a) and dAdo-AQO (part b) in DMSO - d_6 . Concentrations were 550 μ g in 0.3 ml solvent for dGuo-2-AQO, and 100 μ g in 0.3 ml for dAdo-AQO . The chemical shifts were measured in ppm downfield from the DMSO (resonance at 2.5 ppm). In the case of dGuo-2-AQO, a resolution enhancement calculation was used (see Materials and Methods). Assignments were given in Table II for dGuo-2-AQO and Table III for dAdo-AQO.



b) Le dosage des adduits sur l'ADN

Pour poursuivre le travail et en particulier pour les études physicochimiques, il est important de connaître les quantités relatives de chaque adduit sur l'ADN modifié *in vitro* par l'Ac-4HAQO. Une méthode globale de dosage des adduits a été proposée au laboratoire, utilisant la spectrophotométrie d'absorption (GALIEGUE et al., 1980). Nous avons mis au point une méthode permettant de doser par spectrophotométrie le dGuo-C8-AQO. Chacun des adduits dGuo-C8-AQO, dGuo-N2-AQO et dAdo-N6-AQO a été évalué par clhp après hydrolyse enzymatique de l'ADN modifié.

1) Dosage par spectrophotométrie d'absorption de l'adduit sur le C8 de la guanine

En utilisant une propriété spectroscopique du composé dGuo-C8-AQO, nous avons pu mettre au point une méthode de dosage de ce composé sur l'ADN.

Le maximum de la bande d'absorption de cet adduit est situé à 365 nm à pH neutre et à 440 nm à pH basique (Figure 3, A). Cette propriété peut être observée sur les polymères modifiés par l'Ac-4HAQO, comme le montre la figure 3. A l'aide de ces spectres, il a été possible de calculer le taux de fixation de la quinoléine sur la C8 de la guanine, dans l'ADN modifié. La méthode de calcul est décrite dans la publication n° 6 :

Guanyl-C⁸-arylation of DNA by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide. A spectrophotometric titration.
Analytical Biochemistry, 1984 .

Nous trouvons ainsi que le dGuo-C8-AQO représente environ 30 % et 70 % de la modification totale de l'ADN, natif et dénaturé. Comme nous le décrivons, cette technique est rapide et ne possède pas les inconvénients de l'analyse quantitative des adduits après hydrolyse enzymatique ; cependant, sa sensibilité ne permet pas de l'utiliser sur de l'ADN qui a été modifié *in vivo*.

2) Analyse quantitative en clhp des trois principaux adduits après hydrolyse enzymatique de l'ADN

L'hydrolyse enzymatique de l'ADN modifié, utilisée pour faire

l'analyse quantitative des adduits, a été employée de deux façons différentes.

Une première approche a consisté à utiliser les dérivés quinoléiques marqués au tritium sur le carbone 2 du cycle. Cette technique ne nous a pas paru acceptable : en effet, après les étapes de purification de l'ADN modifié, d'hydrolyse enzymatique et d'analyse en clhp, le profil chromatographique obtenu en tritium faisait apparaître un bruit de fond correspondant à plus de 20 % de la radioactivité totale appliquée à la colonne de clhp. Devant l'imprécision de telles données, nous avons abandonné cette technique.

Nous avons alors utilisé les propriétés spectroscopiques des dérivés quinoléiques pour doser les adduits. Nous avons déterminé leur coefficient d'extinction molaire (Σ) à 365 nm. Pour cela nous avons hydrolysé de l'ADN modifié par l'Ac-4HAQO tritié et avons purifié chaque adduit par clhp semi-préparative. On obtient : $\Sigma_{365} \text{dGuo-C8-AQO} = 8200 \pm 500 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{l}$; $\Sigma_{365} \text{dGuo-N2-AQO} = 7500 \pm 500 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{l}$; $\Sigma_{365} \text{dAdo-N6-AQO} = 8000 \pm 500 \text{ mole}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{l}$. Dans le cas de dGuo-C8-AQO, une valeur de Σ_{365} inférieure avait été obtenue précédemment (voir publication n° 6). Ce résultat n'est pas surprenant : les deux méthodes de calculs sont différentes et lorsqu'on utilise un produit tritié, l'échange isotopique introduit une erreur sur l'estimation des valeurs de Σ . On peut néanmoins affirmer que les Σ des trois adduits sont peu différents.

Les nombreuses chromatographies (clhp semi-préparative) que nous avons été amenés à faire au cours de la préparation des adduits dGuo-N2-AQO et dAdo-N6-AQO, nous ont permis de mettre en évidence, et ce de façon reproductible, que l'adduit dGuo-N2-AQO était majeur pour l'ADN natif. Un de ces profils est représenté sur la figure 4.

Pour déterminer les proportions respectives des trois adduits, nous avons fait une intégration des pics clhp (par découpage et pesée du papier). Ces résultats, comparés à ceux obtenus en utilisant la mesure de la DO et le Σ à 365 nm de chaque fraction collectée, ont conduit aux estimations suivantes (+ 5 %) :

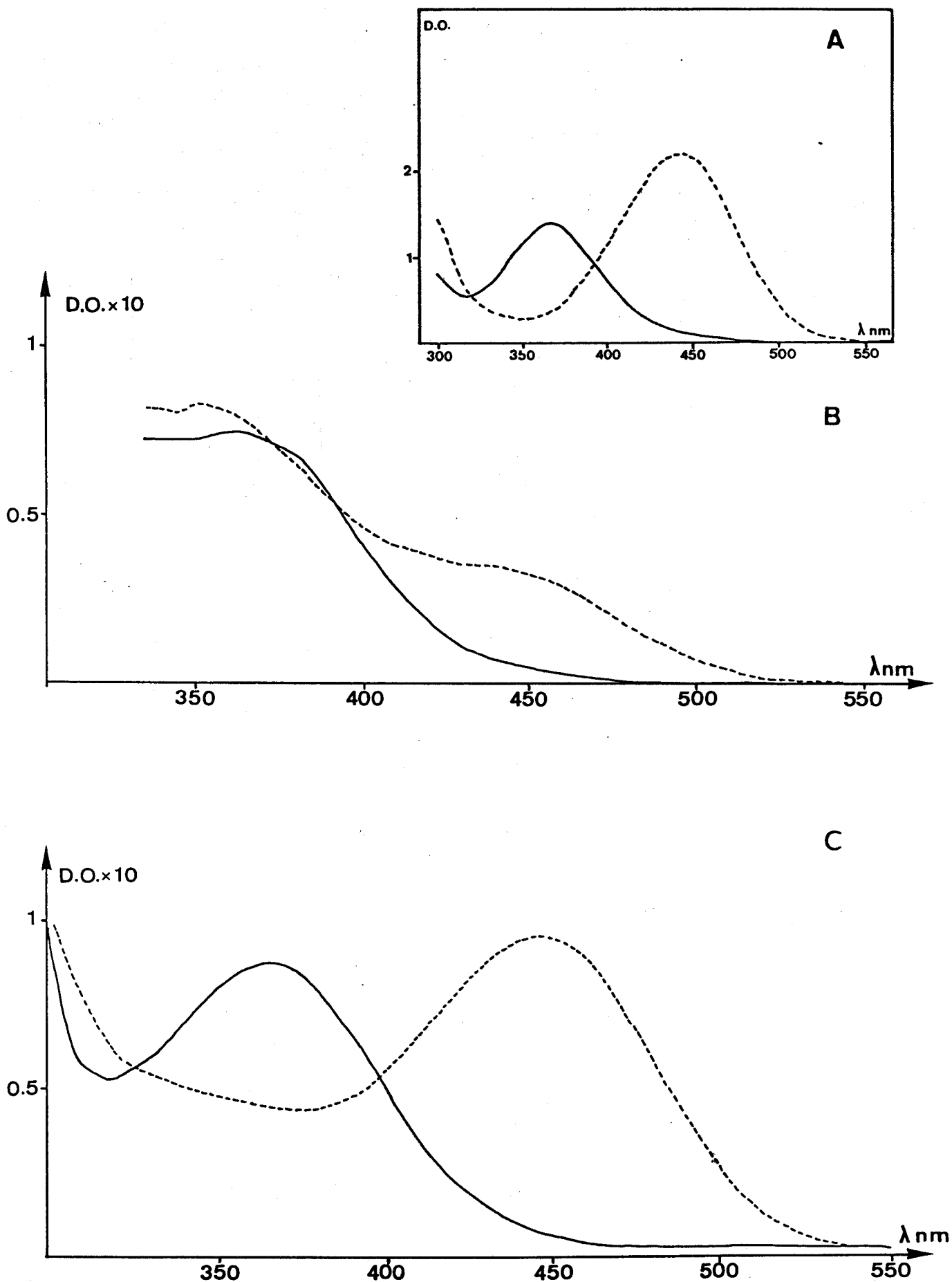
- dGuo-N2-AQO : environ 50 %
- dGuo-C8-AQO : environ 25 %
- dAdo-N6-AQO : environ 10 %

Le pic situé au temps de rétention de 18 m n. représente une fraction d'oligonucléotides modifiés non hydrolysés et contient également

du 4AQO ; l'hydrolyse n'est donc pas totale. Cette fraction non digérée additionnée du 4AQO représente environ 15 % de l'absorption totale.

L'évaluation quantitative à l'aide des surfaces des pics appliquée à un ADN modifié *in vivo* a donné le résultat suivant : les trois adduits (dGuo-N2-AQO, dGuo-C8-AQO, dAdo-N6-AQO) sont obtenus avec des proportions 3/2/1 respectivement. La figure 5 montre le profil clhp de cet hydrolysât d'ADN. Les proportions relatives des principaux adduits quinoléine-base sont donc peu différentes, *in vitro* et *in vivo*, du moins dans le système d'ascite que nous employons.

Lorsque la réaction de l'Ac-4HAQO avec l'ADN natif est faite *in vitro* dans d'autres conditions de pH ou de température, les trois adduits sont obtenus suivant des rapports sensiblement différents. Par exemple à pH 9,7 et à 4°C, la réaction se fait préférentiellement sur le N2 de la guanine (80 %).



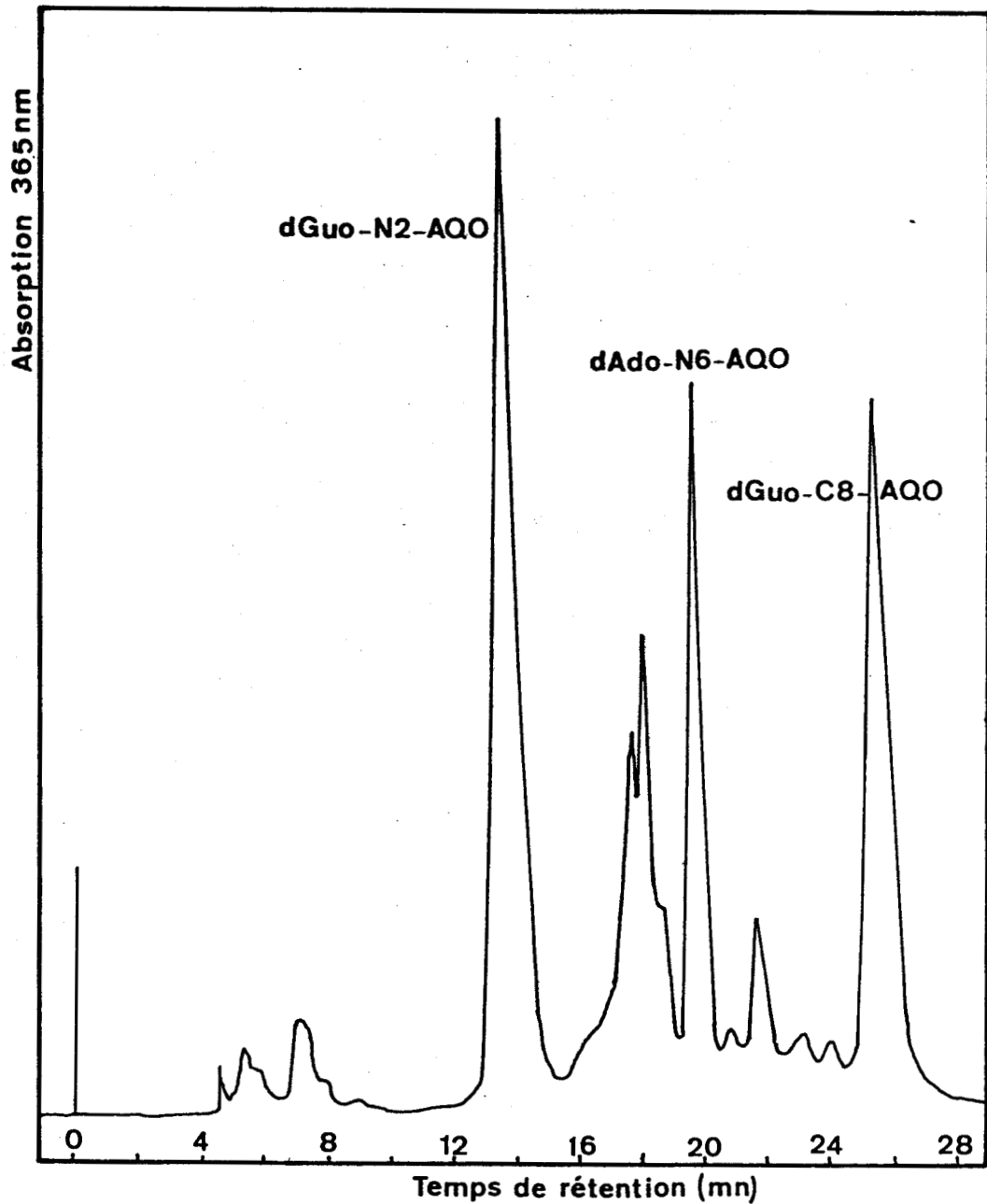


Figure 4 - Profil de clhp semi-préparative d'un hydrolysate d'ADN modifié par l'Ac-4HAQO. Après réaction avec l'Ac-4HAQO, l'ADN est purifié par des précipitations successives à l'éthanol, il est ensuite soumis à l'action de la DNase et des phosphodiésterases, puis de la phosphatase alcaline (voir publications n° 3 et n° 5). L'hydrolysate est analysé par clhp, la détection est faite à 365 nm. Les composés sont élués avec un gradient non linéaire, tout d'abord en tampon (1,5 mM NaH₂ PO₄, 0,4 mM EDTA, pH 6) pendant 12 minutes, puis dans le même tampon contenant 30 % de méthanol.

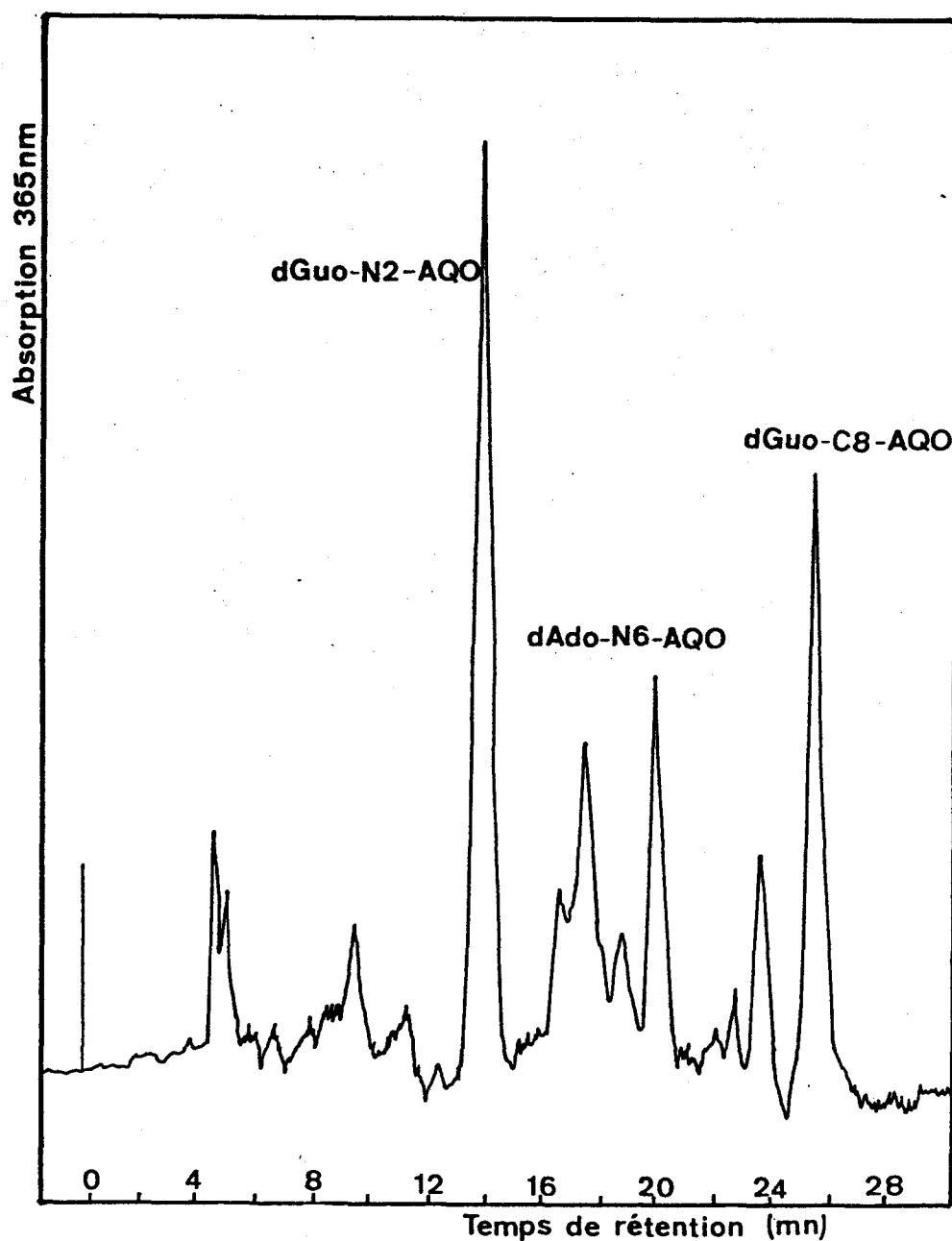


Figure 5 - Profil de clhp semi-préparative d'un hydrolysate d'ADN extrait d'une ascite (hépatome de ZAJDELA) traitée au 4HAQO. 10^9 cellules sont lavées puis mises en survie dans une boîte NUNCLON 150 cm² contenant 100 ml de milieu 199E (Eurobio) additionné de 20 % de sérum de Veau foetal. Une heure après l'ensemencement, le 4HAQO est ajouté dans la culture à une concentration 3×10^{-4} M. Deux heures après le traitement, les cellules sont centrifugées, l'ADN est alors extrait par la méthode de Marmur. Après purification, cet ADN est soumis à l'hydrolyse enzymatique. L'hydrolysate obtenu est analysé par détection de l'absorption à 365 nm, la chromatographie étant effectuée dans les mêmes conditions que pour l'ADN modifié in vitro (fig. 4).

ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 138, 454-457 (1984)

Guanyl-C⁸-Arylamination of DNA by the Ultimate Carcinogen of 4-Nitroquinoline-1-oxide: A Spectrophotometric Titration

SYLVIE GALIÈGUE-ZOÛITINA, BERNARD BAILLEUL,
AND MARIE-H. LOUCHEUX-LEFEBVRE¹

Institut de Recherches sur le Cancer et Unité 124 de l'INSERM BP 311, 59020 Lille Cédex, France

Received February 15, 1983

Native and denatured DNAs and polynucleotides were modified by 4-acetoxyaminoquinoline-1-oxide, the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline-1-oxide (4 NQO). The *N*-(deoxyguanosin-C⁸-yl)-4-aminoquinoline-1-oxide adduct, the so-called "dG III," was quantified on the DNA and on poly(dG-dC) in absorption spectroscopy, by using a spectral property of dG III, i.e., the variation of the absorption spectrum as a function of the pH. Using the "free-dG III" absorption reference spectra, a simple graphic determination of the percentage of dG III was established by recording the absorption spectra of the 4-acetoxyaminoquinoline-1-oxide-modified polymers. It was found that the dG III adduct accounts for about 30% of the total modification in the case of native modified DNA and poly(dG-dC) and for about 70% in the case of denatured modified DNA.

KEY WORDS: carcinogen; 4-nitroquinoline-1-oxide; DNA arylation; absorption spectroscopy; adduct; titration.

It is well known that interaction of the ultimate metabolite of a chemical carcinogen with DNA constitutes a critical event and could be responsible for the carcinogenesis by these substances (1). In the case of 4-nitroquinoline-1-oxide (4 NQO)² (see for reviews (2,3)), we proved that the monoacetyl derivative of 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide, which is obtained from *O,O'*-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide (4-7), constitutes a very attractive model for the *in vitro* study of carcinogenesis by this compound (8,9). Concerning the NQO adducts, one structure was proposed for an adenine adduct (10), and we recently described the synthesis of a guanyl-C⁸-arylation product after a direct reaction between 4-acetoxyaminoquinoline-1-oxide and deoxyguanosine (11). This adduct, which we called dG III, was recovered

from DNA after enzymatic hydrolysis of *in vitro* 4-acetoxyaminoquinoline-1-oxide-modified DNA (8) and *in vivo* 4 NQO-modified DNA (11). These results are strengthening the interest in dG III. Therefore, it seemed important to evaluate the exact amount of C⁸-arylation on the modified DNA. This was done by making use of a spectrophotometric property of the adduct dG III: at neutral pH, this compound exhibits an absorbance band centered at 365 nm, which shifts to 440 nm at basic pH (11). Indeed at basic pH a deprotonation of the guanine occurs, which leads to an electronic delocalization on the quinoline ring. This is accompanied by a bathochrome effect in the dG III spectrum.

We propose here a rapid method for evaluating the amount of dG III on native and denatured DNA and on polynucleotides. First we verified that this adduct alone was responsible for the absorption spectrum using modified poly(dA-dT) and modified poly A as references. Our results are compared with

¹ To whom correspondence should be addressed.

² Abbreviation used: 4 NQO, 4-nitroquinoline-1-oxide.

those previously obtained after enzymatic hydrolysis of the modified DNA.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. 4 NQO was obtained from Fluka AG (Switzerland). 4-Acetoxyaminoquinoline-1-oxide was prepared as previously described (11). The DNA from chicken erythrocytes was the same as previously used (6,9). The polynucleotides poly(dG-dC) and poly(dA-dT) were purchased from P-L Biochemicals. Poly A was obtained from Miles.

