

50376
1984
159

50376
1984
459

N° d'ordre : 640

THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour l'obtention du grade de

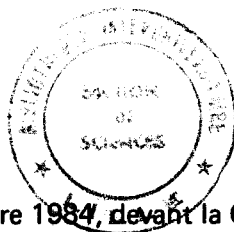
DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

par

Sylvie ZOUTINA-GALIEGUE

LA CANCÉROGÉNÈSE PAR LE 4-NITROQUINOLÉINE 1-OXYDE

ÉTUDE IN VITRO DES MODIFICATIONS CHIMIQUES ET STRUCTURALES DE L'ADN



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

Président : Monsieur G. BISERTE

Rapporteurs : Madame M.H. LOUCHEUX

Monsieur G. DIRHEIMER

Monsieur C. HOUSSIER

Examineurs : Monsieur M. DAUNE

Monsieur M. LENG

Monsieur J. LHOMME

Monsieur J. KREMBEL

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
 M. CAPURON Alfred
 M. CARREZ Christian
 M. CAYATTE Jean-Louis
 M. CHAPOTON Alain
 M. COQUERY Jean-Marie
 Mme CORSIN Paule
 M. CORTOIS Jean
 M. COUTURIER Daniel
 M. CROSNIER Yves
 M. CURGY Jean-Jacques
 Mlle DACHARRY Monique
 M. DAUCHET Max
 M. DEBRABANT Pierre
 M. DEGAUQUE Pierre
 M. DELORME Pierre
 M. DELORME Robert
 M. DE MASSON D'AUTUME Antoine
 M. DEMUNTER Paul
 M. DENEL Jacques
 M. DE PARIS Jean-Claude
 Mlle DESSAUX Odile
 M. DEVRAINNE Pierre
 M. DHAINAUT André
 Mme DHAINAUT Nicole
 M. DORMARD Serge
 M. DOUKHAN Jean-Claude
 M. DUBOIS Henri
 M. DUBRULLE Alain
 M. DUBUS Jean-Paul
 M. DUPONT Christophe
 M. FAKIR Sabah
 M. FONTAINE Hubert
 M. FOUQUART Yves
 M. FRONTIER Serge
 M. GAMBLIN André
 M. GLORIEUX Pierre

 M. GOBLOT Rémi
 M. GOSSELIN Gabriel
 M. GOUDMAND Pierre
 M. GREGORY Pierre
 M. GREMY Jean-Paul
 M. GREVET Patrick
 M. GUILBAULT Pierre
 M. HENRY Jean-Pierre
 M. HERMAN Maurice
 M. JACOB Gérard
 M. JACOB Pierre
 M. JACQUILLAT Bertrand
 M. JEAN Raymond
 M. JOFFRE Patrick
 M. JOURNAL Gérard

Géographie
 Biologie animale
 Informatique
 Sciences économiques
 Electronique
 Psychophysiologie
 Paléontologie
 Physique nucléaire et corpusculaire
 Chimie organique
 Electronique
 Biologie
 Géographie
 Informatique
 Géologie appliquée
 Electronique
 Physiologie animale
 Sciences économiques
 Sciences économiques
 Sociologie
 Informatique
 Analyse
 Spectroscopie de la réactivité chimique
 Chimie minérale
 Biologie animale
 Biologie animale
 Sciences économiques
 Physique du solide
 Spectroscopie hertzienne
 Spectroscopie hertzienne
 Spectrométrie des solides
 Vie de la firme (I.P.A.)
 Algèbre
 Dynamique des cristaux
 Optique atmosphérique
 Ecologie numérique
 Géographie urbaine, industrielle et démographique
 Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques

 Algèbre
 Sociologie
 Chimie physique
 I.P.A.
 Sociologie
 Sciences économiques
 Physiologie animale
 Génie mécanique
 Physique spatiale
 Informatique
 Probabilités et statistiques
 Gestion
 Biologie des populations végétales
 Vie de la firme (I.P.A.)
 Spectroscopie hertzienne

M. KREMBEL Jean
M. LANGRAND Claude
M. LATTEUX Michel
Mme LECLERCQ Ginette
M. LEFEVRE Christian
Mlle LEGRAND Denise
Mlle LEGRAND Solange
Mme LEHMANN Josiane
M. LEMAIRE Jean
M. LE MAROIS Henri
M. LHENAFF René
M. LOCQUENEUX Robert
M. LOSFELD Joseph
M. LOUAGE Francis
M. MACKE Bruno

M. MAIZIERES Christian
M. MESSELYN Jean
M. MESSERLIN Patrick
M. MONTEL Marc
Mme MOUNIER Yvonne
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine
M. PARSY Fernand
M. PASZKOWSKI Stéphan
Mlle PAUPARDIN Colette
M. PERROT Pierre
M. PERTUZON Emile
M. PONSOLLE Louis
M. PORCHET Maurice
M. POVY Lucien
M. RACZY Ladislas
M. RAOULT Jean-François
M. RICHARD Alain
M. RIETSCH François
M. ROBINET Jean-Claude
M. ROGALSKI Marc
M. ROY Jean-Claude
M. SCHAMPS Joël
Mme SCHWARZBACH Yvette
M. SLIWA Henri
M. SOMME Jean
Mlle SPIK Geneviève
M. STAROSWIECKI Marcel
M. STERBOUL François
M. TAILLIEZ Roger
Mme TJOTTA Jacqueline
M. TOULOTTE Jean-Marc
M. TURREL Georges
M. VANDORPE Bernard
M. VAST Pierre
M. VERBERT André
M. VERNET Philippe
M. WALLART Francis
M. WARTEL Michel
M. WATERLOT Michel
Mme ZINN Justin Nicole

Biochimie
Probabilités et statistiques
Informatique
Catalyse
Pétrologie
Algèbre
Algèbre
Analyse
Spectroscopie hertzienne
Vie de la firme (I.P.A.)
Géographie
Physique théorique
Informatique
Electronique
Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques

Automatique
Physique atomique et moléculaire
Sciences économiques
Physique du solide
Physiologie des structures contractiles
Géographie
Mécanique
Analyse numérique
Biologie physiologie végétales
Chimie appliquée
Physiologie animale
Chimie physique
Biologie animale
Automatique
Electronique
Géologie structurale
Biologie animale
Physique des polymères
E.U.D.I.L.
Analyse
Psychophysiologie
Spectroscopie moléculaire
Géométrie
Chimie organique
Géographie
Biochimie
Informatique
Informatique
Génie alimentaire
Mathématiques
Automatique
Spectrochimie infrarouge et Raman
Chimie minérale
Chimie inorganique
Biochimie
Génétique
Spectrochimie infrarouge et Raman
Chimie inorganique
Géologie générale
Algèbre

A MA FAMILLE.

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé à l'Institut de Recherche sur le Cancer de Lille et Unité n° 124 de l'I.N.S.E.R.M., où Monsieur le Professeur G. BISERTE a bien voulu m'accueillir. Qu'il trouve ici l'expression de ma vive reconnaissance et de mes sentiments les plus respectueux.

Madame M.H. LOUCHEUX, Maître de Recherche au C.N.R.S., m'a proposé le sujet de cette thèse ; elle a guidé mes débuts dans la Recherche et a toujours suivi ce travail avec le plus grand intérêt. Je lui adresse ici mes remerciements les plus sincères et toute ma reconnaissance pour la formation de chercheur qu'elle m'a donnée.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur G. DIRHEIMER d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail de thèse. Nous avons entrepris une enrichissante collaboration avec son laboratoire, à Strasbourg. Je le remercie pour l'accueil très sympathique que j'y ai toujours trouvé.

Monsieur le Professeur C. HOUSIER a bien voulu juger ce travail et en être le rapporteur, je l'en remercie vivement. C'est dans son laboratoire, à l'Université de Liège, au Sart-Tilman que les mesures électro-optiques ont été effectuées sur l'ADN modifié. Je lui exprime ici mes remerciements les plus sincères et ma profonde reconnaissance, pour l'accueil très chaleureux que j'ai reçu lors des séjours dans son laboratoire.

Je remercie également Monsieur le Professeur M. DAUNE d'avoir accepté de juger ce travail. C'est dans son laboratoire, à Strasbourg, que tout jeune chercheur, j'ai été épaulée lors de mes débuts dans la recherche en Cancérogénèse chimique. Qu'il trouve ici l'expression de ma sincère gratitude et de mon profond respect.

Je suis reconnaissante à Monsieur M. LENG, Maître de Recherche au C.N.R.S., d'avoir bien voulu participer au Jury de cette thèse.

Monsieur J. L'HOMME, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, a accepté de juger ce travail. Je lui adresse ici tous mes remerciements.

Je remercie vivement Monsieur J. KREMBEL, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille, d'avoir bien voulu examiner ce travail de thèse.

J'associe à mes remerciements Monsieur J. LAVAL, Maître de Recherche au C.N.R.S., pour l'accueil sympathique que j'ai reçu dans son laboratoire, à l'Institut Gustave Roussy à Villejuif.

L'enregistrement des spectres de résonance magnétique nucléaire du proton des composés de substitution base-cancérogène a été effectué par Monsieur B. PERLY, du C.E.N. de Saclay. Je le remercie vivement.

Je remercie également Messieurs P. VIGNY et Y.M. GINOT de l'Institut Curie de Paris, pour la réalisation des spectres de masse par la technique de PDMS, à la faculté des Sciences d'Orsay. Je leur adresse mes plus vifs remerciements.

Madame Annie LESZKOWICZ, du laboratoire du Professeur DIRHEIMER, a réalisé les expériences de méthylation de l'ADN modifié. Je la remercie pour sa sympathie et sa gentillesse lors des discussions que nous avons eues.

C'est avec plaisir que j'associe à ces remerciements mes camarades de l'Unité 124 de l'I.N.S.E.R.M. et de l'I.R.C.L., pour la bonne ambiance régnant au laboratoire.

Je tiens à remercier plus particulièrement Monsieur B. BAILLEUL qui a été mon proche collaborateur dans ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma sympathie.

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

Monsieur C. DENIS pour son excellente aide technique et les schémas qui figurent dans ce mémoire

Madame M. MOISON pour la frappe de ce manuscrit

Madame R. CARETTE pour l'impression

Madame M.T. GARET pour les photographies.

Je remercie la Ligue Nationale Française contre le Cancer qui m'a accordé une bourse pendant deux années et la Fondation pour la Recherche Médicale pour son soutien durant trois mois.

Enfin c'est avec une profonde gratitude que je remercie l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale qui, il y a trois ans, m'a fait l'honneur de m'accueillir en son sein.

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 in vitro des modifi-
cations chimiques et structurales de l'ADN p. 40

I - Mise en évidence de la réaction covalente des
dérivés di- et monoacétylés du 4HAQO sur l'ADN
et les polynucléotides de synthèse. Choix d'un
modèle de cancérogène ultime du 4NQO p. 41

a) Etude de la réactivité du O,O'-diacétyl-4-
hydroxyaminoquinoléine 1-oxyde (diAc-4HAQO)
sur l'ADN in vitro. Comparaison avec l'ADN
modifié in vivo p. 43

1) Etude in vitro p. 43

2) Etude in vivo p. 43

b) Etude de la réactivité du 4-acétoxyaminoquino-
léine 1-oxyde sur l'ADN in vitro p. 59

c) Comparaison par clhp des hydrolysats d'ADN
modifiés in vivo et in vitro. Bilan des princi-
paux adduits base-quinoléine p. 68

Compléments d'information p. 93

d) Conclusion p. 97

II - Identification structurale des composés de substi-
tution de l'ADN par l'Ac-4HAQO p. 98

a) Les principaux adduits base-quinoléine p. 99

1) Le dGuo-C8-AQO p. 99

2) Le r.o. dGuo-C8-AQO p. 99

3) Le dGuo-N2-AQO p. 100

4) Le dAdo-N6-AQO p. 100

b) Le dosage des adduits sur l'ADN p. 150

1) Dosage par spectrophotométrie d'absorption
de l'adduit sur le C8 de la guanine p. 150

2) Analyse quantitative en clhp des trois prin-
cipaux adduits après hydrolyse enzymatique
de l'ADN p. 150

c) Conclusion	p. 160
III - <u>Les altérations structurales de l'ADN modifié in vitro. Etudes physicochimiques et reconnaissance enzymatique des lésions</u>	p. 163
a) Mesure des températures de fusion de l'ADN modifié in vitro par le diAc-4HAQO et l'Ac-4HAQO	p. 165
b) Etude électrooptique de l'ADN modifié par le diAc-4HAQO et l'Ac-4HAQO et du poly(dG-dC).poly(dG-dC) modifié par l'Ac-4HAQO	p. 168
1) Présentation de la méthode et définitions	p. 168
2) Résultats concernant la perturbation structurale de l'ADN modifié	p. 171
3) Détermination de l'orientation du cycle quinoléine dans l'ADN modifié	p. 174
4) Essai de détermination de l'orientation de chacun des adduits guanine-quinoléine dans l'ADN, à l'aide du poly(dG-dC).poly(dG-dC) modifié l'Ac-4HAQO	p. 177
5) Bilan	p. 181
c) Etude de la reconnaissance enzymatique in vitro des lésions créées sur l'ADN par le diAc-4HAQO ou l'Ac-4HAQO	p. 183
1) Reconnaissance enzymatique des lésions par l'endonucléase S ₁ d'Aspergillus Oryzae	p. 183
2) Reconnaissance enzymatique par des extraits cellulaires de Micrococcus luteus	p. 185
d) Etude de la méthylation enzymatique in vitro de l'ADN modifié par l'Ac-4HAQO	p. 192
e) Discussion	p. 199
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	p. 202

BIBLIOGRAPHIE

Dans le texte, les publications apparaissent aux pages suivantes :

Publication n° 1	p. 45
Publication n° 2	p. 54
Publication n° 3	p. 62
Publication n° 4	p. 69
Publication n° 5	p. 101
Publication n° 6	p. 108
Publication n° 7	p. 120
Publication n° 8	p. 156
Publication n° 9	p. 188
Publication n° 10	p. 195

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-Acétylamino fluorène
2AF	2-Amino fluorène
N-AAAF	N-Acétoxy-2-acétylamino fluorène
N-OH-AAF	N-Hydroxy-2-acétylamino fluorène
N-OH-AF	N-Hydroxy-2-amino fluorène
1NA	1-Naphtylamine
2NA	2-Naphtylamine

Adduits

dAdo-N6-AQO	3-(Désoxyadenosin-N ⁶ -yl)-4-aminoquinoléine 1-oxyde
dGuo-C8-AQO	N-(Désoxyguanosin-8-yl)-4-aminoquinoléine 1-oxyde
dGuo-N2-AQO	3-(Désoxyguanosin-N ² -yl)-4-aminoquinoléine 1-oxyde
r.o.dGuo-C8-AQO	1(-1'-désoxyriboside)-1- [6-(2,5-diamino-4-oxypyrimidinyl)] -3-(4-quinoléinyl 1-oxyde) urée
dGuo-C8-AAF	N-(Désoxyguanosin-8-yl)-2-acétylamino fluorène
dGuo-C8-AF	N-(Désoxyguanosin-8-yl)-2-amino fluorène

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
ϵ	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 Bernard BAILLEUL.

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 cancérogène : le O,O'-diacétyl-4-hydroxy-aminoquinoléine 1-oxyde.

Thèse de 3 me 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 3 me Cycle, Lille, 18 octobre 1979.

- GALIEGUE, S., LECOQ, 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. & LAVAL, J.

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-acetoxyminoquinoline from the hydrolysis of 1-acetoxy-4-acetoxymino-1,4-dihydroquinoline. In vitro and in vivo properties.

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

- GALIEGUE-ZOITINA, 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-ZOITINA, 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-ZOITINA, 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-ZOITINA, 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-ZOITINA, 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-ZOITINA, 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-ZOITINA, 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 cancérigène 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 cancérigènes 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 cancérigènes 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 cancérigène 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 cancérigène 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 cancérigènes 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 cancérigènes 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

chloramphénicol 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 cancérogénèse. 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

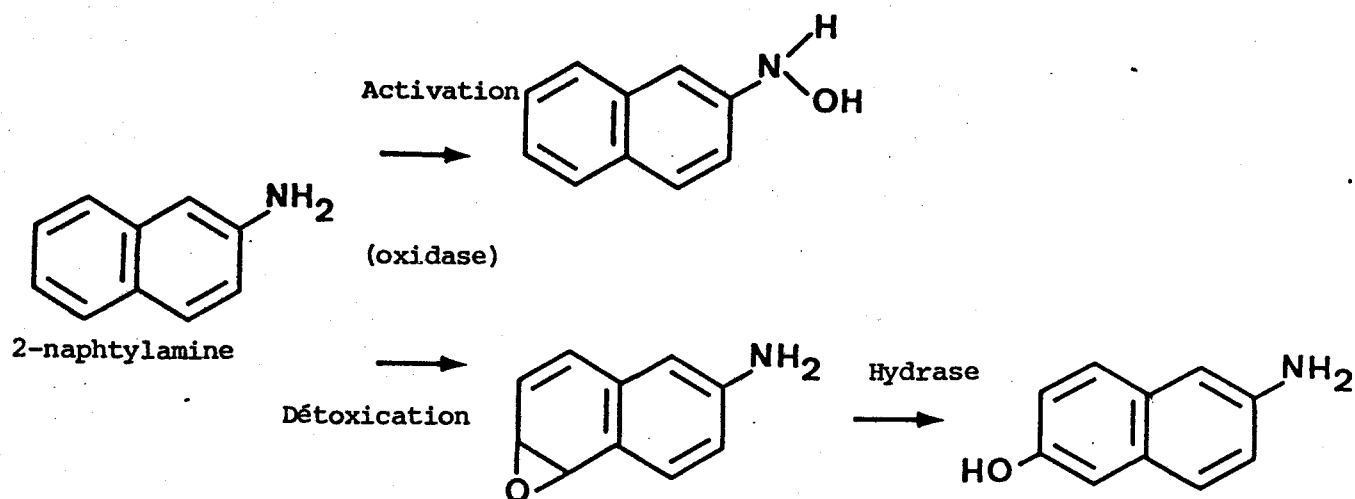
dans la transformation en cellule cancéreuse (GILDEN et al., 1983).

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

L'activation et la détoxication

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 détoxication 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 détoxication. 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 :



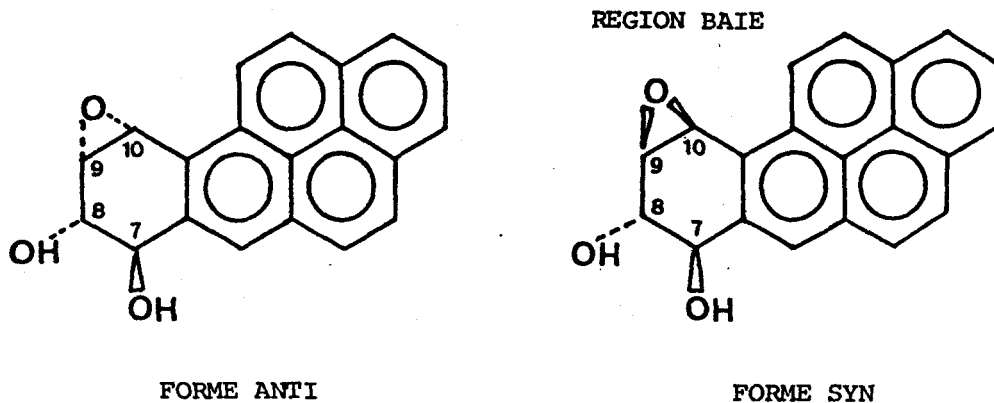
Ainsi, dans le cas des amines aromatiques, la première étape du métabolisme consiste en une C-hydroxylation (voie de détoxification) et une N-hydroxylation (voie d'activation). L'étape de N-hydroxylation peut être suivie de la formation de dérivés de conjugaison de la N-hydroxylamine avec l'acide glucuronique.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

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

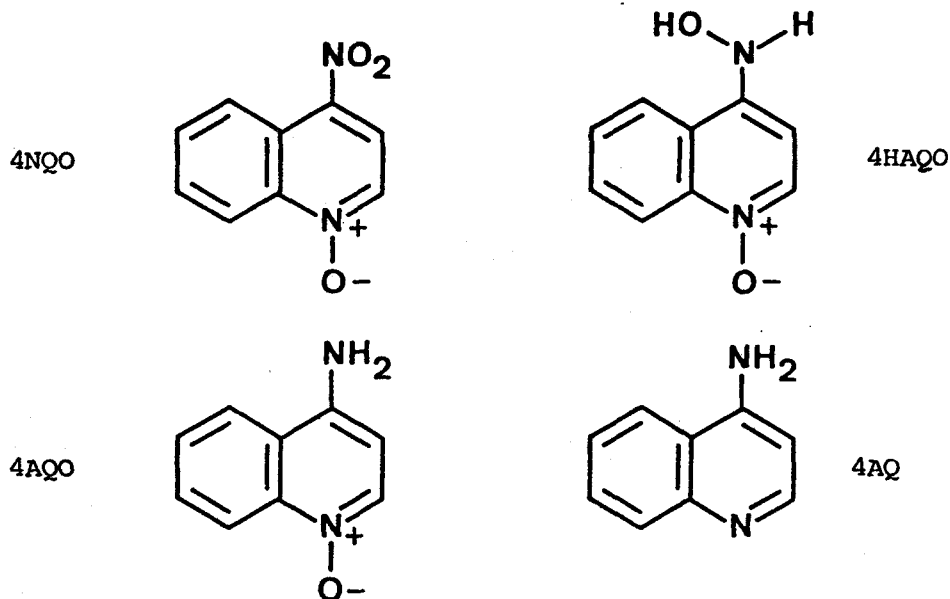


Plus récemment VIGNY et al. ont montré l'intervention de diol-époxydes de la région non-baie dans le cas du benz (a)anthracène (VIGNY et al., 1980).

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'0, 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 cancérrogène de chacun de ces composés, montrent que seul le 4HAQO est cancérrogène. Ils émettent l'hypothèse que ce dérivé pourrait bien être le cancérrogène précurseur, hypothèse qui est rapidement confirmée ; en effet, non seulement le 4HAQO présente, du point de vue de la cancérogénèse, toutes les propriétés du 4NQO, mais, de plus, son pouvoir cancérrogène 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 (cancérrogène intermédiaire) ; les réactions de réduction du précancérrogène en 4AQO et 4AQ constituaient 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 cancérrogènes ultimes et leurs propriétés électrophiles

Comme nous l'avons déjà souligné, l'activation des cancérrogènes chimiques conduit à des formes réactives appelées cancérrogènes 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 cancérrogènes, 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 cancérrogènes. Les espèces réactives postulées sont très diverses ; nous en avons représenté quelques exemples dans la figure 1.

Les formes ultimes des cancérrogènes 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 cancérrogènes 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

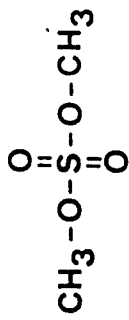
PRECANCEROGENES

CANCEROGENES
INTERMEDIAIRES

CANCEROGENES
ULTIMES

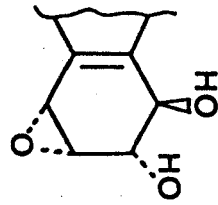
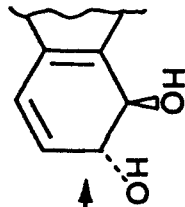
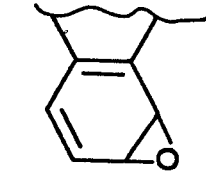
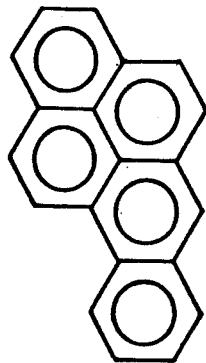
ESPECES REACTIVES
POSTULEES

AGENTS ALKYLANTS : cas du diméthylsulfate



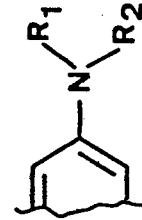
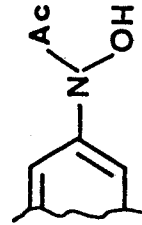
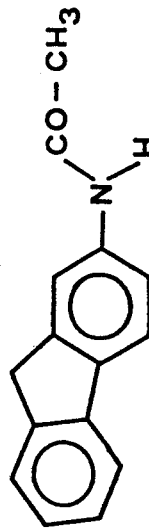
"CH₃⁺"

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⁻

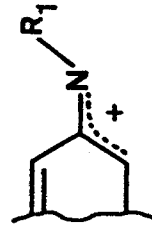
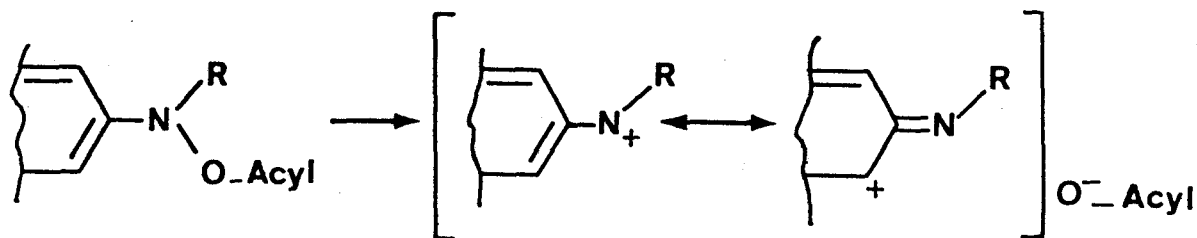


Figure 1 : Métabolisations et espèces réactives pour trois classes de cancérogènes.

les cancérrogènes 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 cancérrogènes 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.



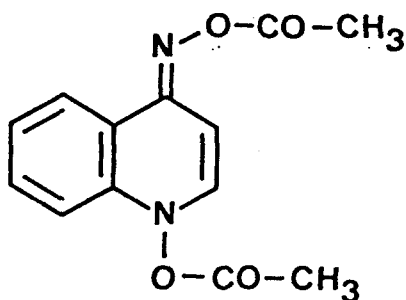
En général l'étude de la dernière étape d'activation d'un cancérrogène chimique peut être orientée de deux façons différentes :

- une voie de recherche s'attache à la mise en évidence des enzymes capables d'activer le cancérrogène 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.

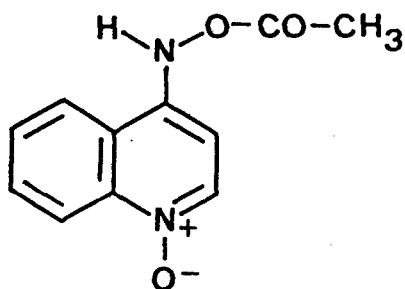
Les deux méthodes doivent être couplées à l'identification des composés de substitution base-cancérrogène (adduits) sur l'ADN, dans un système *in vivo*.

Dans le cas du 4NQO, au moment où nous débutons notre étude, la première étape de l'activation de ce cancérrogène 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.