Instrumentation. The absorption spectra were recorded in the range 550–300 nm using a Cary 118 C spectrophotometer.

Preparation of dG III adduct. dG III was prepared as previously described (11).

Preparation of 4-acetoxyaminoquinoline-1-oxide-modified DNA and polynucleotides. 4-Acetoxyaminoquinoline-1-oxide-modified DNA was prepared as previously described (8,9). The samples of native modified DNA have about 3% of modified bases and the samples of denatured DNA have 3 and 6% of modified bases.

Modified poly(dG-dC) (6% of modified bases), modified poly(dA-dT) (2% of modified bases), and modified poly A (3% of modified bases) were obtained in the same manner as for DNA, using the unlabeled 4-acetoxyaminoquinoline-1-oxide for the absorption spectroscopy study. For the determination of the molar extinction coefficients at 365 nm, three samples were also prepared in the same manner but with ³H-labeled 4-acetoxyaminoquinoline-1-oxide (8,9). The ϵ^{365} values were determined as previously described for the modified DNA (6).

RESULTS AND DISCUSSION

I. Detection of the dG III Adduct on 4-Acetoxyaminoquinoline-1-oxide-Modified DNA and Poly(dG-dC)

The presence of the dG III adduct on the modified polymers was shown by recording the absorption spectra of 4-acetoxyamino-

quinoline-1-oxide-modified native and denatured DNAs and of modified poly(dG-dC) in media near neutrality and in alkaline media. These spectra were compared with those of the nucleoside dG III adduct obtained in the same conditions from 550 to 300 nm (11). The ϵ values of the nucleoside dG III adduct were calculated at 365 nm at neutral pH and 440 nm at basic pH. We obtained 6220 liters mol⁻¹ cm⁻¹ and 9830 liters mol⁻¹ cm⁻¹, respectively.

The spectra (not shown) of the modified native DNA, modified denatured DNA, and modified poly(dG-dC) exhibit the same characteristics indicating the presence of dG III on the macromolecules. In the case of the native modified DNA and modified poly(dG-dC) in alkaline medium there is a shoulder only at 440 nm. Table 1 gives, for all the modified polymers studied, the values of the ratios of absorbance at 440 and 365 nm in alkaline and neutral media, respectively. From the values given in Table 1 we can conclude that adducts other than dG III—and especially the adenine adducts—do not absorb at 440 nm in alkaline media. That means that under this condition only dG III is responsible for this absorption band.

II. Evaluation of the Percentage of dG III Adduct on the 4-Acetoxyaminoquinoline-1-oxide-Modified Polymers

For all the modified polymers, the absorbance at 440 nm at alkaline pH, A_P^{440} , refers only to the dG III adduct, whereas the absorbance at 365 nm at neutral pH, A_P^{365} , refers to dG III adduct and others. Therefore we can write

$$A_P^{365} = \epsilon_P^{365} \cdot C_T \cdot l$$

$$A_P^{440} = \epsilon_{b-dG III}^{440} \cdot [b-dG III] \cdot l$$

in which ϵ_P^{365} and $\epsilon_{b-dG III}^{440}$ (expressed in liters mol⁻¹ cm⁻¹) represent, respectively, the average ϵ value at 365 nm for all the adducts at neutrality and at 440 nm for the dG III adduct at alkaline pH, C_T is the total concentration of bound carcinogen (expressed in mol li-

TABLE I

SPECTROPHOTOMETRIC DATA OF THE 4-ACETOXYAMINOQUINOLINE-1-OXIDE-MODIFIED POLYMERS

Modified polymers	A_P^{440}/A_P^{365} ^a	Average ϵ^{365} ^b (mol ⁻¹ cm l ⁻¹)	Percentage of bound dG III ^c
Native DNA	0.48	5500 ± 200 (6)	26.9
	0.53	Total adducts	29.7
Denatured DNA	1.12	6200 ± 200 (6)	70.8
	1.07	Total adducts	67.7
Poly(dG-dC)	0.45	6400 ± 200	29.4
	0.47	Guanine adducts	30.7
Poly(dA-dT)	0	6000 ± 200 Adenine adducts	0
Poly A	0	5800 ± 200 Adenine adducts	0
Nucleoside-dG III adduct	1.6	6220 ± 100 ^c	100

^a Ratios of absorbances at 440 and 365 nm of the different modified polymers in alkaline and neutral media, respectively.

^b Molar extinction coefficient values at 365 nm at neutral pH of different polymers.

^c The ϵ^{365} value of the nucleoside-dG III adduct.

^d Titration of the dG III-adduct.

ters⁻¹), and l is the path length of the cell (expressed in cm). Combining the two equations one obtains

$$\frac{A_P^{440}}{A_P^{365}} = \frac{\epsilon_{b-dG III}^{440} [b-dG III]}{\epsilon_P^{365} \cdot C_T}$$

$$= \frac{\epsilon_{b-dG III}^{440}}{\epsilon_P^{365}} \times \% b-dG III.$$

This equation makes possible the determination of the percentage of the dG III adduct bound to DNA (b-dG III). Indeed, A_P^{440} and A_P^{365} are given by the experimental spectra recorded at pH 12 and pH 7, respectively (Table 1). ϵ_P^{365} at neutral pH was previously determined (6). It is 5500 ± 200 and 6200 ± 200 liters mol⁻¹ cm⁻¹ for the native modified and denatured modified DNA, respectively, and 6400 ± 200 liters mol⁻¹ cm⁻¹ for the modified poly(dG-dC) (Table 1). $\epsilon_{b-dG III}^{440}$ at pH 12 was assumed to be similar to the extinction coefficient of the nucleoside-dG III adduct, that is, 9830 liters mol⁻¹ cm⁻¹. This hypothesis is likely at 440 nm because we showed that it

is acceptable at 365 nm at neutral pH. Indeed we have calculated the average value of the molar extinction coefficients ϵ_P^{365} for the adenine adducts (formed on poly A and poly(dA-dT) · poly(dA-dT)) and for the guanine adducts (formed on poly(dG-dC) · poly(dG-dC)). One observes (Table 1) that these values are almost the same as those of the total adducts on native and denatured DNA and of the nucleoside-dG III adduct. Therefore in all cases (native DNA, denatured DNA, poly(dG-dC)) we used the same value of 9830 for $\epsilon_{b-dG III}^{440}$ at pH 12. Moreover, we showed that after 5 min heating at 100°C of a native modified DNA (which leads to the denaturation of the double helix), the absorption spectrum obtained at basic pH exhibited a band at 440 nm with the same intensity as before denaturation. This means that the $\epsilon_{b-dG III}^{440}$ value is the same whether the structure of the polymer is single or double stranded.

Thus we found that there is 70% of dG III on the denatured modified DNA, 28% on the native modified DNA, and 30% on the mod-

ified poly(dG-dC) (Table 1). These results have to be compared with those we have previously obtained after enzymatic hydrolysis of the 4-acetoxyminoquinoline-1-oxide-modified DNA (8). In the case of native DNA, only 13% of dG III was recovered in the hydrolysate, and in the case of denatured DNA, we found only 49% of dG III. These values were lower than those we obtained with the spectroscopic determination and this is in agreement with our previous observations concerning the instability and the degradation of the dG III adduct during the enzymatic hydrolysis (8). Obtaining a greater percentage of dG III in the case of the denatured DNA indicates that the secondary structure of DNA influences the formation of the adduct. Our results can be compared with those previously obtained by Fuchs (12) in the case of *N*-acetoxy-*N*-2-acetylaminofluorene-modified DNA, which also showed the influence of secondary structure of DNA on the formation of one adduct. In this case, the C-8 guanyl adduct is a major adduct, and its extent is 100% on denatured DNA. In the same manner, in the case of acetoxyminoquinoline-1-oxide-modified DNA the single-stranded DNA structure favors the reaction of the carcinogen on the C-8 of guanine (70%), which is a chemically more reactive position.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Professor G. Biserte for stimulating discussions and constant help and C. Denis for excellent technical assistance. This work was supported by an INSERM grant (ATP 79-109).

REFERENCES

1. Miller, E. C. (1976) *Cancer Res.* 38, 1479-1496.
2. Endo, H., Ono, T., and Sugimura, T. (1971) *Recent Results Cancer Res.* 34, 1-99.
3. Sugimura, T. (1981) in *Carcinogenesis. A Comprehensive Survey: The Nitroquinolines*, Vol. 6, pp. 1-159, Raven Press, New York.
4. Kawazoe, Y., and Araki, M. (1967) *Gann* 58, 485-487.
5. Kawazoe, Y., Ogawa, O., and Huang, G. F. (1980) *Tetrahedron* 36, 2933-2938.
6. Galiègue, S., Lecocq, G., and Loucheux-Lefebvre, M. H. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 609, 383-391.
7. Galiègue, S., Bailleul, B., and Loucheux-Lefebvre, M. H. (1980) *Eur. J. Cancer* 16, 1283-1287.
8. Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B., and Loucheux-Lefebvre, M. H. (1983) *Carcinogenesis* 4, 249-254.
9. Galiègue, S., Bailleul, B., Loucheux-Lefebvre, M. H., and Laval, J. (1982) *Carcinogenesis* 3, 435-438.
10. Kawazoe, Y., Araki, M., Huang, G. F., Okamoto, T., Tada, M., and Tada, M. (1975) *Chem. Pharm. Bull.* 23, 3041-3043.
11. Bailleul, B., Galiègue, S., and Loucheux-Lefebvre, M. H. (1981) *Cancer Res.* 41, 4559-4565.
12. Fuchs, R. P. P. (1978) *Anal. Biochem.* 91, 663-673.

c) Conclusion

Les structures des trois principaux adduits isolés sur l'ADN modifié sont parfaitement en accord avec le mécanisme réactionnel du composé monoacétylé du 4HAQO. L'agent réactif, l'arylnitrénium, est en équilibre avec le carbénium en α (carbone 3 de la quinoléine). Le nitrénium attaque le C8 de la guanine, le carbénium le N² de la guanine ou le N⁶ de l'adénine. L'agent réactif se fixe principalement sur le C8 de la guanine lorsque celle-ci n'est pas appariée (guanosine ou ADN dénaturé). Au contraire, la forme carbénium réagit de façon plus importante sur l'ADN natif : le dGuo-N2-AQO et le dAdo-N6-AQO représentent, à eux deux, environ 60 % de la réaction sur l'ADN double brin.

Trois adduits avaient également été obtenus par d'autres auteurs, après hydrolyse acide d'ADN modifié par le 4HAQO, en présence de l'aminocyl-tRNA synthétase (IKEGAMI et al., 1970 ; TADA et al., 1971 ; 1976). A ces trois composés s'ajoute le 4AQO, que ces auteurs ont postulé provenir de la décomposition d'un autre adduit instable, formé avec la guanine. Il est en effet possible que le 4AQO, que nous obtenons dans nos hydrolysats d'ADN, provienne d'un autre adduit guanine, mais nous n'en avons pas la preuve formelle.

L'équipe de TADA a récemment publié un dosage des quatre adduits (YOSHIDA et al., 1984) et vient également de montrer que le composé qu'ils nomment QGI correspond à l'adduit dGuo-C8-AQO que nous avons isolé (TADA et al., sous presse). Ils n'ont pas, à l'heure actuelle, proposé d'autres structures d'adduits. Le tableau ci-dessous permet de faire une comparaison entre leurs résultats de dosage et les nôtres.

Résultats de l'équipe de TADA	QGI	QGII	QGIII (4AQO)	QAII
Pourcentages obtenus	16.4	47.3	13.7	22.6
Nos résultats	dGuo-C8-AQO	dGuo-N2-AQO	Autres (4AQO)	dAdo-N6-AQO
Pourcentages obtenus	25	50	15	10

Actuellement aucun argument ne permet de dire que QGII représente l'adduit sur le N² de la guanine. Si cela était prouvé, nous pourrions dire que l'Ac-4HAQO induit sur l'ADN des lésions identiques à celles obtenues après activation du 4HAQO par la séryl-tRNA synthétase.

Tout récemment REDDY, M.V. et al., (1984) ont visualisé, à l'aide d'une méthode très sensible de marquage au phosphore 32, 8 adduits sur l'ADN extrait de cellules de peau de Souris traitée au 4NQO. Trois de ces adduits sont obtenus en très faible quantité (environ 5 %). Parmi les 8 composés détectés par ces auteurs, nous pensons que cinq d'entre eux pourraient correspondre à : dGuo-C8-AQO, dGuo-N2-AQO, dAdo-N6-AQO et aux deux composés d'ouverture du cycle imidazole. Dans ce laboratoire ils ont en effet visualisé par cette technique les deux isomères du produit d'ouverture du cycle purique obtenus dans le cas de l'aminofluorène (GUPTA et al., 1984). Les 3 autres composés pourraient être le (ou les) adduit(s) dont la décomposition conduit au 4AQO que nous avons visualisé. Ce peut être aussi d'autres adduits mineurs, ou des produits de dégradation d'un ou de plusieurs adduits.

Le rôle des composés de substitution induits par le 4NQO dans la cancérogénèse par ce composé, n'a pas été étudié. Un certain nombre de remarques nous semblent cependant intéressantes à formuler à ce niveau.

Dans la partie "Généralités" nous avons montré le rôle joué par la fonction acétyle du fluorène dans la conformation de l'ADN, après fixation du 2AAF ou du 2AF sur le C8 de la guanine. Dans le cas du 4NQO le composé de substitution de ce site ne peut être acétylé. Il ne faut cependant pas penser que les propriétés du dGuo-C8-AQO soient analogues à celles du composé dGuo-C8-AF. En effet, les dérivés du 4NQO diffèrent beaucoup de ceux du fluorène, par le nombre de cycles et surtout par la présence de la fonction N-oxyde.

L'adduit dGuo-C8-AQO pourrait peut-être jouer un rôle *in vivo*, par la formation du composé d'ouverture du cycle imidazole. Nous n'avons actuellement aucune preuve de l'existence *in vivo* du r.o. dGuo-C8-AQO. De nombreuses études permettent cependant d'émettre cette hypothèse. Le dérivé d'ouverture en 8-9 de l'adduit de l'aflatoxine B₁ persiste dans l'ADN hépatique et jouerait un rôle important dans sa cancérogénèse (CROY et al., 1981). De manière similaire, le dérivé de substitution du C8 de la guanine par la 2-naphtylamine, qui s'hydrolyse spontanément en dérivé de 8,9 ouverture du

cycle, est présent *in vivo* dans le tissu cible. Il est également présent dans le foie qui n'est pas un organe cible, mais en quantité 4 à 8 fois inférieure. De plus, c'est dans le tissu cible que ce dérivé persiste le plus longtemps (KADLUBAR et al., 1981a). Enfin, l'existence *in vivo* du composé d'ouverture du cycle de l'adduit dGuo-C8-AF a été montrée de deux manières différentes : par hydrolyse acide et analyse clhp (VISSER et al., 1981) et par radio-immunologie (RIO et al., 1982).

Les adduits sur le N² de la guanine sont souvent retrouvés dans le cas des amines aromatiques (HEMMINKI, 1983), et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (MEEHAN et al., 1977). Dans le cas de la première classe de composés, ces adduits sont rarement majeurs, sauf pour le 4-amino-biphényle (KRIEK et HENGEVELD, 1978). Ces composés de substitution ont peut-être une importance biologique car ils correspondent à une région d'appariement des bases et, de plus, ils sont souvent persistants *in vivo* (KRIEK et HENGEVELD, 1978 ; TULLIS et al., 1981 ; WESTRA et al., 1976). Il n'est cependant pas évident de comprendre de quelle manière ils pourraient constituer des lésions prémutagènes. KADLUBAR a proposé un modèle pour expliquer l'induction de mutations par transversion par l'AAF et le benzo(a)pyrène au niveau des adduits sur le N² de la guanine. Cet auteur suggère que le passage en conformation syn de ces adduits entraînerait un mauvais appariement de la guanine modifiée avec une autre guanine (KADLUBAR, 1980). Ce modèle, s'il peut être vérifié expérimentalement, n'est cependant pas universel.

Les composés de substitution du N⁶ de l'adénine sont plus rarement formés. Citons pour les amines aromatiques les exemples du phénanthrène (SCRIBNER et NAIMY, 1975), du stilbène (SCRIBNER et al., 1979) et de la 2-naphtylamine (KADLUBAR et al., 1980). Plusieurs auteurs ont postulé que ces adduits pourraient avoir un rôle dans la mutagénèse en induisant de mauvais appariements de la base modifiée (KADLUBAR et al., 1980 ; TULLIS et al., 1981 ; PHILLIPS et al., 1981).

Le chapitre III est consacré aux études physicochimiques effectuées sur l'ADN (S. GALIEGUE-ZOUITINA), le poly(dG-dC).poly(dG-dC) (B. BAILLEUL) modifiés par l'Ac-4HAQO.

CHAPITRE III - ETUDES CONFORMATIONNELLES DU POLY (dG-dC).POLY (dG-dC)

MODIFIE PAR l'Ac-4HAQO

a) Conformations du poly (dG-dC).poly (dG-dC) modifié par l'Ac-4HAQO

De nombreuses études concernant la conformation du poly (dG-dC).poly (dG-dC) modifié par des cancérrogènes et d'autres substances chimiques, ont permis d'obtenir des résultats intéressants concernant la géométrie de la lésion. Reprenons rapidement l'exemple du N-AAAF. Le changement de structure du polymère (passage de la forme B à la forme Z) a parfaitement pu être corrélié à la modification infligée au niveau du lien N-glycosidique base-sucre par le cancérrogène (SAGE et al., 1980 ; BROYDE et al., 1983 ; LENG et al., 1980 ; EVANS et al., 1980), la technique utilisée pour visualiser le changement de conformation du poly (dG-dC).poly (dG-dC) est le dichroïsme circulaire. Le changement de signe du signal dichroïque entre 230 et 300 nm correspond à l'inversion du sens d'enroulement de l'hélice, c'est-à-dire à la transition forme B-forme Z (POHL et al., 1972 ; WANG et al., 1979 ; ARNOTT et al., 1980). Le spectre dichroïque au-dessous de 200 nm est également caractéristique des hélices d'enroulement droit et gauche (SUTHERLAND et al., 1981) mais pour des raisons techniques nous n'avons pu utiliser ce domaine spectral.

Nous avons abordé au laboratoire l'étude de la conformation du poly (dG-dC).poly (dG-dC) modifié par l'Ac-4HAQO. Une étude de sensibilité à l'endonucléase S_1 a également été réalisée. L'ensemble de ce travail est décrit dans la publication n° 7, que nous reproduisons ci-après :

Conformations of poly(dG-dC).poly(dG-dC) modified by the O-acetyl derivative of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide.

Nucleic Acids Res., 1984.

A la suite de cette publication nous reviendrons sur certains points qui, pour des raisons de place, n'ont pu être évoqués dans l'article, mais qui étaient notre propos.

Volume 12 Number 20 1984

Nucleic Acids Research

Conformations of poly(dG-dC).poly(dG-dC) modified by the O-acetyl derivative of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide

B.Bailleul, S.Galiègue-Zouitina and M.H.Loucheux-Lefebvre⁺

Unité INSERM no 124, Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, Place de Verdun, 59045 Lille Cédex, France

Received 25 July 1984; Revised and Accepted 28 September 1984

ABSTRACT

Poly(dG-dC).poly(dG-dC) has been modified by reaction with 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide (Ac-4 HAQO), the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide. The circular dichroism (CD) spectra of the modified and unmodified polymers have been compared under various experimental conditions. The CD spectra were recorded in 1 mM phosphate, 50 % (v/v) ethanol, 3.8 M LiCl and 95 % (v/v) ethanol, conditions in which poly(dG-dC).poly(dG-dC) adopts the B-, Z-, C- and A-form respectively. In 1 mM phosphate buffer, poly(dG-dC).poly(dG-dC) modified by Ac-4 HAQO seems not to contain regions in the Z-form. Z-form induction could be progressively obtained by the addition of ethanol as follows : in the buffer with about 30 % ethanol the modified polymer started to adopt the Z structure, while 40 % of ethanol in the buffer was necessary for the unmodified polymer. In the 50 % ethanol-1 mM phosphate buffer mixture (v/v), poly(dG-dC).poly(dG-dC) was entirely in the Z-form while poly(dG-dC).poly(dG-dC) modified by Ac-4 HAQO remained partially in the B-form.

Enzymatic digestions with the nuclease S1 which is specific of the single-stranded DNA were carried out in order to support the modified poly(dG-dC).poly(dG-dC) CD study conclusions. The role played by the two major adducts on the conformational characteristics of modified polymer is discussed.

INTRODUCTION

Most and perhaps all the chemical carcinogens, after their metabolic activation, bind covalently to cellular macromolecules and in particular to DNA (1). This event modifies the native structure of DNA and such a modification can be demonstrated by physico-chemical studies. Various authors have proposed different models for representing the interaction between DNA and carcinogens (2-5).

The discovery of another nucleic acid structure, termed the Z-form (6, 7) and some arguments about the existence of the Z-form *in vivo* (6, 8) have been a stimulus in the search for the biological significance of Z-DNA. In particular experimental conditions i.e. high salt concentration or 60 % alcohol (9, 10) the synthetic polymer poly(dG-dC).poly(dG-dC) adopts the Z-form. The modified bases can also favor the induction of the Z-form as for example after the covalent binding of the carcinogen N-acetoxy-N-acetyl-2-

Nucleic Acids Research

aminofluorene (N-AcO-AAF) to DNA as shown by Sage and Leng (11) and Santella *et al.* (12). In their cases the polymer modification occurs mainly on the C-8 of guanosine residues, by *in vitro* reaction between N-AcO-AAF and poly(dG-dC).poly(dG-dC) (13), and it has been shown that in the corresponding adduct N-(deoxyguanosin-8-yl) acetyl-aminofluorene, the deoxyribose preferentially adopts the *syn* conformation (14, 15). In the present work the conformation of poly(dG-dC).poly(dG-dC) modified by the chemical carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide (4 NQO) has been characterized by circular dichroism and by the action of the single-stranded DNA specific nuclease S_1 . From non-enzymatic *in vitro* reaction between poly(dG-dC).poly(dG-dC) and 4-acetoxyaminoquinoline 1-oxide (Ac-4 HAQO), a ultimate carcinogen of 4 NQO (16, 17), a modified poly(dG-dC).poly(dG-dC) has been obtained.

The HPLC analysis of this modified polymer after enzymatic hydrolysis showed the presence of two major guanyl adducts (18). One of them has been identified as N-(deoxyguanosin-C⁸-yl)-4-aminoquinoline 1-oxide (16). This adduct is easily quantified on the DNA and on the poly(dG-dC).poly(dG-dC) by absorption spectrometry (19). It was found that the C-8 guanyl adduct accounts for about 30 % of the total modification in the case of native DNA and poly(dG-dC).poly(dG-dC) and for 70 % in the case of denaturated DNA (19). A comparison with the fluorene derivatives was interesting to do in particular with this one obtained by N-OH-AF (11) reaction, because it exhibits similar properties as C-8 guanyl adduct of 4 NQO.

MATERIALS AND METHODS

Poly(dG-dC).poly(dG-dC) was purchased from P.L. Biochemicals. S_1 -endonuclease from *Aspergillus oryzae* was obtained from Boehringer Mannheim. Ac-4 HAQO was synthesized from O,O'-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide (20) as previously described (16).

The reaction between Ac-4 HAQO and poly(dG-dC).poly(dG-dC) was performed by two different ways. The first one is corresponding to the method previously described for the modification of DNA at 37°C (21). The second one is the following : poly(dG-dC).poly(dG-dC) was reacted with Ac-4 HAQO at 95°C which is a temperature where the polymer adopts a single-stranded conformation. Then the temperature of the solution was gradually reduced to room temperature and the purification of the polymer carried out as in (21). In some cases two or three successive incubations with Ac-4 HAQO were performed in order to increase the yield of the reaction. We will refer to poly(dG-dC).poly(dG-dC) after its reaction with Ac-4 HAQO as poly(dG-dC)-4 NQO (37°C) or

poly(dG-dC)-4 NQO (95°C) according to the reaction temperature.

The percentage of global modified bases and of C-8 guanyl adduct was deduced from spectrometric studies as previously described (19, 22).

HPLC analysis was carried out on a Waters system consisting of a U6K injector, two 6000 A pumps, a Model 660 solvent programmer and a Model 440 dual-wavelength detector.

The sedimentation coefficients of poly(dG-dC).poly(dG-dC) and poly(dG-dC)-4 NQO (37°C; 7% of modified bases) were determined with an analytical ultracentrifuge Beckman E type equipped with a scanning device (23). The sedimentation coefficients in 100mM NaCl, 5mM Tris-HCl, pH 7.5 at 16°C of unmodified and modified polymers are 11.9 and 12.9 S (+ 0.2) respectively.

Ultra-violet absorption spectra were recorded with a Cary 219 spectrophotometer and the circular dichroism (CD) spectra with a Jobin-Yvon R.J. Mark III dichrograph. All spectra were recorded with solutions of initial optical densities of 0.4 at 260 nm.

The hydrolysis and the determination of S_1 efficiency was performed as previously described (21). The standard mixtures (2.19 ml) containing the various polymers [289 nmol of poly(dG-dC)-4 NQO or 308 nmol of poly(dG-dC).poly(dG-dC) or 430 nmol of untreated native DNA or 430 nmol of untreated denatured DNA] and the enzyme (350 units of S_1 -nuclease) were incubated at 37°C.

RESULTS

Reaction between Ac-4 HAQO and poly(dG-dC).poly(dG-dC)

The percentages of global modified bases and C-8 guanyl adduct obtained from spectroscopic determination are given Table I. One observes that the percentage of C-8 guanyl adduct is very dependent of the reaction temperature(19): at 95°C it is three times more important than at 37°C. This result was confirmed by the HPLC analysis of different modified polymers after enzymatic hydrolysis.

Circular dichroism study

The circular dichroism spectra of poly(dG-dC).poly(dG-dC) and different poly(dG-dC).poly(dG-dC)-4 NQO samples (Table I) were recorded in 1 mM phosphate buffer (pH 7.2) in which increasing quantities of ethanol were added. Figure 1 shows the spectra obtained for poly(dG-dC).poly(dG-dC) and poly(dG-dC)-4 NQO (4.7% ; 95°C) in buffer and in solutions containing 34%, 46 % and 58 % ethanol. In 1 mM phosphate buffer both spectra -unmodified (Fig. 1A) and modified polymer (Fig. 1B)- exhibit positive and negative bands centered at 280 and 250 nm respectively which are characteristic of

Nucleic Acids Research

Table I.- Percentages of modified bases on poly(dG-dC).poly(dG-dC) modified by reaction with Ac-4 HAQO at 37°C and 95°C.

T ^a	R ^b	Percentage of global modified bases ^c	Percentage of C-8 guanyl adduct ^d
37°C	0.01	0.6	~ 25
	0.05	2.2	
	0.5	5.2	
	0.5 x 3 ^e	8.4	
95°C	0.02	0.7	~ 75
	0.1	2.4	
	1	4.7	

^aT is the reaction temperature.

^bR is concentration of Ac-4 HAQO/concentration in phosphate in the initial reaction mixture.

^cThe percentage of global modified bases was obtained as in reference (22).

^dThe percentage of C-8 guanyl adduct was obtained as in reference (19). The accuracy is ± 5%.

^eThree successive incubations of Ac-4 HAQO with poly(dG-dC).poly(dG-dC) were carried out (see text "Materials and Methods").

the B-form structure (10). Figure 2 shows the variation of the ellipticity for the polymer modified at 95°C and at 37°C versus percentage of ethanol (Fig. 2A and Fig. 2B). One observes, in phosphate buffer, a weak difference between poly(dG-dC).poly(dG-dC) and the modified polymers. It cannot be attributed to the presence of Z-form in poly(dG-dC)-4 NQO. Its origin will be discussed below.

When ethanol is added to the buffer, there is no significant modification in the CD spectra of the modified polymer up to an alcohol concentration of 20 % (Fig. 2). In contrast, in 38 % alcohol, poly(dG-dC)-4 NQO (Fig. 1B) starts to adopt the Z-form as observed from the decrease of the 290 nm positive band, and the increase of the 250 nm negative band. In this condition, the unmodified polymer is entirely in B-form (Fig. 1A).

In presence of 58 % alcohol (Fig. 1A), poly(dG-dC).poly(dG-dC) adopts the Z conformation (10), that is the CD spectrum is nearly an inversion of that obtained without alcohol with a negative band at 290 nm and a positive one at 270 nm (10). In the same conditions the poly(dG-dC)-4 NQO spectrum (Fig. 1B) does not correspond to a Z-form CD spectrum. We have verified that

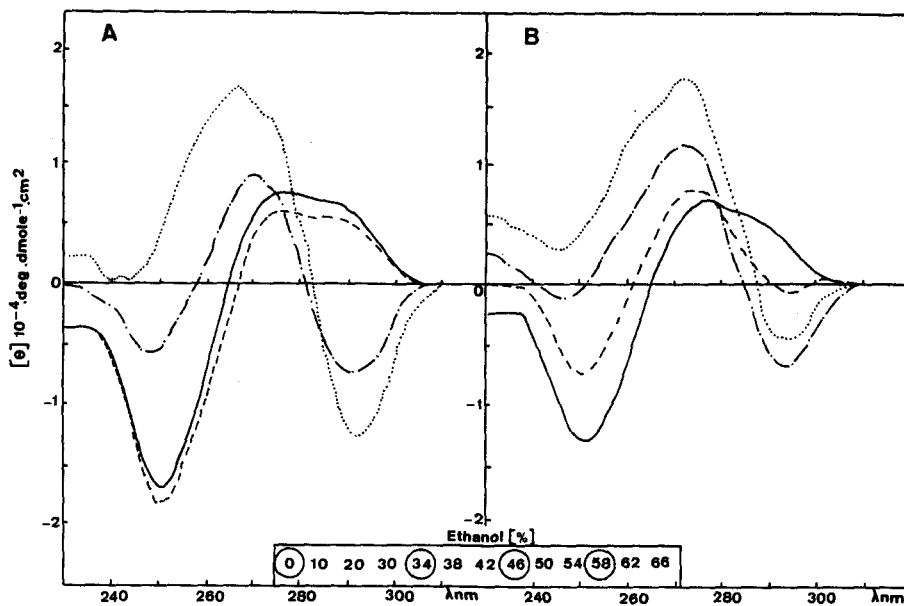


Figure 1.- Circular dichroic spectra of poly(dG-dC).poly(dG-dC) (A) and poly(dG-dC)-4 NQO (95°C) (B) in 1 mM phosphate buffer containing different percentages of ethanol. The reference polymer was previously treated at 95°C, as the modified polymer which is characterized by 4.7 % of modified bases and 75 % C-8 guanyl adduct.. The insert indicates the percentages of ethanol of the different solutions. For clarity, only four spectra were drawn for the following ethanol concentrations : 0 % (—), 34 % (---), 46 % (-·-) and 58 % (··) ethanol.

in these conditions the induction of the Z-form is not dependent on time, by recording the spectrum one hour later : its shape remained identical. On increasing the percentage of alcohol the intensity of the 290 nm band decreases (Fig. 2). A complete poly(dG-dC)-4 NQO B → Z transition is not observed with further increase in the percentage of alcohol.

We have also studied the conversion from the B-form to the A and/or C-forms for poly(dG-dC)-4 NQO in different solutions. Therefore, the CD spectra of poly(dG-dC).poly(dG-dC) and poly(dG-dC)-4 NQO (37°C) -corresponding to 5 % and 6.5 % of modified bases- were recorded i) in ethanol-buffer mixture containing 95 % alcohol, conditions in which the polymer adopts an A-form conformation and ii) in 3.8 M LiCl which induces the C-form conformation (24). One observes (data not shown) that the covalent binding of Ac-4 HAOO on poly(dG-

Nucleic Acids Research

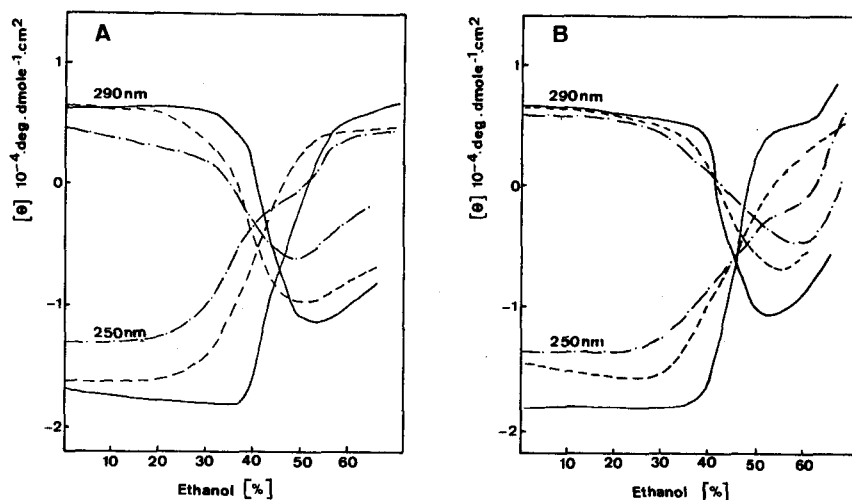


Figure 2.- Variation of the ellipticity at 290 and 250 nm of the poly(dG-dC). poly(dG-dC) modified at 37°C and 95°C against the percentage in ethanol in the 1 mM phosphate buffer-ethanol solution.

A - Poly(dG-dC)-4 NQO (95°C). Reference (—), 1.7 % (---) and 3.4 % (-.-) of modified bases. The C-8 guanyl adduct accounts for 75 % of the modified bases.

B - Poly(dG-dC)-4 NQO (37°C). Reference (—), 3.7 % (-.-) and 6.0 % (-.-) of modified bases. The C-8 guanyl adduct accounts for 25 % of the modified bases.

dC).poly(dG-dC) does not hinder the induction either of the A-form or of the C-form. Nevertheless, the relative intensities of the bands depend upon the percentage of bound quinoline residues.

Differential circular dichroism

Differential CD spectra were recorded for different poly(dG-dC)-4 NQO taking poly(dG-dC).poly(dG-dC) as reference in 1 mM phosphate buffer-ethanol mixture solutions.

Figure 3A shows the differential CD spectra of poly(dG-dC)-4 NQO (95°C, 4.7 % modified bases). In phosphate buffer the shape of the differential spectrum is similar to a B-form spectrum. For 38 % ethanol solution the shape of the differential spectrum is similar to that of difference spectra between poly(dG-dC).poly(dG-dC) in phosphate buffer and in 60 % ethanol solution. This clearly shows the induction of the Z-form by the bound carcinogen. When more ethanol is added to the solution the shape of the differential spectrum is inverted (Fig. 3A).

Therefore, this differential CD study was carried out with different

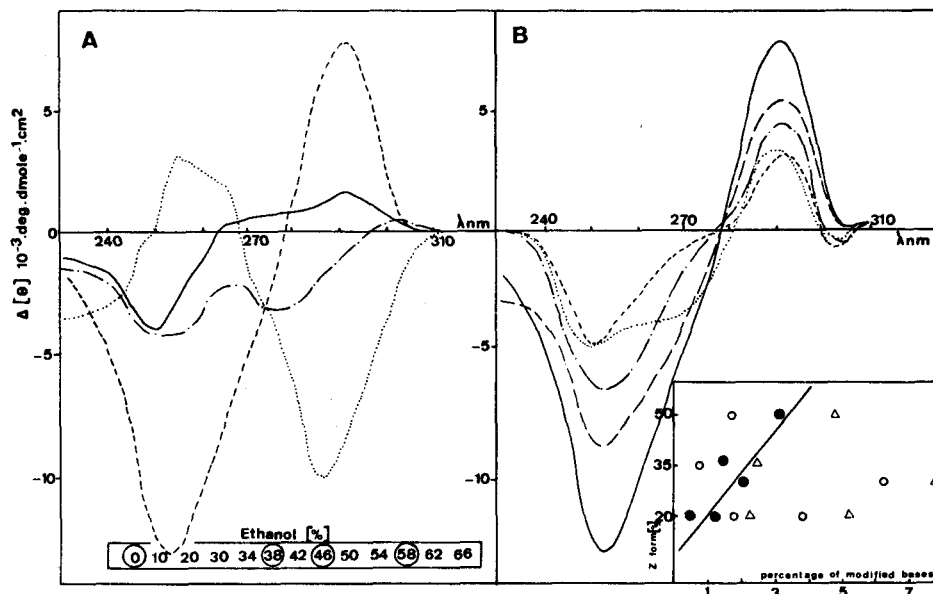


Figure 3.- Differential CD spectra $[\theta]$ unmodified polymer minus $[\theta]$ modified polymer leaves $\Delta[\theta]$.

- A - Differential CD spectra were recorded in 1 mM phosphate buffer-ethanol mixture solutions ; their exact composition is given but, for clarity, only three spectra were drawn for the following ethanol concentrations: 0% (—), 38% (---), 46% (-·-), 58% (···).
- B - Differential CD spectra in 38% ethanol for different modified poly(dG-dC).poly(dG-dC).
 Poly(dG-dC)-4 NQO (95°C) : modified bases 4.7% (—), 2.4% (---).
 Poly(dG-dC)-4 NQO (37°C) : modified bases 8.4% (-·-), 3.7% (···), 2.2% (-·-).
- Insert : Variation of the percentage of Z-form in 38% ethanol solution against the percentage of all the modified bases (Δ), the percentage of C-8 guanyl adduct (\bullet), the percentage of all the modified bases except the C-8 guanyl adduct (\circ).

modified polymer (see Table I) to try to find a correlation between the phenomena observed and the two major adducts present on the modified polymer. Figure 3B shows the results we obtained by differential CD study in 38% ethanol solution. As seen in the insert (Fig. 3B) a correlation was only found for the C-8 guanyl adduct : more C-8 guanyl adduct is present on the modified polymer more important is the induction of the Z-form.

At lower and higher concentration than 38% ethanol in the solution,

Nucleic Acids Research

the role played by one of the two major adducts is not so specific and three correlations were found between the phenomenon observed and the parameters of the Fig. 3B-insert.

S₁-nuclease digestion

The susceptibility of modified poly(dG-dC).poly(dG-dC) to S₁-nuclease was investigated to obtain additional information on its conformation. The kinetics of hydrolysis of Ac-4 HA[2-³H]QO modified poly(dG-dC).poly(dG-dC) (37°C, 15 % modified bases, specific activity 5700 dpm/nmol) by S₁-nuclease are shown in Fig 4 where it is possible to observe that there is a significant release of ethanol-soluble material from poly(dG-dC)-4 NQO while unmodified poly(dG-dC).poly(dG-dC) and native DNA are almost entirely resistant. This release of ethanol-soluble material increases with the time of the incubation (Fig. 4A). The kinetics of the tritiated ethanol-soluble products are shown Fig. 4B where one observes that after 180 nm incubation with S₁-endo-nuclease, 40 % of the 4 NQO modified nucleotides are released, while without enzyme, no significant release of modified nucleotides is observed.

DISCUSSION

The present work was devoted to the study of the conformation of poly(dG-dC).poly(dG-dC) modified by Ac-4 HAQO, the ultimate carcinogen of 4 NQO (16). The results have to be interpreted in the light of the nature and the yield of the different adducts present on the polymer. As seen in "Results" the percentage of the C-8 guanyl adduct differs according to the temperature of the poly(dG-dC).poly(dG-dC)-Ac-4 HAQO reaction : it is 25 % and 75 % at 37° and 95°C respectively. This result is in agreement with this one previously obtained in our laboratory (19) showing that the percentage of the C-8 guanyl adduct on DNA is secondary structure dependent : it is 30 % and 70 % for the native and denaturated DNA respectively. Are there other adducts ? Recent results (25) showed the existence of a N-2 guanyl adduct which was identified by HPLC after enzymatic hydrolysis of the modified polymer. Unfortunately, the N-2 guanyl adduct is unstable in respect to the enzymatic hydrolysis (18) and therefore the HPLC determination is lesser than the real percentage. Nevertheless, more informations can be obtained from the analysis of the HPLC profile from which it is possible to observe that most of the peaks are arising either from the N-2 and C-8 guanyl adducts or from their decomposition products. In other words, any adduct other than the N-2 or C-8 guanyl, is present in a very weak quantity. So we admitted that the N-2 guanyl compound represents a major adduct in the Ac-4 HAQO modification of poly(dG-dC).poly(dG-dC) at 37°C.

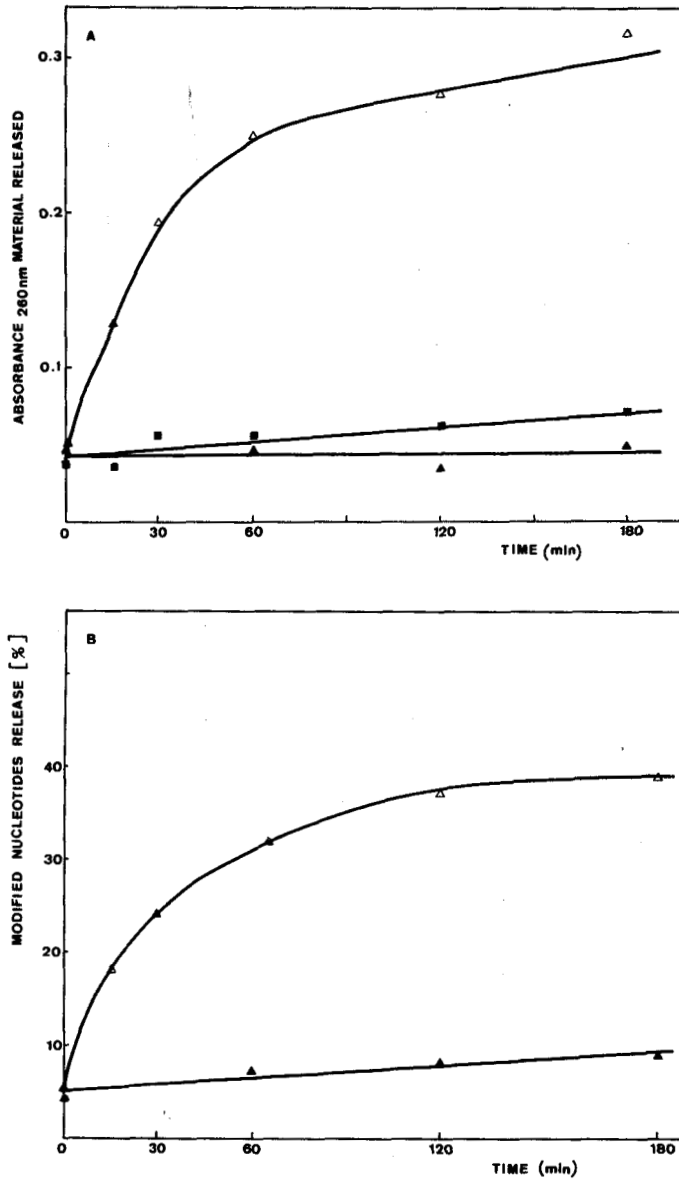


Figure 4.- Kinetics of hydrolysis by S₁-endonuclease. Part A shows the released ethanol soluble nucleotides (260 nm) of native DNA (■), poly(dG-dC).poly(dG-dC) (▲) and Ac-4 HA [2-³H]QO modified poly(dG-dC). poly(dG-dC) (Δ) (15 % modified bases). Part B shows the percentage release of modified nucleotides (i.e. ethanol soluble material) from poly(dG-dC)-4 NQO (15 % modified bases) with (Δ) and without (▲) S₁-endonuclease.

Nucleic Acids Research

The modified polymer poly(dG-dC)-4 NQO can adopt in particular experimental conditions, i.e. 3.8 M LiCl, and in 95 % ethanol, the C-form and A-form structures respectively. The Ac-4 HAQO modification does not prevent the B → C transition. This result is in contrast to that obtained with the N-AcO-AAF-modified poly(dG-dC).poly(dG-dC), the B → C transition of which was not observed (24).

The circular dichroism spectrum recorded in 1 mM phosphate buffer does not indicate any modification corresponding to a B → Z transition of the modified polymer. Indeed, as shown in Fig. 2, the slight difference observed between the poly(dG-dC)-4 NQO and poly(dG-dC).poly(dG-dC) circular dichroism cannot be attributed to Z-form formation, but is probably due to discrepancies in the relative concentrations arising from the contribution of the carcinogen to the optical density at 260 nm. This difference between the modified and unmodified polymer CD spectra (always recorded with solutions with an absorbance of 0.4 at 260 nm) will also be observed whatever the conditions. Moreover there may be an induced optical activity of the 4 NQO residues covalently bound to the organized polymer but its characteristics are unknown.