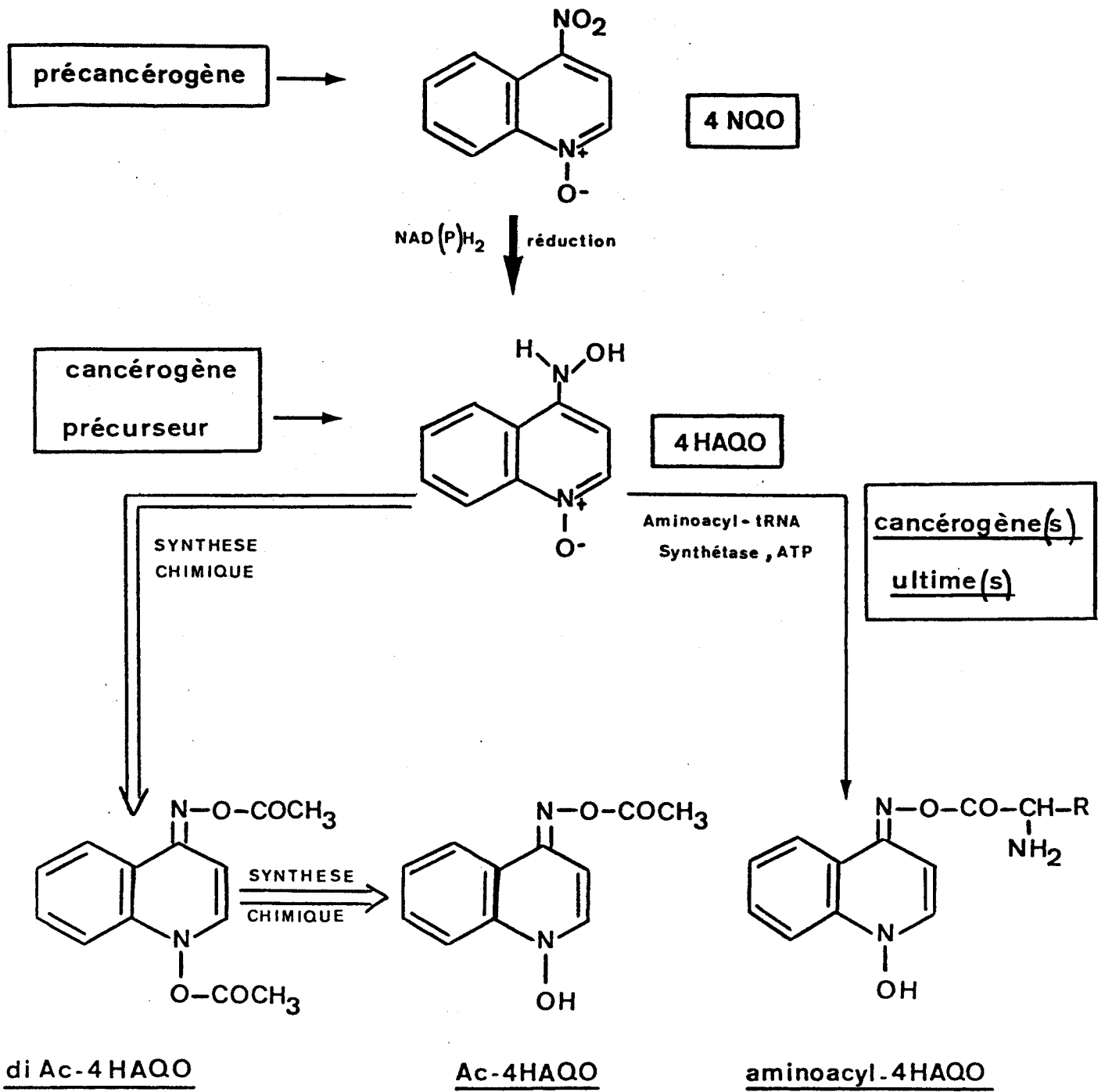


Figure 2
Activation métabolique du 4NQO

II. LES LESIONS SUR L'ADN ET LEURS CONSEQUENCES

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 cancérogènes 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-acétylamino stilbène 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 cancérogène et l'autre pas (voir schéma page 28). 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-acetaminophénantrène acétate ^a sulfate ^a	<i>In vitro</i> , ADN <i>in vitro</i> ADN					20 ^a	80 ^a	SCRIBNER et NAIMY, (1975). <i>Cancer Res.</i> , 35 : 1416-1421	
(N-hydroxy-)4-acétylamino-biphényle	<i>in vivo</i> , foie		b		c			KRIEK, (1971). <i>Chem. Biol. Interaction</i> , 3 : 19-28 ; WESTRA (1974) in : Abstracts 11th Int. Cancer Congress, vol 2. Casa editrice Ambrosiana, Milano, p. 38.	
2-Acétylamino-fluorène	<i>in vivo</i> foie		20			80		KRIEK, (1972). <i>Cancer Res.</i> , 32 : 2042-2048.	
(N-Acétoxy)-4-acétamidostilbène	<i>in vitro</i> nucléo- sides		c		b		c c	SCRIBNER et al., (1979). <i>Chem. Biol. Interaction</i> , 26 : 27-55.	
(N-hydroxy)-4-acétylamino-4'- fluorobiphényle	<i>in vivo</i> foie		b			c		KRIEK et HENGEVELD, (1979) <i>Chem. Biol. Interaction</i> , 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 : Holmstedt B, Lauwerys R, Mercier M, Roberfroid M (eds) <i>Mechanisms of toxicity and hazard evaluation</i> . Elsevier. North Holland, Amsterdam, pp 205-217.	
3-Amino-1 méthyl-5H pyrido (4,3-b) indole	<i>in vitro</i> ADN					100			
N-Benzoyloxy-N-méthyl-4-amino- azobenzène	<i>in vitro</i> ADN	40	15			45		BELAND et al., (1980). <i>Chem. Biol. Interactions</i> , 31 : 1-17.	
N-méthyl-4-aminoazobenzène	<i>in vivo</i> foie	40	10			50		TARPLEY et al., (1980). <i>Cancer Res.</i> , 40 : 2493-2499.	
(N-hydroxy-)1-naphtylamine	<i>in vitro</i> ADN	10			90			KADLUBAR et al., (1978). <i>Cancer Res.</i> , 38 : 3628-3638.	
(N-hydroxy-)2-naphtylamine	<i>in vitro</i> ADN	5	30			50	15	KADLUBAR et al., (1980). <i>Carcinogenesis</i> , 1 : 139-150.	

a) données calculées

b) adduit mineur

c) adduit majeur

TABLEAU B. Adduits des cancérogènes de la classe des amines
aromatiques (HEMNINKI, 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.

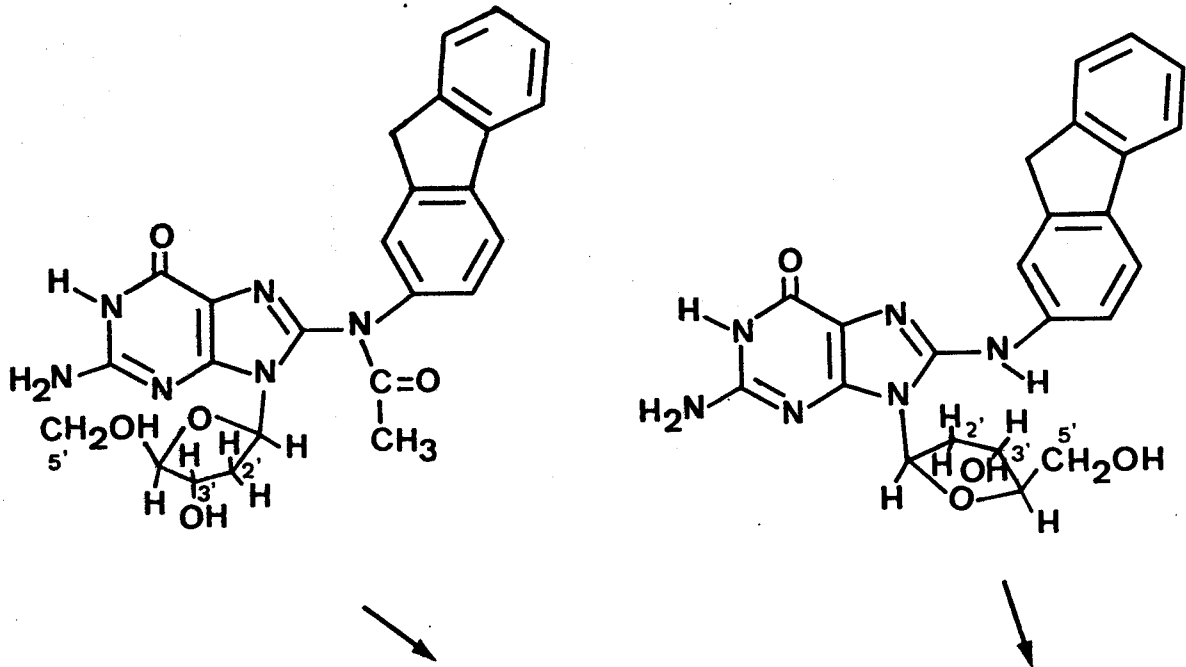
Le modèle insertion-dénaturation

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., 1979 b). 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 <i>in vitro</i>	80 % par action du N-AAF	100 % par action du N-OH-AF
Pourcentage de l'adduit sur l'ADN <i>in vivo</i>	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 cancérogène 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 cancérogène 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 cancérogène 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 de l'ADN de plasmide, modifié *in vitro*, dans des 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 corréler 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'ADNs modifiés 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-AAAF. D'autres expériences ont également conduit à des résultats différents : on peut observer dans certains cas une hyperméthylation de l'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 → 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 reliés 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⁺, Mg²⁺) (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-AAF. 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 cancérogénèse par le 4-nitroquinoléine 1-oxyde. Etude *in vitro*
des modifications chimiques et structurales de l'ADN

CHAPITRE I

Mise en évidence de la réaction covalente des dérivés di- et mono-acétylés du 4HAQO sur l'ADN et les polynucléotides de synthèse.
Choix d'un modèle de cancérogène ultime du 4NQO.

Dans ce chapitre nous allons expliquer de quelle manière nous avons mis au point un modèle d'étude *in vitro* de l'ADN modifié par le N-oxyde de la 4-nitroquinoléine.

Nous avons tout d'abord étudié la réactivité du dérivé diacétylé du 4HAQO sur l'ADN, ce composé ayant été postulé comme modèle de cancérigène ultime du 4NQO par ENOMOTO et al.

Dans le cadre de cette hypothèse nous avons mis au point un système d'étude *in vivo* de l'ADN modifié, en utilisant les cancérigènes précurseurs, 4NQO et 4HAQO et nous avons alors fait une comparaison grossière des deux types d'ADN modifiés.

Par la suite, des travaux effectués au laboratoire nous ont conduit à étudier la réactivité sur l'ADN et les polynucléotides de synthèse d'un deuxième modèle de cancérigène ultime : un dérivé monoacétylé du 4HAQO, l'Ac-4HAQO. Ce composé s'est révélé être très adéquat, puisqu'il crée sur l'ADN modifié *in vitro* les mêmes lésions principales que celles obtenues dans un système *in vivo*, où nous avons fait agir les cancérigènes précurseurs, le 4NQO et le 4HAQO.

Les résultats de ces travaux ont fait l'objet des quatre publications qui figurent dans ce chapitre.

a) Etude de la réactivité du O,O'-diacétyl-4-hydroxyaminoquinoléine 1-oxyde (diAc-4HAQO) sur l'ADN *in vitro*. Comparaison avec l'ADN modifié *in vivo*

L'hypothèse que le diAc-4HAQO pouvait être un métabolite ultime du 4NQO avait été émise en 1968 par ENOMOTO et al. Ces auteurs avaient en effet montré la fixation covalente de ce composé sur l'ADN, l'ARN et la méthionine, sans intervention d'enzyme. Ils avaient alors comparé les propriétés de fluorescence de l'ADN modifié par ce dérivé diacétylé aux spectres de fluorescence obtenus par TADA et al. et MATSUSHIMA et al. sur de l'ADN modifié *in vivo* par le 4NQO (MATSUSHIMA et al., 1967 ; TADA et al., 1971). Devant la similitude des deux séries de données, ils avaient alors émis l'hypothèse du rôle possible du diAc-4HAQO dans l'activation du 4NQO *in vivo*.

Au moment où nous commençons notre étude sur le 4NQO, nous possédions deux éléments sur lesquels nous nous sommes tout d'abord basés :

- l'hypothèse d'ENOMOTO et al.,
- la possibilité de synthétiser chimiquement le diAc-4HAQO, la synthèse ayant été décrite en 1967 par KAWAZOE et al.

1) Etude *in vitro*

Nous avons synthétisé le diAc-4HAQO à partir du 4HAQO, puis nous avons étudié sa réactivité sur l'ADN. Ce travail nous a conduit à mettre en évidence la réaction entre l'ADN et ce dérivé diacétylé, et de montrer l'influence de la structure secondaire de la macromolécule sur la réactivité du cancérigène. Ceci suggérerait une fixation du cycle quinoléine en des sites ayant une réactivité différente dans l'ADN natif et dénaturé.

Des études de fusion de l'ADN modifié ont également été réalisées. Elles seront décrites dans le chapitre III.

Ces travaux sont décrits dans la publication n° 1 (p. 45) :

"In vitro DNA reaction with a carcinogen, the O,O'-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide. Changes of stability of modified DNA".
Biochimica et Biophysica Acta, 1980.

2) Etude *in vivo*

La méthode de fixation de la quinoléine sur l'ADN *in vitro* étant mise au point, il nous a semblé important d'essayer de vérifier l'hypothèse d'ENOMOTO et al., à savoir : le diAc-4HAQO peut-il représenter un

métabolite ultime du 4NQO *in vivo* ? Nous avons repris la comparaison que ces auteurs avaient faite des spectres de fluorescence de l'ADN modifié par le diAc-4HAQO avec ceux d'un ADN modifié *in vivo*. L'étude *in vivo* a été réalisée sur une ascite, établie à partir d'un hépatome de ZAJDELA et entretenue sur des Rats Wistar. Ce système présente l'avantage d'être d'une utilisation facile et rapide, et de fournir de grandes quantités d'ADN.

Bien que le modèle de l'ascite soit criticable, puisque constitué de cellules déjà cancéreuses, nous verrons par la suite qu'il constitue un système tout à fait valable, comme le montreront nos études de comparaison "*in vivo-in vitro*". C'est sur ce même modèle que nous avons effectué toutes nos études *in vivo* avec le 4NQO.

L'ADN modifié dans ce système et l'ADN modifié *in vitro* par le diAc-4HAQO ont des spectres de fluorescence identiques. Bien que ceci constitue un premier élément positif, cela ne signifie pas du tout que le diAc-4HAQO puisse être formé *in vivo*. Ainsi, comme nous le verrons plus loin dans ce chapitre, seule la comparaison des adduits formés dans les deux cas doit permettre de conclure quant à la validité d'un modèle de cancérogène ultime.

Ce travail est décrit dans la publication n° 2 (p. 54) :

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

European Journal of Cancer, 1980.

Biochimica et Biophysica Acta, 609 (1980) 383-391
© Elsevier/North-Holland Biomedical Press

BBA 99730

IN VITRO DNA REACTION WITH A CARCINOGEN

THE *O,O'*-DIACETYL-4-HYDROXYAMINOQUINOLINE 1-OXIDE CHANGES OF STABILITY OF MODIFIED DNA

SYLVIE GALIÈGUE, GÉRARD LECOCQ and MARIE-H. LOUCHEUX-LEFEBVRE *

*Institut de Recherches sur le Cancer et Unité No. 124 de l'INSERM, B.P. No. 311, 59020
Lille Cédex (France)*

(Received February 29th, 1980)

Key words: Chemical carcinogenesis; Diacetylhydroxyaminoquinoline oxide; Thermal destabilization; DNA structure

Summary

The diacetyl derivative of 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide, the proximate carcinogen of 4-nitroquinoline 1-oxide, was reacted in vitro with native and heat denatured chicken erythrocyte DNA under various conditions. The amount of fixed carcinogen was obtained by using the labeled diacetyl derivative and from this result the molar extinction coefficients of bound carcinogen were calculated in order to allow a direct spectrophotometric determination.

A decrease in melting temperature of DNA samples modified by *O,O'*-diacetyl 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide (di Ac-4HAQO) was measured: the melting temperature depression value is equal to 1.4°C per 1% of modified DNA bases. This result was compared with the values previously obtained by Fuchs and coworkers (Fuchs, R. and Daune, M. (1973) *FEBS Lett.* 34, 295-298 and Fuchs, R. Lefebvre, J.F., Pouyet, J. and Daune, M. (1976) *Biochemistry* 15, 3347-3351) for *N*-acetoxy-*N*-2-acetylaminofluorene-modified DNA and by Lang et al. [25] for the phenanthrylation of the DNA bases of *N*-acetoxy-*N*-2-acetylaminophenanthrene-modified DNA.

Introduction

The carcinogenicity of 4-nitroquinoline 1-oxide (4NQO) was first reported by Nakahara et al. [1]. Endo et al. [2] and Nagao and Sugimura [3] have pub-

* To whom correspondence should be addressed.

Abbreviations: 4NQO, 4-nitroquinoline 1-oxide; 4HAQO, 4-hydroxy-aminoquinoline 1-oxide; di Ac-4HAQO, *O,O'*-diacetyl 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide; 4N[2-³H]QO, 4-nitro[2-³H]quinoline 1-oxide; di Ac-4HA[2-³H]QO, *O,O'*-diacetyl 4-hydroxyamino[2-³H]quinoline 1-oxide.

lished a monographic review of studies on this compound. Results have been reported on its induction of certain types of gastric carcinoma [4], pancreatic tumor [5,6], and lung tumor, especially in rats and mice [7-10].

One advantage of carrying out studies by using 4NQO as a carcinogen is that its metabolic activation systems are commonly present in microbial and mammalian cells. Indeed, most typical carcinogens, such as acetylaminofluorene and many aromatic hydrocarbons, are activated metabolically only by mammalian microsomal enzymes, but not by microbial enzymes [3].

As with most carcinogens, 4NQO is known to have mutagenic activity. This compound induces mutations in bacteria, for example in *Neurospora crassa* [11], *Aspergillus nidulans* [12] and other microorganisms [13]. Previous works have shown that 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide (4HAQO), formed by reduction from 4NQO in rat tissues [14,15], is a more potent carcinogen than the nitro derivative [2,16]. This compound is now well known as a proximate carcinogen of 4NQO.

Tada et al. [17] and Matsushima et al. [18] have shown that in rats administered 4HAQO, fluorescent derivatives of 4HAQO are bound to the DNA and RNA of ascites hepatoma cells. Enomoto et al. [19] found that the diacetyl derivative of 4HAQO (di Ac-4HAQO) reacted non-enzymatically and covalently with DNA, RNA and methionine at neutrality, and the fluorescent properties of the di Ac-4HAQO-reacted DNA and RNA are similar to those reported by Tada et al. [17] and Matsushima et al. [18] for the nucleic acid derivatives obtained after treatment in vivo by 4HAQO. Therefore it seems from these works that the di Ac-4HAQO could be considered as an ultimate carcinogen model for 4NQO. We have thus carried out a comparison [20] more accurate than that of Enomoto et al. [19], between the in vivo and in vitro modified DNAs. In the in vivo experiments the complexes between carcinogen and DNA were formed by exposure of Zajdela ascites tumor cells either to 4HAQO or to 4NQO; the in vitro di Ac-4HAQO-reacted DNA was obtained by using the unmodified ascites cell DNA extracted from untreated cells. In both cases the fluorescence spectra of modified DNAs are very similar; such a result is in good agreement with the choice of di Ac-4HAQO as an ultimate carcinogen. Moreover, this diacetyl derivative constitutes an adequate model on which to carry out physicochemical studies, since it can be easily obtained by chemical synthesis. Therefore in this present work we investigate the in vitro binding of quinoline ring to DNA. As a first step we have determined the amount of quinoline binding to DNA as a function of two parameters: (i) the secondary structure of DNA (making a comparison between the reactivity of native and heat-denatured DNA); (ii) the dynamic state of DNA (by variation of the ionic strength of the incubation buffer). In the second step, the thermal stability of native DNA has been studied as a function of the percentage of modified bases.

Materials and Methods

Reagents

All chemicals were reagent grade. 4NQO was obtained from Fluka. Di Ac-4HAQO derivative was synthesized from 4HAQO [19] as previously described [21]. Di Ac-4HAQO was stored in a dessicator over P_2O_5 in the dark at $-20^\circ C$.

4N[2-³H]QO was obtained from Amersham (specific activity 941 mCi/mmol); di Ac-4HA[2-³H]QO we have prepared exhibits a specific activity of 9630 cpm/nmol.

DNA preparation

Native DNA was a generous gift of Professor M.P. Daune (Strasbourg). It was prepared from chicken erythrocytes and had the following characteristics: $S_{20,w}$, 22 S; hyperchromicity at 260 nm, 41%; melting temperature (in 0.1 M NaCl), 87°C.

Heat denatured DNA was obtained by heating a buffered solution of native DNA in a sealed vial to 100°C for 15 min. To avoid DNA renaturation the sample was rapidly chilled in ice.

Solvolysis of di Ac-4HAQO

In order to determine the optimal conditions of reaction with DNA, the solvolysis reaction of di Ac-4HAQO was studied in $2 \cdot 10^{-3}$ M sodium citrate buffer (pH 7)/ethanol (80 : 20, v/v) with or without 0.05 M NaCl, at 37°C, in darkness.

The kinetics of the solvolysis reaction were followed by means of absorption spectroscopy. Diacetyl derivative exhibits two absorption bands, at about 260 and 351 nm. Changes in the absorption spectra indicate that there occurs a reaction of decomposition into several products, as seen by the formation of a large number of spots in thin-layer chromatography. The limit spectrum is defined as that obtained when there is no longer any spectral change. This limit spectrum depends on the concentration of salt in the incubation buffer. The solvolysis curves were obtained by plotting the percentage of decomposition observed at 351 nm vs. time. The half-lives ($t_{1/2}$) for solvolysis in citrate buffer are about 10 min and 8 min with and without NaCl, respectively.

Reaction of di AC-4HAQO with DNA

It appears from our solvolysis experiments at 37°C in $2 \cdot 10^{-3}$ M sodium citrate buffer (pH 7)/ethanol (80 : 20, v/v) that the decomposition of di Ac-4HAQO depends upon the presence of salt in the buffer. In the buffer with NaCl the decomposition is almost complete after 1 h, and in that without NaCl this decomposition is obtained after 0.75 h. As a consequence of this result, the incubation times were chosen to be 1.25 h and 0.75 h for the buffer with and without NaCl, respectively. The reactions of DNA with di Ac-4HAQO were performed with native and denatured DNAs. The DNA (concentration approx. 0.5 mg/ml) was incubated at 37°C in aqueous ethanol solution, under a nitrogen atmosphere, in the dark and in the presence of different amounts of di Ac-4HAQO. Each sample was characterized by R , the ratio of the molar concentration of di Ac-4HAQO to the concentration of DNA expressed as mol P_1/l , in the initial reaction mixture. The modified DNA was purified by extensive diethyl ether extractions. The remaining noncovalently-bound quinoline residue was removed by precipitation by ethanol. The lack of noncovalently-bound quinoline was checked by counting aliquots of the supernatant ethanolic fractions.

The amount of bound quinoline ring is given by the ratio $[c]/[P]$ where $[c]$

is the concentration of ^3H -labelled carcinogen determined by counting aliquots of 100 μl of the DNA solutions (Nuclear Chicago Isocap 300 scintillator) and [P] the concentration of nucleotides (expressed as mol P_i/l) as determined by the absorbance at 260 nm. Since the carcinogen exhibits an absorption at this wavelength, the absorbance has been corrected for the quinoline ring contribution by assuming a molar extinction coefficient, ϵ , equal to 10 000 at 260 nm, which corresponds approximately to the limiting value of ϵ at this wavelength after solvolysis of di Ac-4HAQO. Due to the small amount of bound carcinogen, its contribution to the absorbance at 260 nm is always very low. The results are given as the number of bound quinoline rings per 100 bases (percentage of modified bases).

Melting points of native and di Ac-4HQO reacted DNA samples

The melting curves of native and carcinogen-reacted DNA were measured at 260 nm with a Cary 118 C spectrophotometer. Temperature control of the cells was provided by a Lauda (Type NB-58/12) thermostat having a circulating pump yielding a 8 l/min flow of thermostat liquid. The cell temperature was obtained from a platinum sensor immersed in the cell. The step temperature program itself was connected to the spectrophotometer and the thermometer, and the absorbance was recorded at different temperatures with a constant increment which could be set at any value between 0.01 and 0.99°C. At any given temperature, the measurement of the absorbance was carried out many times in order to decrease the noise. Once the temperature reached its new equilibrium level, the calculator stored a spectrum giving the variation in the absorbance against the temperature. The corresponding curve was smoothed and its derivative drawn on an XY recorder (SEFRAM). Then the melting temperature was easily obtained as the maximum of the $\Delta(A)/\Delta T = f(T)$ curve.

Since the melting temperatures are very dependent on the ionic strength of the solution, their determinations were always carried out using exactly the same buffer from a same storage for all samples corresponding to the same set of determinations.

Results and Discussion

Influence of the DNA secondary structure

Di Ac-4HAQO was reacted with native and denatured DNAs in the buffer without NaCl. In both cases, the absorption spectra of the modified DNA samples showed a weak absorption signal in the 300–400 nm range. The maximum of this band was located at about 350 and 360 nm for the native and denatured DNAs, respectively. Its intensity was 2- to 3-times greater for the denatured than for the native DNA. The reactions were performed for different values of R (Table I) and the numbers of bound quinoline rings per 100 bases were plotted versus R as in Fig. 1. As expected from the absorption spectra, the carcinogen's binding has a value which is about 2.5-times greater for the denatured than for the native DNA (native DNA: one quinoline ring per 100 bases, for $R = 1$; denatured DNA: about 2.5 quinoline rings per 100 bases, for $R = 1$). In other words, this means that the DNA secondary structure influences the reactivity of di Ac-4HAQO.

TABLE I
AMOUNT OF CARCINOGEN BOUND TO NATIVE DNA (NDNA) AND DENATURATED DNA (DDNA) IN TWO BUFFERS WITH DIFFERENT IONIC STRENGTH

Expressed as the number of modified bases per 100 bases.

Solvent	Percentage modified bases *
$2 \cdot 10^{-3}$ M sodium citrate buffer, pH 7	$R^{**} = 0.1$ DDNA 0.50 NDNA 0.17; 0.20; 0.20
	$R = 0.2$ DDNA 1.00 NDNA 0.47; 0.37; 0.35
	$R = 0.5$ DDNA 1.80 NDNA 0.74; 0.75; 0.73
	$R = 1$ DDNA 2.30 NDNA 1.10; 0.86; 1.06
	$R = 2$ DDNA 2.60 NDNA 0.97; 0.95
	$2 \cdot 10^{-3}$ M sodium citrate buffer + 0.05 M NaCl, pH 7
	$R = 1$ DDNA 0.27 NDNA not detectable
	$R = 2$ NDNA not detectable

* The amount of bound carcinogen is obtained by the ratio $[c]/[P]$ where $[c]$ is the concentration of bound quinoline rings and $[P]$ the concentration of nucleotides (see Materials and Methods).

** R is concentration of the carcinogen/concentration in DNA, in the initial reaction mixture.

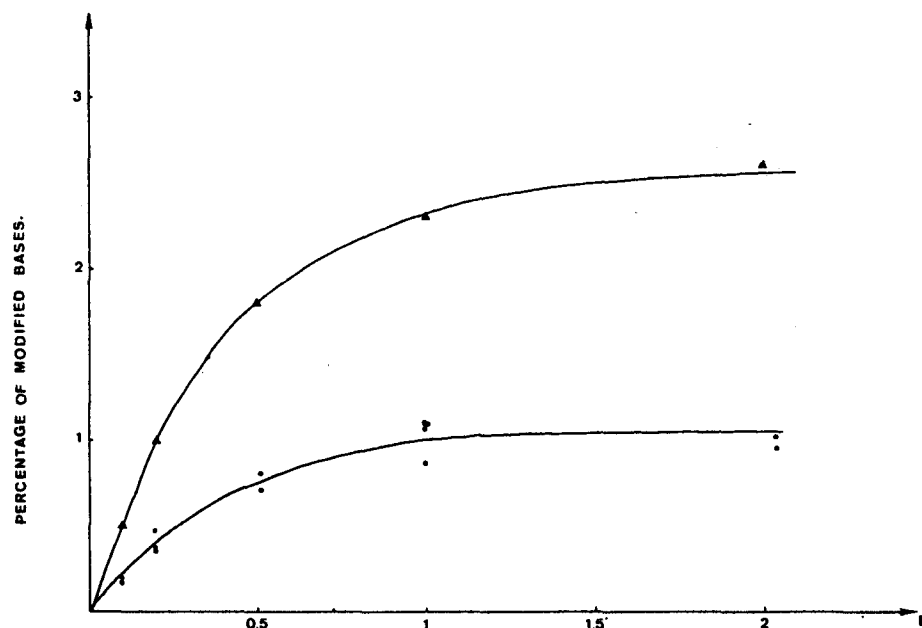


Fig. 1. Variation of the percentage of modified bases as a function of R , ratio of the molar concentration of di Ac-4HAQO/the concentration of DNA expressed as mol P_1/μ in the initial reaction mixture for native (•) and denatured (▲) DNA.

In both cases it can also be noticed (Fig. 1) that for $R \geq 1$ the addition of the carcinogen remains constant and is independent of R . This phenomenon probably does not correspond to a saturation of the DNA's reactive sites, but it could be explained with regard to the high instability of di Ac-4HAQO in aqueous medium. That is, when the concentration increases, competition occurs between the reaction of di Ac-4HAQO with short molecules (di Ac-4HAQO itself, H_2O , etc.) and with the macromolecules (DNA).

By plotting either A_{350}/A_{260} (for native DNA) or A_{360}/A_{260} (for denatured DNA) vs. the percentage of modified bases, for different DNA samples, one obtains linear representations (Fig. 2) which give a direct spectrophotometric determination of the amount of quinoline binding to DNA. From these data, and knowing the value of $[C]$ by counting, the specific molar extinction coefficients are calculated: one finds $\epsilon_{350} = 5500 \pm 400$ and $\epsilon_{360} = 6200 \pm 200 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ for the carcinogen's binding to native and to denatured DNA, respectively. This result (i.e., the difference obtained between the two values of ϵ) is not unexpected, since it is possible to consider that the bound carcinogen could be influenced by the internal field of the DNA double helix as previously observed by Fuchs and Daune [22] for *N*-acetoxyacetylaminofluorene-modified DNA.

Influence of ionic strength

Since the amount of bound carcinogen depends markedly on the DNA secondary structure, we tried to investigate whether the stabilization effect of the

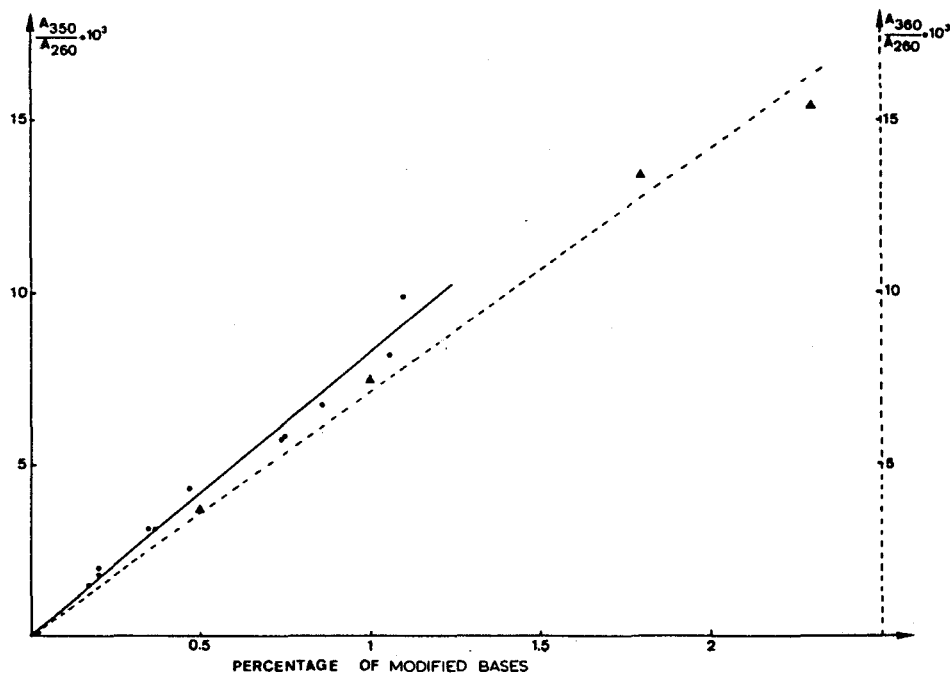


Fig. 2. Variation of the ratios of absorbances at either 350 nm (A_{350}) or 360 nm (A_{360}) over absorbances at 260 nm (A_{260}), as a function of the percentage of modified bases. A_{350}/A_{260} corresponds to the native (●) and A_{360}/A_{260} to the denatured (▲) DNA.