A study of the modified polymer in the presence of Mg^{++} also confirms the lack of induction of Z-form in phosphate buffer. Indeed, it has been shown that the CD signal of N-AcO-AAF modified poly(dG-dC) was sensible to the presence of small amounts of Mg^{++} in the buffer; the induction of the Z-form is favored by adding Mg^{++} and is reduced by adding EDTA to the buffer (24). The poly(dG-dC)-4 NQO which we have studied does not exhibit such a dependence and no modification of CD spectrum was obtained by raising Mg^{++} in low salt concentration buffer up to 0.1 M $MgCl_2$ concentration (data not shown). This result confirms the absence of small regions in the Z-form in the poly(dG-dC)-4 NQO.

Previous studies have shown that DNA modified by different chemical carcinogens is sensitive to the S_1 -nuclease digestion (21, 26). In contrast it was established that poly(dG-dC).poly(dG-dC) modified by AAF is almost completely resistant to S_1 digestion (12, 24). This result provided evidence for the lack of denatured regions and for a particular restructuring (Z-form) of the modified polymer (12, 24). Moreover the base-pairing was demonstrated to be intact in N-AcO-AAF-modified poly(dG-dC).poly(dG-dC) by immunological assays with anti-cytidine antibodies (27). The results we obtained allow us to affirm that poly(dG-dC)-4 NQO contains single stranded regions. This finding is in good agreement with our CD data: the regions which are modified by the carcinogen do not adopt the Z-structure: they constitute probably destabilized regions as in the case of the Ac-4 HAQO modified DNA (21). The slight differen-

ce observed by CD between poly(dG-dC).poly(dG-dC) and poly(dG-dC)-4 NQO can be attributed to a partial deformation of the B-form. Differential CD studies with some poly(dG-dC)-4 NQO with different C-8 guanyl adduct percentages seem to show that the two major adducts play a role in the arising of the phenomenon.

Concerning the role of ethanol, we have observed with poly(dG-dC)-4 NQO, by adding increasing quantities of alcohol in buffer, that there is no B → Z transition for up to 25 % alcohol (v/v) in the solution and that much less alcohol is necessary to start the B → Z transition of the modified polymer in contrast to the unmodified one (Fig. 2). The C-8 guanyl adduct seems responsible of the arising of the Z-form, as shown by differential CD studies in 38 % ethanol solution (insert fig. 3).

It is interesting to note that the B → Z transition obtained by Sage and Leng (11) with poly(dG-dC) modified by N-hydroxy-N-2-aminofluorene (N-OH-AF) is induced at a lower percentage of ethanol than that of poly(dG-dC).poly(dG-dC). In this case, the substitution occurs mainly on the C-8 guanyl residues, as for N-AcO-AAF modified poly(dG-dC) which is well known to induce a structuration in Z-form in phosphate buffer. However, both experimental data (14) and theoretical calculations (28, 29) indicate that deoxyguanosine AF adduct, in contrast to AAF adduct, does not induce the deoxyribose *anti-syn* transition. Indeed, the *anti* or *syn* conformation depended on whether or not the 8-acyl amino nitrogen is acetylated. In the case of 4 NQO both the reaction mechanism and the C-8 guanyl adduct structure show that this nitrogen cannot be acetylated, and, as for the unacetylated N-OH-AF adduct, the B → Z transition in 38 % ethanol is favored by the C-8 substitution.

These results seem to show that the N-2 guanyl adduct of poly(dG-dC)-4 NQO does not favor the induction on the Z-form of poly(dG-dC).poly(dG-dC). This result have to be compared to the previous work of Kadlubar (30) who showed that the N-2-substituted guanine in DNA by AAF or benzo[a]pyrene may be easily converted from the normal *anti* to a *syn* conformation. These two results do not seem to us inconsistent.

Moreover, even in presence of 60 % ethanol [condition in which the unmodified poly(dG-dC).poly(dG-dC) is entirely in the Z-form] the Ac-4 HAQO modified polymer seem to be partially in the B-form in contrast to N-OH-AF and AAF modified poly(dG-dC).poly(dG-dC). This lack of total conversion of the modified polymer into the Z-conformation in 60 % ethanol is not explained by the nature of the C-8 guanyl adduct though this phenomenon seems to be induced by the two major adducts. However we can think that the N-2 guanyl adduct (25), which is a major adduct on the 37°C Ac-4 HAQO modified poly(dG-dC),

Nucleic Acids Research

inhibits the alcohol-induced conversion from the B- to Z-form. This result is not unexpected because, in the Z-form, the N-2 guanyl is located near of the left helix axis (6) and therefore is more burried than in the B-form.

It is interesting to do a comparison between our work and the results recently published by Hingerty and Broyde (31) who performed mimimized conformational potential energy calculations for a AAF N-2 guanyl adduct. They showed the presence of B-Z junctions which would be stabilized by the amine guanine adduct. We think that in certain conditions -as for example in 60 % ethanol- the N-2 adduct inhibits the complete Z-form structuration.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Professor Gérard Biserte for his constant help. We also thank Dr. M. Leng and Dr. J.P. Aubert for valuable discussions, Dr. J. Pouyet for the determination of the sedimentation coefficients and M.P. Hildebrand and C. Denis for their excellent technical assistance.

+To whom reprint requests should be addressed

REFERENCES

1. Miller, E.C. (1978) *Cancer Res.* 38, 1479-1496.
2. Fuchs, R.P.P. and Daune, M. (1972) *Biochemistry* 11, 2659-2666.
3. Grunberger, D. and Weinstein, I.B. (1976) in *Biology of Radiation Carcinogenesis*, Yukas, J.M., Tennant, R.W. and Regan, J.D. Eds., pp. 175-187, Raven Press, New York.
4. Fuchs, R.P.P., Lefevre, J.F., Pouyet, J. and Daune, M. (1976) *Biochemistry* 15, 3347-3351.
5. Grunberger, D. and Weinstein, I.B. (1978) in *Chemical Carcinogens and DNA*, Grover, P.L., Ed., Vol. 2, pp. 59-93, CRC Press Inc.
6. Wang, A.H., Quigley, G.J., Kolpak, F.J., Cranford, J.L., Van Boom, J.A., Van der Macel, G. and Rich, A. (1979) *Nature (London)* 282, 680-686.
7. Arnott, S., Chandrasekaran, R., Birdsall, D.L., Leslie, A.G.W. and Ratliff, R.L. (1980) *Nature (London)* 283, 743-745.
8. Hanau, L.H., Santella, R.M., Grunberger, D. and Erlanger, B.F. (1984) *J. Biol. Chem.* 259, 173-178.
9. Pohl, F.M. and Jovin, T.M. (1972) *J. Mol. Biol.* 67, 375-396.
10. Pohl, F.M. (1976) *Nature (London)* 260, 365-366.
11. Sage, E. and Leng, M. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4597-4601.
12. Santella, R.M., Grunberger, D., Weinstein, I.B. and Rich, A. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 1451-1455.
13. Harvan, D.J., Hass, R. and Liberman, M.W. (1977) *Chem. Biol. Interact.* 17, 203-210.
14. Leng, M., Ptak, M. and Rio, P. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96, 1095-1102.
15. Grunberger, D., Nelson, J.H., Cantor, C.R. and Weinstein, I.B. (1970) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66, 488-494.
16. Bailleul, B., Galiègue, S. and Loucheux-Lefebvre, M.H. (1981) *Cancer Res.* 41, 4559-4565.

Nucleic Acids Research

17. Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B. and Loucheux-Lefebvre, M.H. (1983) *Carcinogenesis* 4, 249-254.
18. Galiègue-Zouitina, S., et Al., *Cancer Res.* (accepted for publication).
19. Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B. and Loucheux-Lefebvre, M.H. (1984) *Analyt. Biochem.* 138, 454-457.
20. Kawazoe, Y. and Araki, M. (1967) *Gann* 58, 485-487.
21. Galiègue, S., Bailleul, B., Loucheux-Lefebvre, M.H. and Laval, J. (1982) *Carcinogenesis* 3, 435-438.
22. Galiègue, S., Lecocq, G. and Loucheux-Lefebvre, M.H. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 609, 383-391.
23. Neimark, J. (1975) Thesis, University of Strasbourg, Strasbourg, France.
24. Sage, E. and Leng, M. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9, 1241-1250.
25. Galiègue-Zouitina, S. *et al.*, in preparation.
26. Fuchs, R.P.P. (1975) *Nature (London)* 257, 151-152.
27. Santella, R.M., Grunberger, D., Broyde, S. and Hingerty, B.E. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9, 5459-5467.
28. Evans, F., Miller, D. and Beland, F. (1980) *Carcinogenesis* 3, 955-959.
29. Broyde, S. and Hingerty, B. (1983) *Biopolymers* 22, 2423-2441.
30. Kadlubar, F.F. (1980) *Chem. Biol. Interact.* 31, 255-263.
31. Hingerty, B. and Broyde, S. (1983) *Nucleic Acids Res.* 11, 3241-3254.

L'étude de la conformation du poly(dG-dC).poly(dG-dC) modifié par l'Ac-4HAQO a été entreprise avec, comme objectif principal, l'identification de la perturbation induite par la fixation du cycle quinoléine sur la guanine. Les phénomènes les plus intéressants que nous avons mis en évidence nous semblent être les suivants :

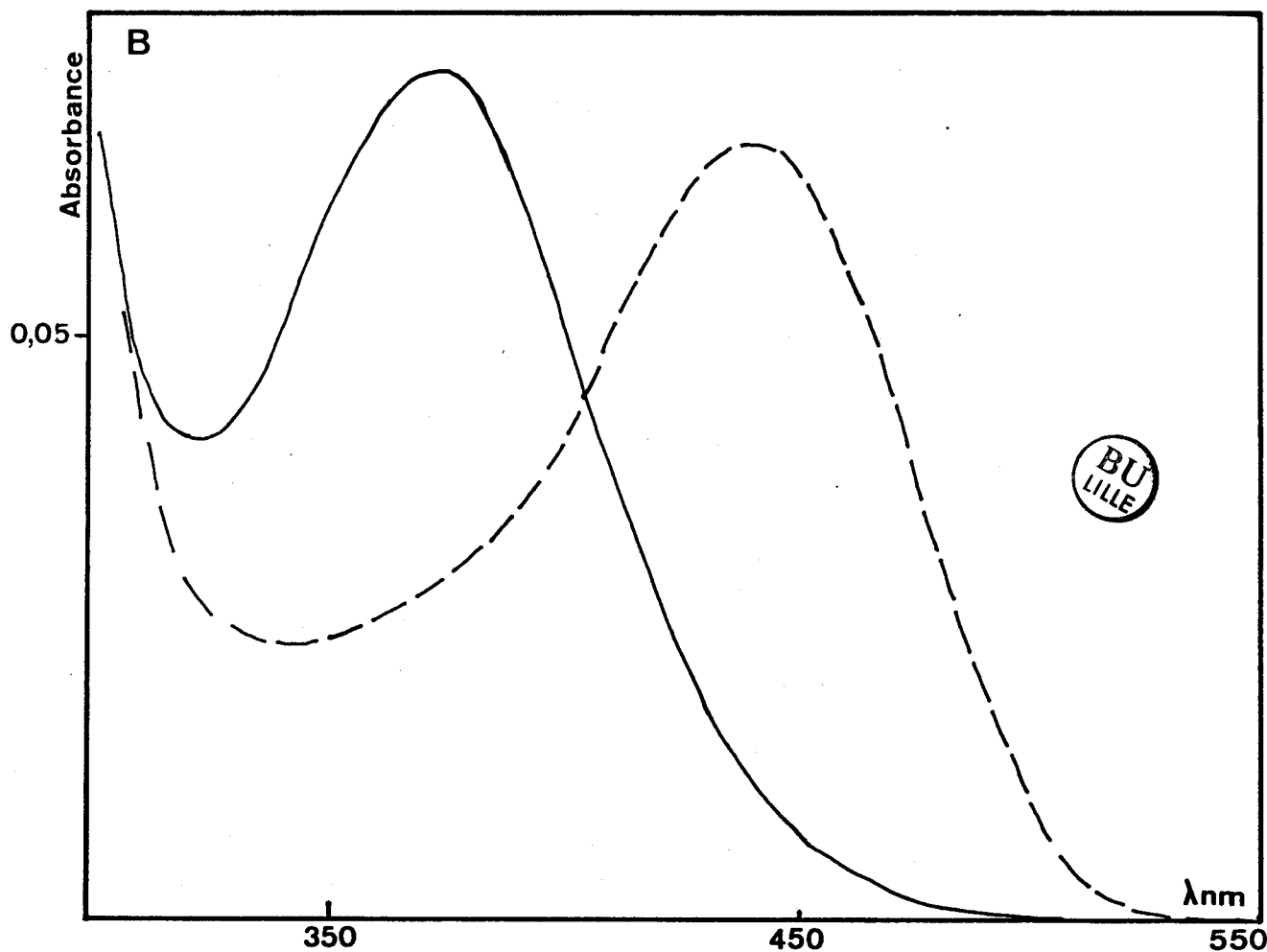
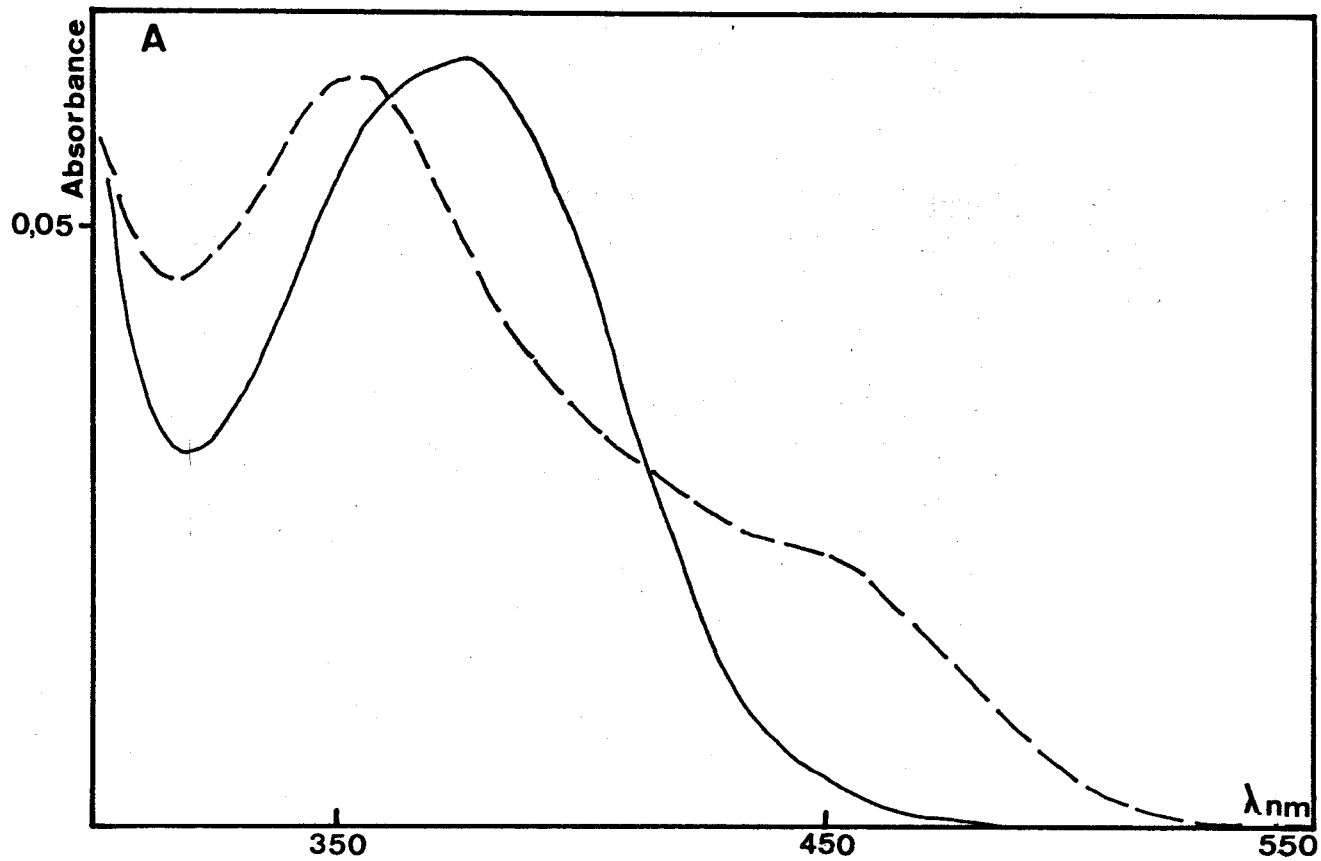
1 - Le poly(dG-dC).poly(dG-dC) modifié par l'Ac-4HAQO n'adopte pas la forme Z dans des conditions où le polymère témoin est en hélice B.

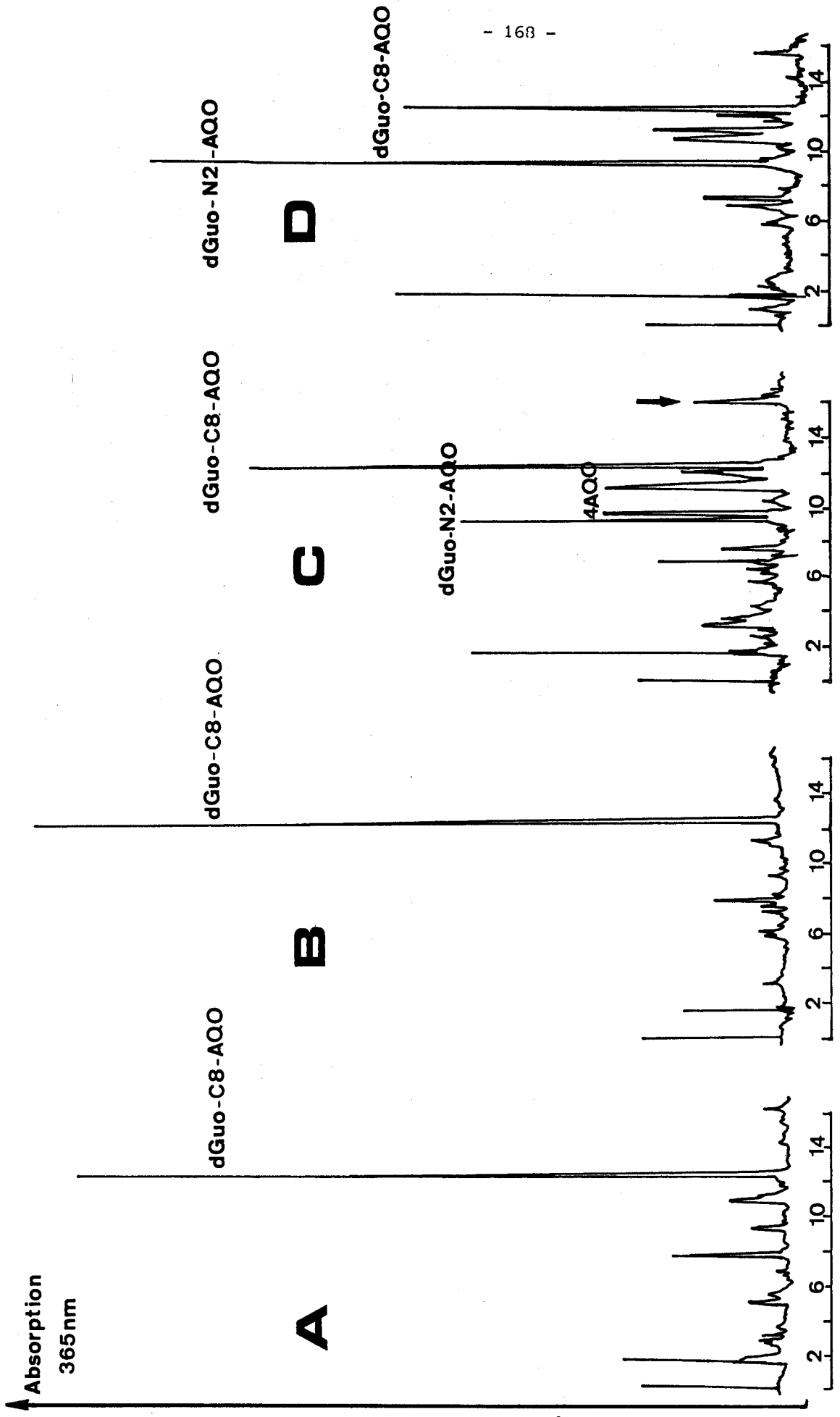
2 - La structure est cependant modifiée comme le montre l'étude de la sensibilité à l'endonucléase S_1 .

3 - Les lésions du 4NQO inhibent la transition B \rightarrow Z induite par l'éthanol.

D'autre part, nous avons pu orienter la fixation du cancérogène sur le C8 de la guanine en effectuant la réaction à 95°C sur le polymère en simple brin. Dans ce cas, la séquence alternée guanine-cytosine permet la restructuration du polymère en hélice B, lorsque l'on amène doucement la température de la solution de 95° à la température ambiante. La figure 6 montre les spectres d'absorption à pH 7,2 et à pH 12 de la quinoléine fixée sur le poly(dG-dC).poly(dG-dC) après réaction du dérivé Ac-4HAQO, à 37°C (A) et à 95°C (B). A pH basique, l'absorption à 440nm est caractéristique de l'adduit dGuo-C8-AQO et a été utilisée pour calculer le taux de fixation sur le C8 de la guanine (voir publication n° 6 pour le mode opératoire et la méthode de calcul). Les résultats sont indiqués dans le tableau 1 de la publication n° 7.

Cette fixation préférentielle a également été visualisée à l'aide de l'hydrolyse enzymatique suivie d'une étude chromatographique. Les profils clhp des hydrolysats obtenus à partir des polymères modifiés à 37°C et 95°C sont comparés à ceux obtenus avec l'ADN modifié, natif et dénaturé. Ils sont représentés sur la figure 7. On observe que l'adduit dGuo-C8-AQO est le composé principal de la réaction dans le cas du poly(dG-dC).poly(dG-dC) modifié à 95°C et de l'ADN dénaturé modifié à 37°C. Il n'en est pas de même avec le polymère et l'ADN natif traités à 37°C. Dans ces deux cas l'adduit dGuo-C8-AQO ne représente qu'environ un tiers à un quart de la modification totale. Nous visualisons en effet d'autres composés et en particulier l'adduit dGuo-N2-AQO et le 4AQO. Le composé au Tr = 16 min observé sur le profil du poly(dG-dC)-4NQO (37°C) provient de la décomposition de dGuo-N2-AQO (voir publication n° 3). L'origine du 4AQO est également discutée dans cette publication, bien qu'elle ne soit pas encore parfaitement établie.



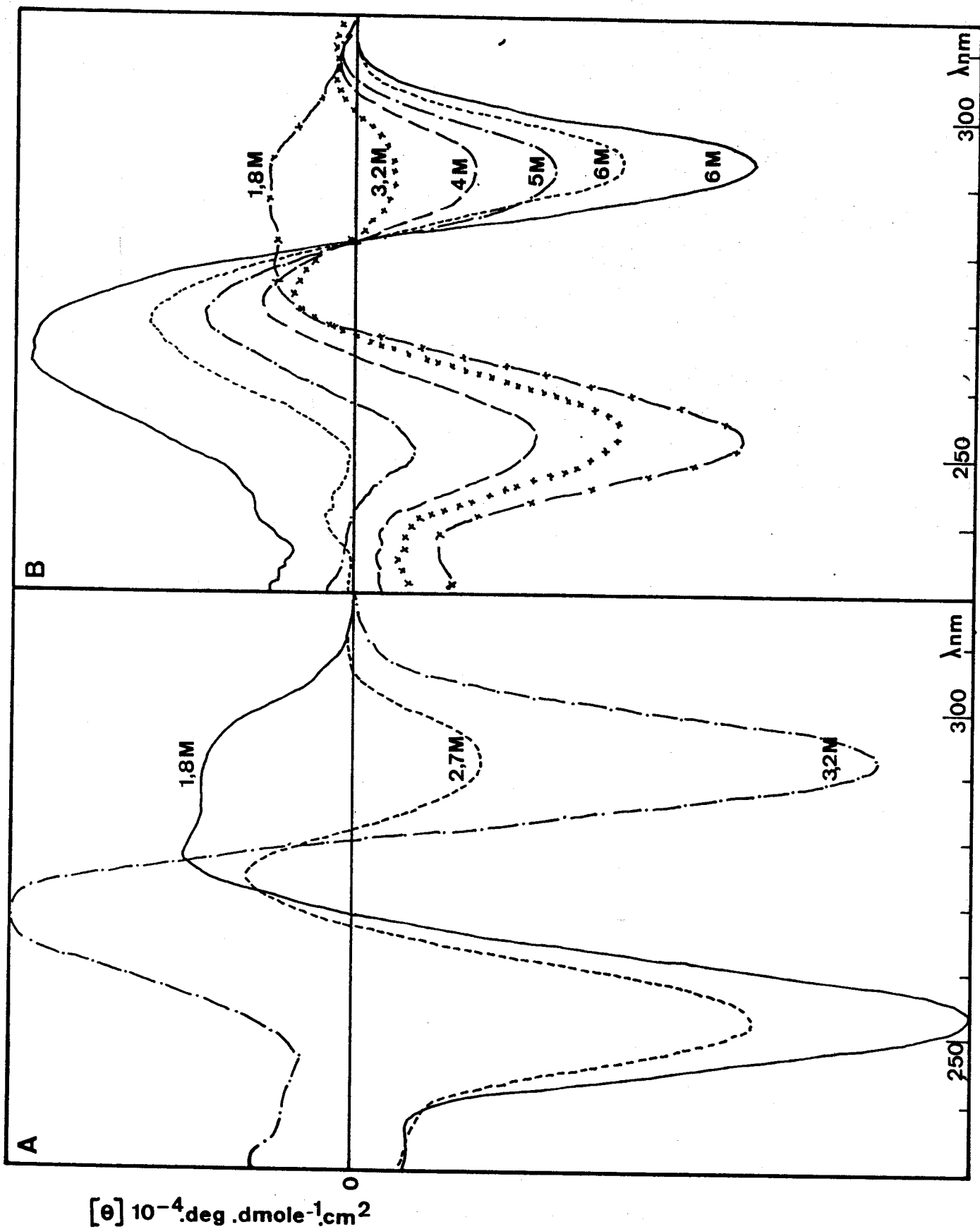


Temps de rétention en min

b) Etude de la transition B \rightarrow Z, induite par NaCl, du poly(dG-dC).poly(dG-dC) modifié par l'Ac-4HAQO

Le poly(dG-dC).poly(dG-dC) en solution de force ionique élevée adopte également la forme Z (RAMSTEIN et LENG, 1980 ; ARNOTT et al., 1980). Nous avons étudié la transition B \rightarrow Z dans ces conditions à partir d'un échantillon de poly(dG-dC)-4NQO modifié à 37°C et caractérisé par 8 % de bases modifiées. La méthodologie utilisée est identique à celle décrite dans la publication n° 7. Nous avons représenté sur la figure 8 les spectres dichroïques des polymères témoin et modifié (A et B) à différentes concentrations en NaCl. La transition B \rightarrow Z est très coopérative sur le poly(dG-dC).poly(dG-dC) non modifié ; elle commence à une concentration légèrement supérieure à 1,8 M NaCl et est terminée à une concentration d'environ 3,2 M NaCl. A cette dernière concentration le spectre est caractéristique de la forme Z. Il n'en est pas de même pour le polymère modifié : en effet, il adopte encore partiellement la forme B dans NaCl 3,2 M. Sa structuration complète en forme Z est possible mais à des forces ioniques beaucoup plus élevées (6 M) et après un certain laps de temps comme le montre la figure 8. Nous pouvons donc conclure que dans NaCl la fixation du cancérigène sur la guanine inhibe la structuration du polymère en hélice d'enroulement gauche. Un résultat comparable a été obtenu avec une solution d'éthanol à 60 %. Cependant, à des concentrations d'éthanol inférieures (38 %), l'induction de la structure Z est favorisée par la présence de l'adduit dGuo-C8-AQO. Ce phénomène n'étant pas observé dans NaCl, on peut penser que c'est une interaction spécifique éthanol-dGuo-C8-AQO, qui est responsable de ce comportement particulier du poly(dG-dC).poly(dG-dC) modifié dans 38 % d'éthanol.

Puisque l'inversion du sens d'enroulement de l'hélice, lors de la transition B \rightarrow Z implique le passage des guanosines de la conformation anti à la conformation syn, l'étude de la conformation de dGuo-C8-AQO a été réalisée.



c) Etude de la conformation de l'adduit dGuo-C8-AQO en ^1H RMN

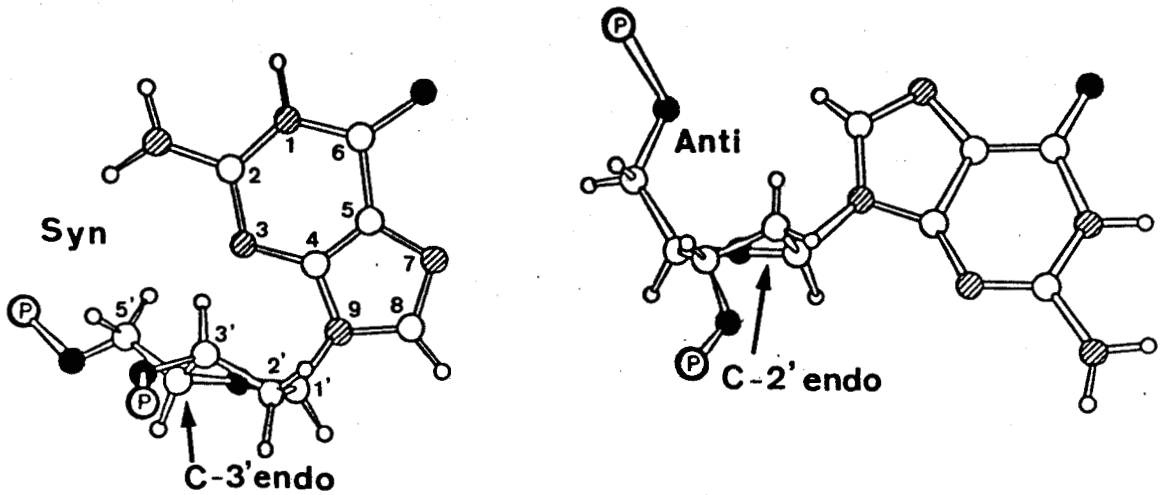
L'intérêt à connaître la structure du nucléoside modifié revient implicitement à admettre que la structure du nucléoside serait conservée dans la macromolécule ; ce qui n'est pas certain. Ces études permettent cependant d'obtenir une indication. Elles utilisent essentiellement l'analyse par RMN des protons du désoxyribose.

Méthodes

Les composés dGuo-C8-AQO et Guo-C8-AQO ont été préparés par réaction de l'Ac-4HAQO sur la désoxyguanosine et la guanosine ; leur purification a été réalisée comme cela est décrit dans l'article n° 1. Les spectres R.M.N. du ^1H ont été enregistrés sur une caméra 250 MHz à 25°C. Les nucléosides modifiés ont été solubilisés dans le CD_3OD , à des concentrations d'environ 4 mg/ml. Les déplacements chimiques des protons non échangeables ont été mesurés par rapport au TMS en référence interne. Les signaux résiduels du solvant ont été partiellement éliminés par une séquence $180^\circ\tau \cdot 90^\circ$ avec $D_1 = 3,3$ sec, $D_2 = 2,6$ sec, $D_3 = 5$ sec. Les déplacements exacts des protons H5' et H5'' ont été obtenus par simulation spectrale (ITRCAL). Les déplacements chimiques des protons des nucléosides non modifiés ont également été mesurés dans les mêmes conditions de solvant et de température. Cette étude RMN a été effectuée en collaboration avec Bruno PERLY au C.E.N. de Saclay à Gif-sur-Yvette.

Résultats

Les valeurs des déplacements chimiques et des constantes de couplage des protons du sucre de la guanosine, de la désoxyguanosine et des dérivés de substitution sur le C8 de la guanine sont indiquées dans le tableau ci-dessous. Nous donnons ci-dessous une représentation schématique de la désoxyguanosine dans les conformations syn et anti.



Protons	Déplacements chimiques (ppm)		Δ (ppm)
	<u>Guanosine</u>	<u>Guo-C8-A₂O</u>	
GH ₈	7,95	-	-
H ₁ '	5,83	6,24	+ 0,41
H ₂ '	4,60	4,96	+ 0,36
H ₃ '	4,29	4,35	+ 0,06
H ₄ '	4,09	4,15	+ 0,06
H ₅ '	3,84	3,88	+ 0,04
H ₅ "	3,73	3,74	+ 0,01

Constantes de couplage (H₂)

J _{1'2'}	5,7	6,5
J _{4'5'}	2,6	2,19
J _{4'5"}	3,1	3,45
J _{5'5"}	- 12,1	- 11,9

Protons	Déplacements chimiques (ppm)		Δ (ppm)
	<u>Désoxyguanosine</u>	<u>dGuo-C8-A₂O</u>	
GH ₈	7,95	-	-
H ₁ '	6,27	6,41	0,14
H ₂ '	2,70	2,98	0,28
H ₂ "	2,35	2,30	- 0,05
H ₃ '	4,52	4,54	0,02
H ₄ '	4,00	4,04	0,04
H ₅ '	3,79	3,89	0,10
H ₅ "	3,72	3,75	0,03

Constantes de couplage (H₂)

J _{4'5'}	3,30	3,5 ± 0,3
J _{4'5"}	3,91	3,5 ± 0,3
J _{5'5"}	- 11,93	- 12,0

Toutes les constantes de couplage des protons du sucre n'ont pu être obtenues ; en particulier, sur les composés modifiés, ces valeurs ne sont pas mesurables à partir des spectres. Nous avons indiqué sur le tableau la valeur Δ (ppm) correspondant à la différence des déplacements chimiques entre le nucléoside modifié et le nucléoside témoin. Une valeur positive correspond à un déplacement vers les bas champs.

Le déplacement chimique du proton H-2' du désoxyribose est un indicateur préférentiel de la conformation du sucre (EVANS et al., 1976 ; LAPPI et al., 1980). En effet, le proton H-2' est à proximité de l'azote hétérocyclique en position 3 de la guanine, lorsque la conformation est syn : cette configuration se traduit par un déblindage de H-2' (EVANS et al., 1980), donc par un déplacement vers les bas champs du proton H-2' ; c'est ce qui est observé pour Guo-C8-AQO et dGuo-C8-AQO respectivement : $\Delta = + 0,36$ et $\Delta = + 0,28$. Ce déplacement vers les bas champs est cependant d'intensité légèrement inférieure à celles précédemment observés pour des nucléosides modifiés et qui ont été décrits comme adoptant une conformation syn. En particulier dans le cas de l'adduit dGuo-C8-AAF, le proton H-2' est déplacé de 0,41 ppm pour dGuo-C8-AAF (EVANS et al., 1980) et de 0,35 ppm pour Guo-C8-AAF (LENG et al., 1980). Il nous semble donc que cette seule indication à partir du proton H-2' ne permette pas d'affirmer que la conformation est réellement syn. En effet, la substitution du C8 de la guanine par le cycle quinoléine peut induire un déplacement vers les bas champs du proton H-2', par effet de cycle et cela en particulier si le sucre est en conformation anti, car dans ce cas, le ribose est proche du cycle quinoléine. Récemment, dans l'équipe des MILLER (DELCLOS et al., 1984), l'étude par RMN du proton H-2' des adduits dGuo-C8-4-aminoazobenzène et dGuo-C8-N-méthyl-4-aminoazobenzène, ainsi que l'étude de leur persistance, suggèrent que ces composés pourraient avoir, *in vivo*, des analogies avec les dérivés désacétylé et acétylé de l'AAF.

La géométrie du ribose est elle aussi caractéristique des conformations syn et anti du nucléoside. En effet, le cycle ribose adopte préférentiellement la géométrie C-3' endo pour la conformation syn et C-2' endo pour la conformation anti. Les constantes $J_{1,2}$ et $J_{3,4}$ permettent de caractériser chacune de ces deux géométries. Malheureusement, dans notre cas, ces constantes n'ont pu être déterminées.

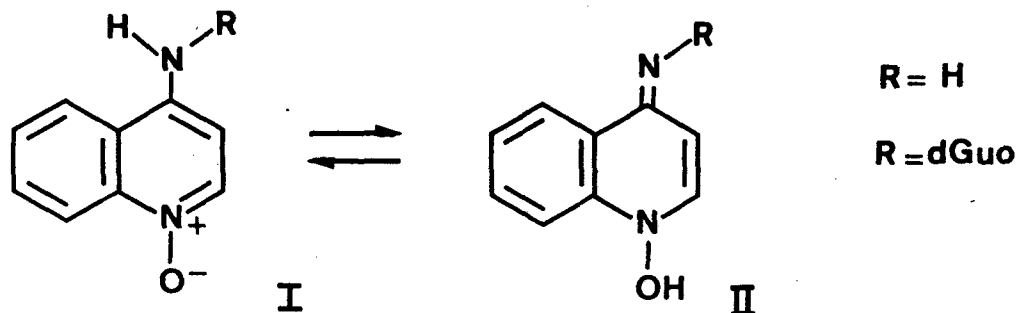
Dans le ribose, la conformation au niveau de la liaison 4'-5' est également modifiée lors de la rotation du sucre au niveau de la liaison N-glycosidique. Trois conformations d'énergie minimale ont été identifiées :

gauche-gauche (gg), gauche-trans (gt) et trans-gauche (tg). Les conformations gt et tg sont prépondérantes pour la forme syn comme cela a été décrit pour le 8-bromoguanosine-5'-monophosphate (EVANS F.E., 1979). Les différentes populations au niveau de la liaison 4'-5' peuvent être déterminées, à l'aide de la loi de KARPLUS appliquée à $J_{4,5'}$ et $J_{4,5''}$: des valeurs voisines de 1,5 Hz correspondent à une conformation entièrement gg. Des valeurs proches de 6,5 Hz sont caractéristiques des conformations tg ou gt (EVANS et al., 1976). Ces constantes de couplage déterminées sur dGuo-C8-AQO et Guo-C8-AQO sont peu différentes des valeurs obtenues sur les nucléosides (voir tableau). Il n'y a donc pas de modification importante au niveau de la liaison 4'-5' sur le nucléoside modifié par rapport au témoin.

Il est important de signaler les résultats obtenus sur le dGuo-C8-AF par EVANS et al. (1980). Ces auteurs ont trouvé pour $J_{4,5'}$ et $J_{4,5''}$ des valeurs beaucoup plus faibles (2,1 Hz) que celles des nucléosides non modifiés (4,6 Hz). Ils en avaient déduit que la conformation gg était prépondérante et qu'elle était stabilisée par une liaison hydrogène entre le NH du fluorène et l'oxygène en position 5' du sucre, ce qui ne peut être réalisé que pour la forme anti.

D'après nos valeurs de $J_{4,5'}$ et $J_{4,5''}$, ce type de stabilisation ne semble pas exister pour (d)Guo-C8-AQO bien que le produit de substitution du C8 de la guanine par le cancérigène soit une amine secondaire. Il est possible d'expliquer nos résultats.

1. La quinoléine peut exister sous deux formes tautomères dont l'une ne possède plus d'hydrogène sur l'atome d'azote en position 4 (voir schéma ci-dessous). Dans ce cas, il ne peut y avoir de liaison stabilisant la conformation anti.



KAWAZOE et al. (1980) ont d'ailleurs montré d'après les déplacements chimiques des protons du cycle quinoléine, que la forme II prédominait dans le diméthylsulfoxyde pour le composé 4HAQO.

2. Ou alors tout simplement la conformation du nucléoside est syn.

Il n'est cependant pas nécessaire de trancher entre ces deux possibilités, puisqu'elles vont dans le même sens.

Il est difficile d'être catégorique dans l'interprétation de ces résultats, car il ne semble pas y avoir dans la molécule de dGuo-C8-AQO de contraintes suffisamment importantes pour forcer le nucléoside à adopter une conformation donnée. En particulier, les contraintes stériques du noyau quinoléine ne sont pas suffisantes pour imposer la conformation syn et, d'autre part, la liaison hydrogène intramoléculaire qui stabiliserait la forme anti semble ne pas exister. On peut cependant supposer que la conformation préférentielle adoptée par le dGuo-C8-AQO est la forme syn.

d) Conclusion

Puisque nous mettons en évidence le fait que le 4NQO inhibe la structuration en hélice Z de l'ADN, nous avons recherché dans la littérature les composés qui présentent cette même propriété. Nous n'en avons trouvé aucun relatif à la substitution sur le C8 ou le N² de la guanine.

L'aflatoxine B₁ est un hépatocancérogène qui se fixe principalement sur le N7 de la guanine. NORDHEIM et al. (1982a) ont montré que sa fixation sur le poly(dG-dC).poly(dG-dC) inhibe la transition B → Z induite par NaCl. Ces auteurs expliquent difficilement ce résultat, car la fixation de l'aflatoxine B₁ sur le N7 de la guanine charge positivement le cycle imidazole, et que dans le cas du polymère modifié en position 7 par un méthyle, c'est l'existence de cette charge qui est responsable de l'induction très facile de la forme Z de ce polymère (MÖLLER et al., 1981). Pour l'aflatoxine B₁, les auteurs proposent que ce soit l'encombrement du noyau ainsi que son interaction avec les constituants de l'ADN, qui pourraient être responsables de la stabilisation de la forme d'enroulement droit.

Le poly(dG-dC).poly(dG-dC) modifié par certains dérivés du platine, comme les cis- et trans-dichloroplatinium (cis-Pt, trans-Pt), n'adopte pas la forme Z. Par contre, le chlorodiéthylène-triaminoplatinium (dien-Pt) la stabilise (MALFOY et al., 1981).

Dans ce dernier cas le dien-Pt se fixe sur le N7 de la guanine ; la base est alors chargée positivement, ce qui favorise la forme Z, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent. Par contre, les dérivés cis- et trans-Pt empêchent la conformation Z du polymère probablement par une fixation covalente sur deux sites de l'ADN. Des études de réactivité du cis-Pt ont permis de préciser les modifications induites par ce composé. Il a été montré que ce dérivé (MALINGE et al., 1984) se fixait principalement sur deux guanines d'un même brin de l'ADN. Cette réaction est favorisée lorsque le poly(dG-dC).poly(dG-dC) est en forme B. Des résultats différents ont été obtenus lorsque le polymère est en forme Z ; le cis-Pt se fixe alors uniquement sur le N7 de la guanine, stabilisant la forme Z.

D'autres drogues antitumorales ont été étudiées, comme la daunomycine (CHAIRES, 1983) qui ne se fixe pas de façon covalente sur l'ADN : elle appartient à la famille des intercalants. Certains composés de cette famille inhibent la structuration du poly(dG-dC).poly(dG-dC) en forme Z. Citons par exemple le bromure d'éthyldium (POHL et al., 1972b), la daunomycine (CHAIRES, 1983),

l'actinomycine (VAN HELDEN, 1983). Ils préfèrent la forme B de l'ADN, comme cible d'interaction. Dans certains cas, l'agent intercalant peut réverser la transition B \rightarrow Z préalablement induite par une forte concentration en NaCl (POHL et al., 1972b ; CHAIRES, 1983). Le mécanisme par lequel ils inhibent la forme Z n'est pas encore élucidé, mais il est très probable que l'interaction de l'intercalant avec l'ADN joue un rôle déterminant.

Revenons maintenant au cas du 4NQO. La connaissance des sites de fixation base-4NQO n'est pas suffisante pour expliquer l'inhibition de la transition B \rightarrow Z par le cancérogène. En effet, les deux adduits C8 et N² semblent inhiber, tous les deux, la transition B \rightarrow Z (voir figure 2, publication n° 7). Dans l'état actuel des travaux réalisés sur les adduits en N² de la guanine, il n'est pas possible d'expliquer le rôle joué par ces adduits dans l'inhibition de la structuration en forme Z. Pour dGuo-C8-AQO, les études RMN ne nous permettent pas non plus d'expliquer cette inhibition : en effet, il n'y a pas de contraintes importantes au niveau de la liaison N-glycosidique de dGuo-C8-AQO.

Sur le polymère, il est cependant probable que la fonction N-oxyde doit jouer un rôle important et ceci est vrai pour tous les adduits 4NQO. Cette fonction possède un moment dipolaire important, qui pourrait interagir avec des sites de la macromolécule. Cette interaction n'est pas covalente comme l'ont prouvé les hydrolysats enzymatiques. Néanmoins elle pourrait être forte et avoir lieu profondément dans l'hélice.