DNA double-helical structure further inhibits the addition reaction. Therefore, by adding salt, we prevented the dynamic structure of DNA (i.e. the existence of transient open regions in the otherwise double helical structure). Incubations were performed in $2 \cdot 10^{-3}$ M sodium citrate buffer, pH 7, in the presence of 0.05 M NaCl. Unfortunately, from the results (Table I) it is impossible to determine the influence of the dynamic state of DNA on the amount of bound quinoline because inhibition of the reaction is observed for native as well as for denatured DNA in the citrate buffer to which salt was added: this means that the chemical reaction itself is inhibited by the ionic strength.

Thermal destabilization of di Ac-4HAQO-modified DNA samples

Two series of di Ac-4HAQO-modified DNA samples obtained after incubation in the $2 \cdot 10^{-3}$ M citrate buffer, pH 7, were melted and the differences between the melting temperature (T_m) of a given carcinogen-reacted DNA and unmodified DNA (ΔT_m) were recorded.

The melting temperature of DNA samples reacted with increasing concentrations of di Ac-4HAQO decreases as the amount of modification increases ($\Delta T_m < 0$), as observed Table II. As seen in Fig. 3, it appears that the relation between ΔT_m and the percentage of bound carcinogen is linear and the slope of the straightline is of -1.4°C per 1% of modified bases. It is interesting to compare this result with those obtained with *N*-acetoxy-*N*-2-acetylaminofluorene-modified DNA [23,24]: the authors found a melting temperature depression value equal to 1.15°C per percent of modified bases, very close to the ΔT_m we observed. But in a more recent work, Lang et al. [25], studying acetylaminophenanthrene-modified DNA, were able to attribute the destabilization of the DNA double helix either to the phenanthrylation ($\Delta T_m = 1.23^\circ\text{C}$ per 1%) or to the acetylation ($\Delta T_m = 5.37^\circ\text{C}$ per 1%). In the case of the di Ac-4HAQO-modified DNA, some preliminary results allow us to think that an acetylation reaction occurs, but to date its extent has not been determined. Therefore, we can observe only that the temperature depression value we obtained is very close to the ΔT_m corresponding to the phenanthrylation.

TABLE II
MELTING TEMPERATURE VALUES OF DIFFERENT NATIVE MODIFIED DNA SAMPLES

Solvent	Percentage modified bases *	T_m ($^\circ\text{C}$)	ΔT_m ($^\circ\text{C}$)	
$2 \cdot 10^{-3}$ M sodium citrate buffer, pH 7	Series I **	0	58.20	0
		0.20 ($R = 0.1$)	58.05	-0.15
		0.35 ($R = 0.2$)	57.55	-0.65
		0.73 ($R = 0.5$)	56.95	-1.25
		1.06 ($R = 1$)	56.55	-1.65
		0.95 ($R = 2$)	56.50	-1.70
	Series II	0	57.90	0
		0.47 ($R = 0.2$)	57.25	-0.65
		1.10 ($R = 1$)	56.20	-1.70

* The modified DNAs we have studied are characterized in the Table I.

** Two series of melting temperature determinations were carried out, corresponding to two different preparations of the $2 \cdot 10^{-3}$ M citrate buffer (pH 7).

390

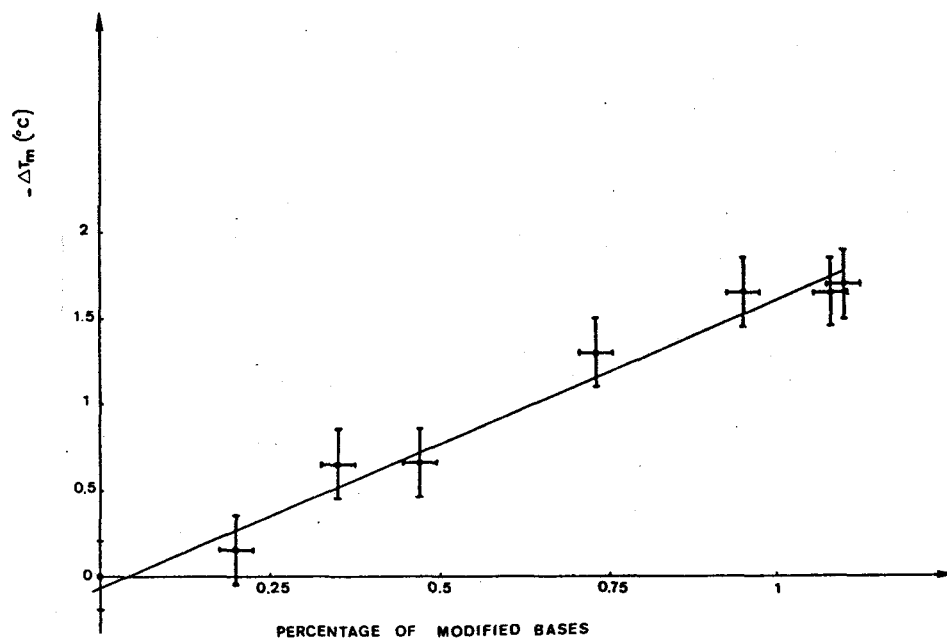


Fig. 3. Destabilization ΔT_m ($^{\circ}\text{C}$) as a function of the percentage of modified bases. Confidence limits: for T_m , $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$; for ΔT_m , $\pm 0.2^{\circ}\text{C}$; for the percentage of modified bases, ± 0.02 .

Conclusion

Since the reactivity of di Ac-4HAQO with DNA depends upon the secondary structure of the macromolecule, it is possible to think that the carcinogen reaction takes place, at least partly, on atoms which are buried in the double helix. And this is in good agreement with the decrease in the melting temperature of the modified DNA. Indeed, the covalent binding of the carcinogen on such internal atoms could involve the appearance of partial denatured regions along the macromolecular chain.

A more precise interpretation of these results in terms of exposure of DNA reactive sites to the carcinogen is not yet possible, since the atoms involved in the interaction of metabolites of 4NQO with DNA are unknown to date. Some work has been performed in different laboratories in order to identify the adducts between these metabolites and DNA [26–29], but no precise determination has been published concerning their structures. Only one piece of information was given, by Kawazoe et al. [30], about the site of carcinogen's binding in the case of an adenine-adduct: it would be either the 6-NH₂ or the N-1 of adenine. But nothing is known concerning the adducts with guanine.

Studies are in progress in our laboratory to gain some information about the structure of these adducts.

Acknowledgements

The authors wish to thank Professor G. Biserte, Directeur de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, for his constant help and for his valuable dis-

cussions. This work was supported in part by the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Grant No. 78.7.2628) and by the 'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale' (Action thématique 'Cancérogénèse chimique', Grant No. 79.109). One of us, S.G., is the recipient of a fellowship from the 'Ligue Nationale Française contre le Cancer'.

References

- 1 Nakahara, W., Fukuoka, F. and Sugimura, T. (1957) *Gann* 48, 129-137
- 2 Endo, H., Ono, T. and Sugimura, T. (1971) *Recent Results Cancer Res.* 34, 1-99
- 3 Nagao, M. and Sugimura, T. (1976) *Adv. Cancer Res.* 23, 132-169
- 4 Mori, K. and Ohta, A. (1967) *Gann* 58, 551-554
- 5 Konishi, Y., Popp, J.A. and Shinozuka, H. (1974) *J. Natl. Cancer Inst.* 52, 917-920
- 6 Hayashi, Y. and Hasegawa, T. (1971) *Gann* 62, 329-330
- 7 Hisematsu, T., Mori, K. and Okamoto, K. (1965) *Gann* 56, 77-79
- 8 Mori, K., Kondo, M. and Suzuki, S. (1966) *Gann* 57, 559-561
- 9 Mori, K. and Yasuno, A. (1961) *Gann* 52, 149-153
- 10 Suzuki, S. (1968) *Gann* 59, 163-165
- 11 Ong, T., Matter, B.E. and de Serres, F.J. (1975) *Cancer Res.* 35, 291-295
- 12 Bal, J., Kajtaniak, E.M. and Pieniazek, N.J. (1977) *Mutation Res.* 56, 153-156
- 13 Okabayashi, T., Ide, M., Yoshimoto, A. and Otsubo, M. (1965) *Chem. Pharm. Bull. Tokyo* 13, 610-611
- 14 Sugimura, T., Okabe, K. and Endo, H. (1965) *Gann* 56, 489-501
- 15 Sugimura, T., Okabe, K. and Nagao, M. (1966) *Cancer Res.* 26, 1717-1721
- 16 Endo, H. and Kume, F. (1965) *Gann* 56, 261-265
- 17 Tada, Mar., Tada, Mit. and Takahashi, T. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 469-477
- 18 Matsushima, T., Kobuna, I. and Sugimura, T. (1967) *Nature* 216, 508
- 19 Enomoto, M., Sato, K., Miller, E.C. and Miller, J.A. (1968) *Life Sci.* 7, Part II, 1025-1032
- 20 Galiègue, S., Bailleul, B. and Loucheux-Lefebvre, M.H. (1980) *Eur. J. Cancer*, in the press
- 21 Kawazoe, Y. and Araki, M. (1967) *Gann* 58, 485-487
- 22 Fuchs, R. and Daune, M. (1971) *FEBS Lett.* 14, 206-208
- 23 Fuchs, R. and Daune, M. (1973) *FEBS Lett.* 34, 295-298
- 24 Fuchs, R., Lefebvre, J.F., Pouyet, J. and Daune, M. (1976) *Biochemistry* 15, 3347-3351
- 25 Lang, M.C.E., Fuchs, R.P.P. and Daune, M.P. (1977) *Cancer Res.* 37, 3887-3891
- 26 Tada, Mit. and Tada, Mar. (1971) *Chem. Biol. Interactions* 3, 225-229
- 27 Tada, Mit. and Tada, Mar. (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 454, 558-566
- 28 Tada, Mit. and Tada, Mar. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46, 1025-1032
- 29 Tada, Mit. and Tada, Mar. (1975) *Nature* 255, 510-512
- 30 Kawazoe, Y., Araki, M., Huang, G.F., Okamoto, T., Tada, Mit. and Tada, Mar. (1975) *Chem. Pharm. Bull. Tokyo* 23, 3041-3043

Reactivity of the *O,O'*-Diacetyl Derivative of the Carcinogen 4-Hydroxyaminoquinoline-1-Oxide with DNA. Comparison with *in Vivo*-Reacted DNA*

S. GALIÈGUE, B. BAILLEUL and M.-H. LOUCHEUX-LEFEBVRE†

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

Abstract—An ester of 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide (4-HAQO), the *O,O'*-diacetyl derivative (diAc-4-HAQO), was previously considered as a possible ultimate metabolite of the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO). In order to verify such a hypothesis we have carried out a fluorescent comparative study between the *in vitro* diAc-4-HAQO reacted DNA and the *in vivo* 4-HAQO and 4-NQO modified DNA. Our results show that diAc-4-HAQO could be used as a model of ultimate carcinogen of 4-NQO.

INTRODUCTION

THE POTENT carcinogenic action of 4-nitroquinoline-1-oxide (4-NQO) is well known since it was first demonstrated by Nakahara *et al.* [1]. Later, it was proposed that 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide (4-HAQO), which is a metabolite of 4-NQO, might be the proximate carcinogen [2] and that the reductive pathway which yields 4-HAQO seemed to be essential for the carcinogenic mechanism of 4-NQO [3, 4]. More recently, Tada and Tada [5] have shown that an unique enzymatic system could be responsible for the activation of 4-HAQO.

By analogy with other carcinogens, such as acetyl-aminofluorene [6], it was considered that esters of 4-HAQO could appear as ultimate metabolites in the carcinogenic activity. Indeed, Enomoto *et al.* [7] reported that the *O,O'*-diacetyl derivative of 4-HAQO (diAc-4-HAQO) reacted covalently and non-enzymatically with DNA at neutrality. The diAc-4-HAQO-reacted DNA exhibits particular fluorescent properties and preliminary work was carried out by Enomoto *et al.* [7] in order to compare these fluorescent properties with those reported by Tada *et al.* [8] and Matsushima *et al.* [9] for the reacted nucleic

acid formed *in vivo* by exposure of ascite cells to 4-HAQO. The work of Enomoto *et al.* [7] is the only publication to date which concerns the *in vitro* binding of the diacetyl derivative with DNA and unfortunately, no spectra are shown in this work. It is therefore impossible to appreciate the degree of accuracy of such a comparison.

In this paper we carry out a comparative fluorescence study between the *in vivo*- and *in vitro*-reacted DNA, with either 4-NQO and 4-HAQO or diAc-4-HAQO respectively. In the *in vivo* experiments the complexes between carcinogen and DNA were formed by exposure of Zajdela ascite tumor cells to 4-HAQO and 4-NQO. The *in vitro* diAc-4-HAQO reacted DNA was obtained by using the ascite cell DNA.

In the two cases, the determination of quinoline binding DNA was carried out by using 4-HA[2-³H]QO and diAc-4-HA[2-³H]QO.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

4-NQO was kindly provided by Professors Sato and Kawazoe.

4-HAQO was obtained from 4-NQO by the method of Enomoto *et al.* [7].

DiAc-4-HAQO was prepared from 4-HAQO according to the method of Kawazoe and Araki [10].

Accepted 3 March 1980.

*This work was supported by the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique" (Grant No. 78.7.2628).

†To whom correspondence should be addressed.

4-N[2-³H]QO was obtained from Amersham Ltd. (specific radioactivity 941 mCi/mmmole).

4-HA[2-³H]QO obtained as previously described [7] presented a specific radioactivity of 18.42 mCi/mmmole.

DiAc-4-HA[2-³H]QO obtained from the method of Kawazoe and Araki [10] exhibits a specific radioactivity of 9630 counts/min/nmmole.

Preparation of in vivo-reacted DNA

The method of preparation was previously described by Ikegami *et al.* [11]. 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, either 4-NQO or 4-HAQO was i.p. injected.

For 4-NQO, a 0.018 M solution was used. It was obtained from 4-NQO dissolved in a small amount of dimethylsulfoxide followed by appropriate dilution with physiological saline solution. For 4-HAQO the 0.03 M solution was obtained by direct dissolution of the carcinogen in physiological saline solution. In the two cases 0.5 ml/rat of the carcinogen solution was injected. The rats were killed by decapitation either 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 [12].

Preparation of in vitro-reacted DNA

The DNA was obtained from ascite cells of untreated rats using the method of extraction of Marmur [12]. DNA in a 2 × 10⁻³ M sodium citrate buffer pH 7 was reacted with diAc-4-HAQO dissolved in EtOH in order to obtain a final buffer/EtOH ratio: 80/20 by volume. The initial reaction mixture is characterized by R, the ratio of molar concentration of diAc-4-HAQO/concentration of DNA expressed in mole P/1. Many samples of modified DNA's were prepared corresponding to different values of R. The reaction is carried out at 37°C, in the darkness, for 45 min. After reaction, the modified DNA was purified by extensive diethyl ether extractions. The remaining non-covalently bound quinoline residues were removed by extensive precipitations and washing with ethanol. The lack of non-covalently bound quinoline was checked by counting aliquots of 200 μl of the supernatant ethanolic fractions.

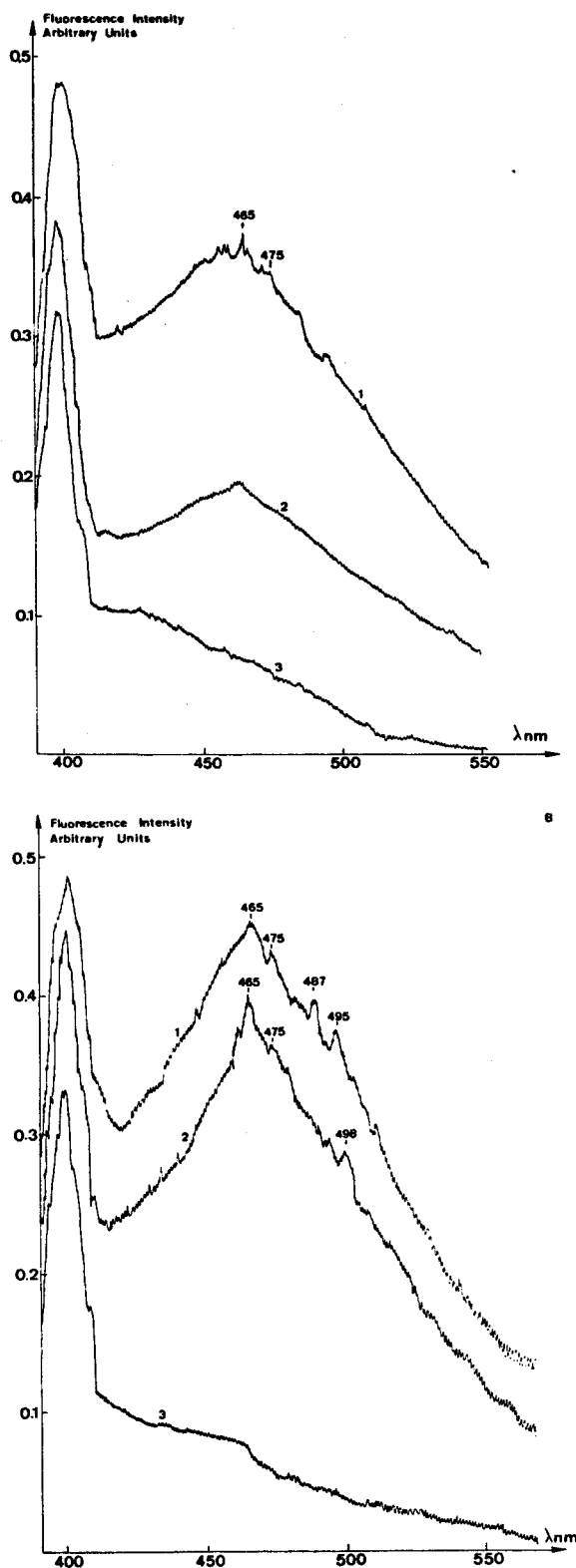


Fig. 1. Fluorescence spectra of DNA isolated from (A) 4-NQO and (B) 4-HAQO-exposed ascite tumor cells, in 2 × 10⁻³ M citrate buffer, pH 7. The concentration of DNA was 1 mg/ml and the excitation wavelength 350 nm. The figure shows the corrected readings at different exposure times. Curve 1: t = 2 hr; curve 2: t = 1 hr; curve 3: no carcinogen exposure (reference DNA). The band at 400 nm is corresponding to a Raman vibration of water.

Fluorescence studies

The fluorescence spectra were recorded with a differential spectrofluorimeter (model FICA 55 000). The apparatus is totally corrected, that is, in excitation (the fluctuations and the ageing of the lamp are automatically compensated) and in emission. The spectra were recorded using the unreacted DNA as reference. Fluorescence spectra were measured in 2×10^{-3} M citrate buffer pH 7. Concentration of DNA was 1 mg/ml for the *in vivo* reacted DNA.

The fluorescence curves were recorded in arbitrary units; therefore the quantitative determinations were impossible; more especially the quantum yield of the bound carcinogen could not be calculated. Nevertheless, a comparison between the intensities of different fluorescence spectra could be carried out when these spectra were recorded with exactly the same experimental conditions and with identical settings on the spectrofluorimeter.

RESULTS

Fluorescence studies

In vivo-reacted DNA. DNA isolated from 4-NQO- and 4-HAQO-exposed cells is fluorescent. The spectra obtained with an excitation wavelength at 350 nm (Fig. 1) exhibit a fluorescence emission band with a main maximum at 465 nm either for 4-NQO- or 4-HAQO-modified DNA. In the case of 4-HAQO-modified DNA, the spectrum is slightly structured and three secondary maxima at 475, 487 and 495 nm are observed. It appears that the fluorescence intensity and consequently the amount of bound fluorescent compound depends on the time of carcinogen exposure, essentially in the case of 4-NQO. As observed in Fig. 1, the spectrum is more intense after 2 hr than after 1 hr of exposure. For 4-HAQO-modified DNA, the difference

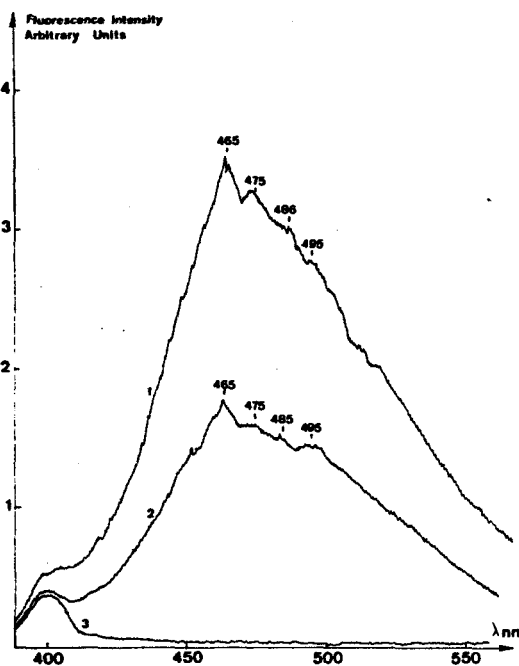


Fig.2. Fluorescence spectra of the diAc-4-HAQO-reacted DNA. The DNA was isolated from untreated ascite tumor cells. The spectra were recorded with 0.3 mg/ml DNA solutions in 2×10^{-3} M citrate buffer, pH 7. The excitation wavelength was 350 nm. The figure shows the corrected instrument readings for different values of R, ratio of molar concentration of diAc-4-HAQO/concentration of DNA expressed in mole P/l, in the initial reaction mixture. Curve 1:R=0.5; curve 2:R=0.2; curve 3:R=0 (reference DNA). The band at 400 nm has the same meaning as that in Fig. 1.

observed between the two spectra obtained after 1 or 2 hr of exposure of cells is not significant.

In vitro-reacted DNA. The fluorescence spectra obtained with an excitation at 350 nm are shown in Fig. 2. Two spectra corresponding to two different values of R (R=0.5; R=0.2) are shown. These spectra are slightly structured and exhibit a principal maximum at 465 nm and three secondary maxima at 475, 485 and 495 nm.

Table 1. Determination of the quinoline binding to DNA in *in vivo* experiments using 4-HA[2-³H]QO. Half a ml of the solution of carcinogen in physiological saline solution was injected *i.p.* to rats bearing a Zajdela ascite tumor. The exposure time was 1 and 2 hr and two rats were used for each experiment

	Time after carcinogen injection (hr)	DNA specific activity counts/min/mg DNA	Quinoline binding to DNA, expressed as molecule of carcinogen per nucleotide
4-HA[2- ³ H]QO 0.03 M	1	3333	$5,4 \times 10^{-5}$
	1	2920	$4,7 \times 10^{-5}$
4-HA[2- ³ H]QO 0.006 M	2	2714	$4,6 \times 10^{-5}$
	1	600	1×10^{-5}

Determination of quinoline binding to DNA

In vivo-reacted DNA. The extent of binding of isotope to DNA at 1 and 2 hr after injection of 4-HA[2-³H]QO is given in Table 1. Moreover, we show that by using different amounts of 4 HAQO (30 mM and 6 mM), the percentage of quinoline binding to DNA is proportional to the injected quantity of carcinogen. As observed in Table 1, the specific activity of DNA obtained with the more concentrated solution of 4-HAQO—either for 1 or 2 hr of exposure—corresponds to approximately 1 molecule of quinoline derivative per 20,000 nucleotides of DNA. This result is in good agreement with those previously obtained by Ikegami *et al.* [11] and Tada and Tada [13].

In vitro-reacted DNA. Many samples corresponding to different extents of carcinogen binding to DNA were characterized (from 0.2 to 1.0 quinoline ring per 100 nucleotides). The details concerning these determinations will be given elsewhere.

DISCUSSION

Since the fluorescent properties of reacted DNA were essentially due to the quinoline ring one can claim that the quinoline moiety is covalently bound to DNA either *in vitro*

with diAc-4-HAQO or *in vivo* from 4-NQO and 4-HAQO. As expected, the percentage of bound rings is higher in the *in vitro* than in the *in vivo* reactions.

For both *in vivo* and *in vitro* reacted DNA the fluorescence spectra exhibit a principal maximum at the same wavelength i.e., 465 nm and, in the two cases, three additional maxima at 475, about 485 and 495 nm are observed. Such characteristically similar fluorescence spectra support the proposal that diAc-4-HAQO constitutes a valid model for the ultimate carcinogen in investigating chemical carcinogenesis by 4-NQO.

This result, however, does not allow us to state that the reaction was exactly the same in the two cases, i.e., that the adducts are identical. Further work is in progress in our laboratory to characterize these adducts.

Acknowledgements—The authors would like to express appreciation to Pr. Gérard Biserte, Director of the Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, for discussions and advice. Thanks are also due to Mrs M. N. Vlaeminck and Miss A. M. Debève for technical assistance concerning the *in vivo* experiments. The fluorescence studies were carried out at the Université des Sciences et Techniques de Lille with the help of Dr. A. Pollet.

One of us (S.G.) is a recipient of a fellowship from the Ligue Nationale Française contre le Cancer.

The authors are grateful to Dr. B. M. Carden for critical reading of the English text.

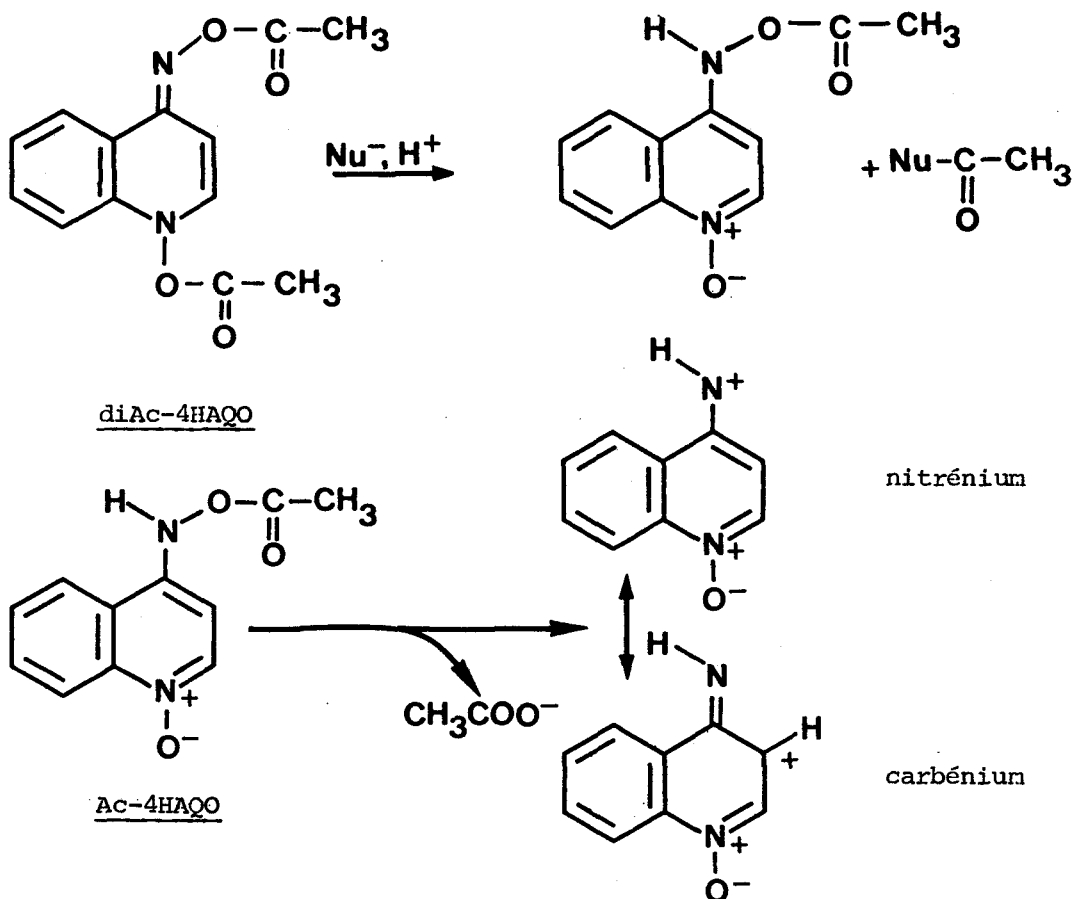
REFERENCES

1. W. NAKAHARA, F. FUKUOKA and T. SUGIMURA, Carcinogenic action of 4-nitroquinoline-*N*-oxide. *Gann* **48**, 129 (1957).
2. Y. SHIRASU, Further studies on carcinogenic action of 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide. *Gann* **54**, 487 (1963).
3. 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**, 489 (1965).
4. T. SUGIMURA, K. OKABE and M. NAGAO, The metabolism of 4-nitroquinoline-1-oxide, a carcinogen. 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 (1966).
5. Mit. TADA and Mar. TADA, Seryl-tRNA synthetase and activation of the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide. *Nature (Lond.)* **255**, 510 (1975).
6. J. A. MILLER, Carcinogenesis by chemicals: an overview—G.H.A. Clowes memorial lecture. *Cancer Res.* **30**, 559 (1970).
7. 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.* **7**, (part II), 1025 (1968).
8. Mar. TADA, Mit TADA and T. TAKAHASHI, Interaction of a carcinogen, 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide with nucleic acids. *Biochem. biophys. Res. Comm.* **29**, 469 (1967).
9. T. MATSUSHIMA, I. KOBUNA and T. SUGIMURA, *In vivo* interaction of 4-nitroquinoline-1-oxide and its derivatives with DNA. *Nature (Lond.)* **216**, 508 (1967).
10. Y. KAWAZOE and M. ARAKI, Studies on chemical carcinogenesis. V. O,O'-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide. *Gann* **58**, 485 (1967).

11. S. IKEGAMI, N. NEMOTO, S. SATO and T. SUGIMURA, Binding of ¹⁴C-labeled 4-nitroquinoline-1-oxide to DNA *in vivo*. *Chem. biol. Interact.* **1**, 321 (1969/1970).
12. J. MARMUR, A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. mol. Biol.* **3**, 208 (1961).
13. Mit. TADA and Mar. TADA, Interaction of a carcinogen, 4-nitroquinoline-1-oxide, with nucleic acids: chemical degradation of the adducts. *Chem. biol. Interact.* **3**, 225 (1971).

b) Etude de la réactivité du 4-acétoxyaminoquinoléine 1-oxyde (Ac-4HAQO) sur l'ADN *in vitro*

Au cours d'une discussion à propos de notre travail sur le dérivé diacétylé du 4HAQO (publication n° 1), nous émettions l'hypothèse que la réaction covalente du diAc-4HAQO sur l'ADN pouvait peut-être conduire à une acétylation de la macromolécule, sans l'avoir cependant dosée. A ce moment, des travaux effectués au laboratoire par Bernard BAILLEUL, sur l'étude de la réaction d'hydrolyse du dérivé diacétylé, mirent en évidence cette réaction d'acétylation qui avait lieu au cours de la conversion du diAc-4HAQO en un dérivé monofonctionnel : le 4-acétoxyaminoquinoléine 1-oxyde (Ac-4HAQO). Ce composé a alors été choisi comme deuxième modèle de cancérigène ultime du 4NQO. En effet, c'est un électrophile puissant et il est très réactif. De plus, de par sa structure monofonctionnelle, ce composé se rapproche de l'hypothèse des TADA qui avaient proposé que l'activation du 4HAQO conduisait à la formation d'un aminoacyl-4HAQO, lui aussi monofonctionnel (TADA et al., 1975). Le schéma ci-dessous, extrait de la publication n° 5 (p.106) décrit la formation de l'Ac-4HAQO ainsi que le mécanisme réactionnel que nous avons proposé pour ce composé.



Des travaux de chimie effectués dans l'équipe du Pr. Jean LHOMME ont parfaitement confirmé ce mécanisme réactionnel (DEMEUNYNCK, 1984).

Nous avons montré que l'Ac-4HAQO est environ 2,5 fois plus réactif sur l'ADN que le diAc-4HAQO. Ce résultat confirme, d'une part, les travaux effectués sur les nucléosides isolés (guanosine et adénosine) qui sont décrits dans la publication n° 5, et d'autre part, l'existence, au cours de réaction d'hydrolyse du diAc-4HAQO, d'autres mécanismes que ceux conduisant à la formation de l'Ac-4HAQO. Il a été en effet montré, au laboratoire, que le diAc-4HAQO peut être également converti en un autre composé, ne possédant pas de fonction N-oxyde : l'Ac-4HAQ (BAILLEUL et al., 1983) ; ceci explique le plus faible taux de fixation obtenu lorsque l'on fait réagir le diAc-4HAQO sur la macromolécule.

Un autre résultat important est la mise en évidence de l'influence de la structure secondaire de l'ADN sur la réactivité du cancérigène, comme nous l'avons précédemment observé dans le cas du dérivé diacétylé (publication n° 1). Ainsi, comme cela a déjà été constaté pour d'autres cancérigènes tels l'AAF et le benzo(a)pyrène, (KRIEK et HENGEVELD, 1978 ; FUCHS, 1978 ; PULKRABEK et al., 1979), la structure de la macromolécule module la réactivité de l'espèce réactive en différents sites.

Nous avons également pu démontrer que l'Ac-4HAQO conduit à la formation de composés de substitution des bases analogues à ceux obtenus quand on modifie l'ADN par le diAc-4HAQO. Ceci confirme bien l'hypothèse inscrite dans le schéma donné à la p.59 . En particulier, nous avons retrouvé dans les deux cas l'adduit sur le C8 de la guanine (dGIII) qui avait été synthétisé et caractérisé au laboratoire (BAILLEUL et al., 1981 : publication n° 5). La formation de cet adduit dépend de la structure secondaire de l'ADN : il est obtenu en plus grande quantité sur l'ADN dénaturé.

L'isolement par chromatographie clhp de plusieurs composés de substitution base-quinoléine, après hydrolyse enzymatique de l'ADN modifié, constitue une preuve formelle de la liaison covalente du cancérigène sur la macromolécule d'ADN.

Ce travail est décrit dans la publication n° 3 (p. 62) :

"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, 1983.

En conclusion, nous avons utilisé un modèle de cancérrogène ultime du 4NQO qui nous semble très adéquat. Cependant, une dernière étape reste à franchir : savoir si l'Ac-4HAQO induit *in vitro* des lésions identiques à celles produites *in vivo* par les précancérrogènes. Nous avons donc entrepris la comparaison "*in vivo-in vitro*" ; elle est décrite dans le paragraphe C de ce chapitre.

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

S.Galiègue-Zouitina, B.Bailleul and
M.H.Loucheux-Lefebvre¹

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

(Received on 7 August 1982; accepted on 12 January 1983)

Abstract

²⁻³H-Labelled 4-acetoxyaminoquinoline-1-oxide (Ac-4 HAQO), the ultimate carcinogen model of 4-nitroquinoline-1-oxide, was reacted *in vitro* with native and denatured DNA. We found that Ac-4 HAQO is 2- to 3-fold more reactive than diAc-4 HAQO, another ultimate carcinogen model of 4 NQO which was previously studied [Galiègue *et al.* (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, 609, 383-391]. Ac-4 HAQO-modified DNA is thermally destabilized: when 1% of the bases of DNA were modified by Ac-4 HAQO, its melting temperature decreased 1.2°C. Enzymatic degradation of Ac-4 HAQO-modified native and denatured DNA's to nucleosides was performed. The hydrolysates were analyzed, first with a simple chromatographic system, and then by h.p.l.c. The compounds recovered from the modified polymers were characterized by h.p.l.c. and a variation in their respective amounts as a function of the secondary structure of DNA was observed. Especially, the N-(deoxyguanosin-(C⁸-yl)-4-aminoquinoline-1-oxide, the so called dG III adduct, was recovered from DNA, and its amount was evaluated to be ~3.5-fold greater in the case of denatured DNA than in the case of native DNA.

Introduction

With the exception of some alkylating agents, most chemical carcinogens require metabolic activation to reactive intermediates prior to binding to cellular macromolecules (1). It is now clear that DNA constitutes a crucial target in the tumorigenesis processes. In our laboratory, we are studying some structural and chemical DNA modifications after covalent binding of the ultimate metabolite of 4-nitroquinoline-1-oxide (4 NQO)*. This compound is a potent carcinogen (2), and some of its biological and chemical properties, as well as preliminary findings on its mode of action, have been reported (for reviews, see 3-5). Previously we used (6,7) the O,O'-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide (diAc-4 HAQO) (8,9) as a ultimate carcinogen model of 4 NQO: we showed its covalent binding to DNA *in vitro* (6,7), the thermal destabilization of the modified DNA (6) and its sensitivity to the S₁ endonuclease (10). More recently, the monoacetyl derivative of 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide (4 HAQO), 4-acetoxyaminoquinoline-1-oxide (Ac-4 HAQO) (11) has

¹To whom reprint requests should be addressed.

*Abbreviations: Ac-4 HAQO, 4-acetoxyaminoquinoline-1-oxide; diAc-4 HAQO, O,O'-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide; 4 NQO, 4-nitroquinoline-1-oxide; 4 HAQO, 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide; N-AAAF, N-acetoxy-N-acetyl-2-aminofluorene; AAF acetylaminofluorene.

been shown to constitute a good model of ultimate carcinogen of 4 NQO (12).

Many studies have been carried out the last ten years, by using more and more sensitive techniques, to determine for each chemical carcinogen the nature of all the adducts formed with DNA and to evaluate the respective amounts of each of them (see for example, Essigmann *et al.* (13) and Croy *et al.* (14) in the case of aflatoxin; Pulkrabek *et al.* (15) in the case of benzo[a]pyrene; Kadlubar *et al.* for N-OH-1-naphthylamine (16) and for N-OH-2-naphthylamine (17)). In the case of 4 NQO, some authors pointed out that *in vivo* binding of the carcinogen mainly occurs on the purine bases of DNA (18). However, the precise nature of this binding to DNA, i.e., the identification and enumeration of all the adducts which are formed with the DNA macromolecule have not yet been seriously explored. Moreover, to date nothing is known about the stability of the NQO-adducts of DNA. Indeed, it is known that some adducts can be unstable and for example Kriek and Westra showed that under particular conditions the guanyl-C-8 AF-adduct can be decomposed (19). Thus, it seems also important to date to think in terms of degradation products of the adducts.

Ikegami *et al.* (18) and after them, Tada and Tada (20,21) have only mentioned the obtention of some adducts after enzymatic and chemical degradation of *in vivo* 4 NQO-modified DNA. Since these studies used descending chromatography for the separation of their adducts, a reinvestigation of these compounds with more sensitive separation techniques was desirable. Therefore it seemed very useful to visualize all of the quinoline-adducts on DNA and their eventual degradation compounds.

We report *in vitro* reaction of Ac-4 HAQO with DNA and we compare our results with those obtained with diAc-4 HAQO, which is considered as another ultimate carcinogen (6,7). Initially, we studied the reactivity of the monoacetyl derivative with DNA as a function of its secondary structure, and we emphasized the thermal destabilization of the modified DNA. Then, the enzymatic degradation of the modified DNA allowed us to visualize the adducts and their eventual degradation products. In particular we focused our attention on N-(deoxyguanosin-C⁸-yl)-4-aminoquinoline-1-oxide, the so-called dG III, the structure of which was recently elucidated in our laboratory (12). Moreover, we showed that the extent of the different adducts formed depends on the conformation of the starting DNA.

Materials and Methods

Reagents

The carcinogen 4 NQO was obtained from Fluka AG (Switzerland). Ac-4 HAQO was prepared from diAc-4 HAQO (12). DiAc-4 HAQO was synthesized from 4 HAQO (9), as previously described (8). The 4 N[2-³H]QO was obtained from Amersham (sp. act.: 941 mCi/mmol). Ac-4 HA[2-³H]QO and diAc-4 HA[2-³H]QO were prepared as described for the unlabelled compounds; they had the same specific activity: 18.41 mCi/mmol.

All of the enzymes (bovine pancreatic DNase I, snake venom phosphodiesterase, calf spleen phosphodiesterase, endonuclease from *Neurospora*

crassa, alkaline phosphatase from *Escherichia coli* and alkaline phosphatase from calf intestine) were purchased from Boehringer-Mannheim (FRG). Their conditions of utilization are described below.

Native DNA was obtained from chicken erythrocytes. It had the following characteristics: $S_{20,w}^{0.5}$ 22S; hyperchromicity at 260 nm, 41%; melting temperature (in 0.1 M NaCl), 87°C. Denatured DNA was prepared just before each experiment by heating for 10 min in a boiling water bath, then chilling in an ice bath.

Instrumentation

The absorption spectra and the melting temperature studies were carried out using a Cary 118 C spectrophotometer. The melting curves of unmodified and modified DNA's were measured at 260 nm with the Cary 118 C spectrophotometer which was fitted out for melting temperature determinations. The apparatus was previously described (6).

H.p.l.c. 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). Radioactivity of the peaks was determined with a SL 300 Intertechnic scintillator counter.

Preparation of a Ac-4 HA[2-³H]QO-modified DNA samples

Ac-4 HA[2-³H]QO-modified DNA was prepared according to the same method as for diAc-4 HAQO-modified DNA (6). The reactions were performed with native and denatured DNA's, in a 2 mM sodium citrate buffer, pH 7. Approximately 1 mg of DNA (concentration ~0.5 mg/ml) was incubated at 37°C, for 0.25 h, under a nitrogen atmosphere, in the dark and in the presence of different amounts of Ac-4 HA[2-³H]QO solubilized in dimethylsulfoxide. The incubation time was reduced (0.25 h instead of 0.75 h in the case of diAc-4 HAQO) because of the very high reactivity of Ac-4 HAQO (12). Each sample was characterized by the ratio R of the molar concentration of DNA, expressed as mol Pi/l, in the initial reaction mixture. The modified DNA was purified by one (or two) diethyl-ether extraction(s). The purification was achieved as previously described (6,7) by extensive ethanol-precipitations (0.1 volume of NaCl 5 M and 2 volumes of precooled ethanol were added to each DNA solution; the DNA precipitated after shaking). The amount of bound quinoline ring is given by the ratio [C]/[P] where [C] is the concentration of ³H-labelled carcinogen, determined by counting aliquots of 100 μl of the DNA solutions (SL 300 Intertechnic scintillator), and [P] the concentration of nucleotides (expressed as mol Pi/l) as determined by the absorbance at 260 nm. The same correction for the A_{260} is always made, as previously described (6). The results are given as the number of bound quinoline rings/100 bases (percentage of modified bases).

Three series of samples were prepared: (i) a first series of native and denatured modified DNA's was prepared for the study of the reactivity of Ac-4 HAQO as a function of the secondary structure of DNA; (ii) a second series of native-modified DNA samples was prepared for the melting point measurements. In this case, since the melting temperatures are very dependent on the ionic strength of the solution, all DNA samples were solubilized in the same buffer from a stock solution; (iii) the third series was constituted of two native-modified DNA's and one denatured-modified DNA samples, for the enzymatic hydrolysis to nucleosides. In this case, after the last ethanol-precipitation, the DNA was solubilized in the appropriate buffer, at a concentration of ~2 mg/ml. The samples were then dialysed against this buffer (1 liter for each sample) for 4 h, with 2 buffer changes.

Preparation of diAc-4 HA[2-³H]QO-modified-native DNA

Only one sample was prepared as previously described (6) for the comparison with Ac-4 HA[2-³H]QO-modified DNA, after enzymatic hydrolysis. This preparation of diAc-4 HAQO-modified DNA contained 0.9% of modified bases and its specific activity was 415 d.p.m./γ.

Enzymatic hydrolysis of the modified DNA to nucleosides

The incubation buffer was: Tris-HCl 5 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 7.4. The DNA was always solubilized at a concentration of 2 mg/ml.

Two different methods were used for the hydrolysis: (i) in the case of the comparison between the two samples of diAc-4 HAQO-modified DNA and Ac-4 HAQO-modified DNA, the hydrolysis were carried out according to the method previously described (12): the modified DNA (~1 mg) was incubated at 37°C for 24 h with 30 γ of bovine pancreatic DNase I (grade II, sp. act.: 1000 units/mg) and 30 γ of snake venom phosphodiesterase (sp. act.: 1.5 units/mg). The pH was adjusted to 9.0 and dephosphorylation of the hydrolysis products was performed for 24 h by adding 20 γ of alkaline phosphatase of *E. coli* (20 units/mg). Thus, the total incubation time was 48 h; (ii) in the case of the samples prepared for h.p.l.c. analysis, the conditions of hydrolysis were slightly modified in order to limit the eventual degradation of the products formed during the hydrolysis. Indeed, the amounts of the enzymes were increased, the incubation time was shortened, and the sequence of the enzymes was slightly modified. For the native Ac-4 HAQO-modified DNA, 0.8 mg of DNA was solubilized in the buffer men-

tioned above and incubated at 37°C for 2 h with 45 γ of the DNase I; then, 45 γ of the venom snake phosphodiesterase and 90 γ of calf spleen phosphodiesterase (0.25 units/mg) were added for an additional incubation of 17 h at 37°C. The pH was adjusted to 8.0, 35 γ of alkaline phosphatase from calf intestine (grade I, 400 units/mg) were added and the dephosphorylation of the hydrolysis products was performed for 7 h. Thus, the total incubation time was 26 h. The denatured-Ac-4 HAQO modified-DNA (0.75 mg) was hydrolysed according to the same method as for native-modified DNA, but DNase I was replaced by 40 γ of endonuclease of *N. crassa* (24 units/mg) which is specific for the single-stranded DNA.

Column chromatography of the DNA hydrolysates

Chromatography on Biogel P 2 (minus 400 mesh) was performed using a column (0.6 x 60 cm) equilibrated with 2 mM sodium citrate buffer (pH 7). The flow rate was 4 ml/h, fractions of 1 ml were collected and the radioactivity measured. The column was calibrated with deoxyadenosine-5'-monophosphate, deoxyguanosine-5'-monophosphate, deoxyadenosine, deoxyguanosine and adenosine-triphosphate.

H.p.l.c. analysis of P 2 fractions

After P 2 column chromatography each tritiated fraction was collected, concentrated, and the analysis was carried out by means of h.p.l.c. A C18-μ-Bondapak 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.

Results

Reactivity of Ac-4 HA[2-³H]QO with DNA

Influence of the DNA secondary structure. Ac-4 HAQO was reacted with native and denatured DNA's in 2 x 10⁻³ M citrate buffer, pH 7. In both cases (and in the same manner) as with diAc-4 HAQO (6), the quinoline binding to DNA can be observed when recording the absorption spectra in the 300–500 nm range. The maxima of the bands are located at 360 nm and 365 nm for native and denatured-modified DNA's, respectively. The amounts of bound carcinogen as a function of R (see **Materials and Methods**) are set in Table I. First we observe that, as for diAc-4 HAQO (6), the secondary structure of DNA influences the reactivity of Ac-4 HAQO. Indeed the reactivity of denatured DNA (6 quinoline rings/100 bases for R = 1) is 2-fold greater than in the case of native DNA (2.7 quinoline rings/100 bases, for R = 1). The second phenomenon which is interesting to note is that, whatever the secondary structure of DNA is, the extent of binding of Ac-4 HAQO to the DNA is 2- to 3-fold greater than in the case of diAc-4 HAQO (6): 1 quinoline rings/100 bases, for native DNA, and 2.5 quinoline rings/100 bases, for denatured DNA. Therefore, it seems attractive to use Ac-4 HAQO for studying *in vitro* DNA modification.

Thermal destabilization of Ac-4 HAQO-modified DNA samples. A series of Ac-4 HAQO-modified DNA samples were melted and the differences between the melting temperature (T_m) of a given carcinogen-modified DNA and unmodified DNA (ΔT_m) were calculated. The melting temperatures of DNA samples decrease as their extent of modification increases (ΔT_m < 0), as observed in Table II. We calculated the value of ΔT_m per 1% of modified bases (in the same manner), as for diAc-4 HAQO-modified DNA (6). We found ΔT_m = 1.2°C per 1% of modified bases, which is a very similar result as those we obtained in the case of diAc-4 HAQO-modified DNA (6).

Enzymatic degradation of Ac-4 HA[2-³H]QO-modified DNA to nucleosides. Chromatographic analysis of the hydrolysates

Rough analysis by chromatography on Biogel P 2. Comparison of Ac-4 HAQO-modified DNA with a diAc-4 HAQO-modified DNA. Two samples of Ac-4 HA[2-³H]QO and diAc-4 HA[2-³H]QO modified-native DNA's were incubated with the enzymes, at 37°C, for 48 h (see **Materials**

Table I. Amounts of carcinogen bound to native DNA (NDNA) and denatured DNA (DDNA) as a function of R.

R ^a	Percentage of modified bases ^b
R = 0.01	NDNA 0.12 DDNA 0.25
R = 0.05	NDNA 0.5; 0.6 DDNA 1.1
R = 0.1	NDNA 0.8; 1.0 DDNA 1.7
R = 0.2	NDNA 1.2; 1.5 DDNA 3.0
R = 0.5	NDNA 2.1; 2.2 DDNA 5.0
R = 1	NDNA 2.9; 3.0; 2.7 DDNA 6.0; 6.4

^aRepresents the concentration of the carcinogen/the concentration in DNA, in the initial reaction mixture. ^bThe amount of bound carcinogen is obtained by the ratio [C]/[P] where [C] is the concentration of bound quinoline rings and [P] the concentration of nucleotides (see Materials and Methods). The confidence limits are: [C]/[P] ± 0.1%.

Table II. Melting temperature values of native modified-DNA samples.

Solvent	Percentage of modified bases ^a	T _m (°C) ^b	ΔT _m (°C)
2 x 10 ⁻³ M sodium citrate buffer, pH 7	0	58.05	0
	0.5 (R = 0.05)	57.60	-0.45
	1.0 (R = 0.1)	56.85	-1.20
	1.5 (R = 0.2)	56.40	-1.65
	2.7 (R = 1)	54.65	-3.40

^aThe modified DNA's studied are characterized in Table I. ^bThe confidence limits are: T_m, 0.1°C; ΔT_m, ± 0.2°C.

and Methods). The hydrolysates were then analyzed on a Biogel P2 minus 400 mesh column. We used u.v. detection at 254 nm, to see the deoxyribonucleosides, and the ³H radioactivity of 100 μl aliquots of each fraction was counted to detect the presence of the quinoline moiety. In both cases we found a u.v. chromatographic profile characteristic of the four deoxyribonucleosides (Figure 1, part I): this means that hydrolysis takes place effectively, at least at the unsubstituted regions of the DNA. Some minor other peaks were also detected. The chromatographic radioactive patterns are shown in Figure 1, parts II and III: for the two modified DNA's, we obtained the same radioactive profiles, i.e., five distinct tritiated fractions we called A, B, C, D, E. The presence of many radioactive peaks suggests that the hydrolysis was also efficient in the substituted regions of the DNA.

H.p.l.c. analysis of the P2 column fractions. This analysis was performed by using Ac-4 HAQO as ultimate carcinogen. Two Ac-4 HA[2-³H]QO-modified polymers were prepared: a native-modified DNA (2.2% of modified bases; sp. act.: 1620 d.p.m./γ) and a denatured-modified DNA (6.4% of modified bases; sp. act.: 4715 d.p.m./γ) in order to study the influence of the DNA secondary structure on the respective amounts of the different adducts.

After enzymatic hydrolysis (see Materials and Methods), the same five P2 tritiated fractions were obtained for the native and denatured DNA's, but we pointed out a variation

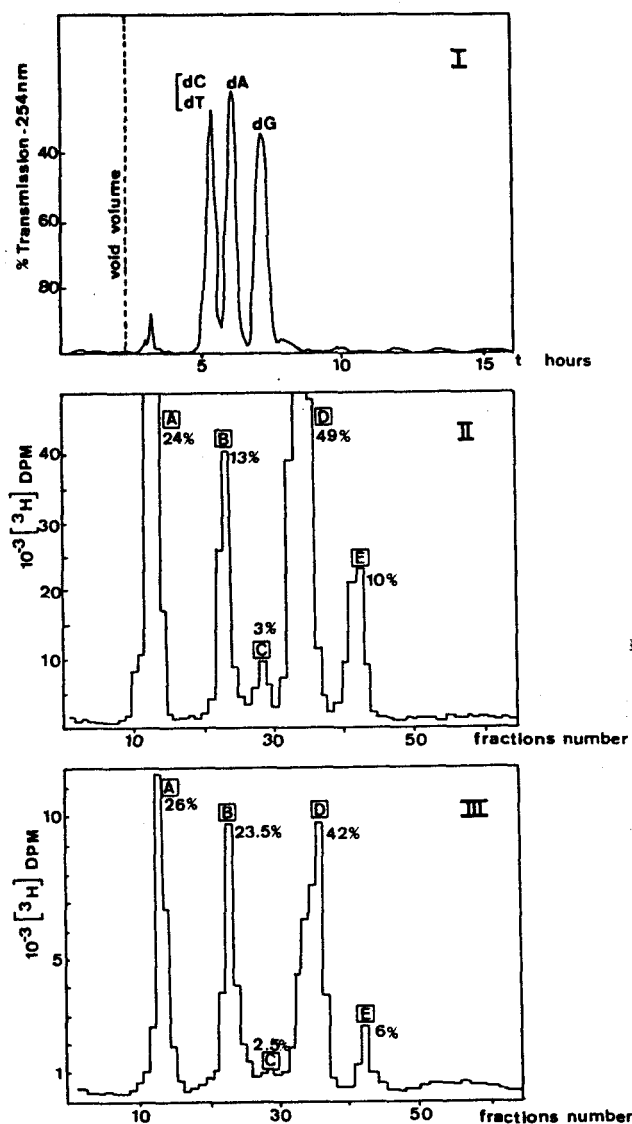


Fig. 1. Elution profiles from P2 minus 400 mesh column after enzymatic hydrolysis of Ac-4 HAQO-modified DNA (I: u.v. detection; II: radioactivity detection) and diAc-4 HAQO-modified DNA (III: radioactivity detection). Ac-4 HAQO modified DNA has 2.3% of modified bases and its specific activity is: 1320 d.p.m./γ; 500 γ were applied to the column. DiAc-4 HAQO modified DNA has 0.9% of modified bases and its specific activity is: 415 d.p.m./γ; 100 γ were applied to the column. The conditions used for the enzymatic hydrolysis are described in Materials and Methods.

in their respective amounts. For example, E is greater and D is weaker in the case of denatured DNA than in the case of native DNA. In the two cases, each P2 fraction was collected, concentrated and submitted to h.p.l.c. analysis. We used absorbance detection at two wavelengths: at 254 nm, characteristic wavelength for both nucleosides and quinoline ring, and at 365 nm, characteristic wavelength of the quinoline moiety. Moreover, quinoline is also detected by ³H radioactivity measurements of 500 μl aliquots. Therefore this method allowed us to discriminate between (i) an unmodified nucleoside and (ii) an adduct or a quinoline derivative, which could be released from eventually unstable adduct(s). The Table III gives the composition of each P2 fraction and the percentage of each h.p.l.c. isolated compound. These percentages were evaluated from the ratio: ³H of the isolated

peak/ ^3H of the total DNA radioactivity. The two first fractions A and B appear in h.p.l.c. as complex mixtures of different compounds and their origin will be discussed below (see Discussion). At the opposite, fractions C, D and E are

Table III. H.p.l.c. analysis of the P2 fractions^a for native and denatured Ac-4 HA[2- ^3H]QO-modified DNA's.

P2 fraction	H.p.l.c. isolated peaks ^b	Native DNA ^c	Denatured DNA ^c
A	Complex diagram: many peaks	21%	16%
B	Complex diagram: many peaks	16%	18%
C	C Minor products	6% -	1.2% 3%
D	D ₁	22.5%	2.8%
	D ₂	21%	2.6%
	D' ₂	-	7%
E	dGIII	13%	49%

^aThe hydrolysates were first chromatographed on the P2 minus-400 mesh column, the P2 tritiated fractions A, B, C, D, E were collected, concentrated and each of them was analyzed by h.p.l.c. (see Materials and Methods). ^bThe peaks represented here are the tritiated peaks recovered by h.p.l.c. analysis; they give an absorbance signal at 254 nm and 365 nm on the h.p.l.c. chromatograms. ^cFor each isolated h.p.l.c. peak, the percentage is given by the ratio: ^3H radioactivity of the isolated peak/ ^3H total radioactivity of the native modified DNA or the denatured modified DNA.

constituted either by a pure compound (E), or by two or three compounds (C, D). Several hydrolysis were carried out and the results were always reproducible.

The tritiated h.p.l.c. patterns of fractions C, D, E are shown in Figure 2, for the native modified DNA. Each tritiated peak, which gives an absorbance at 254 nm and 365 nm (u.v. profile not shown) is characterized by its retention time R_t in our conditions of chromatography, and by the ratio $\Delta = \text{DO}_{254 \text{ nm}}/\text{DO}_{365 \text{ nm}}$ (Figure 2). Fraction E was identified as dG III, the adduct we have characterized previously (12). Indeed fraction E and this synthetic compound comigrated in P2 chromatography and in h.p.l.c., with a retention time of 12 min and a Δ value of 1.8 at neutral pH. This adduct corresponds to the fixation of quinoline on the C-8 of guanine. Its extent was more important for denatured DNA (49%) than for native DNA (13%) (see Table III). Fraction D, which is quantitatively important in the case of the native DNA (43.5%) is composed of two major products: D₁ and D₂ which represent 22.5% and 21% of the total radioactivity, respectively. In contrast, these two compounds were present in weaker amounts in the case of denatured DNA. Moreover, in this last case another product was detected, D'₂ (h.p.l.c. data not shown). The retention times are: $R_t = 9.1$ min for D₁ and $R_t = 10.5$ min for D₂. The Δ values are: $\Delta = 2.2$ for D₁ and $\Delta = 1.5$ for D₂. The fraction C represents the weakest fraction and appears as pure in radioactivity for the native polymer (retention time $R_t = 11.8$ min; $\Delta = 2.1$). For denatured DNA, C was recovered with 1.2% of radioactivity and a mixture of three or four other minor compounds which account for 3% of radioactivity is also observed (Table III).