Dans ce cas, il serait possible de comprendre que la forme B de l'ADN ou du poly(dG-dC).poly(dG-dC), déformée de façon importante, permette l'attaque par l'endonucléase S₁, enzyme spécifique de l'ADN simple brin (publication n° 7 ; GALIEGUE et al., 1982). L'inhibition de la structuration en forme Z pourrait être due au fait que l'interaction N-oxyde-ADN ne peut avoir lieu que sur l'ADN en forme B. Cette interaction est naturellement beaucoup moins stable qu'une liaison covalente, mais nous pouvons cependant faire une analogie prudente avec les agents bifonctionnels, cis- et trans-Pt, qui entravent la formation de la structure Z en fixant la forme B par deux liaisons covalentes. Le 4NQO retarde simplement la transition B-Z et on peut penser que cela se fait d'une part par la fixation du cancérogène et, d'autre part, par une interaction du N-oxyde avec un site de l'ADN, qui stabiliserait la forme B déformée au niveau de la lésion.

Un cas particulier de cette interaction pourrait être constitué par l'empilement du cycle quinoléine avec les plans des bases, comme cela a été décrit avec le 4NQO libre (WINKLE et al., 1978 ; 1979). Cet empilement du cycle quinoléine entre les bases de l'ADN serait probablement beaucoup moins stable que dans le cas des agents intercalants, même si le N-oxyde peut avoir un rôle stabilisant. En effet, dans le cas des adduits, la liaison covalente restreint beaucoup les possibilités d'interaction d'empilement du noyau quinoléine et aussi la liberté de mouvement du cycle.

Tout ceci constitue des hypothèses, la discussion reste ouverte, mais, pour le moment, nous ne pouvons interpréter autrement nos résultats.

Le travail d'équipe avec Sylvie GALIEGUE-ZOITINA a permis d'aborder d'autres études concernant la modification de l'ADN par le 4NQO : la sensibilité à l'endonucléase S_1 , la mesure de la température de fusion et des études de dichroïsme linéaire électrique.

Nous allons essayer, dans la conclusion, de faire une synthèse de l'ensemble de nos résultats.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les études que nous avons effectuées avec les dérivés acétylés du 4HAQO nous ont permis de montrer la fixation covalente du cycle quinoléine sur l'ADN et sur les nucléosides. Un mécanisme de formation des adduits a pu être proposé, il a ensuite été parfaitement démontré par des travaux de chimie (DEMEUNYNCK, 1984) : l'agent réactif est un dérivé nitrénium ; il est obtenu à partir de l'Ac-4HAQO, par départ de la fonction acétoxy en position 4. Sa formation est facilitée par la présence de la fonction N-oxyde en position 1 qui le stabilise. L'existence d'un composé monoacétylé, non réactif, (Ac-4HAQ) ne comportant pas de fonction N-oxyde est également une preuve du rôle joué par la fonction N-oxyde dans le pouvoir cancérigène du 4NQO.

Grâce à la connaissance du mécanisme réactionnel, nous avons pu affirmer que le dérivé Ac-4HAQO est un modèle de cancérigène ultime très adéquat. En effet, la structure de ce composé reflète parfaitement celle de la forme active postulée par les TADA : le séryl-4HAQO. De plus, les principaux composés de substitution base-quinoléine sont identiques, que ce soit sur l'ADN modifié *in vivo* par action des cancérigènes précurseurs, ou sur l'ADN modifié *in vitro* par l'Ac-4HAQO. On peut ainsi penser qu'*in vivo* l'agent réactif principal est également le nitrénium.

Le modèle de cancérigène ultime du 4NQO nous a permis de vérifier que l'action de ce composé était régie par le concept des MILLER : la métabolisation des cancérigènes.

Nous avons identifié la structure des principaux adduits base-quinoléine sur l'ADN. Un composé est formé par la substitution du proton en position 8 de la guanine par le nitrénium. Les deux autres correspondent à l'attaque du carbénium sur le N² de la guanine et le N⁶ de l'adénine.

La détermination de ces structures a été un travail délicat, car nous ne disposions que de faibles quantités de produit. Les techniques spectroscopiques employées dans ces études devaient donc être très précises et très sensibles. L'aboutissement de ce travail, c'est-à-dire la connaissance des principaux sites d'attaque du cancérigène sur les bases de l'ADN, est un résultat primordial en cancérigénèse chimique.

Nous allons maintenant faire une synthèse de l'ensemble des résultats obtenus au laboratoire concernant les perturbations induites dans l'ADN par le cancérigène et que nous rappelons ci-après.

- La première mise en évidence de la perturbation structurale de l'ADN modifié par le cancérrogène ultime a été faite par des mesures de températures de fusion.

- Le test de l'hydrolyse par l'endonucléase S_1 effectué sur l'ADN modifié a montré que la fixation de la quinoléine crée une importante distorsion dans l'ADN, probablement assimilable à une zone dénaturée. Il en est de même lorsque la séquence du polymère est exclusivement une alternance guanine-cytosine.

- Les adduits guanine-quinoléine inhibent la structuration du poly(dG-dC).poly(dG-dC) en forme Z, induite par l'éthanol et également par NaCl.

- L'orientation du cancérrogène dans la macromolécule correspond à une inclinaison d'une vingtaine de degrés par rapport au plan des bases, ceci pour chacun des deux adduits guanine.

L'ensemble de ces résultats nous amène à penser que l'insertion de la quinoléine entre les paires de bases est plausible. Pour étayer cette hypothèse nous nous sommes demandés quels pourraient être les facteurs stabilisant cette géométrie.

C'est dans ce sens que des études de RMN ont été faites sur l'adduit dGuo-C8-AQO ; nous avons constaté que ce nucléoside modifié n'adopte préférentiellement ni la conformation syn, ni la conformation anti. Il semble donc que dans le cas du 4NQO la géométrie des lésions ne soit pas la conséquence de contraintes au niveau de la liaison N-glycosidique.

Ce qui serait plutôt déterminant dans la géométrie du cancérrogène fixé pourrait être la présence de la fonction N-oxyde. Par son moment dipolaire important elle pourrait interagir avec un site de l'ADN, infligeant ainsi des contraintes géométriques au cycle quinoléine. Si cette interaction a lieu à l'intérieur de la macromolécule, la quinoléine se trouve alors insérée. Cette insertion pourrait être stabilisée par une interaction d'empilement du cancérrogène avec le plan des bases.

Pour essayer de confirmer l'hypothèse de l'insertion certaines études peuvent être envisagées.

On peut penser que des études de RMN et de DC sur des dinucléotides complémentaires permettraient d'évaluer la force de l'interaction

d'empilement éventuelle entre le cycle quinoléine et le plan des bases.

Il devrait être possible par des études spectroscopiques de mettre en évidence une interaction de la fonction N-oxyde avec un site de l'ADN. Nous pensons par exemple à la spectroscopie Raman de résonance.

Il serait intéressant de savoir si la distorsion induite dans l'ADN entraîne des ruptures des liaisons hydrogène des paires de bases au niveau des lésions. L'utilisation d'anticorps anti-cytosine et anti-guanine permettrait de connaître l'accessibilité de ces bases aux alentours de la lésion.

La mise en évidence du déroulement de l'ADN supertorsadé par le cancérogène est un argument en faveur d'un modèle de type "insertion". Cette étude est également à envisager dans le cas du 4NQO.

L'acquis le plus important du laboratoire a été l'identification des sites de fixation du 4NQO sur les bases de l'ADN. Ceci doit aider à mieux comprendre l'impact biologique de l'interaction du cancérogène avec l'ADN, en particulier au niveau de la réparation, de la réplication et de la méthylation.

Il serait intéressant de connaître la durée de vie de chaque lésion *in vivo*. La technique de visualisation des lésions proposée par REDDY et al. (1984) et utilisant le marquage au Phosphore 32 des adduits pourrait permettre d'aborder ce problème, quel que soit le système *in vivo* choisi. Il serait ainsi possible de connaître le (ou les) adduit(s) persistant(s).

Les trois types de blocage de la réplication, au niveau des guanines modifiées, observés *in vitro* par YOSHIDA et al. (1984) devraient pouvoir être corrélés aux différentes lésions sur la guanine induites par le 4NQO. D'autres questions seraient à résoudre telles que :

- des trois lésions que nous avons identifiées, y en a-t-il une qui soit plus spécifiquement sensible à l'attaque par l'endonucléase S_1 ?
- l'hyperméthylation que nous avons observée *in vitro* sur l'ADN modifié est-elle due à un adduit particulier, et si oui, lequel ?

Ces études pourraient être abordées en utilisant des polymères modifiés ne comportant pratiquement qu'un seul type de lésion. Actuellement nous sommes capables d'orienter la fixation du cancérogène soit sur le C8 soit sur le N² de la guanine. D'autre part, il serait très important de savoir de quelle manière la réplication et la méthylation sont réellement affectées par le 4NQO *in vivo*.

Le spectre de mutagénèse du 4NQO comporte de nombreuses substitutions de paires de bases G-C. Ceci est en accord avec le fait que 90 % de la modification totale de l'ADN est retrouvée sur la guanine. Rappelons que le 4NQO induit à 90 % des transitions G-C --> A-T, quelques transversions G-C --> T-A et également des mutations par déplacement du cadre de lecture. Ces types de mutations peuvent-ils être associés aux différentes lésions que nous connaissons actuellement (dGuo-N2-AQO, dGuo-C8-AQO, r.o. dGuo-C8-AQO, dAdo-N6-AQO) ? Bien qu'aucune réponse claire ne puisse être faite à cette question actuellement, il est néanmoins possible de penser que la lésion majeure sur le N² de la guanine joue probablement un rôle dans l'induction de la mutation majeure observée. Les transversions G-C --> T-A pourraient peut-être s'expliquer par la présence de l'adduit r.o. dGuo-C8-AQO sur l'ADN, le cycle purique étant transformé dans cet adduit en cycle pyrimidique.

En ce qui concerne la lésion dAdo-N6-AQO, la fixation de la quinoléine sur l'azote exocyclique de l'adénine pourrait être responsable de l'induction de mutations par mauvais appariement, lors de la réplication. Cependant les mutations induites par le 4NQO affectent rarement les paires de bases A-T.

Les connaissances que nous avons acquises, permettent de considérer l'étude du 4NQO comme une nouvelle voie pour progresser dans la compréhension du phénomène de cancérisation par une substance chimique.

BIBLIOGRAPHIE

- ABANOBI, S.E., COLUMBANO, A., MULIVOR, R.A., RAJALAKSHMI, S. & SARMA, D.S.R. (1980) In vivo replication of hepatic deoxyribonucleic acid of rats treated with dimethylribosamine. *Biochemistry*, 19 : 1382-1387.
- AHMED, F.E. & SETLOW, R.B. (1981) DNA repair in human fibroblasts treated with a combination of chemicals. *Biophys. J.*, 35 : 17-22.
- ANDOH, T., & IDE, T. (1972) Strand scission and rejoining of DNA in cultured mammalian cells induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Res.*, 32 : 1230-1235.
- ARAKI, M., KAWAZOE, Y. & NAGATA, C. (1969) Homolytic degradation of O,O'-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 17 : 1344-1351.
- ARNOTT, S., CHANDRASEKARAN, R., BIRDSALL, D.L., LESLIE, A.G.W. & RATLIFF, R.L. (1980) Left-handed DNA helices. *Nature*, 183 : 743-745.
- BAILLEUL, B. (1979) Etude de la fixation du O,O'-diacétyl-4-hydroxyaminoquinoléine-1-oxyle sur le DNA à l'aide des nucléosides puriques. Thèse de 3ème cycle. Lille.
- BAILLEUL, B., GALIEGUE, S., DEMEUNYNCK, M., LHOMME, M.F., LHOMME, J. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. (1983) Identification of 4-acetoxyimino-1,4-dihydroquinoline, in vitro and in vivo properties. *Chem. Biol. Interact.*, 43 : 87-98.
- BAILLEUL, B., GALIEGUE-ZOUITINA, S. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. (1984) Conformations of poly(dG-dC).poly(dG-dC) modified by the O-acetyl derivative of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide. *Nucleic Acid Res.*, 12 : sous presse.
- BEHE, M. & FELSENFELD, G. (1981) Effects of methylation on a synthetic polynucleotide : the B-Z transition in poly(dG-m⁵dC).poly(dG-m⁵dC). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 : 1619-1623.
- BELAND, F.A. (1978) Computer-generated graphic models of the N² substituted deoxyguanosine adducts of 2-acetylaminofluorene and benzo(a)pyrene and the O⁶-substituted deoxyguanosine adduct of 1-naphthylamine in the DNA double helix. *Chem. Biol. Interact.*, 22 : 329-339.
- BELAND, F.A., ALLABEN, W.T. & EVANS, F.E. (1980) Acyltransferase-mediated Binding of N-hydroxyarylamides to nucleic acids. *Cancer Res.*, 40 : 834-840.
- BERENBLUM, I. (1975) Sequential aspects of chemical carcinogenesis : Skin, in cancer : a comprehensive treatise, ed. F.F. Becker, Plenum Press, New-York, 1 : 323-344.
- BISHOP, J.M. (1983) Cancer genes come of age. *Cell*, 32 : 1018-1020.
- BOEHM, T.L.J. & DRAHOVSKY, D. (1981a) Hypomethylation of DNA in Raji cells after treatment with N-methyl-N-nitrosourea. *Carcinogenesis*, 2 : 39-42.
- BOEHM, T.L.J. & DRAHOVSKY, D. (1981b) Elevated transcriptional complexity and decrease in enzymatic DNA methylation in cells treated with L-ethionine. *Cancer Res.*, 41 : 4101-4106.

- BOEHM, T.L.J. & DRAHOVSKY, D. (1983a) Guest editorial. Alteration of enzymatic methylation of DNA cytosines by chemical carcinogens : a mechanism involved in the initiation of carcinogenesis. *J. Natl. Canc. Inst.*, 71 : 429-433.
- BOEHM, T.L.J., GRUNBERGER, D. & DRAHOVSKY, D. (1983b) Aberrant de novo methylation on DNA after treatment of murine cells with N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene. *Cancer Res.*, 43 : 6066-6071.
- BOYLAND, E. & MANSON, D. (1966) The biochemistry of aromatic amines. The metabolism of 2-naphthylamine and 2-naphthylhydroxylamine derivatives. *Biochem. J.*, 101 : 84-102.
- BROYDE, S. & HINGERTY, B. (1983) Conformation of 2-aminofluorene- modified DNA. *Biopolymers*, 22 : 2423-2441.
- CHAIRES, J.B. (1983) Daunomycin inhibits the B-Z transition in poly d(G-C). *Nucleic Acids Res.*, 11 : 8485-8494.
- CHANG, E.J., FURTH, M.E., SCOLNICK, E.M. & LOWY, D.R. (1982) Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature*, 297 : 479-483.
- CLEAVER, J.E. (1978) DNA repair and its coupling to DNA replication in eukaryotic cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 516 : 489-516.
- COOPER, G.M. (1982) Cellular transforming genes. *Science*, 218 : 801-806.
- COX, R. (1980) DNA methylase inhibition in vitro by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer Res.*, 40 : 61-63.
- CRAWFORD, J.L., KOLPAK, F.J., WANG, A.H.J., QUIGLEY, G.J., VAN BOOM, J.H., VAN DER MAREL, G. & RICH, A. (1980) The tetramer d(CpGp CpG) crystallizes as a left-handed double helix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 4016-4020.
- CROY, R.G. & WOGAN, G.N. (1981) Temporal patterns of covalent DNA adducts in rat liver after single and multiple doses of aflatoxin B₁. *Cancer Res.*, 41 : 197-203.
- DAUDEL, P., DUQUESNE, M., VIGNY, P., GROVER, P.L. & SIMS, P. (1975) Fluorescence spectral evidence that benzo(a)pyrene-DNA products in mouse skin arise from diol-epoxides. *FEBS Lett.*, 57 : 250-253.
- DAUNE, M.P., FUCHS, R.P. & LENG, M. (1981) Structural modification and protein recognition of DNA modified by N-2-fluorenylacetamide, its 7-iodo derivatives, and by N-2-fluorenamine. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 58 : 201-210.
- DE BAUN, J.R., MILLER, E.C. & MILLER, J.A. (1970) N-hydroxy-2-acetylaminofluorene sulfotransferase : its probable role in carcinogenesis and protein (methion-S-yl) binding in rat liver. *Cancer Res.*, 30 : 577-595.
- DELCLOS, K.B., TARPLEY, W.G., MILLER, E.C. & MILLER, J.A. (1984) 4-Aminoazobenzene and N,N-dimethyl-4-aminoazobenzene as equipotent hepatic carcinogens in Male C57BL/6 x 63H/HeF₁ Mice and characterization of N-(deoxyguanosin-8-yl)-4-aminoazobenzene as the major persistent hepatic DNA-bound dye in these Mice. *Cancer Res.*, 44 : 2540-2550.

- DE MURCIA, G., LANG, M.C.E., FREUND, A.M., FOCHS, R.P.P., DAUNE, M.P., SAGE, E. & LENG, M. (1979) Electron microscopic visualization of N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene binding sites in Cole1 DNA by means of specific antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 : 6076-6080.
- DEMEUNYNCK, M. (1979) Réactivité chimique : le O,O'-diacétyl-4-hydroxyaminoquinoléine-1-oxyde. Diplôme d'Etudes approfondies, Lille.
- DEMEUNYNCK, M. (1981) Réactivité chimique d'un agent cancérigène : le N-oxyde de nitro-4-quinoléine (4-NQO) et de ses dérivés. Thèse de 3ème cycle, Lille.
- DEMEUNYNCK, M. (1984) Contribution à l'étude du mode d'action de substances cancérigènes : réactivité d'esters d'oximes et d'hydroxylamines en série quinoléine. Doctorat d'Etat. Lille.
- DEMEUNYNCK, M., LHOMME, M.F. & LHOMME, J. (1981) 1-Acetoxy-4-hydroxyimino-1,4-dihydroquinoline, a reactive intermédiaire derived from the potent carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide. Tetrahedron Lett., 22 : 3189-3192.
- DEMEUNYNCK, M., LHOMME, M.F. & LHOMME, J. (1983) Solvolytic behavior of 1-acetoxy-4-(acetoxyimino)-1,4-dihydroquinoline, a model for the activated form of the carcinogenic 4-nitroquinoline N-oxide. J. Org. Chem., 48 : 1171-1175.
- DOERFLER, W., KRUCZEK, I., LANGNER, K.D., VARDIMON, L. & RENZ, D. (1984) DNA methylation : specific promoteur methylations cause gene inactivation, in : DNA methylation, Springer Verlag New-York, Eds : RAZIN, A., CEDAR, H. & RIGGS, A.
- DULBECCO, R. (1982) La nature du cancer, La recherche, 13 : 1426-1436.
- DYBING, E., SAXHOLM, H.J.K., AUNE, T., WIRTH, P.J. & THORGEIRSSON, S.S. (1981) Studies on mutagenic and carcinogenic N-substituted aryl compounds : cosmetics and drugs. Natl. Cancer Inst. Monogr., 58 : 21-26.
- ENDO, H. & KUME, F. (1963) Comparative studies on the biological actions of 4-nitroquinoline 1-oxide and its reduced compound, 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide. Gann, 54 : 443-453.
- ENDO, H., ONO, T. & SUGIMURA, T. (1971) Chemistry and biological actions of 4-nitroquinoline 1-oxide. Recent results in Cancer Res., 34 : 1-99.
- ENOMOTO, M., SATO, K., MILLER, E.C. & MILLER, J.A. (1968) Reactivity of the diacetyl derivative of the carcinogen 4HAQO with DNA, RNA, and other nucleophiles. Life Science, 7 : 1025-1032.
- EVANS, F.E. & KAPLAN, N.O. (1976) 8-alkylaminoadenyl nucleotides as probes of dehydrogenase interaction with nucleotide analogs of different glycosyl conformation. J. Biol. Chem., 251 : 6791-6797.
- EVANS, F.E. & KAPLAN, N.O. (1979) Probing the sensitivity of ³¹P NMR chemical shifts to hydrogen bonding and to stereochemistry. FEBS Lett., 105 : 11-14.
- EVANS, F.E., MILLER, D.W. & BELAND F.A. (1980) Sensitivity of the conformation of deoxyguanosine to binding at the C-8 position by N-acetylated and unacetylated 2-aminofluorene. Carcinogenesis, 1 : 955-959.

- FREDERICQ, E. & HOUSIER, C. (1973) Electric dichroism and electric birefringence. Clarendon, Oxford.
- FUCHS, R.P.P. (1975) In vitro recognition of carcinogen-induced local denaturation sites in native DNA by S₁ endonuclease from *Aspergillus Oryzae*. *Nature*, 257 : 151-152.
- FUCHS, R.P.P. (1978) Arylamidation and arylation by the carcinogen N-2-fluorenyl-acetamide : A sensitive and rapid radiochemical assay. *Anal. Biochem.*, 91 : 663-673.
- FUCHS, R.P.P. (1984) DNA binding spectrum of the carcinogen N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene significantly differs from the mutation spectrum. *J. Mol. Biol.*, 177 : 173-180.
- FUCHS, R.P.P. & DAUNE, M.P. (1971) Changes of stability and conformation of DNA following the covalent binding of a carcinogen. *FEBS Lett.*, 14 : 206-208.
- FUCHS, R.P.P. & DAUNE, M.P. (1972) Physical studies on deoxyribonucleic acid after covalent binding of a carcinogen. *Biochemistry*, 11 : 2659-2666.
- FUCHS, R.P.P. & DAUNE, M.P. (1973) Physical bases of chemical carcinogenesis by N-2 fluorenylacetamide derivatives and analogs. *FEBS Lett.*, 34 : 295-298.
- FUCHS, R.P.P. & DAUNE, M.P. (1974) Dynamic structure of DNA modified with the carcinogen N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene. *Biochemistry*, 13 : 4435-4440.
- FUCHS, R.P.P., LEFEBVRE, J.F. & POUYET, J. & DAUNE, M.P. (1976) Comparative orientation of the fluorene residue in native DNA modified by N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene and two 7-halogens derivatives. *Biochemistry*, 15 : 3347-3351.
- FUCHS, R.P.P., KOFFEL-SCHWARTZ, N. & DAUNE, M.P. (1983) N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene induced frameshift mutation : a comparison between the DNA modification spectrum and the mutation spectrum. Dans "Cellular Responses to DNA damage" pp. 547-557, Alan R. Liss, New-York.
- FUCHS, R.P.P. & SEEBERG, E. (1984) pBR 322 plasmid DNA modified with 2-acetylaminofluorene derivatives : transforming activity and in vitro strand cleavage by the *Escherichia coli* uvr ABC endonuclease. *EMBO J.*, 3 : 757-760.
- FUCHS, R.P.P., SCHWARTZ, N. & DAUNE, M.P. (1981) Hot spots of frameshift mutations induced by the ultimate carcinogen N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene. *Nature*, 294 : 657-659.
- GALIEGUE, S. (1978) Interaction entre le DNA et un cancérigène : le O,O'-diacétyl-4-hydroxyaminoquinoléine-1-oxyde. Thèse de 3ème cycle. Lille.
- GALIEGUE, S., BAILLEUL, B. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. (1980) Reactivity of the O,O'-diacetyl derivative of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide with DNA. Comparison with in vivo-reacted DNA. *Europ. J. Cancer*, 16 : 1283-1287.
- GALIEGUE, S., LECOCQ, G. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. (1980) In vitro DNA reaction with a carcinogen. The O,O'-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide changes of stability of modified DNA. *Biochim. Biophys. Acta*, 609 : 383-391.