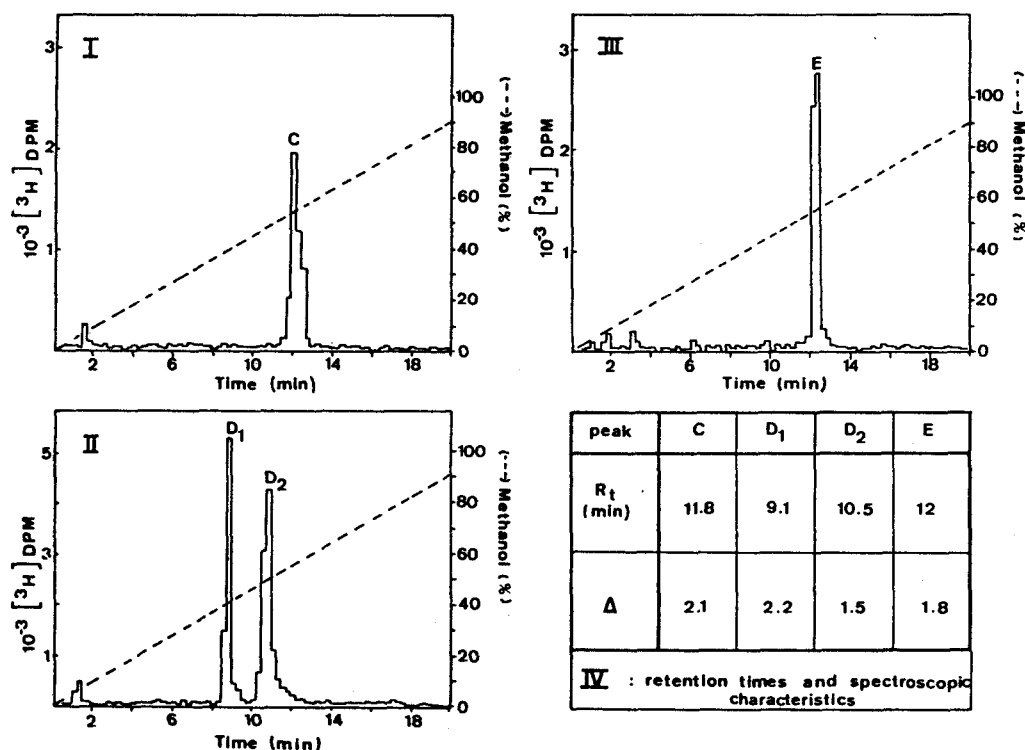


Fig. 2. H.p.l.c. chromatographic profiles of the P2 fractions C, D, E obtained after enzymatic hydrolysis of Ac-4 HA[2- ^3H]QO-native modified DNA (2.2% of modified bases: sp. act.: 1620 d.p.m./ γ). Chromatographies with linear gradient (during 20 min) from water to 95% methanol-water were made by collection of aliquots (500 μl) and ^3H radioactivity measurements. I: fraction C, II: fraction D, III: fraction E; IV: retention times (R_t) and ratios Δ : optical density at 254 nm/optical density at 365 nm, for the different h.p.l.c. isolated peaks.

Discussion

In this paper we showed that the monoacetyl derivative of 4 HAQO is an attractive model for studying *in vitro* DNA modification by 4 NQO. Indeed this compound was found to be ~3-fold more reactive with DNA than the diacetyl derivative previously used (6). Moreover the covalent binding of both derivatives with DNA induces the same structural perturbation. Concerning the formation of adducts, after enzymatic degradation of two DNA samples modified either by di-Ac 4 HAQO or by Ac-4 HAQO, we observe the same chromatographic P2 column and h.p.l.c. patterns (the h.p.l.c. data in the case of diAc-4 HAQO are not shown). This means that the two derivatives induced the same adducts on the DNA, and this is in agreement with our previous findings about the reaction of Ac-4 HAQO and diAc-4 HAQO with purine nucleosides (12). Thus our present results provide a strong support for the hypothesis of the mechanism of interaction with DNA we have proposed, involving the two acetylated derivatives (12): Ac-4 HAQO is obtained from diAc-4 HAQO and constitutes a very reactive electrophilic intermediate which rapidly interacts either with DNA or with isolated nucleosides, with a better yield than diacetyl derivative.

The existence of a thermal destabilization of modified DNA is clearly in agreement with the results we have previously obtained, which demonstrated the sensitivity of Ac-4 HAQO or diAc-4 HAQO modified DNA's to the single-stranded specific endonuclease S₁ (10). This means that the binding of the ultimate carcinogen to the DNA induces partially denatured regions on the macromolecule.

In this work we also studied the influence of the DNA secondary structure on the extent of the different adducts formed. Except for P2 fractions we called A and B (see Results, Figure 1), which are observed by h.p.l.c. as a complex mixture of unidentified peaks, we can affirm that our results indicate that the secondary structure of DNA influences the extent of the adducts. For example, the compounds called D₁ and D₂ account for ~20% of the total radioactivity in native-modified DNA, while they constitute minor products (<8% of the total radioactivity) in the case of denatured modified DNA. In contrast, the adduct dG III represents only 13% of the total radioactivity of the native DNA while it is recovered as 49% in the denatured DNA. Our results compare with those obtained by Pulkrabek *et al.* (15) concerning the modification of DNA by two enantiomers of a diol epoxide of benzo[a]pyrene (BPDE I): they showed that there exists a similar phenomenon, i.e., one minor deoxyguanosine adduct was present in greater amounts in denatured DNA than in native DNA. The case of AAF is another example. The interaction of N-AAF with DNA *in vitro* results in the production of C-8 and N-2 adducts of deoxyguanosine, which are formed if the substrate is double-stranded DNA (22). On the other hand, *in vitro* modification of single-stranded DNA or RNA leads only to the binding of AAF to the C-8 position of guanine residues (23).

Concerning the dG III adduct, it corresponds to the C-8 arylamination of deoxyguanosine, the carcinogen being attached by the nitrogen in position 4 of the quinoline ring (12). This adduct has also been recovered in the hydrolysate of *in vivo* modified DNA (12), and this result is strengthening its interest. However, it does not constitute a major adduct, except for denatured DNA. We obtained very recently a series of arguments which allow us to think that the amounts of dG

III recovered in this present study are minimized, due to the instability of this adduct during the enzymatic DNA hydrolysis. Indeed we showed that under certain experimental conditions, and in particular under our enzymatic hydrolysis conditions (see Materials and Methods), dG III is unstable and gives rise to some degradation products. For example, by increasing the duration of the hydrolysis to 70 h, the amount of dG III recovered after P2 analysis decreased: it was only 2% in the case of native modified DNA, and 15% in the case of denatured modified DNA, instead of 13% and 49%, respectively. The hydrolysis conditions were slightly modified as a consequence of these observations. Therefore, we are now trying in our laboratory to test another method for the titration of the dG III adduct on the DNA, which will use the spectrophotometric properties of this compound.

Let us now consider the so-called A and B P2 fractions. Our experimental h.p.l.c. data show complex tritiated profiles, which as yet cannot be completely explained. Concerning the fraction A one observes (Figure 1) that it is located near to the void volume. This may indicate that the DNA-hydrolysates are containing oligonucleotides and/or (di- or) trinucleotides bearing some quinoline molecules. In other words, it is possible that the binding of the carcinogen to the DNA hinders the total DNA hydrolysis. Therefore, we tried to improve the yield of the hydrolysis by adding greater amounts of the different enzymes: whatever the conditions, we always found at least 20% of the total radioactivity in the fraction A. Thus, this hypothesis does not seem sufficient to explain the origin of A. Another explanation for A could be discussed in the light of an experimental result we very recently obtained: the decomposition of dG III (as we previously mentioned) gives rise to some products which comigrate with A on P2 chromatography. We are now studying the nature of these degradation products of dG III and their stability.

Dealing with the fraction B, more than five tritiated peaks are detected in h.p.l.c. This fraction also contains great quantities of the unlabelled nucleosides deoxythymidine, deoxycytidine and deoxyadenosine. Studies are being carried out in our laboratory to determine whether or not the tritiated peaks are minor adducts.

In conclusion, we pointed out the two following facts: (i) the adducts may be unstable. This phenomenon was evidenced by the degradation which occurs for the dG III adduct, preventing its precise quantitative determination. It is possible that other adducts may also exhibit similar properties, and therefore (ii) it is evident that the enzymatic hydrolysis does not allow a quantitative evaluation but constitutes only a qualitative analysis.

Studies are now devoted to the identification of the purified h.p.l.c. peaks in order to compare the results obtained with *in vitro* and *in vivo* modified DNA. A first series of experiments have already shown that the dG III compound is present in both cases (12).

Acknowledgements

We would like to thank Professor G.Biserte for his constant help and stimulating discussions. We thank M.C.Denis for excellent technical assistance. This work was supported by an INSERM grant: ATP no. 79.109. One of us, B.B., is a recipient of a fellowship from the Ligue Nationale Française contre le Cancer.

References

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

2. Nakahara, W., Fukuoka, F. and Sugimura, T. (1957), Carcinogenic action of 4-nitroquinoline-N-oxide, *Gann*, **48**, 129-137.
3. Endo, H., Ono, T. and Sugimura, T. (1971), Chemistry and biological action of 4-nitroquinoline-1-oxide, *Recent Results Cancer Res.*, **34**, 1-99.
4. Nagao, M. and Sugimura, T. (1976), Molecular biology of the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide, *Adv. Cancer Res.*, **23**, 132-169.
5. Sugimura, T. (1981), *Carcinogenesis. A Comprehensive Survey: The Nitroquinolines*, Volume 6, Raven Press, New York, pp. 1-159.
6. Galiègue, S., Lecocq, G. and 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.
7. Galiègue, S., Bailleul, B. and 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, *Eur. J. Cancer*, **16**, 1283-1287.
8. Kawazoe, Y. and Araki, M. (1967), Studies on chemical carcinogens. V. O,O'-Diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide, *Gann*, **58**, 485-487.
9. Enomoto, M., Sato, K., Miller, E.C. and Miller, J.A. (1968), Reactivity of the diacetyl derivative of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide with DNA, RNA and other nucleophiles, *Life Sci.*, **17** (part II), 1025-1032.
10. Galiègue, S., Bailleul, B., Loucheux-Lefebvre, M.H. and Laval, J. (1982), *In vitro* enzymatic recognition of DNA modified by O,O'-diacetyl or O-acetyl derivatives of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide, *Carcinogenesis*, **3**, 435-438.
11. Kawazoe, Y., Ogawa, O. and Huang, G.F. (1980), Structure of carcinogenic 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide derivatives, *Tetrahedron*, **36**, 2933-2938.
12. 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.
13. Essigmann, J.M., Croy, R.G., Nadzan, A.M., Busby, W.F., Jr., Reinhold, V.N., Büchi, G. and Wogan, G.N. (1977), Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B1 *in vitro*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1870-1874.
14. Croy, R.G., Essigmann, J.M., Reinhold, V.N. and Wogan, G.N. (1978), Identification of the principal aflatoxin B1-DNA adduct formed *in vivo* in rat liver, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1745-1749.
15. Pulkrabek, P., Leffler, S., Grunberger, D. and 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 transcriptional activity, *Biochemistry (Wash.)*, **18**, 5128-5134.
16. Kadlubar, F.F., Miller, J.A. and Miller, E.C. (1978), Guanyl O⁶-arylamination and O⁶-arylation of DNA by the carcinogen N-hydroxy-1-naphthylamine, *Cancer Res.*, **38**, 3628-3638.
17. Kadlubar, F.F., Unruh, L.E., Beland, F.A., Straub, R.M. and 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 the N⁶ atom of adenine, *Carcinogenesis*, **1**, 139-150.
18. Ikegami, S., Nemoto, N., Sato, S. and Sugimura, T. (1969/70), Binding of ¹⁴C-labeled 4-nitroquinoline-1-oxide to DNA *in vivo*, *Chem.-Biol. Interactions*, **1**, 321-330.
19. 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.
20. Tada, Mit. and Tada, Mar. (1971), Interaction of a carcinogen, 4-nitroquinoline-1-oxide, with nucleic acids: chemical degradation of the adducts, *Chem.-Biol. Interactions*, **3**, 225-229.
21. Tada, Mit. and Tada, Mar. (1976), Main binding sites of the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide in nucleic acids, *Biochim. Biophys. Acta*, **454**, 558-566.
22. 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.
23. 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.

c) Comparaison par clhp des hydrolysats d'ADN modifiés *in vivo* et *in vitro*.
Bilan des principaux adduits base-guinoléine

Afin de tester la validité du modèle de cancérogène ultime du 4NQO que nous avons proposé, nous avons entrepris une comparaison de deux types d'ADN modifiés :

- l'un modifié *in vivo* par les cancérogènes précurseurs,
- l'autre modifié *in vitro* par le modèle de cancérogène ultime Ac-4HAQO.

Nous avons effectué l'hydrolyse enzymatique des deux échantillons d'ADN et nous avons comparé les deux hydrolysats. D'autre part, nous avons analysé dans l'ADN modifié *in vitro* la nature et le nombre d'adduits principaux formés, grâce à des comparaisons avec le poly(dG-dC).poly(dG-dC) et le poly(dA-dT).poly(dA-dT) modifiés par l'Ac-4HAQO.

Nous avons ainsi pu montrer que les trois adduits majeurs induits par le 4HAQO *in vivo* (2 sur la guanine et un sur l'adénine) sont également obtenus *in vitro* sur l'ADN modifié par l'Ac-4HAQO. En d'autres termes, l'acétoxyaminoquinoléine 1-oxyde représente un modèle *in vitro* très adéquat.

Le travail que nous venons de résumer est décrit dans la publication n° 4 :

"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 polynucléotides".

Cancer Research, sous presse.

Bien que cet article ne comporte pas d'études structurales sur les adduits, la conclusion indique la structure des principales lésions base-guinoléine actuellement connues. Ces informations nous avaient été demandées par les "Referees". Les travaux qui ont conduit à la détermination de ces structures feront l'objet du chapitre II.

A la suite de la publication n° 4 nous reviendrons sur certains points qui, pour des raisons de place, n'avaient pu être détaillés dans l'article, mais qui apportent cependant des informations complémentaires.

PUBLICATION N° 4

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 & Marie-H. LOUCHEUX-LEFEBVRE.

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

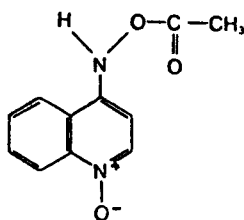
Cancer Research, sous presse.

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). 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 : $S^{\circ}_{20,w}$, 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 µBon-dapak 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 ENZYMATIC 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 D_1 , D_2 , D_4 and D_5 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 P_2 fraction D obtained after hydrolysis of the modified poly(dA-dT).poly(dA)dT) contained only one component which was the D_3 compound we recovered from the modified DNA. Indeed, the retention time and Δ values were exactly the same and the two isolated D_3 compounds (either from modified poly(dA-dT).poly(dA-dT) or from modified DNA) comigrated in HPLC.

As we previously mentioned, D_1 and D_3 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 D_1 is a guanyl adduct, we call dGuo-2-AQO and that D_3 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.

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.

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.

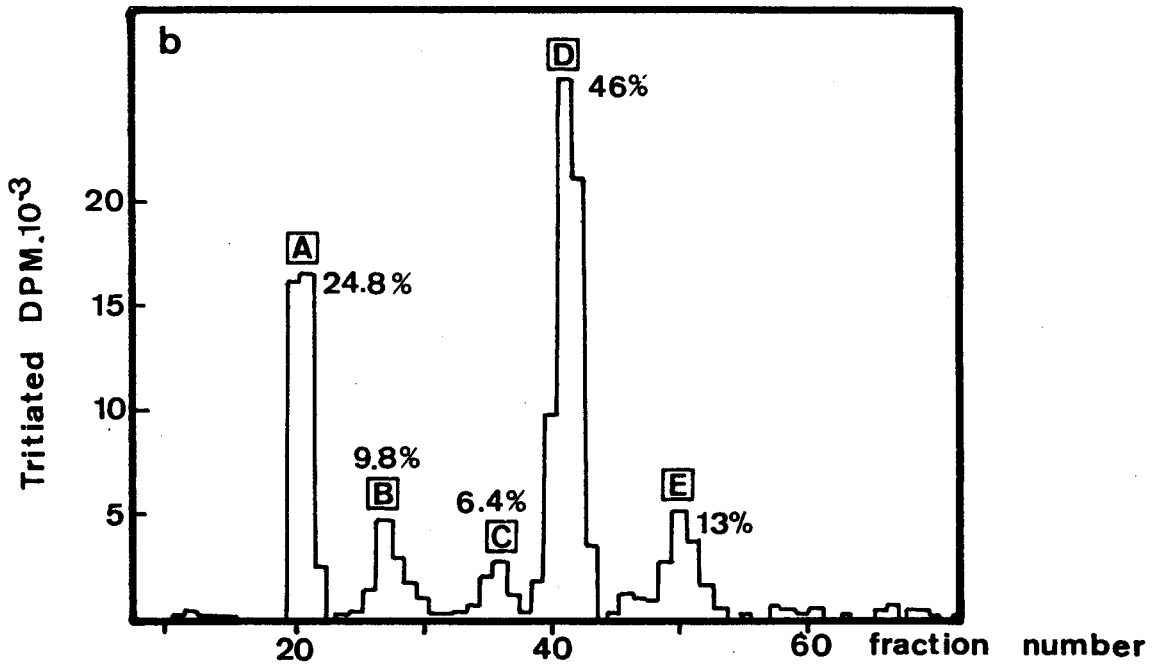
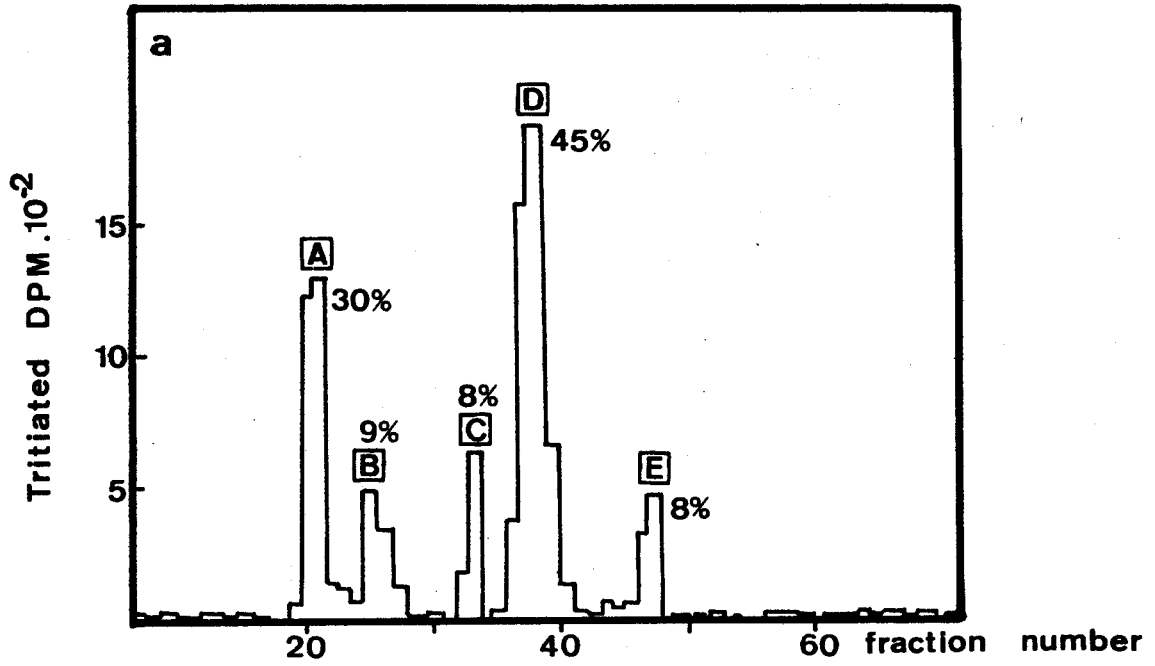


Chart 1. P₂ minus 400 mesh tritiated elution profiles of the DNA hydrolysates, in a 2 mM sodium citrate buffer, pH 7. The flow rate was 4 ml/hr, fractions of 1 ml were collected and the radioactivity was measured. a, *in vivo* 4-HA[2-³H]QO-modified DNA, with 0.02 % of modified bases ; 1 ml of a 60 mM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

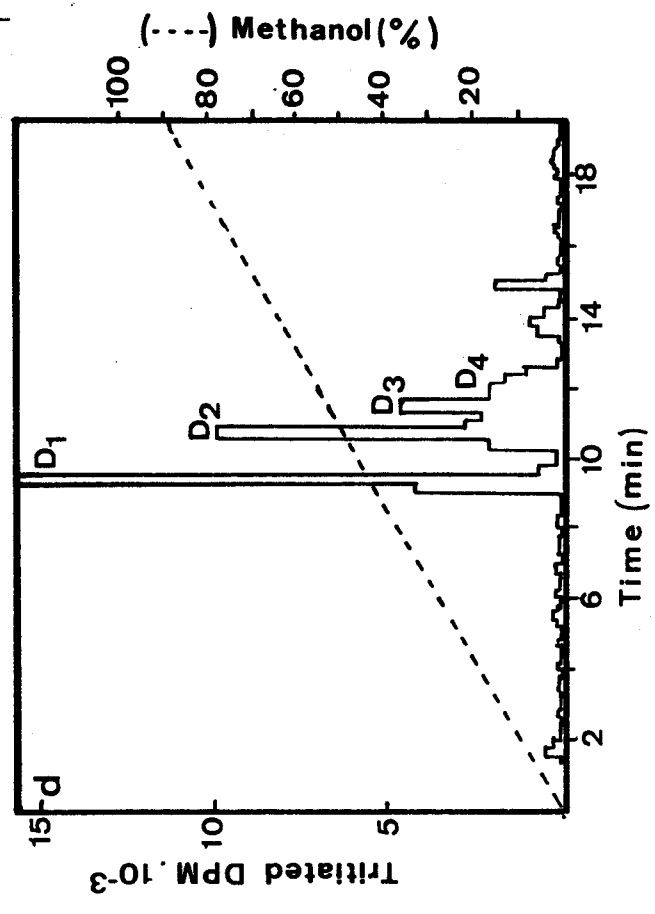
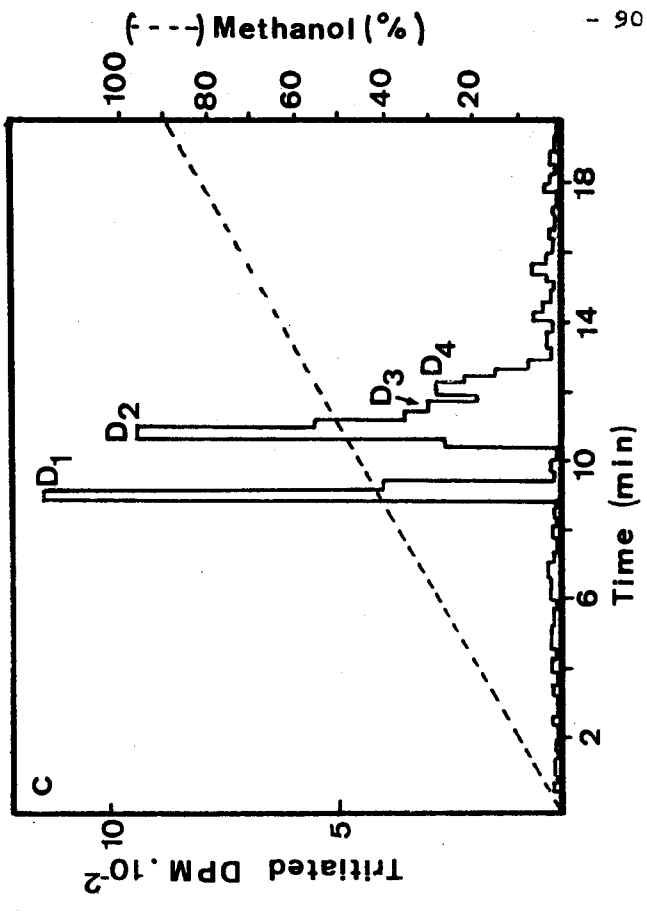
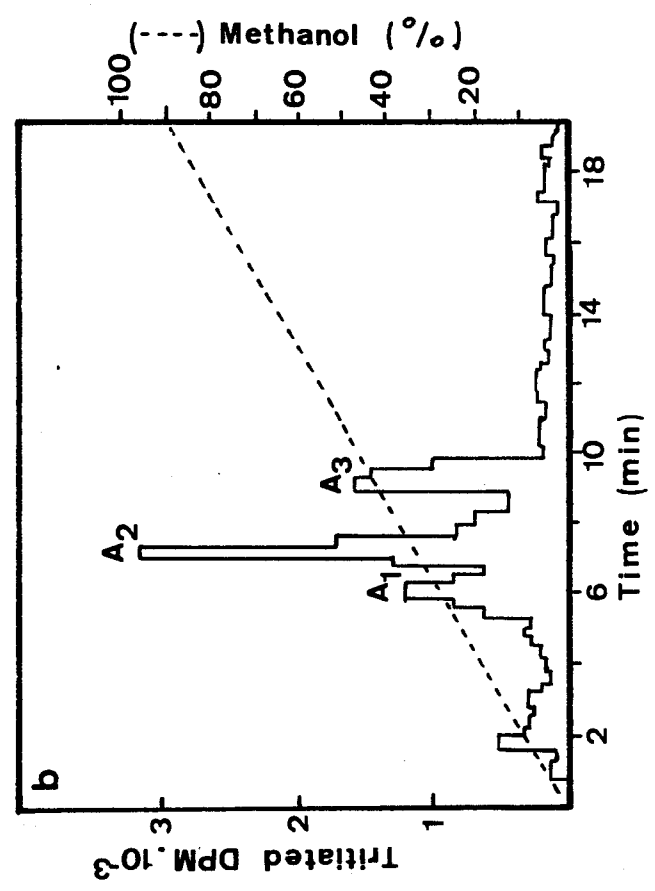
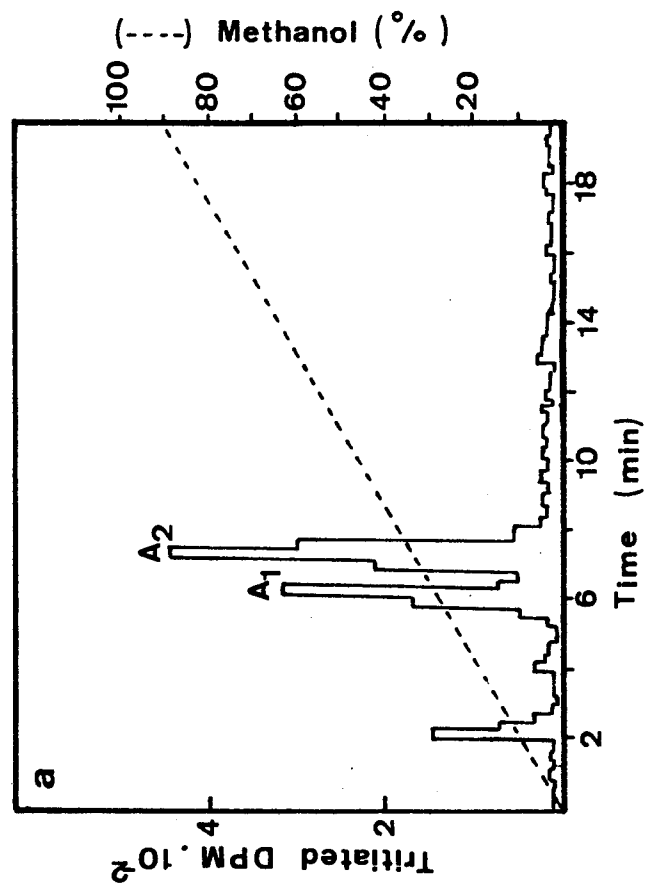
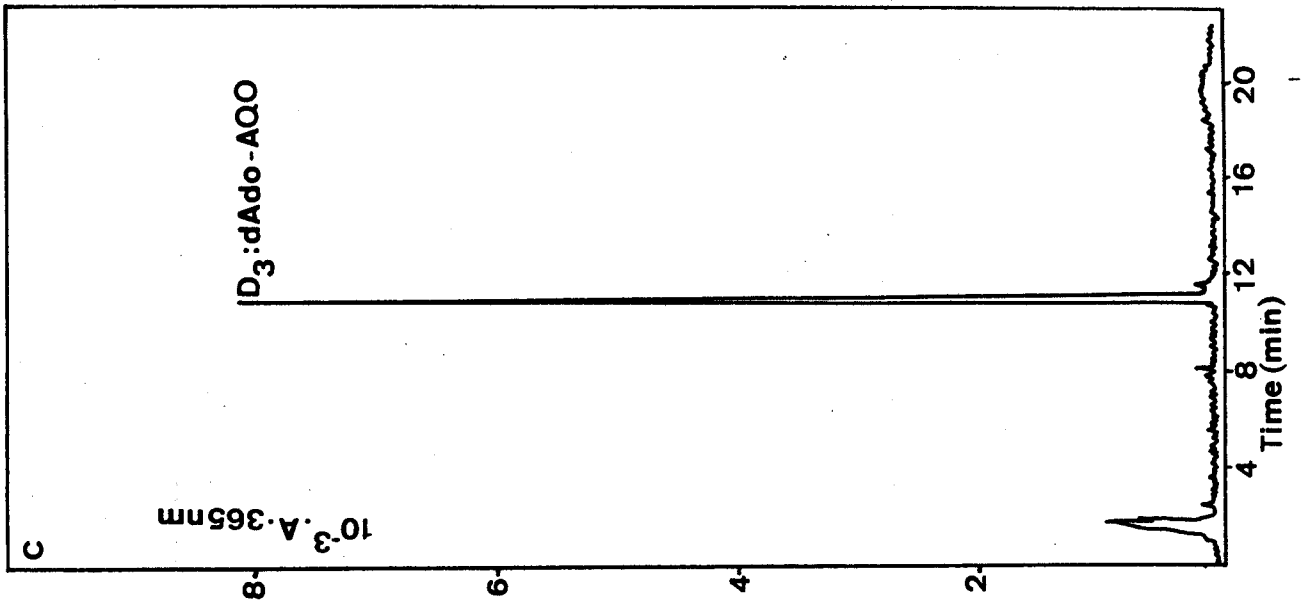
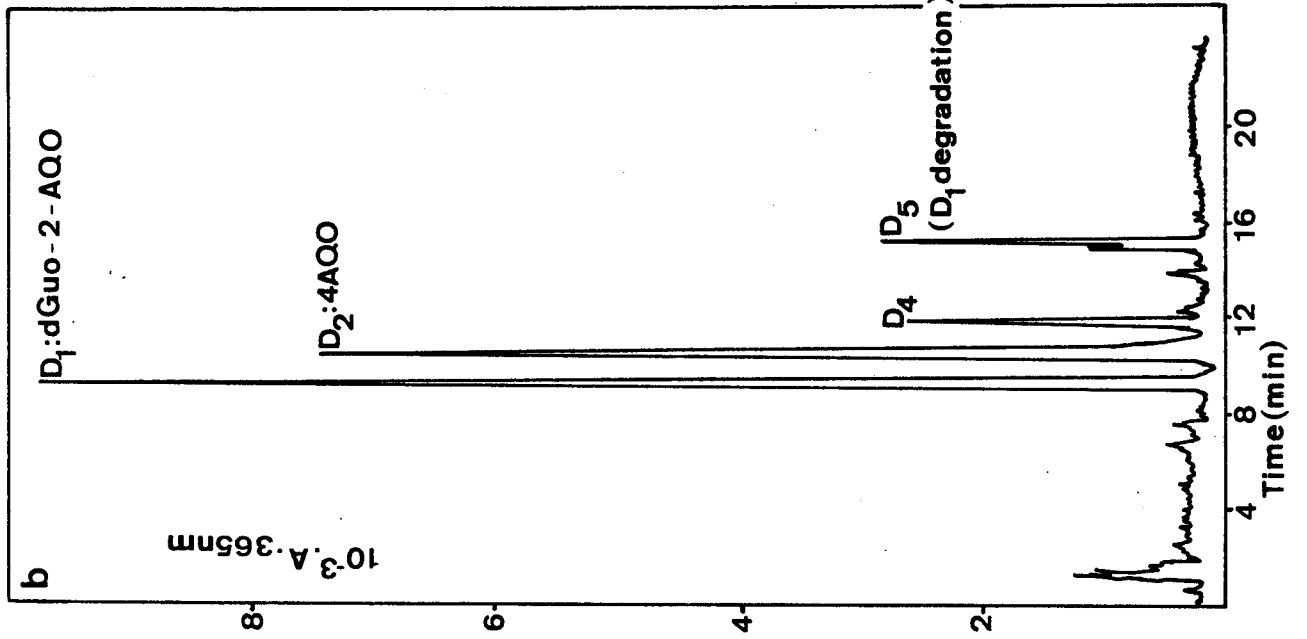
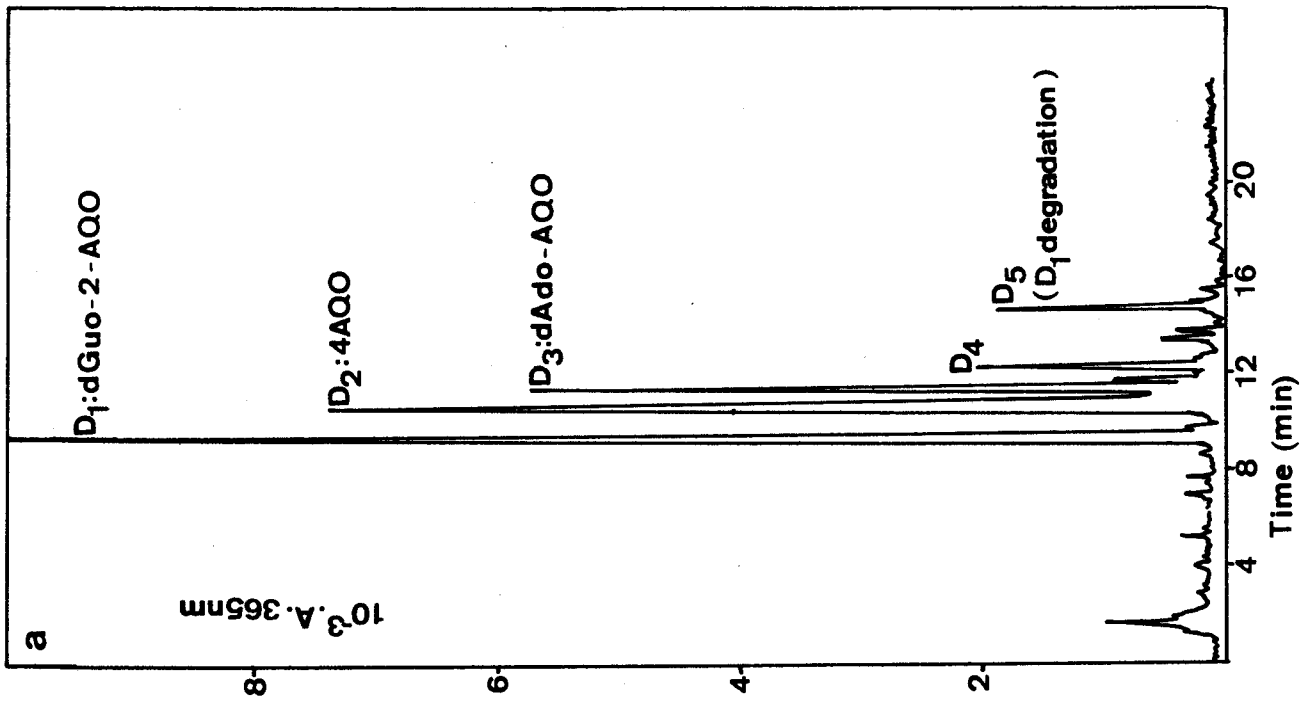