- GALIEGUE-ZOUFFINA, S., BAILLEUL, B. & LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. (1983) In vitro DNA reaction with an ultimate carcinogen model of 4-nitroquinoline-1-oxide : the 4-acetoxyminoquinoline-1-oxide. Enzymatic degradation of the modified DNA. *Carcinogenesis*, 4 : 249-254.
- GEACINTOV, N.E., GAGLIANO, A., IVANOVIC, V. & WEINSTEIN, I.B. (1978) Electric linear dichroism study on the orientation of benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol 9,10-oxide covalently bound to DNA. *Biochemistry*, 17 : 5256-5262.
- GELBOIN, H. & TS'UO, P.O.P. (eds) "Polycyclic hydrocarbons and cancer", vol 1 and 2 New-York, Academic Press, (1978).
- GILDEN, R.V. & RICE, N.R. (1983) Oncogenes. *Carcinogenesis*, 4 : 791-794.
- GOTH, R. & RAJEWSKY, M.F. (1974) Persistence of O⁶-ethylguanine in rat-brain DNA : Correlation with nervous system-specific carcinogenesis by ethylnitrosourea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 71 : 639-643.
- GRUNBERGER, D. & WEINSTEIN, I.B. (1976) in "Biology of radiation carcinogenesis" (Yuhas, J.M., Tennant, R.W. & Regan, J.D., eds), Raven Press. New-York, pp. 175-187.
- GRUNBERGER, D. & WEINSTEIN, I.B. (1978) Conformational changes in nucleic acids modified by chemical carcinogens. In chemical carcinogens and DNA, Vol 2, Grover, P.L., C.R.C. Press, pp 53-93.
- GUPTA, G., BANSAL, M. & SASISEKHARAN, V. (1980) Polymorphism and conformational flexibility of DNA : right and left stranded duplexes. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2 : 368-380.
- GUPTA, R.C. & DIGHE, N.R. (1984) Formation and removal of DNA adducts in rat liver treated with N-hydroxy derivatives of 2-acetylaminofluorene, 4-acetylaminobiphenyl and 2-acetylaminophenanthrene. *Carcinogenesis*, 5 : 343-349.
- GUPTA, R.C., REDDY, M.V. & RANDEPATH, K. (1982) ³²P-postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts. *Carcinogenesis*, 3 : 1081-1092.
- HARTMAN, P.E., LEVINE, K., HARTMAN, Z. & BERGER, H. (1971) Hycanthone : a frameshift mutagen. *Science*, 172 : 1058-1060.
- HAY, A. (1982) Spot the potential carcinogen. *Nature*, 294 : 100.
- HAYASHI, Y. & HASEGAWA, T. (1971) Experimental pancreatic tumor in rats after intravenous injection of 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide. *Gann*, 62 : 329-330.
- HEFLICH, R.H., DORNEY, D.J., MAHER, V.M. & Mc. CORMICK, J.J. (1977) Reactive derivatives of benzo(a)pyrene and 7,12-dimethylbenz (a)anthracene cause S₁ nuclease sensitive sites in DNA and "UV-like" repair. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 77 : 634-641.
- HEMMINKI, K. (1983) Nucleic acid adducts of chemical carcinogens and mutagens. *Arch. Toxicol.*, 52 : 249-285.
- HERTZOG, P.G., LINDSAY-SMITH, J.R. & GARNER, R.C. (1982) Characterization of the imidazole ring-opened forms of trans-8,9-dihydro-8-(7-guanyl) 9-hydroxy aflatoxin B₁. *Carcinogenesis*, 3 : 723-725.

HIGGINSON, J. (1969) Present trends in cancer epidemiology. In : Proceedings of the Eighth Canadian Cancer Conference, Honey Harbour, Ontario, 1968 (Morgan, J.F. ed.) pp 40-75. Pergamon Press, Toronto.

HIGGINSON, J. & MUIR, C.S. (1977) Détermination de l'importance des facteurs environnementaux dans le cancer humain : rôle de l'épidémiologie. Bull. Cancer (Paris) 64 : 365-384.

- HOGAN, M., DATTA GUPTA, N. & CROTHERS, D.M. (1978) Transient electric dichroism of rod-like DNA molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75 : 195-199.
- HOGAN, M., DATTA GUPTA, N. & CROTHERS, D.M. (1979) Transient electric dichroism studies of the structure of the DNA complex with intercalated drugs. Biochemistry, 18 : 280-288.
- HOUSSIER, C. (1977) Etude optique et électro-optique des interactions de molécules d'intérêt biologique et de complexes macromoléculaires. Thèse Liège (Belgique).
- HOUSSIER, C. (1981) Investigating nucleic acids, nucleoproteins, polynucleotides, and their interactions with small ligands by electro-optical methods, in : Molecular electro-optics, Ed. S. Krauss, New-York.

HOWARD, P.C., CASCIANO, D.A., BELAND, F.A. & SHADDOCK, K.R.J.G. (1981). The binding of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene to DNA and repair of the adducts in primary rat hepatocyte cultures. Carcinogenesis, 2 : 97-102.

HOZUMI, M. (1969) Induction of skin tumors in mice by painting with 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide. Gann, 60 : 161-165.

IKEGAMI, S., NEMOTO, N., SATO, S. & SUGIMURA, T. (1969/1970) Binding of ¹⁴C-labeled 4-nitroquinoline 1-oxide to DNA in vivo. Chem. Biol. Interact., 1 : 321-330.

IKENAGA, M., ICHIKAWA-RYO, H. & KONDO, S. (1975) The major cause of inactivation and mutation by 4-nitroquinoline-1-oxide in Escherichia coli : Excisable 4NQO-purine adducts. J. Mol. Biol., 92 : 341-356.

IKENAGA, M., TADA, M. & KAWAZOE, Y. (1981a) Measurement of base damage caused by 4-nitroquinoline 1-oxide, in : DNA repair : a laboratory manual for research procedures, Eds. Friedberg, E.C. & Hanawalt, P.C., Marcel Dekker, New-York.

IKENAGA, M. & TAKEBE, H. (1981b) Actions of 4-nitroquinoline 1-oxide on eucaryotic cells : molecular and cellular studies. Dans "T. Sugimura (ed.), Carcinogenesis, Vol. 6, pp. 47-64 : New York Raven Press.

IKENAGA, M., TAKEBE, H. & ISHII, Y. (1977) Excision repair of DNA base damage in human cells treated with the chemical carcinogen, 4-NQO. Mutat. Res., 43 : 415-427.

ISHIZAWA, M. & ENDO, H. (1970) Mutagenic effect of a carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide in bacteriophage T4. Mutat. Res., 9 : 134-137.

ISHIZAWA, M. & ENDO, H. (1971) Mutagenesis of bacteriophage T4 by a carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide. Mutat. Res., 12 : 1-8.

IRVING, C.C. (1973) Interaction of chemical carcinogens with DNA. *Methods Cancer Res.*, 7 : 190-244.

IRVING, C.C. (1977) Influence of the aryl group on the reaction of glucuronides of N-arylacethydroxamic acids with polynucleotides. *Cancer Res.*, 37 : 524-528.

JANIAUD, P., DELAFORGE, M., LEVI, P., MAUME, B.F. & PADIEU, P. (1977) In mécanismes d'altération et de réparation du DNA, relation avec la mutagenèse et la cancérogénèse chimique. Editions du CNRS, Paris, pp. 431-470.

KADLUBAR, F.F. (1980) A transversion mutation hypothesis for chemical carcinogenesis by N². Substitution of guanine in DNA. *Chem. Biol. Interact.*, 31 : 255-263.

KADLUBAR, F.F., ANSON, J.F., DOOLEY, K.L. & BELAND, F.A. (1981a) Formation of urothelial and hepatic DNA adducts from the carcinogen 2-naphthylamine. *Carcinogenesis*, 2 : 467-470.

KADLUBAR, F.F., MELCHIOR, W.B., FLAMMANG, T.J., GAGLIANO, A.G., YOSHIDA, H. & GEACINTOV, N.E. (1981b) Structural consequences of modification of the oxygen atom of guanine in DNA by the carcinogen N-hydroxy-1-naphthylamine. *Cancer Res.*, 41 : 2168-2174.

KADLUBAR, F.F., MILLER, J.A. & MILLER, E.C. (1977) Hepatic microsomal N-glucuronidation and nucleic acid binding of N-hydroxy arylamines in relation to urinary bladder carcinogenesis. *Cancer Res.*, 37 : 805-814.

KADLUBAR, F.F., MILLER, J.A. & MILLER E.C. (1978) Guanyl O⁶-arylamination and O⁶-arylation of DNA by the carcinogen N-hydroxy-1-naphthylamine. *Cancer Res.*, 38 : 3628-3638.

KADLUBAR, F.F., UNRUH, L.E., BELAND, F.A., STRAUB, K.M. & EVANS, F.E. (1980) In vitro reaction of the carcinogen N-hydroxy-2-naphthylamine, with DNA at the C-8 and N² atoms of guanine and at N⁶ atom of adenine. *Carcinogenesis*, 1 : 139-150.

KAWAZOE, Y. (1981) Chemistry of 4-nitroquinoline 1-oxide and related compounds. *Carcinogenesis* Raven Press, Vol. 6 : The nitroquinolines, pp. 1-24.

KAWAZOE, Y. & ARAKI, M. (1967) Studies on chemical carcinogens. V. O,O'-diacetyl-4-hydroxyamino-quinoline 1-oxide. *Gann*, 58 : 485-487.

KAWAZOE, Y., ARAKI, M., HUANG, G.F., OKAMOTO, T., TADA, M. & TADA, M. (1975) Chemical structure of Q AII, one of the covalently bound adducts of carcinogenic 4NQO with nucleic acid bases of cellular nucleic acids. *Chem. Pharm. Bull.*, (Tokyo), 23 : 3041-3043.

KAWAZOE, Y. & OGAWA, O. (1980a) On acetylation of 4-(N-hydroxy-N-methylamino)quinoline 1-oxide. *Hétérocycles*, 14 : 1093-1095.

KAWAZOE, Y., OGAWA, O. & HUANG, G.F. (1980b) Studies on chemical carcinogens. XVII Structure of carcinogenic 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide derivatives. *Tetrahedron*, 36 : 2933-2938.

- KAWAZOE, Y., TACHIBANA, M., AOKI, K. & NAKAHARA, W. (1967) The structure-carcinogenicity relationship among derivatives of 4-nitro and 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxides. *Biochem. Pharm.*, 16 : 631-636.
- KING, C.M. & WEBER, W.W. (1981). Formation, metabolic activation by N,O-acyl-transfer, and hydrolysis of N-acyl-N-arylamine derivatives. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 58 : 117-122.
- KING, H.W.S., OSBORNE, M.R., BELAND, F.A., HARVEY, R.G. & BROOKES, P. (1976) (+)-7 α , 8 β -dihydroxy-9 β , 10 β -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene is an intermediate in the metabolism and binding to DNA of benzo(a)pyrene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 8 : 2679-2681.
- KLEIN, G. & KLEIN, E. (1984) Oncogene activation and tumor progression. *Carcinogenesis*, 5 : 429-435.
- KLEVAN, L. & SCHUMAKER, V.N. (1982) Stabilisation of Z-DNA by polyarginine near physiological ionic strength. *Nucleic Acids Res.*, 10 : 6809-6817.
- KOLATA, G. (1983) Z-DNA moves toward "real biology". *Science*, 222 : 495-496.
- KRAWISZ, B.R. & LIEBERMAN, M.N. (1984) Methylation of deoxycytidine in replicating cells treated with ultraviolet radiation and chemical carcinogens. *Carcinogenesis*, 5 : 1141-1144.
- KRIEK, E. (1972) Persistent binding of a new reaction product of the carcinogen N-hydroxy-N-2-acetylaminofluorene with guanine in rat liver DNA in vivo. *Cancer Res.*, 32 : 2042-2048.
- KRIEK, E. (1979) Aromatic amines and related compounds as carcinogenic hazards to man, in "Environmental carcinogenesis", (Emmelot, P. & Kriek, E., eds) Elsevier/North Holland Biomedical Press, pp. 143-164.
- KRIEK, E. & HENGEVELD, G.M. (1978) Reaction products of the carcinogen 4-hydroxy-4-acetyl-amino-4'-fluorobiphenyl with DNA in liver and kidney in rat. *Chem. Biol. Interact.*, 21 : 179-201.
- KRIEK, E. & SPELT, C.E. (1979) Differential excision from data of the C-8 deoxyguanosine reaction products of N-hydroxy-2-aminofluorene and N-acetoxy-N-acetyl-2-aminofluorene by endonuclease S1 from *Aspergillus oryzae*. *Cancer Lett.*, 7 : 147-154.
- KRIEK, E. & WESTRA, J.G. (1980) Structural identification of the pyrimidine derivatives formed from N-(deoxyguanosin-8-yl)-2-aminofluorene in aqueous solution at alkaline pH. *Carcinogenesis*, 1 : 459-468.
- KRUCZEK, I. & DOERFLER, W. (1983) Expression of the chloramphenicol acetyl-transferase gene in mammalian cells under the control of adenovirus type 12 promoters : effect of promoter methylation on gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 : 7586-7590.
- LAFER, E.M., MOLLER, A., NORDHEIM, A., STOLLAR, B.D., & RICH, A. (1981) Antibodies specific for left-handed Z-DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 : 3546-3550.

- LANG, M.C.E., FUCHS, R.P.P. & DAUNE, M.P. (1977) Secondary structural modifications as a consequence of in vitro acetylation and phenanthrylation of DNA by the ultimate carcinogen N-acetoxy-N-2-acetylaminophenanthrene. *Cancer Res.*, 37 : 3887-3891.
- LANGNER, K.D., VARDIMON, L., RENZ, D. & DOERFLER, W. (1984) DNA methylation of three 5'-C-C-G-G-3' sites in the promoter and 5' region inactivate the E2a gene of adenovirus type 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 : 2950-2954.
- LAPPI, D.A., EVANS, F.E. & KAPLAN, N.O. (1980) Reduced nicotinamide 8-(alkylamins) adenine dinucleotides : enzyme - coenzyme interactions with different adenyl glycosyl bond conformation. *Biochemistry*, 19 : 3841-3845.
- LAVAL, J. (1977) Two enzymes are required for strand incision of alkylated DNA. *Nature*, 169 : 829-832.
- LAVAL, J. (1978) Recent progress in excision repair of DNA. *Biochimie*, 60 : 1123-1134.
- LAVAL, J., PIERRE, J. & LAVAL, F. (1981) Release of 7-methylguanine residues from alkylated DNA by extracts of *Micrococcus luteus* and *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 : 852-855.
- LEFEVRE, J.F., FUCHS, R.P. & DAUNE, M.P. (1978) Comparative study on the 7-iodo and 7-fluoro derivatives of N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene : binding sites on DNA and conformational change of modified deoxytrinucleotides. *Biochemistry*, 17 : 2561-2567.
- LENG, M., PTAK, M., RIO, P. (1980) Conformation of acetylaminofluorene and aminofluorene modified guanosine and guanosine derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 96 : 1095-1102.
- LEVINE, A.F., FINK, L.M., WEINSTEIN, I.B. & GRUNBERGER, D. (1974) Effect of N-2-acetylaminofluorene modifications on the conformation of nucleic acids. *Cancer Res.*, 34 : 319-327.
- LEVITT, M. (1978) How many base-pairs per turn does DNA have in solution and in chromatin ? Some theoretical calculations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75 : 640-644.
- LOTLIKAR, P.D. & HONG, Y.S. (1981) Microsomal N- and C-oxidations of carcinogenic aromatic amines and amides. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 58 : 101-107.
- MALFOY, B., HARTMANN, B. & LENG, M. (1981) The B-Z transition of poly(dG-dC). poly(dG-dC) modified by some platinum derivatives. *Nucleic Acids Res.*, 9 : 5255-5271.
- MALINGE, J.M. & LENG, M. (1984) Reaction of cis-diamminedichloroplatinum (II) and DNA in B or Z conformation. *EMBO, J.*, 3 : 1273-1279.
- MALKIN, M.F. & ZAHALSKY, A.C. (1966) Interaction of the water-soluble carcinogen 4-nitroquinoline N-oxide with DNA. *Science*, 154 : 1665-1667.
- MARSHALL, C.J., VOUSDEN, K.H. & PHILLIPS, D.H. (1984) Activation of C-Ha-ras-1 proto-oncogene by in vitro modification with a chemical carcinogen, benzo(a)pyrene diol-epoxide. *Nature*, 310 : 586-589.

MATSUSHIMA, T., KOBUNA, I. & SUGIMURA, T. (1967) In vivo interaction of 4-nitroquinoline-1-oxide and its derivatives with DNA. *Nature*, 216 : 508.

MEEHAN, T., STRAUB, K. & CALVIN, M. (1977) Benzo(a)pyrene diol epoxide covalently binds to deoxyguanosine and deoxyadenosine in DNA. *Nature*, 269 : 725-727.

MILLER, E.C. (1978) Some current perspectives on chemical carcinogens in humans and experimental animals : presidential address. *Cancer Res.*, 38 : 1479-1496.

MILLER, J.A. (1970) Carcinogenesis by chemicals : an overview. G.H.A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.*, 30 : 559-576.

MILLER, J.A. & MILLER, E.C. (1953) The carcinogenic aminoazo dyes. *Advan. Cancer Res.*, 1 : 340-396.

MILLER, J.A. & MILLER, E.C. (1979) Perspectives on the metabolism of chemical carcinogens. In "Environmental carcinogenesis", (Emmelot, P. & Kriek, E., eds), Elsevier/North Holland Biomedical Press, p. 25-50.

MOLLER, A., NORDHEIM, A., NICHOLS, S.R. & RICH, A. (1981) 7-methylguanine in poly(dG-dC).poly(dG-dC) facilitates Z-DNA formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 : 4777-4781.

MOORE, P.D., RABKIN, S.D., OSBORN, A.L., KING, C.M. & STRAUSS, B.S. (1982) Effects of acetylated and deacetylated 2-aminofluorene adducts on in vitro DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 : 7166-7170.

MORGENEGG, G., CELIO, M.R., MALFOY, B., LENG, M. & KUENZLE, C.C. (1983) Z-DNA immunoreactivity in rat tissues. *Nature*, 303 : 540-543.

MORI, K. (1967) Carcinoma of the glandular stomach of mice by instillation of 4-nitroquinoline 1-oxide. *Gann*, 58 : 389-393.

MORI, K. & YASUNO, A. (1961) Induction of pulmonary tumors in mice by subcutaneous injection of 4-nitroquinoline N-oxide. *Gann*, 52 : 149-153.

NAGAO, M. & SUGIMURA, T. (1976) Molecular biology of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide. Dans : *Advances in Cancer Research*, Vol. 33, ed. by G. Klein & S. Neinhouse, pp. 131-169. Academic Press, New-York et London.

NAGATA, C., KODAMA, M., TAGASHIRA, Y. & IMAMURA, A. (1966) Interaction of polynuclear aromatic hydrocarbons, 4-nitroquinoline 1-oxide, and various dyes with DNA. *Biopolymers*, 4 : 409-427.

NAKAHARA, W., FUKUOKA, F. & SAKAI, S. (1958) The relation between carcinogenicity and chemical structure of certain quinoline derivatives. *Gann*, 49 : 33-41.

NAKAHARA, W., FUKUOKA, F. & SUGIMURA, T. (1957) Carcinogenic action of 4-nitroquinoline 1-oxide. *Gann*, 48 : 129-137.

- NELSON, J.H., GRUNBERGER, D., CANTOR, C.R. & WEINSTEIN, I.B. (1971) Modification of ribonucleic-acid by chemical carcinogens. IV. Circular dichroism and proton magnetic resonance studies of oligonucleotides with N-2-acetylaminofluorene. *J. Mol. Biol.*, 62 : 331-346.
- NEUMANN, J.M., GUSCHLBAUER, W. & TRAN-DINH, S. (1979) Conformation and flexibility of GpC and CpG in neutral aqueous solution using ^1H nuclear-magnetic-resonance and spin-lattice-relaxation time measurements. *Eur. J. Biochem.*, 100 : 141-148.
- NORDHEIM, A., HAO, W.M., WOGAN, G.N. & RICH, A. (1982a) Salt-induced conversion of B-DNA to Z-DNA. Inhibited by aflatoxin B_1 . *Science*, 219 : 1434-1436.
- NORDHEIM, A. & RICH, A. (1983b) Negatively supercoiled simian virus 40 DNA contains Z-DNA segments within transcriptional enhancer sequences. *Nature*, 303 : 674-678.
- NORDHEIM, A. & RICH, A. (1983a) The sequence $(\text{dC-dA})_n (\text{dG-dT})_n$ forms left-handed Z DNA in negatively supercoiled plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 : 1821-1825.
- NORDHEIM, A., TESSER, P., AZORIN, F., KWON, Y.H., MOLLER, A. & RICH, A. (1982b) Isolation of drosophila proteins that bind selectively to left-handed Z-DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 : 7729-7733.
- O'CONNOR, P.J., SAFFHILL, R. & MARGISON, G.P. (1979) N-Nitroso compounds : biochemical mechanisms of action. In "Environmental carcinogenesis", (Emmelot, P. & Kriek, E., eds), Elsevier/North Holland Biomedical Press, pp. 73-98.
- OKABAYASHI, T. & YOSHIMOTO, A. (1962) Reduction of 4-nitroquinoline 1-oxide by microorganism. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 10 : 1221-1226.
- OKANO, T., GOTO, M., MATSUMOTO, H. & TAKADATE, A. (1972) Electronic properties of N-heteroaromatics. XLVII. Absorption spectra and electronic structure of some quinoline 1-oxides of biological interest. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 20 : 2551-2560.
- OKANO, T., NIITSUMA, A., TAKADATE, A. & UEKAMA, K. (1969) Charge transfer in the molecular interaction of 4-nitroquinoline 1-oxide and related carcinogens with DNA and deoxyribonucleosides. *Gann*, 60 : 97-106.
- ORNSTEIN, R.L., & REIN, R. (1979) Nucleic acid base and carcinogen metabolite specificities during intercalative interactions between DNA and 4-nitroquinoline 1-oxide. *Chem. Biol. Interact.*, 27 : 291-311.
- PAUL, J.S. & MONTGOMERY, P. O'B. Jr. (1970) Interaction of 4-nitroquinoline 1-oxide with deoxyribonucleic acid and synthetic polydeoxyribonucleotides. *Mol. Pharmacol.*, 6 : 315-322.
- PAUL, J.S., MONTGOMERY, P.O'B.Jr. & LOUIS, J.B. (1971) A proposed model of the interaction of 4-nitroquinoline 1-oxide with DNA. *Cancer Res.*, 31 : 413-419.
- PECK, L.J., NORDHEIM, A., RICH, A. & WANG, J.C. (1982) Flipping of cloned $\text{d}(\text{pCpG})_n\text{-d}(\text{pCpG})_n$ DNA sequences from right- to left-handed helical structure by salt, $\text{Co}(\text{III})$, or negative supercaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79 : 4560-4564.

- PFEIFER, G.P., GRUNBERGER, D. & DRAHOVSKY, D. (1984) Impaired enzymatic methylation of BPDE-modified DNA. *Carcinogenesis*, 5 : 931-935.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A., FUCHS, R.P.P. & DIRHEIMER, G. (1984) In vitro enzymatic methylation of DNA modified with 2-aminofluorene. *Soumis pour publication*.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A., BOITEUX, S., LAVAL, J., KEITH, G. & DIRHEIMER, G. (1983a) Enzymatic methylation of chemically alkylated DNA and poly(dG-dC).poly(dG-dC) in B and Z forms. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 116 : 682-688.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A., GALIEGUE-ZOUITINA, S., BAILLEUL, B., LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. & DIRHEIMER, G. (1983b) Enzymatic methylation of DNA and poly(dG-dC).poly(dG-dC) modified by 4-acetoxyaminoquinoline-1-oxide, the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline-1-oxide. *FEBS Lett.*, 163 : 85-88.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A., SALAS, C., FUCHS, R.P.P. & DIRHEIMER, G. (1981) Mechanism of inhibition of enzymatic deoxyribonucleic acid methylation by 2-(acetylamino)fluorene bound to deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 20 : 3020-3024.
- PHILLIPS, D.H., MILLER, J.A., MILLER, E.C. & ADAMS, B. (1981) Structures of the DNA adducts formed in mouse liver after administration of the proximate hepatocarcinogen 1'-hydroxyestrazole. *Cancer Res.*, 41 : 176-186.
- PIERRE, J. & LAVAL, J. (1980) *Micrococcus luteus* endonucleases for apurinic/aprimidinic sites in deoxyribonucleic acid. 1. Purification and general properties. *Biochemistry*, 19 : 5018-5024.
- PIERRE, J. & LAVAL, J. (1980b) *Micrococcus luteus* endonucleases for apurinic/aprimidinic sites in deoxyribonucleic acid. 2. Further studies on the substrate specificity and mechanism of action. *Biochemistry*, 19 : 5024-5029.
- POHL, F.M. & JOVIN, T.M. (1972a) Salt-induced co-operative conformational change of a synthetic DNA : equilibrium and kinetic studies with poly(dG-dC). *J. Mol. Biol.*, 67 : 375-396.
- POHL, F.M., JOVIN, T.M., BAEHR, W. & HOLBROOK, J.J. (1972b) Ethidium bromide as a cooperative effector of a DNA structure. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 69 : 3805-3809.
- POIRIER, M.C. (1981) Antibodies to carcinogen-DNA adducts. *J. Natl. Cancer Inst.*, 67 : 515-519.
- PRAKASH, L. & SHERMAN, F. (1974a) Differentiation between amber and ochre mutants of yeast by reversion with 4-nitroquinoline-1-oxide. *Genetics*, 77 : 245-254.
- PRAKASH, L., STEWART, J.W. & SHERMAN, F. (1974b) Specific induction of transitions and transversions of G-C base pairs by 4-nitroquinoline-1-oxide in iso-1-cytochrome c mutants of yeast. *J. Mol. Biol.*, 85 : 51-65.
- PULKRABEK, P., LEFFLER, S., GRUNBERGER, D. & WEINSTEIN, B. (1979) Modification of deoxyribonucleic acid by a diol epoxide of benzo(a)pyrene. Relation to deoxyribonucleic acid structure and conformation and effects on transfectional activity. *Biochemistry*, 18 : 5128-5134.

PULKRABEK, P., LEFFLER, S., WEINSTEIN, I.B. & GRUNBERGER, D. (1977) Conformation of DNA modified with a dihydrodiol epoxide derivative of benzo(a)pyrene. *Biochemistry*, 16 : 3127-3132.

PURCHASE, I.F., LONGSTAFF, E., ASHBY, J., STYLES, J.A., ANDERSON, D., LEFEVRE, P.A. & WESTWOOD, F.R. (1976) Evaluation of six short term tests for detecting organic chemical carcinogens and recommendations for their use. *Nature*, 264 : 624-627.

RADMAN, M. (1980) Is there SOS induction in mammalian cells ? *Photochem. Photobiol.*, 32 : 823-830.

RADOMSKI, J.L. (1979) The primary aromatic amines : their biological properties and structure-activity relationships. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 19 : 129-157.

RAMSTEIN, J. & LENG, M. (1980) Salt-dependent dynamic structure of poly(dG-dC). poly (dG-dC). *Nature*, 288 : 413-414.

REDDY, E.P., REYNOLDS, R.K., SANTOS, E. & BARBACID, M. (1982) A point mutation is responsible for the acquisition of transforming properties by the T₂₄ human bladder carcinoma oncogene. *Nature*, 300 : 149-152.

REDDY, M.V., GUPTA, R.C., RANDEPATH, E. & RANDEPATH, K. (1984) ³²P-post labeling test for covalent DNA binding of chemicals in vivo : application to a variety of aromatic carcinogens and methylating agents. *Carcinogenesis*, 5 : 231-243.

REGAN, J.D. & SETLOW, R.B. (1974) Two forms of repair in the DNA of human cells damaged by chemical carcinogens and mutagens. *Cancer Res.*, 34 : 3318-3325.

RIGGS, A.D. & JONES, P.A. (1983) 5-methylcytosine, gene regulation, and cancer. *Advances in cancer research*, 40 : 1-30.

RIO, P., BAZGAR, S. & LENG, M. (1982) Detection of N-hydroxy-2-acetylaminofluorene-DNA adducts in rat liver measured by radioimmunoassay. *Carcinogenesis*, 3 : 225-227.

ROBERT-NICOUD, M., ARNDT-JOUIN, D.J., ZARLING, D.A. & JOUIN, T.M. (1984) Immunological detection of left-handed Z DNA in isolated polytene chromosomes. Effects of ions strength, pH, temperature and topological stress. *EMBO J.*, 3 : 721-731.

ROSENKRANZ, H.S. & POIRIER, L.A. (1979) An evaluation of the mutagenicity and DNA modifying activity in microbial systems of carcinogens and non carcinogens. *J. Natl. Cancer Inst.*, 62 : 873-892.

SAGE, E. (1981) Etude des modifications des acides nucléiques par des dérivés du cancérigène 2-acétylamino-fluorène, à l'aide d'anticorps spécifiques. Thèse d'Etat. Orléans.

SAGE, E. & LENG, M. (1980) Conformation of poly(dG-dC).poly(dG-dC) modified by the carcinogens N-acetoxy-N-acetyl-2-aminofluorene and N-hydroxy-N-2-aminofluorene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 : 4597-4601.

- SALAS, C.E., PFOHL-LESZKOWICZ, A., LANG, M.C. & DIRHEIMER, G. (1978) Effect of modification by N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene on the level of DNA methylation. *Nature*, 278 : 71-72.
- SARMA, D.S.R., RAJALAKSHMI, S. & FARBER, E. (1975) Chemical carcinogenesis : interactions of carcinogens with nucleic acids. In *Cancer : A comprehensive treatise* (F.F. Becker, ed.) Plenum Press, New York, 1 : 235-287.
- SAULE, S., MARTIN, P., GEGONNE, A., BEGUE, A., LAGROU, C. & STEHELIN, D. (1984) Expression of the C-myc oncogene in two fibroblastic, methylcholanthrene-induced cell lines of japanese quail. *Soumis pour publication*.
- SCRIBNER, J.D., FISK, S.R. & SCRIBNER, N.K. (1979a) Mechanisms of action of carcinogenic aromatic amines : an investigation using mutagenesis in Bacteria. *Chem. Biol. Interact.*, 26 : 11-25.
- SCRIBNER, J.D., MILLER, J.A. & MILLER, E.C. (1970) Nucleophilic substitution on carcinogenic N-acetoxy-N-arylacetamides. *Cancer Res.*, 30 : 1570.
- SCRIBNER, J.D. & NAIMY, N.K. (1973) Reaction of esters of N-hydroxy-2-acetamideophenanthrene with cellular nucleophiles and the formation of free radicals upon decomposition of N-acetoxy-N-arylacetamides. *Cancer Res.*, 33 : 1159.
- SCRIBNER, J.D. & NAIMY, N.K. (1975) Adducts between the carcinogen 2-acetamidophenanthrene and adenine and guanine of DNA. *Cancer Res.*, 35 : 1416-1421.
- SCRIBNER, N.K., SMITH, D.L., SCHRAM, K.H., Mc CLOSKEY, J.A. & SCRIBNER, J.D. (1979b) Reaction of the carcinogen N-acetoxy-4-acetamidostilbene with nucleosides. *Chem. Biol. Interact.*, 26 : 27-46.
- SHIRASU, Y. (1963) Further studies on carcinogenic action of 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide. *Gann*, 54 : 487-495.
- SHIRASU, Y. & OHTA, A. (1963) A preliminary note on the carcinogenicity of 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide. *Gann*, 54 : 221-223.
- SHIVAPURKAR, N., WILSON, M.J. & POIRIER, L.A. (1984) Hypomethylation of DNA in ethionine-fed rats. *Carcinogenesis*, 5 : 989-992.
- SIMS, P., GROVER, P.L., SWAISLAND, A., PAL, K. & HEWER, A. (1974) Metabolic activation of benzo(a)pyrene proceeds by a diol-epoxide. *Nature*, 252 : 326-328.
- SINGER, B. (1975) The chemical effects of nucleic acid alkylation and their relation to mutagenesis and carcinogenesis. In : Cohen, W.E., (ed.) *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, Vol. 15. Acad. Press, New York, pp. 219-284.
- SINGER, B. (1976) O²-alkylcytidine -- A new major product of neutral, aqueous reaction of cytidine with carcinogens. *FEBS Lett.*, 63 : 85-88.
- SINGLETON, C.K., KLYSIK, J., STIRDIVANT, S.M. & WELLS, R.D. (1982) Left-handed Z-DNA is induced by supercoiling in physiological ionic conditions. *Nature*, 299 : 312-316.

SPODHEIM-MAURIZOT, M., DREUX, M., SAINT-RUF, G. & LENG, M. (1979a) Alkaline stability of guanosine and some of its derivatives modified by the carcinogen N-acetoxyacetylaminofluorene. *Nucleic Acids Res.*, 7 : 2347-2356.

SPODHEIM-MAURIZOT, M., RIO, P. & LENG, M. (1979b) Discrimination by antibodies between local defects in DNA induced by 2-aminofluorene derivatives. *FEBS Lett.*, 108 : 66-68.

•SPODHEIM-MAURIZOT, M., SAINT-RUF, G. & LENG, M. (1979c) Conformational changes induced in DNA by in vitro reaction with N-hydroxy-N-2-aminofluorene. *Nucleic Acids Res.*, 6 : 1683-1694.

SUGIMURA, T. (1981) ed. *The nitroquinolines. Carcinogenesis*, Vol. 6, pp. 1-153, Raven Press, New York.

SUGIMURA, T. & NAGAO, M. (1981) Carcinogenic, mutagenic and comutagenic aromatic amines in human foods. *Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 58 : 27-33.

SUTHERLAND, J.C., GRIFFIN, K.P., KECK, P.C. & TAZACS, P.Z. (1981) Z-DNA : vacuum ultraviolet circular dichroism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78 : 4801-4804.

SWENSON, D.H., LIN, J.K., MILLER, E.C. & MILLER, J.A. (1977) Aflatoxin B₁-2,3-oxide as a probable intermediate in the covalent binding of aflatoxins B₁ and B₂ to rat liver DNA and ribosomal RNA in vivo. *Cancer Res.*, 37 : 172-181.

TADA, M. (1981) Metabolism of 4-nitroquinoline 1-oxide and related compounds. In *Carcinogenesis*, Vol. 6 : The nitroquinolines (Takashi Sugimura ed.) Raven Press, New York, pp. 25-45.

TADA, Mar., KOHDA, K.H. & KAWAZOE, Y. (1984) Biomimetic preparation and structure determination of QG_I, one of the quinoline-DNA base adducts formed in cells treated with 4-nitroquinoline 1-oxide. *Gann*, (sous presse).

TADA, M. & TADA, M. (1971) Interaction of a carcinogen, 4-nitroquinoline-1-oxide, with nucleic acids : Chemical degradation of the adducts. *Chem. Biol. Interact.*, 3 : 225-229.

TADA, M. & TADA, M. (1974) Requirement of L-serine for enzymic activation of carcinogen, 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide. *Gann*, 65 : 281-284.

TADA, M. & TADA, M. (1975) Seryl-tRNA synthetase and activation of the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide. *Nature*, 255 : 510-512.

TADA, M. & TADA, M. (1976) Main binding sites of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide in nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta*, 454 : 558-566.

TADA, M., TADA, M. & TAKAHASHI, T. (1967) Interaction of a carcinogen, 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide with nucleic acids. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 29 : 469-477.

TAKAHASHI, K., KAWAZOE, Y., TADA, M., TADA, M., ITO, N. & OKADA, M. (1978) Carcinogenicity of 4-nitrosoquinoline 1-oxide and its possible role in carcinogenesis by 4-NQO. *Gann*, 69 : 499-505.

- TANG, M.S. & LIEBERMAN, M.W. (1983) Quantification of adducts formed in DNA treated with N-acetoxy-2-acetylaminofluorene or N-hydroxy-2-aminofluorene : comparison of trifluoroacetic acid and enzymatic degradation. *Carcinogenesis*, 4 : 1001-1006.
- TARPLEY, W.G., MILLER, J.A. & MILLER, E.C. (1980) Adducts from the reaction of N-benzoyloxy-N-methyl-4-aminoazobenzene with deoxyguanosine or DNA in vitro and from hepatic DNA of mice treated with N-methyl-or N,N-dimethyl-4-aminoazobenzene. *Cancer Res.*, 40 : 2493-2499.
- TARPLEY, W.G., MILLER, J.A. & MILLER, E.C. (1982) Rapid release of carcinogen-guanine adducts from DNA after reaction with N-acetoxy-2-acetylaminofluorene or N-benzoyloxy-N-methyl-4-aminoazobenzene. *Carcinogenesis*, 3 : 81-88.
- TOHME, N. (1983) Mode d'action de substances cancérigènes : synthèse et réactivité de métabolites du N-oxyde de nitro-4-quinoléine (4NQO). Thèse de 3ème cycle, Lille.
- TOMATIS, L., AGTHE, C., BARTSH, H., HUFF, J., MONTESANO, R., SARACCI, R., WALKER, E. & WILBOORN, J. (1978) Evaluation of the carcinogenicity of chemicals : a review of the monograph programme of the International Agency for Research on Cancer (1971-1977). *Cancer Res.*, 38 : 877-885.
- TULLIS, D.L., STRAUB, K.M. & KADLUBAR, F.F. (1981) A comparison of the carcinogen-DNA adducts formed in rat liver in vivo after administration of single or multiple dose of N-methyl-4-aminoazobenzene. *Chem. Biol. Interact.*, 38 : 15-27.
- VAN HELDEN, P.D. (1983) The effect of adriamycin on Z-DNA and DNA synthesis. *Nucleic Acid Res.*, 23 : 8415-8420.
- VARDIMON, L., KRESSMANN, A., CEDAR, H., MAECHLER, M. & DOERFLER, W. (1982) The expression of a cloned adenovirus gene is inhibited by in vitro methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79 : 1073-1077.
- VIGNY, P., KINDTS, M., DUQUESNE, M., COOPER, C.S., GROVER, P.L. & SIMS, P. (1980) Metabolic activation of benz(a)anthracene : fluorescence spectral evidence indicates the involvement of a non-"bay-region" diol-epoxide. *Carcinogenesis*, 1 : 33-36.
- VISSER, A., & WESTRA, J.G. (1981) Portal persistency of 2-aminofluorene and N-acetyl-2-aminofluorene in rat liver DNA. *Carcinogenesis*, 2 : 737-740.
- WANG, A.H.J., HAKOSHIMA, T., VAN DER MAREL, G., VAN BOOM, J.H. & RICH, A. (1984) AT base pairs are less stable than GC base pairs in Z-DNA : the crystal structure of d(m⁵-CGT Am⁵-CG). *Cell*, 37 : 321-331.
- WANG, A.H.J., QUIGLEY, G.J., KOLPAK, F.J., CROWFORD, J.L., VAN BOOM, J.H., VAN DER MAREL, G. & RICH, A. (1979) Molecular structure of a left-handed double helical DNA fragment at atomic resolution. *Nature*, 282 : 680-686.
- WEINSTEIN, I.B. (1981) Current concepts and controversies in chemical carcinogenesis. *Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry*, 17 : 99-120.

WEISBURGER, E.K. (1981) N-substituted aryl compounds in carcinogenesis and mutagenesis. Natl. Cancer Inst. Monogr., 58 : 1-7.

WEISBURGER, J.H. & WEISBURGER, E.K. (1973) Biochemical formation and pharmacological toxicological and pathological properties of hydroxylamines and hydroxamic acids. Pharmacol. Rev., 25 : 1-66.

WEISBURGER, J.H. & WILLIAMS, G.M. (1975) Metabolism of chemical carcinogens. In Cancer : A comprehensive treatise (F.F. Becker, ed.) Plenum Press, New York, 1, pp. 185-234.

WESTRA, J.G., KRIEK, E. & HITTENHAUSEN, H. (1976) Identification of the persistently bound form of the carcinogen N-acetyl-2-aminofluorene to rat liver DNA in vivo. Chem. Biol. Interact., 15 : 149-164.

WILSON, V.L. & JONES, P.A. (1983) Inhibition of DNA methylation by chemical carcinogens in vitro. Cell, 32 : 239-246.

WILSON, V.L. & JONES, P.A. (1984) Chemical carcinogen-mediated decreases in DNA 5-methyl-cytosine content of BALB/3T3 cells. Carcinogenesis, 5 : 1027-1031.

WINKLE, S.A. & TINOCO, I. (1978) Interactions of 4-nitroquinoline 1-oxide with four deoxyribonucleotides. Biochemistry, 7 : 1352-1356.

WINKLE, S.A. & TINOCO, I. (1979) Interactions of 4-nitroquinoline 1-oxide with deoxyribodinucleotides. Biochemistry, 18 : 3833-3839.

WISLOCKI, P.G., BORCHERT, P., MILLER, J.A. & MILLER, E.C. (1976) The metabolic activation of the carcinogen 1'-hydroxysafrole in vivo and in vitro and the electrophilic reactivities of possible ultimate carcinogens. Cancer Res., 36 : 1686-1695.

•YAMASAKI, H., LEFFLER, S. & WEINSTEIN, I.B. (1977a) Effect of N-2-acetylaminofluorene modification on the structure and template activity of DNA and reconstituted chromatin. Cancer Res., 37 : 684-691.

YAMASAKI, H., PULKRABEK, P., GRUNBERGER, D. & WEINSTEIN, I.B. (1977b) Differential excision from DNA of the C-8 and N² guanosine adducts of N-acetyl-2-aminofluorene by single strand-specific endonucleases. Cancer Res., 37 : 3756-3760.

YOSHIDA, S., KOIWAI, O., SUZUKI, R. & TADA, M. (1984) Arrest of DNA elongation by DNA polymerases at guanine adducts on 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide modified DNA template. Cancer Res., 44 : 1867-1870.

YU F.L. (1977) Mechanism of aflatoxin B₁ inhibition of rat hepatic nuclear RNA synthesis. J. Biol. Chem., 252 : 3245-3251.

Les références indexées par • ne sont pas citées dans ce manuscrit. La bibliographie est en effet commune pour S. Zouitina-Galiègue et moi-même.



Cette thèse a été dactylographiée et imprimée

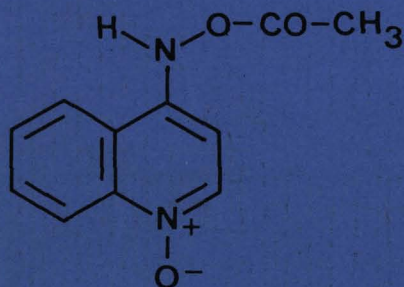
par

le Service Polycopie

de l'ASSOCIATION CORPORATIVE DES

ETUDIANTS EN MEDECINE DE LILLE

Le 4-nitroquinoléine 1-oxyde est une substance connue pour ses propriétés cancérigènes. Il est métabolisé dans la cellule en composés capables de réagir avec les nucléophiles cellulaires et en particulier l'ADN. Nous avons pu montrer que le dérivé acétylé du 4 hydroxyaminoquinoléine 1-oxyde, se fixe de façon covalente sur les bases de l'ADN.



Les modifications obtenues sont identiques à celles produites sur l'ADN de cellules traitées avec le cancérigène. Nous avons déterminé la structure des principaux composés formés ; deux composés correspondent à la substitution de la guanine par la quinoléine (en C8 et N²) un composé avec l'adénine, l'atome substitué étant l'azote en position 6.

Nous avons également abordé l'étude de la perturbation induite sur l'ADN par la fixation du cancérigène à l'aide d'un polynucléotide, le poly(dG-dC).poly(dG-dC).

Mots-clefs : CANCÉROGÈNE ULTIME - ADDUIT MOLÉCULAIRE - DNA - STRUCTURE - QUINOLÉINE DÉRIVÉ - CONFORMATION INDUITE - MÉTABOLISME.