Chart 3. HPLC elution profiles of the P₂ fractions D of hydrolysates of *in vitro* modified-DNA and polynucleotides : absorbance detection at 365 nm. Chromatographies were carried out with linear gradient (during 20 min) from water to 95 % methanol-water. Each peak was characterized by its retention 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.



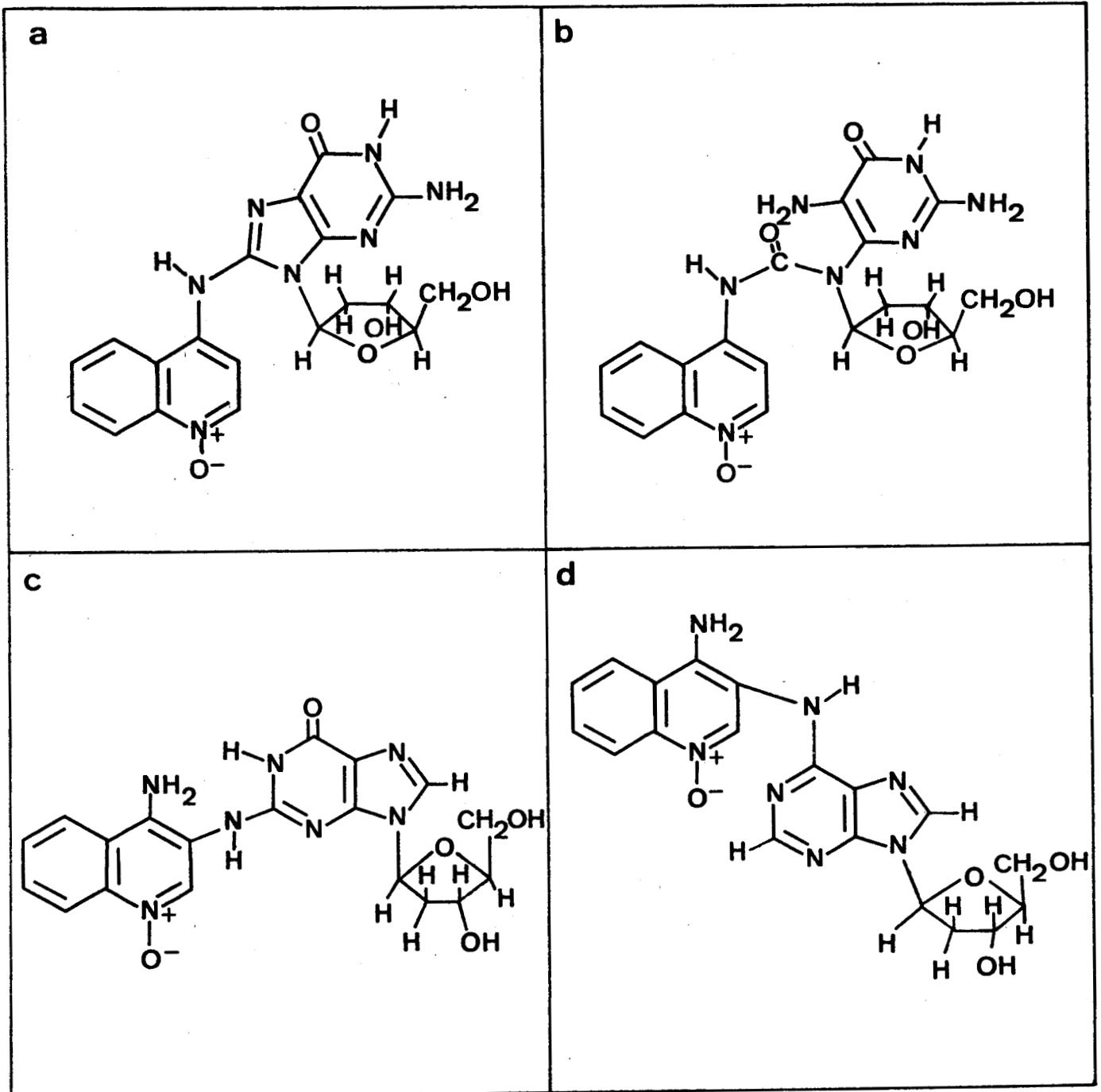


Chart 4. Chemical structures of the main actually known DNA-NQO adducts. a : dGuo-C8-AQO (1), b : r.o. dGuo-C8-AQO (2), c : dGuo-N2-AQO (8), d : dAdo-N6-AQO (8, 11).

Compléments d'information à la publication n° 4 :

Analyse directe en clhp des hydrolysats d'ADN, de poly(dG-dC).poly(dG-dC) et de poly(dA-dT).poly(dA-dT) modifiés par l'Ac-4HAQO.

La figure 3 montre les profils de clhp analytique obtenus à 365 nm, dans le cas de l'ADN natif (A) et dénaturé (B) modifié par le cancérogène ultime. Ils ont été obtenus par injection directe en clhp des hydrolysats totaux, sans préséparation par le biogel P₂ (voir la discussion de la publication n° 4). Ces profils donnent ainsi une illustration du bilan global des adduits retrouvés dans l'hydrolysate d'ADN.

Dans le cas de l'ADN natif, nous retrouvons bien les trois adduits principaux : dGuo-2-AQO qui est majeur, dAdo-AQO et dGuo-C8-AQO, ainsi que le 4AQO. Les composés de dégradation des deux adduits sur la guanine (A₁ et A₂ pour dGuo-C8-AQO et D₅ pour dGuo-2-AQO) sont également observés, en faible quantité. Le composé D₄, présent dans l'hydrolysate de poly(dG-dC).poly(dG-dC) modifié est retrouvé. Dans le cas de l'ADN dénaturé, le pic majeur correspond à l'adduit dGuo-C8-AQO et l'on peut observer, en tête du profil d'éluion (tr ≈ 7 mn) un pic dédoublé qui correspond à A₁ et A₂. L'adduit sur l'adénine est présent, le dGuo-2-AQO également, mais en très faible quantité.

Ainsi, ces deux profils chromatographiques confirment bien que la formation des deux adduits sur la guanine, le dGuo-2-AQO et le dGuo-C8-AQO dépend de la structure secondaire de l'ADN, qui oriente la réaction. Remarquons que pour ces deux adduits les espèces réactives sont différentes : un arylnitronium pour l'adduit en C8 et un carbénium pour le composé de substitution du N².

La figure 4 montre le résultat obtenu dans le cas du poly(dG-dC).poly(dG-dC) (partie B) et du poly(dA-dT).poly(dA-dT) (partie A) modifiés par l'Ac-4HAQO. On constate que dans le cas du poly(dG-dC).poly(dG-dC), on retrouve bien les deux adduits majeurs formés sur la guanine : dGuo-2-AQO et dGuo-C8-AQO. On retrouve également leurs produits de dégradation (D₅, A₁ et A₂) ainsi que le 4AQO. Le composé D₄, qui est présent sur l'ADN, est également retrouvé ; nous ne possédons aucune information sur lui.

Dans le cas du poly(dA-dT).poly(dA-dT), on retrouve deux composés, dont l'adduit dAdo-AQO. L'autre produit, que nous appelons x, est instable. Nous avons observé que, dans certaines conditions, il se transforme

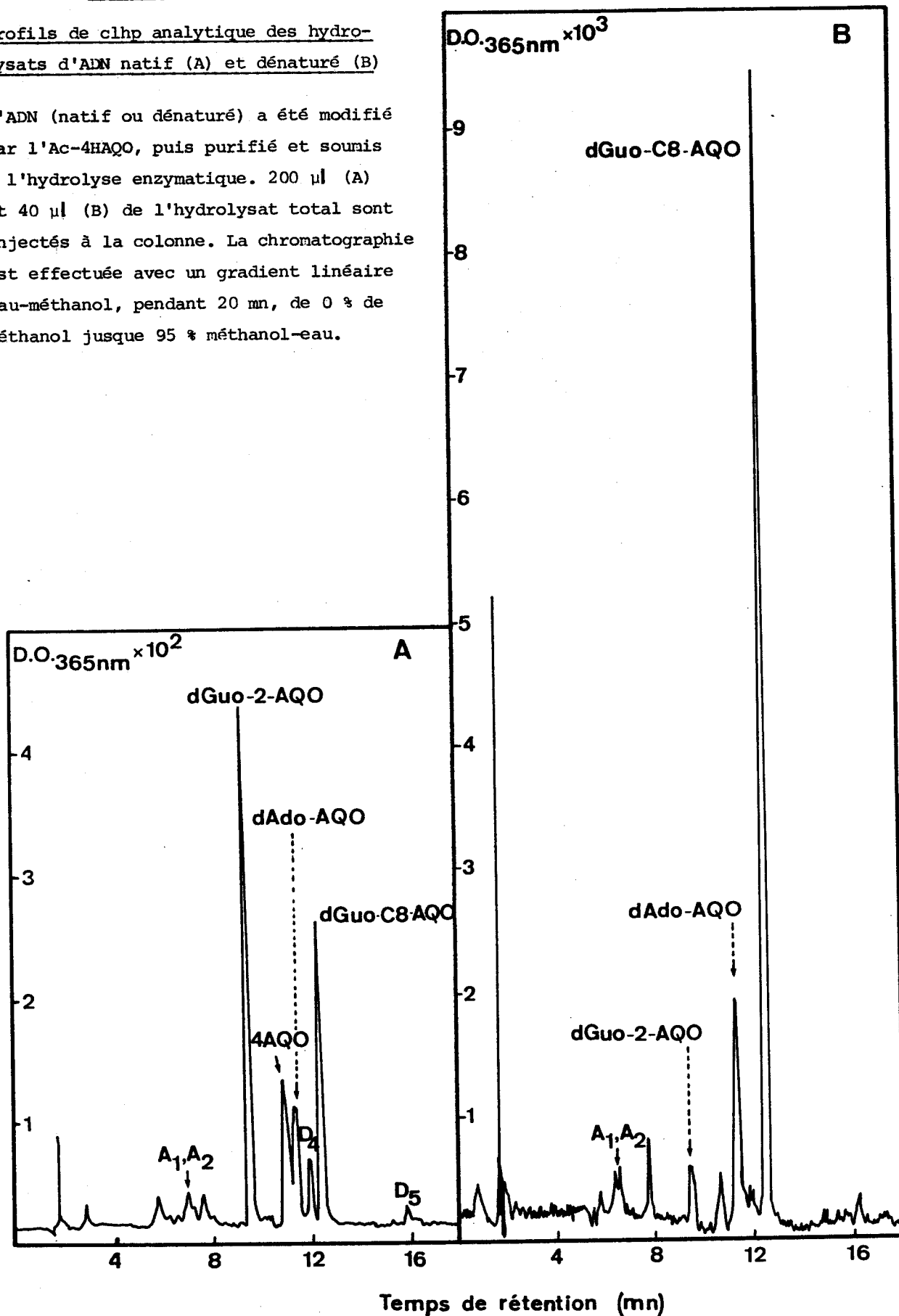
en dAdo-AQO, en particulier lorsqu'il est incubé à 37°C dans les conditions de l'hydrolyse enzymatique. De plus, si on laisse la solution d'hydrolysate de poly(dA-dT).poly(dA-dT) quelque temps à température ambiante, le profil clhp alors obtenu indique une diminution du pic x en faveur du pic de l'ad-duit adénine connu. Il semble qu'un pic mineur, observé à $t_r \approx 8$ mn dans les hydrolysats d'ADN pourrait correspondre à ce composé x.

On observe aussi à partir de ces profils chromatographiques que le 4AQO n'est retrouvé que dans les hydrolysats d'ADN et de poly(dG-dC).poly(dG-dC). Ce résultat est à rapprocher de celui précédemment publié par les auteurs Japonais (TADA et al., 1971 ; 1976) qui mentionnent l'existence de trois adduits sur la guanine, l'un étant instable et se dégradant avec formation de 4AQO.

Figure 3

Profils de clhp analytique des hydrolysats d'ADN natif (A) et dénaturé (B)

L'ADN (natif ou dénaturé) a été modifié par l'Ac-4HAQO, puis purifié et soumis à l'hydrolyse enzymatique. 200 μ l (A) et 40 μ l (B) de l'hydrolysats total sont injectés à la colonne. La chromatographie est effectuée avec un gradient linéaire eau-méthanol, pendant 20 mn, de 0 % de méthanol jusque 95 % méthanol-eau.



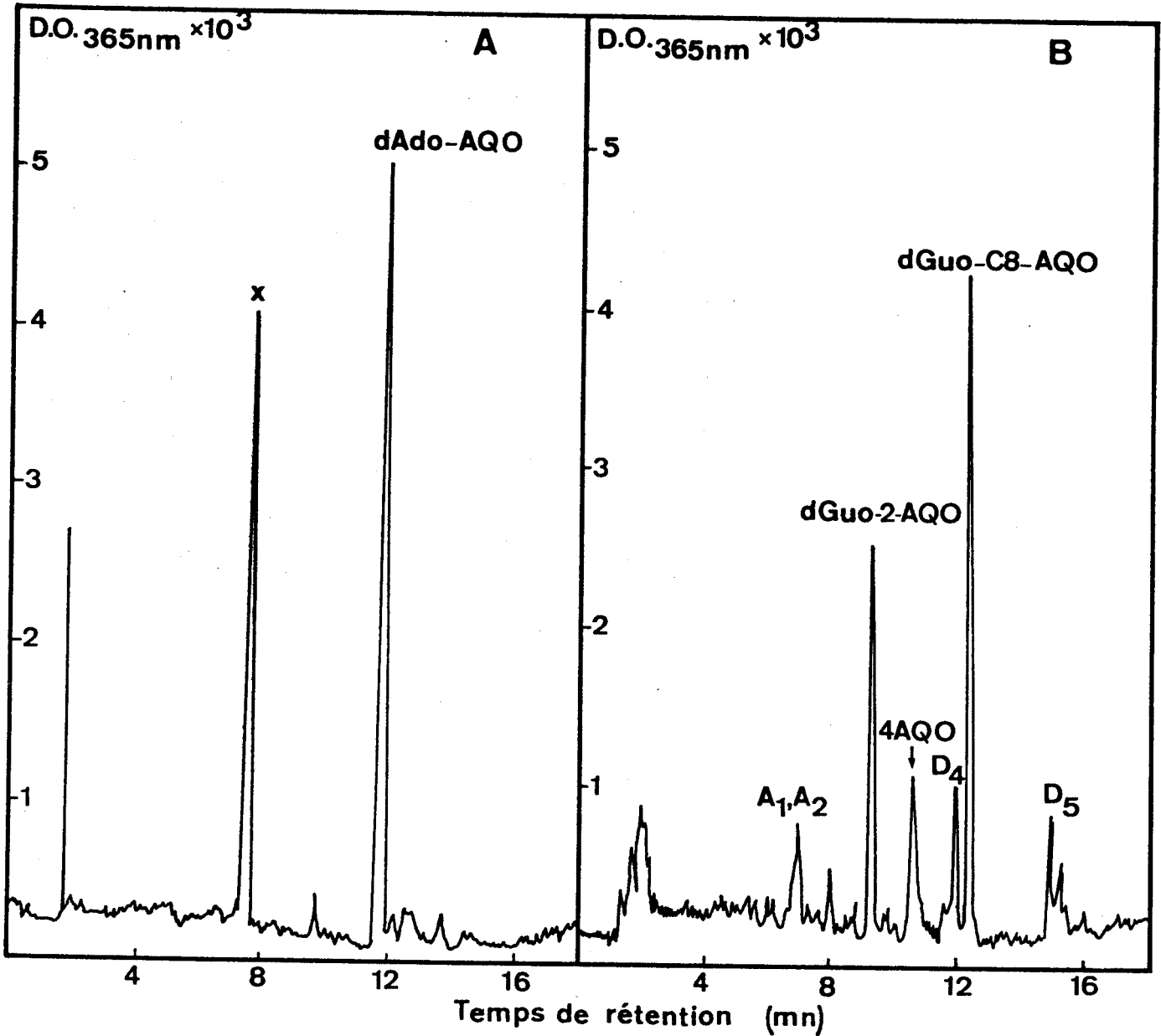


Figure 4

Profils de clhp analytique des hydrolysats de poly(dA-dT).poly(dA-dT) (A) et de poly(dG-dC).poly(dG-dC) (B) modifiés par l'Ac-4HAQO.

Les polymères modifiés ont été soumis à l'hydrolyse enzymatique et 40 µl de l'hydrolysat total sont injectés à la colonne. La chromatographie est effectuée de la même manière que pour l'hydrolysat d'ADN (figure 3).

d) Conclusion

L'étude des modèles acétylés du 4HAQO a été abordée au laboratoire par des approches différentes. Un objectif était 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 la 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° 5, page 101) :

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 (voir publication n° 3). 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° 6, p.100) :

"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° 4). 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° 7, p.120) :

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

[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 Gallègue, 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*⁷-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.

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 µl 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 µmol/ml. Reaction was obtained in the case of diAc-4-HAQO by addition of 1.8 mg of diAc-4-HAQO dissolved in 200 µl 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 µl 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-µBondapak 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 µg were dissolved in 100 µl 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 (≈2 mg/ml) in 5 mM Tris-HCl; 5 mM MgCl₂; 2 mM CaCl₂ buffer, pH 7.4. The sample was incubated with 150 µg of bovine pancreatic DNase I (Boehringer-Mannheim, specific activity, 1000 units/mg) and 150 µg 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 µg 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 an unique compound containing one of

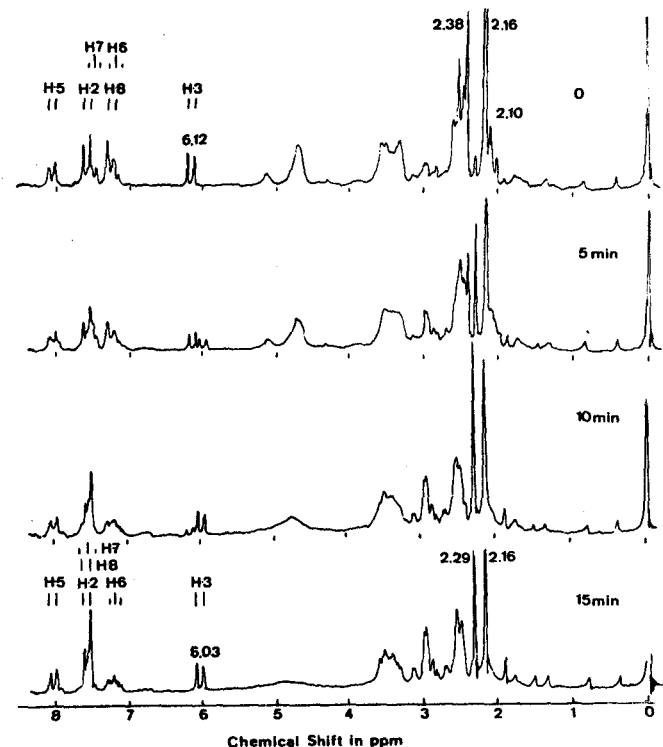


Chart 1. Proton NMR spectra of Ac-4-HAQO formation. DiAc-4-HAQO (30 mg) and DTT (21 mg) (HS-CH₂-CHOH-CHOH-CH₂-SH) were dissolved in 0.3 ml of DMSO-d₆. Chemical shifts are relative to tetramethylsilane, internal standard.

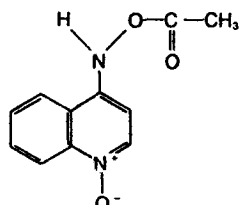
Adduct between Ultimate Carcinogen of 4-NQO and Guanine

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.

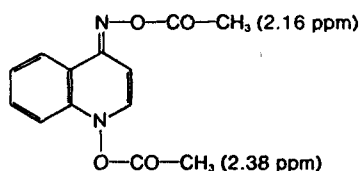
Indeed, these high-field resonances correspond to one acetoxy function at 2.16 ppm superimposed with the DTT sulfhydryl resonances at 2.10 ppm. The integrated value of the sulfhydryl peak at 2.10 ppm decreases with time, and a new band appears at 2.29 ppm due to the initiation of a thioacetyl function (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 denaturated 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.

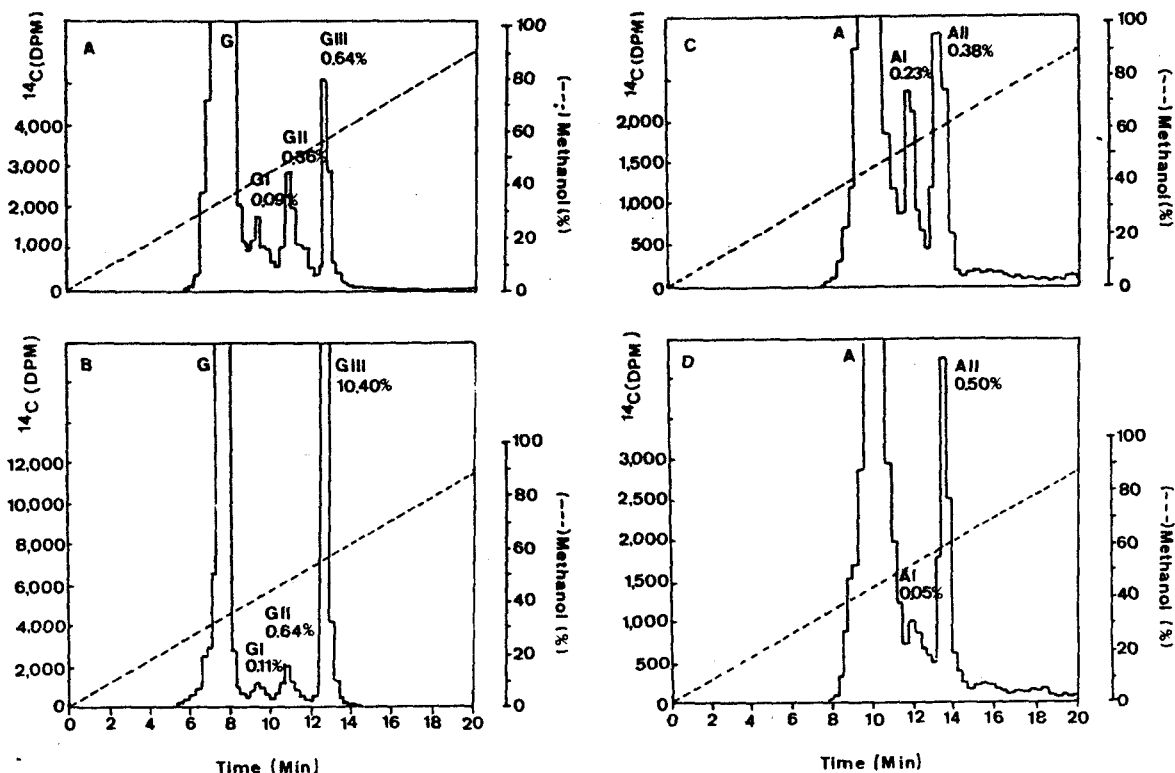


Chart 2. Reactions of diAc-4-HAQO and Ac-4-HAQO with guanosine and adenosine. Chromatographies with linear gradient (during 20 min) from water to 95% methanol:water were made by collection of aliquots (500 μ l) and ¹⁴C radioactivity measurements. A, guanosine plus diAc-4-HAQO; B, guanosine plus Ac-4-HAQO;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

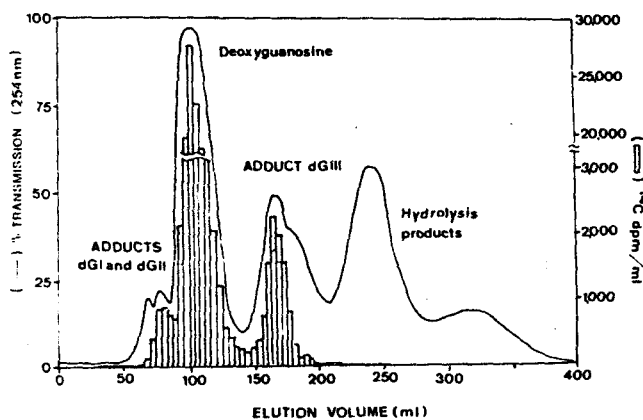


Chart 3. Elution profile from a Sephadex LH 20 column of the reaction Ac-4-HAQO-[U-¹⁴C]deoxyguanosine. The fraction which is eluted after deoxyguanosine was identified as dG III. This fraction contained 9 to 10% of the ¹⁴C applied to the Sephadex column.

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 [8-³H]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 (N⁴-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

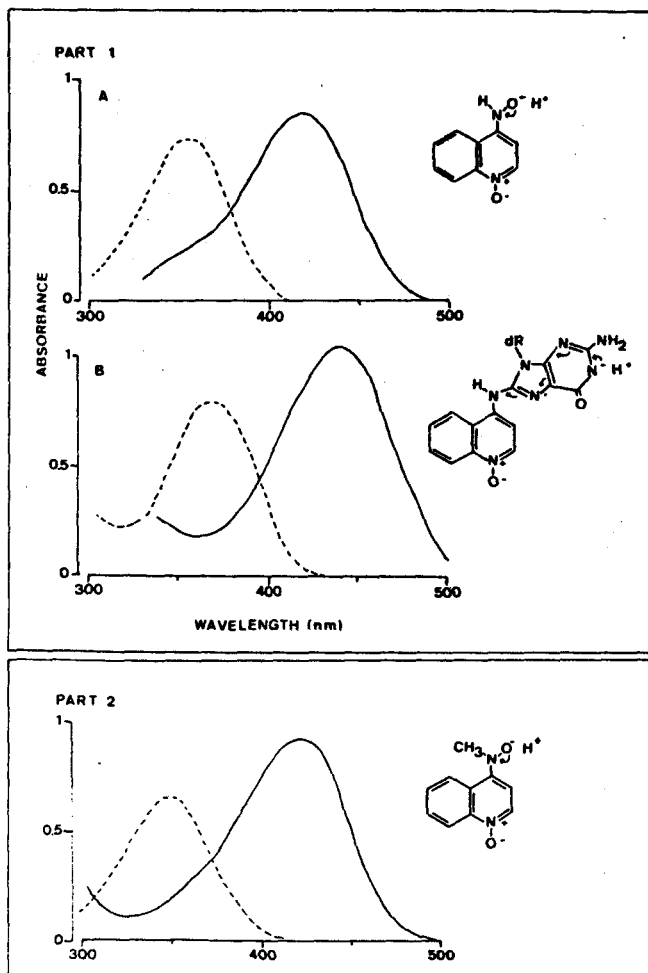


Chart 4. Part 1, UV spectra of 4-HAQO (A) and dG III adduct (B) in near neutral (---, 2 mM sodium citrate, pH 7) and alkaline (—, 1 N NaOH) media. The concentrations of 4-HAQO and dG III adduct are, respectively, 20 and 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Part 2, UV spectra of 4-Me-HAQO given by Kawazoe *et al.* (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^6 atoms of guanine residues.

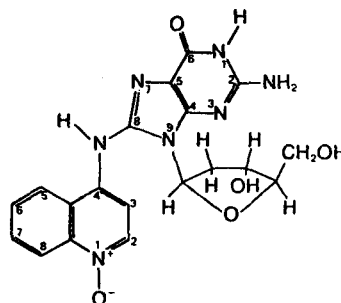
A comparative analysis of the 90-MHz proton NMR spectra of dG III, diAc-4-HAQO, and deoxyguanosine was carried out. The spectrum of dG III was recorded in DMSO- d_6 without and with DCI. Indeed, in DMSO, the quinoline-ring protons appeared as broad resonances which became sharper when DCI was added. 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

B. Bailleul et al.

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.

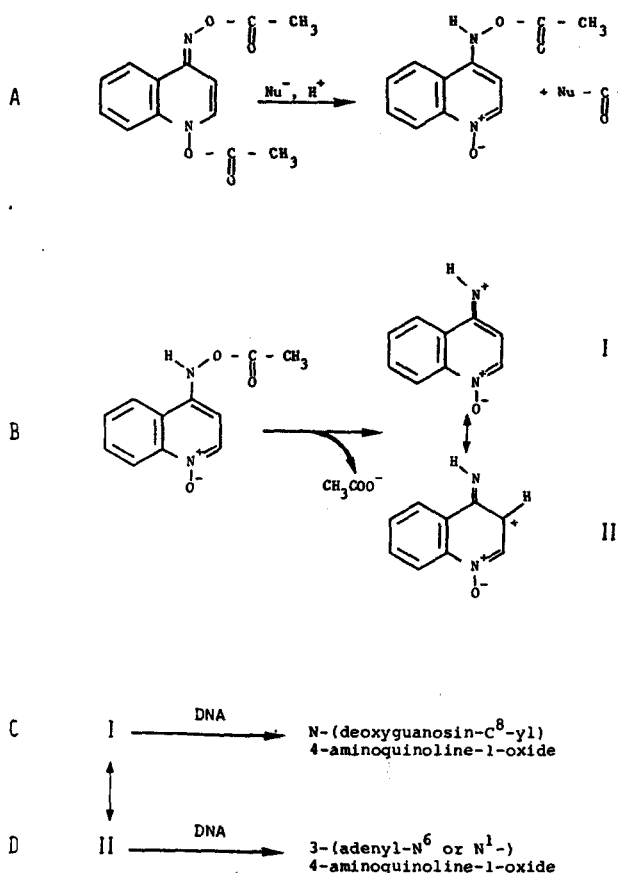


Chart 5. Reaction of diAc-4-HAQO and Ac-4-HAQO with DNA. Hypothetical mechanisms. C and D represent one of possible adduct formations from I and II.

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

Furthermore, we showed that one O-ester function of di-Ac-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 C⁸ 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 ¹⁴C 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. Gallègue, 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. Gallègue, 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, 1976.
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.

PUBLICATION n° 6

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

Bernard BAILLEUL^{*}, Sylvie GALIEGUE-ZOUITINA^{*}, 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 mn) 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.

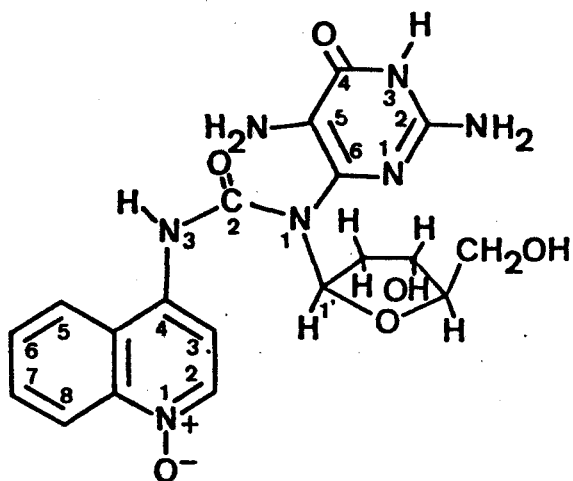
Guo-C8-AQO showed one less sites for silylation and a molecular weight less 18 (5). These data suggested a purine ring-opened derivative obtained by water hydrolysis giving a new potential site of silylation. The i.r. spectra of dGuo-C8-AQO and r.o. dGuo-C8-AQO were compared. The ring opened derivative 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'-deoxyribose)-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 microsome-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.

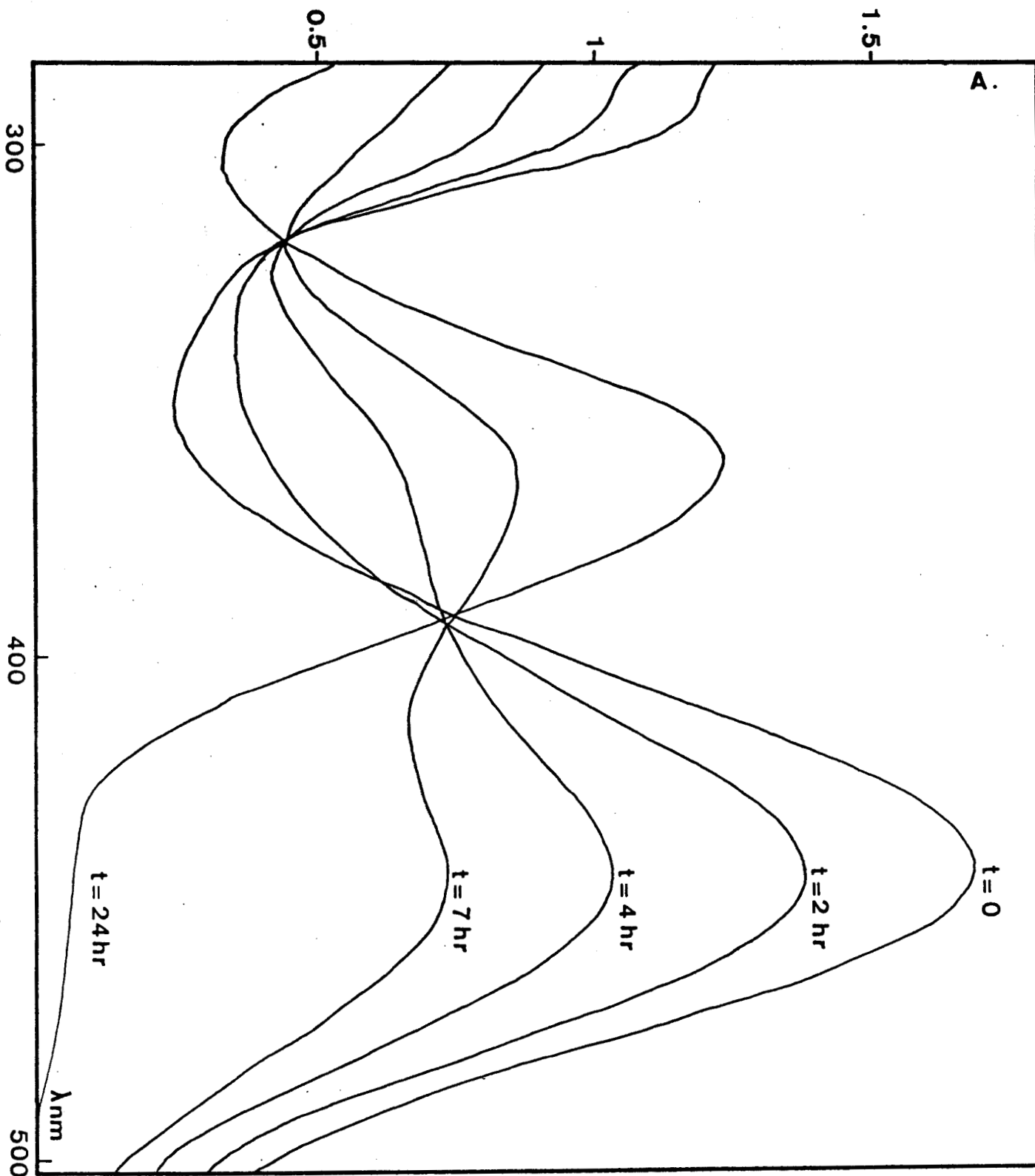


Figure 1. Evolution of ultraviolet absorption spectra of dGuo-C8-AQO during alkaline treatment at 37° in NaOH 0.1 M.

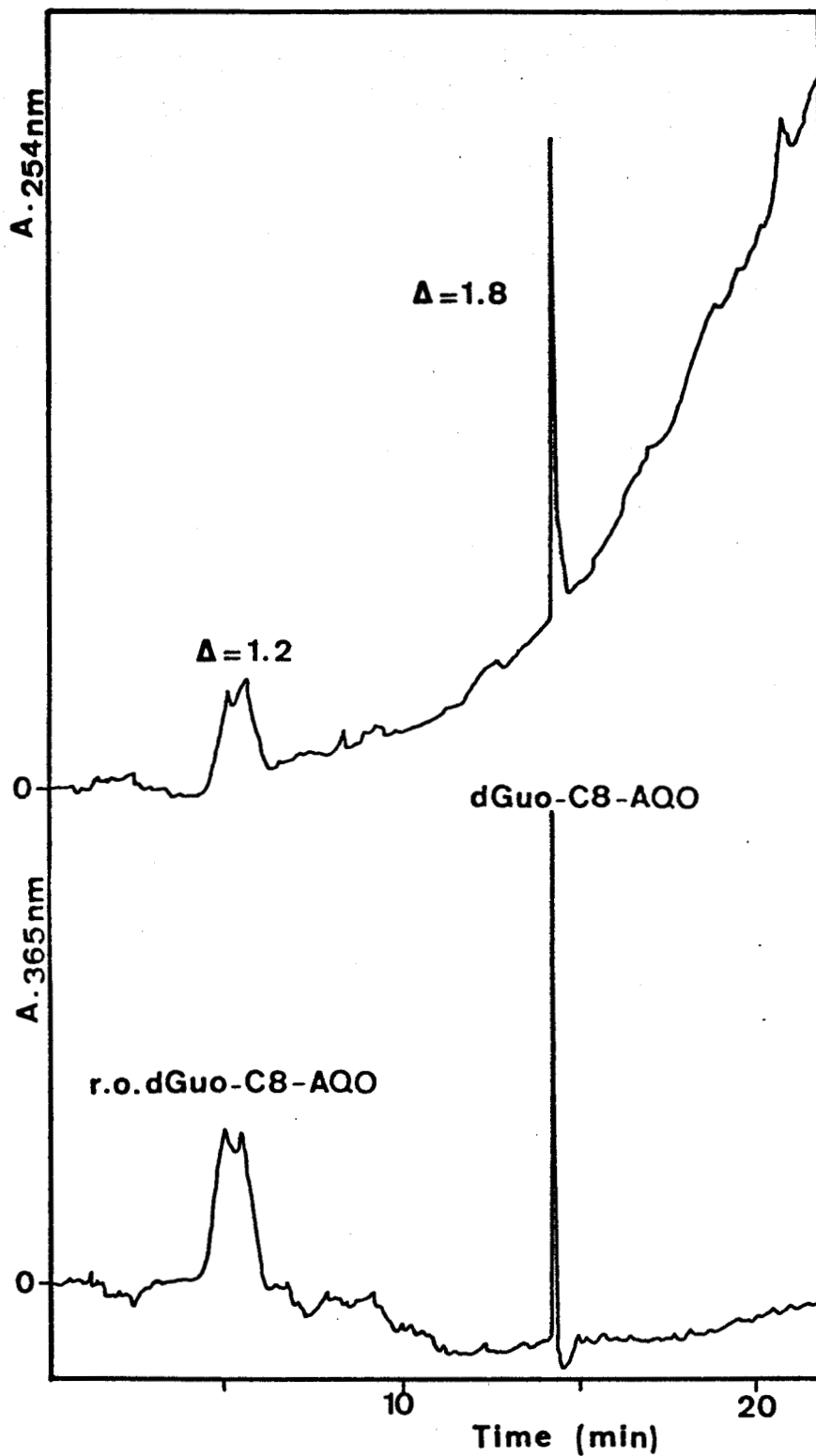
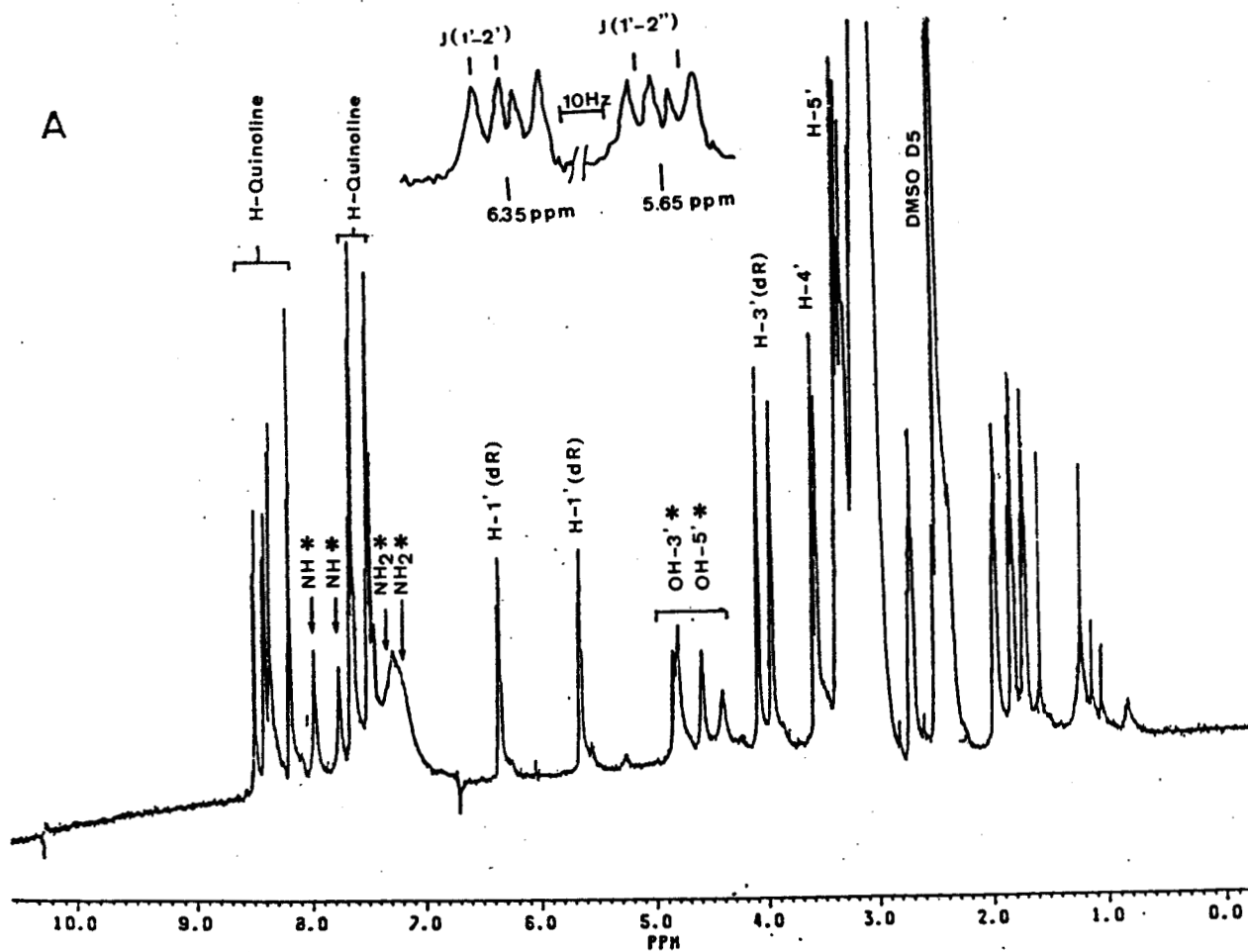
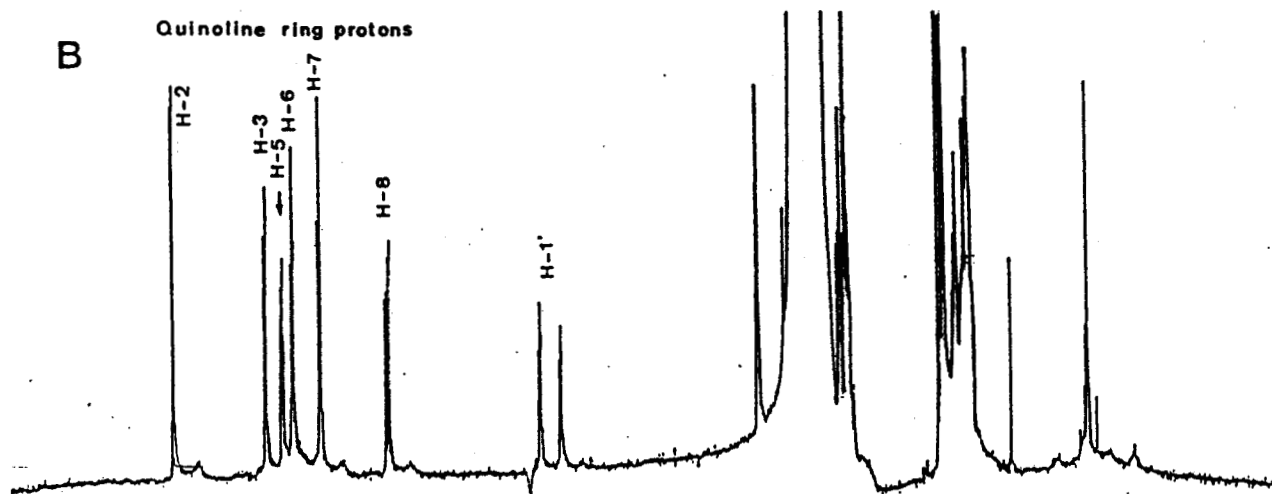
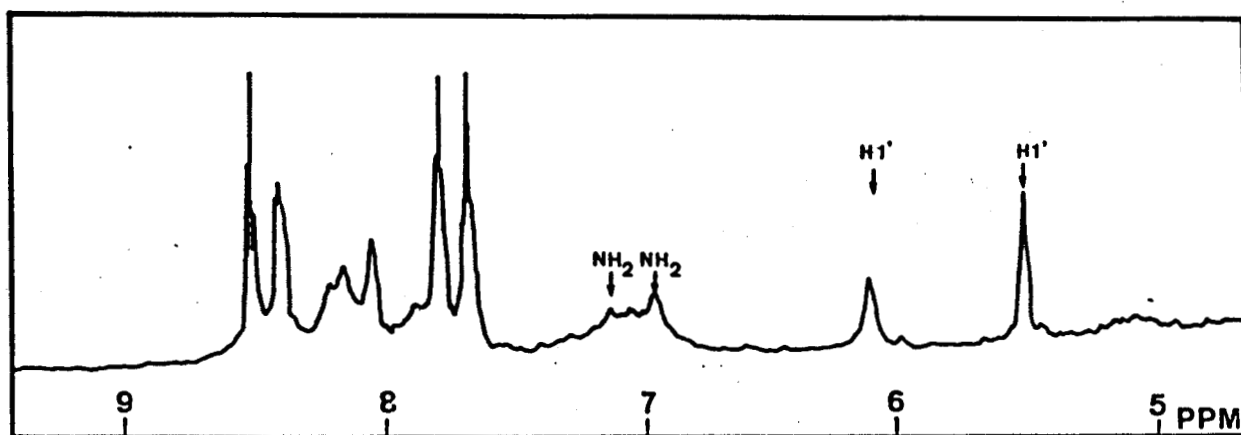


Figure 2. h.p.l.c. chromatographic profile of C8-deoxyguanosyl adduct after treatment at 37° in NaOH 0.1 M during 4 hours. Two derivatives are present in the peak with a retention time of about 5.2 minutes.

Figure 3. Proton-n.m.r. spectra of r.o. dGuo-C8-AQO at 60°. A. in DMSO-d₆. B. in DMSO-d₆ + DCl. Insert : the spectra were recorded at 25° in DMSO-d₆. In the spectrum of r.o. dGuo-C8-AQO (A) the signals * disappear after exchange in D₂O, and in the small insert the signals of the two H-1'.



PUBLICATION n° 7

N²-guanyl and N⁶-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-acetoxyminoquinoline 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^r Michel 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 μ g of dGuo-2-AQO and about 250 μ g 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 partitioning 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. accumulation 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

I) 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 assigne 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 partitionning 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 $^{\text{C}}\text{C-2}$ 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 dAdo-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 NMR 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-*d*₆. 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 ^aC³-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).

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.

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 or 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 spectro-photometric 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. 0,0'-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-hydroxyaminoquinoline 1-oxide-modified DNA Template. *Cancer Res.*, 44 : 1867-1870, 1984.

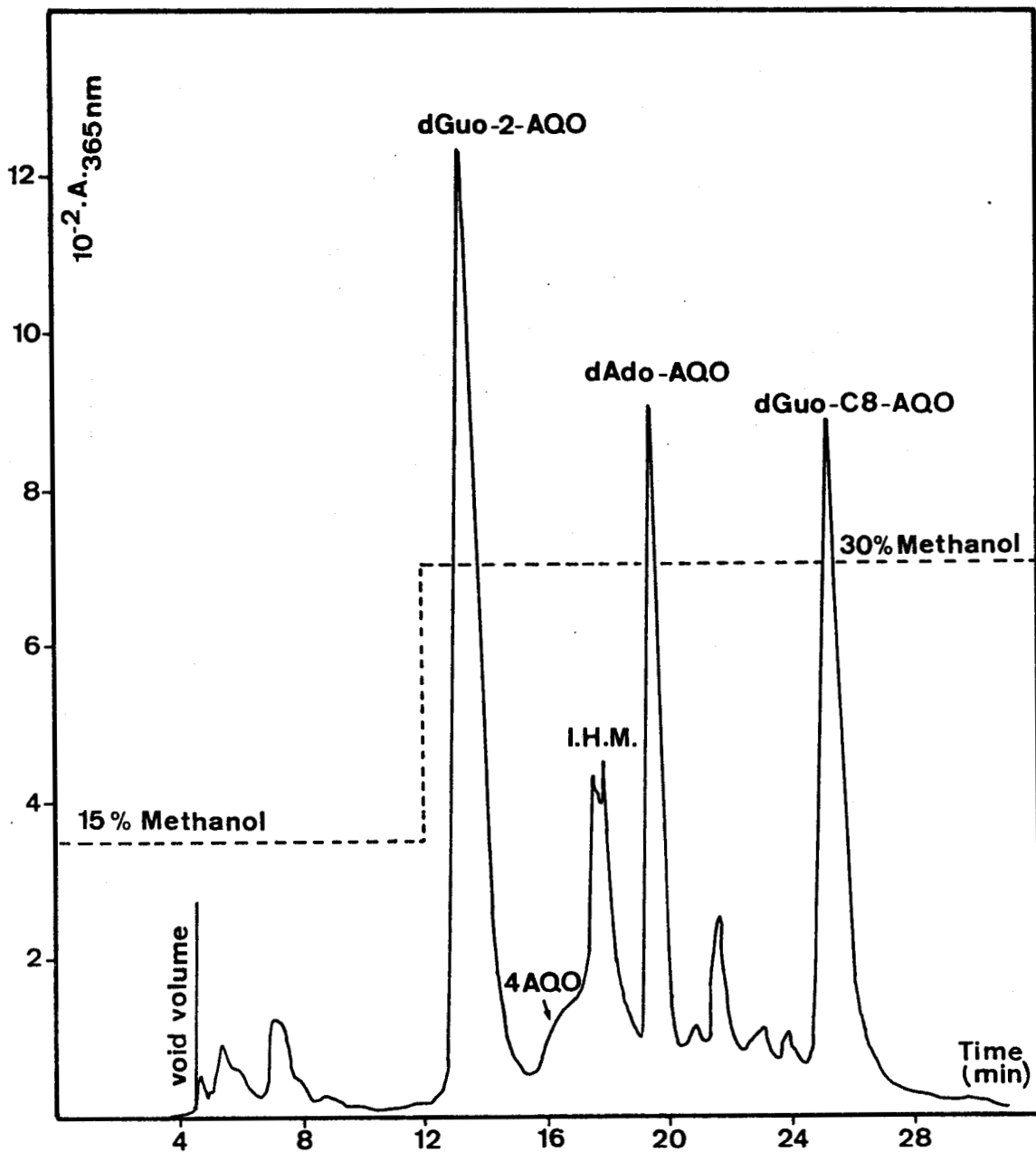


Chart 1 : Semi-preparative HPLC elution profile of 3 mg of hydrolyzed-modified DNA - Absorbance detection at 365 nm. Chromatographies were carried out with an unlinear gradient during 12 min from a phosphate/EDTA buffer (1.5 mM NaH₂ PO₄, 0.4 mM EDTA, pH6) to 30 % methanol in the buffer, during 20 min. 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.

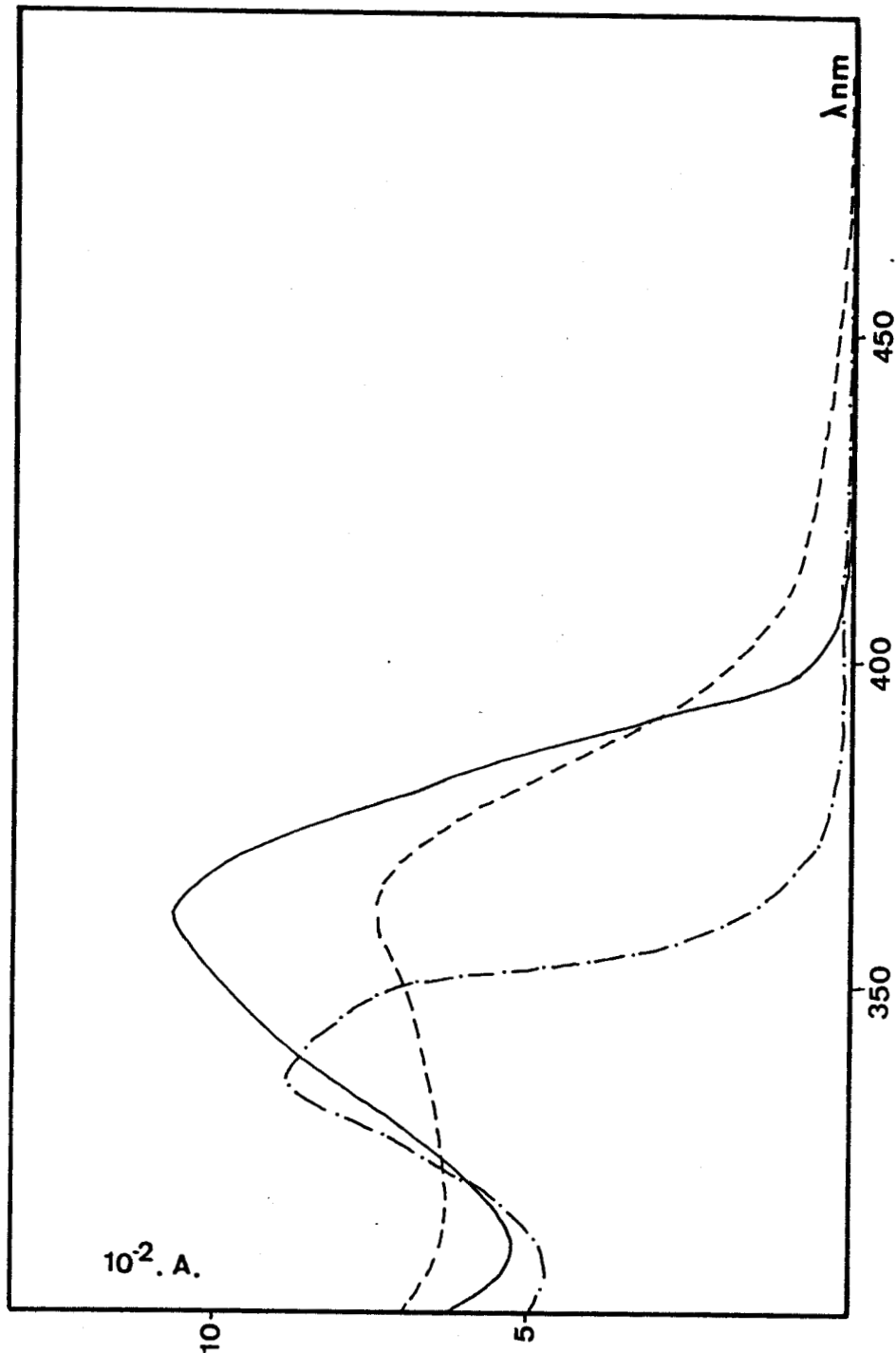


Chart 2 : UV spectra of dGuo-N2-AQO adduct in 2mM sodium citrate buffer (pH 7.3 ; —) or 0.1 N H Cl (pH 1.5 ; -.-) or 0.1 N NaOH (pH 12.3 ; ---).

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

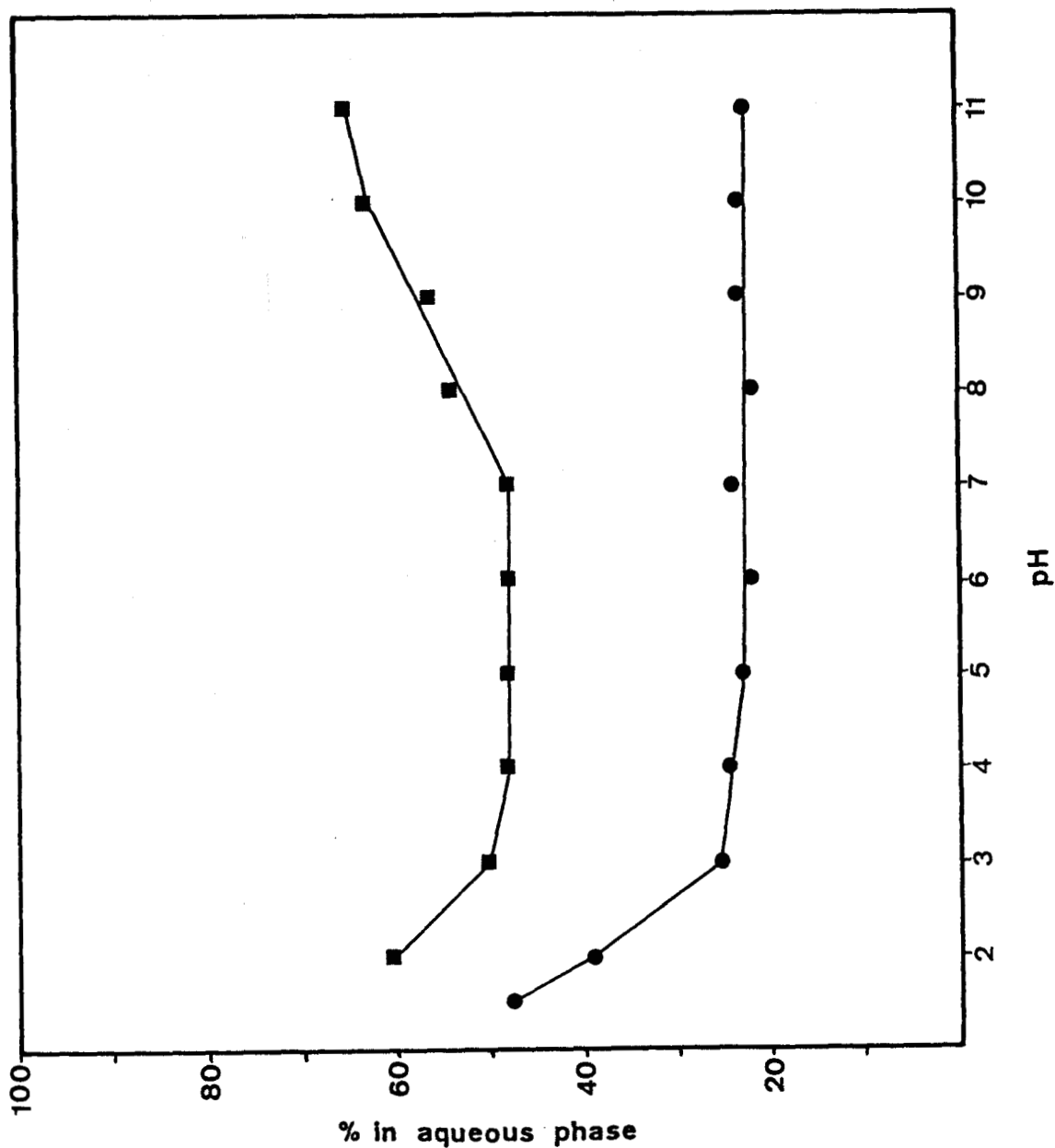


Chart 3 : Partition of tritiated dGuo-2-AQO (■) and tritiated dAdo-AQO (●) between aqueous buffers, pH 1-14 (24) and n-butanol. The percentage of each adduct in aqueous phase was determined by counting 100 μ l aliquots of the tritiated solutions.

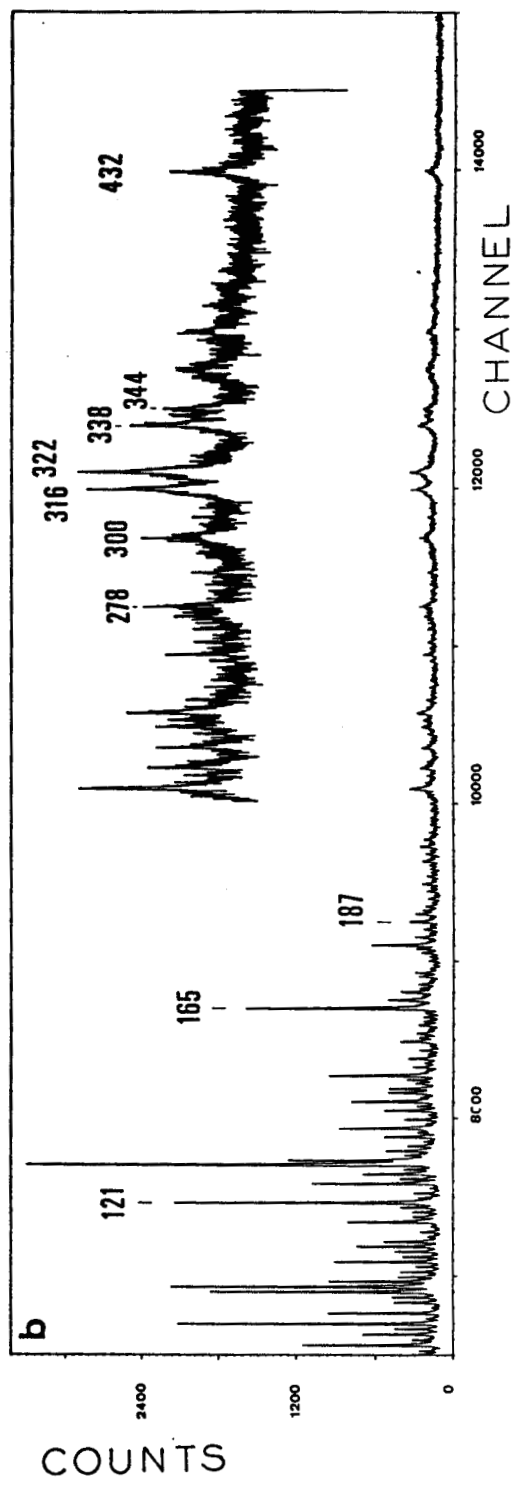
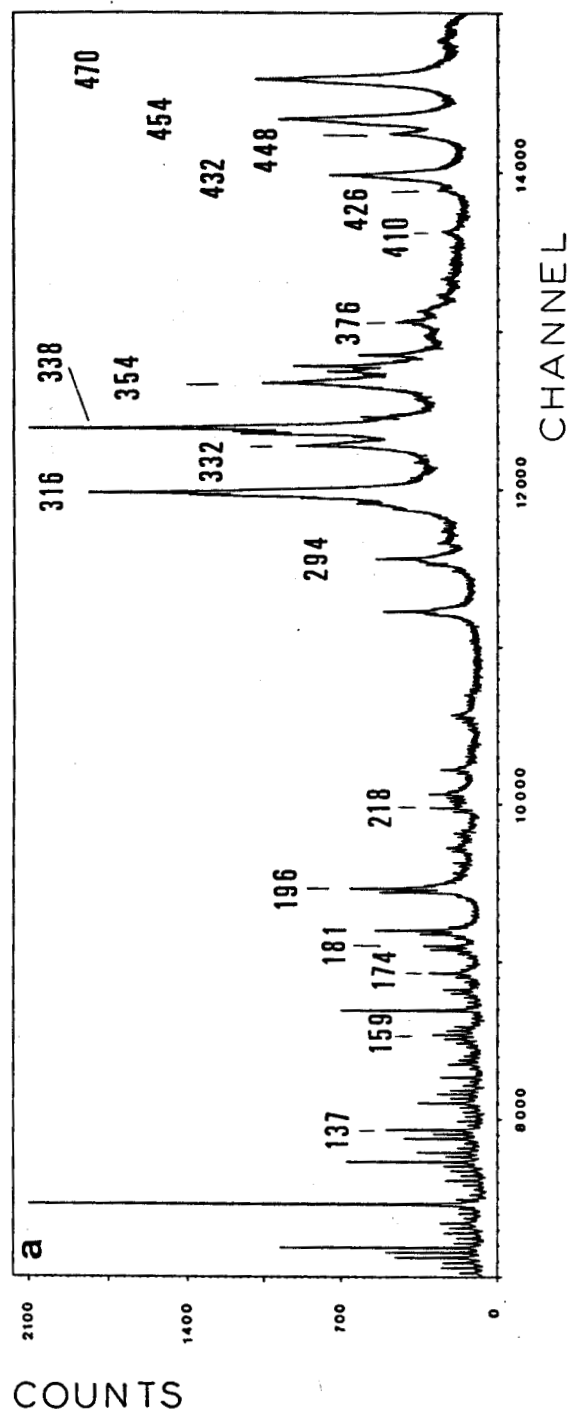


Chart 4 : 252-Cf time of flight mass spectra in the positive ionization mode of (a) dGuo-2-AQO, (b) dAdo-AQO. In the upper part of this spectrum, the scale is 6 times higher. The presence of each adduct is evidenced by observation of molecular ions and characteristic fragment ions (see Table I).

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.

Chart 5 : 500 MHz NMR spectra of dGuo-2-AQO (part a) and dAdo-AQO (part b) in DMSO - d₆. 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.

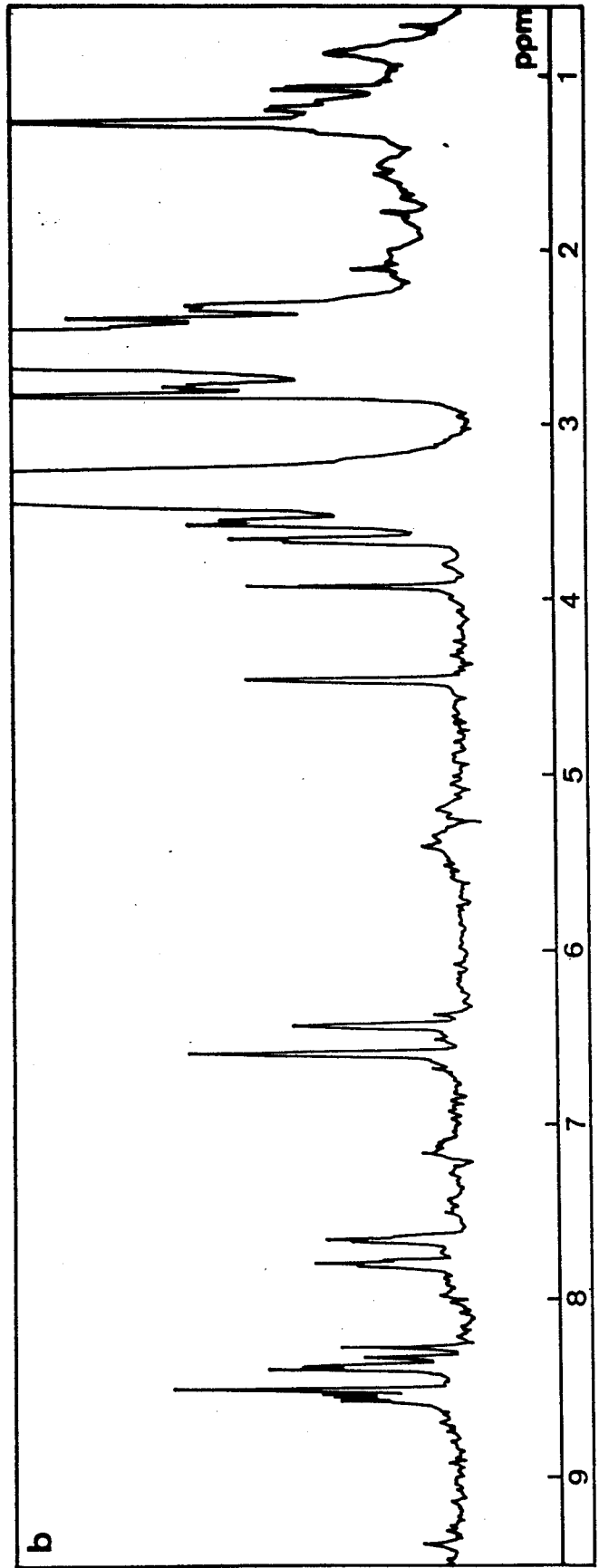
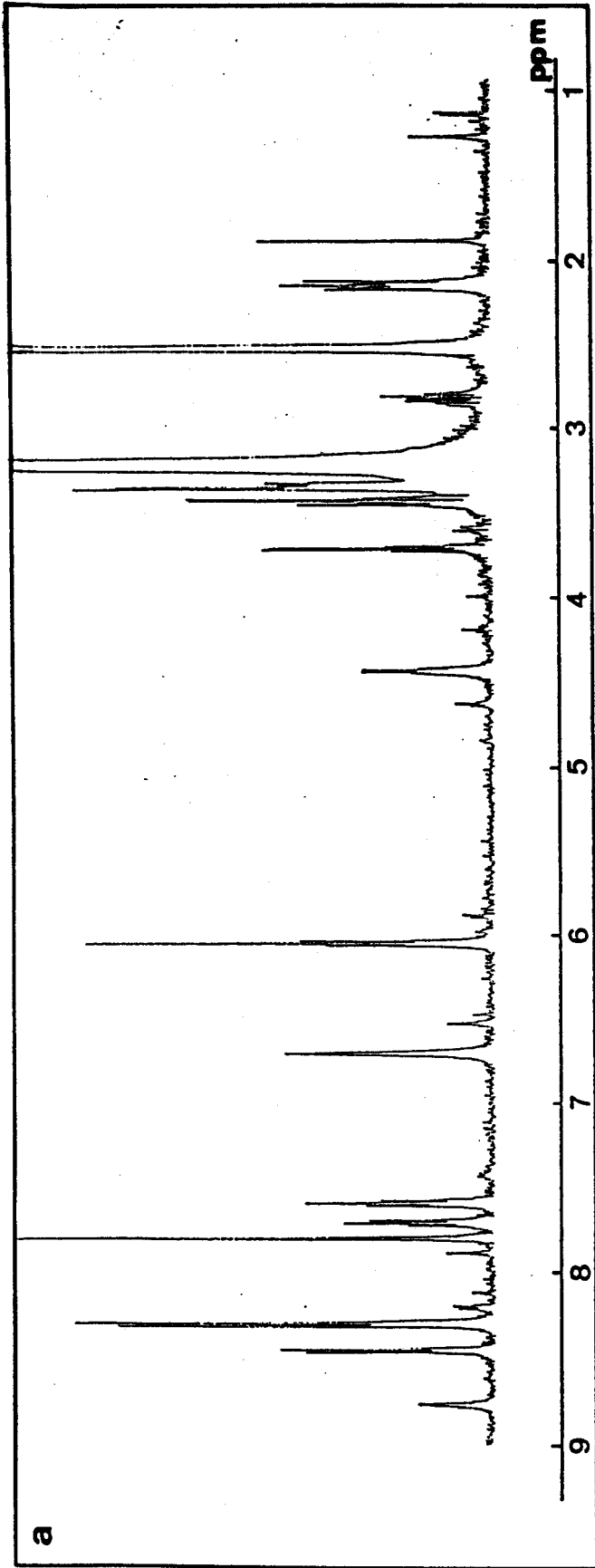
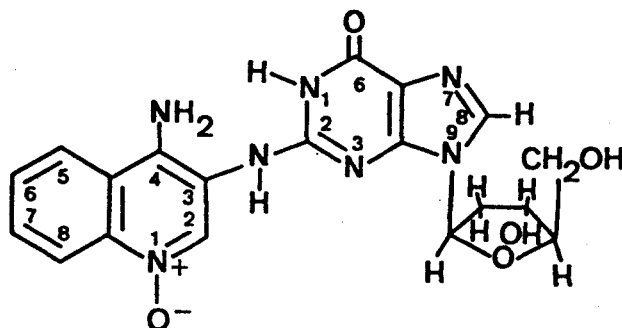


Table II. NMR study of dGuo-N²-AQO.



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).

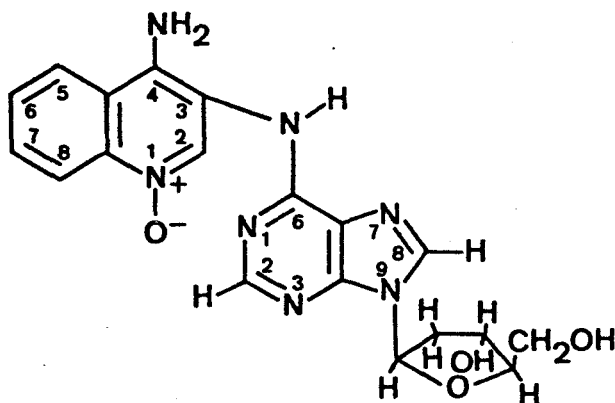
(c) The intensity of this band is about two fold that this expected for one proton (see for example the Q-C8H resonance at 8.49 ppm). This signal is in fact an overlapping of the resonances of two protons, and we observed that one of them was exchangeable. We think it is the guanyl N² proton since the 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.

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 (voir publication n° 1). 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 dosé 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 5, A). Cette propriété peut être observée sur les polymères modifiés par l'Ac-4HAQO, comme le montre la figure 5. 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° 8 (p.156) :

"Guanyl-C⁸-arylamination 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° 8). 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 dans 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 6.

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 mn 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 7 montre le profil clhp de cet hydrolysate 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.

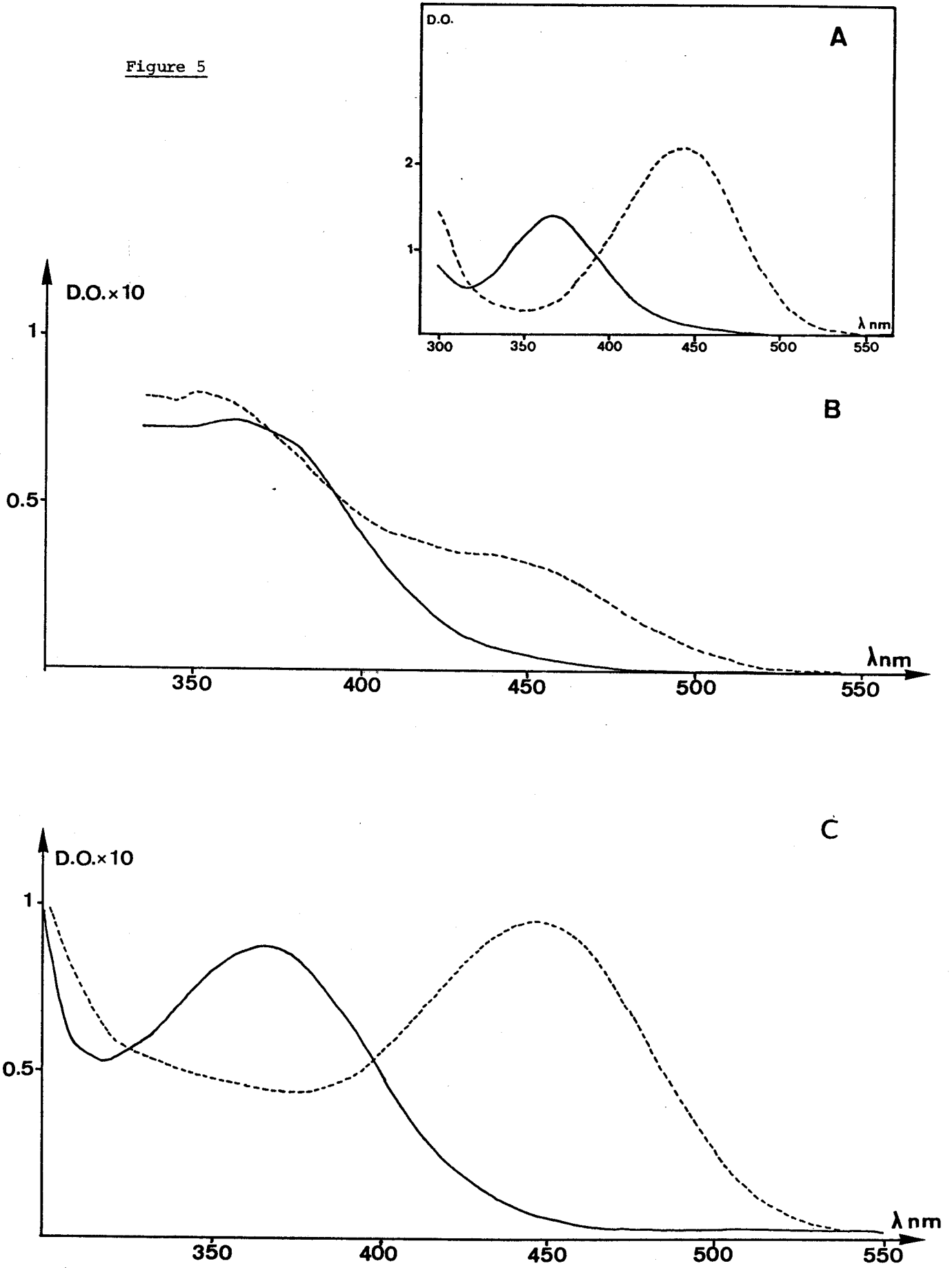
Lorsque la réaction de l'Ac-4HAQO avec l'ADN natif est faite *in vitro* dans d'autres conditions de pH ou de température, les trois adduits sont obtenus suivant des rapports sensiblement différents. Par exemple à pH 9,7 et à 4°C, la réaction se fait préférentiellement sur le N² de la guanine (80 %).

Figure 5 - Spectres d'absorption de dGuo-C8-AQO (A) et des ADN natif (B) et dénaturé (C) modifiés par l'Ac-4HAQO, dans la zone d'absorption du cancérogène.

— Spectre en tampon citrate $2 \cdot 10^{-3}$ M, pH 7,0

---- Spectre dans NaOH 0,5 M, pH 12,6.

Figure 5



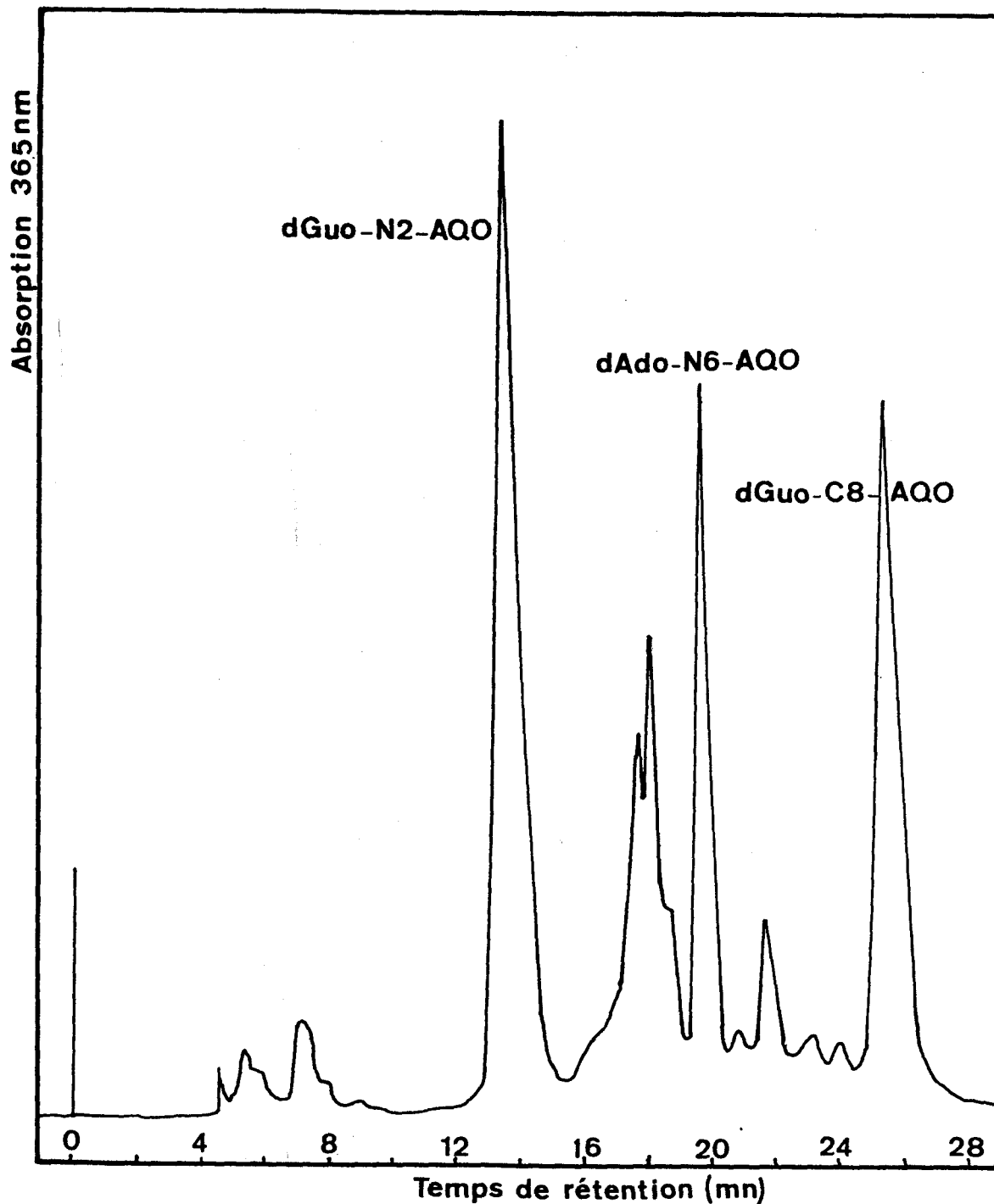


Figure 6 - Profil de clhp semi-préparative d'un hydrolysats d'ADN modifié par l'Ac-4HAQO. Après réaction avec l'Ac-4HAQO, l'ADN est purifié par des précipitations successives à l'éthanol, il est ensuite soumis à l'action de la DNase et des phosphodiesterases, puis de la phosphatase alcaline (voir publications n° 3 et n° 4). L'hydrolysats 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 NaH_2PO_4 , 0,4 mM EDTA, pH 6) pendant 12 minutes, puis dans le même tampon contenant 30 % de méthanol.

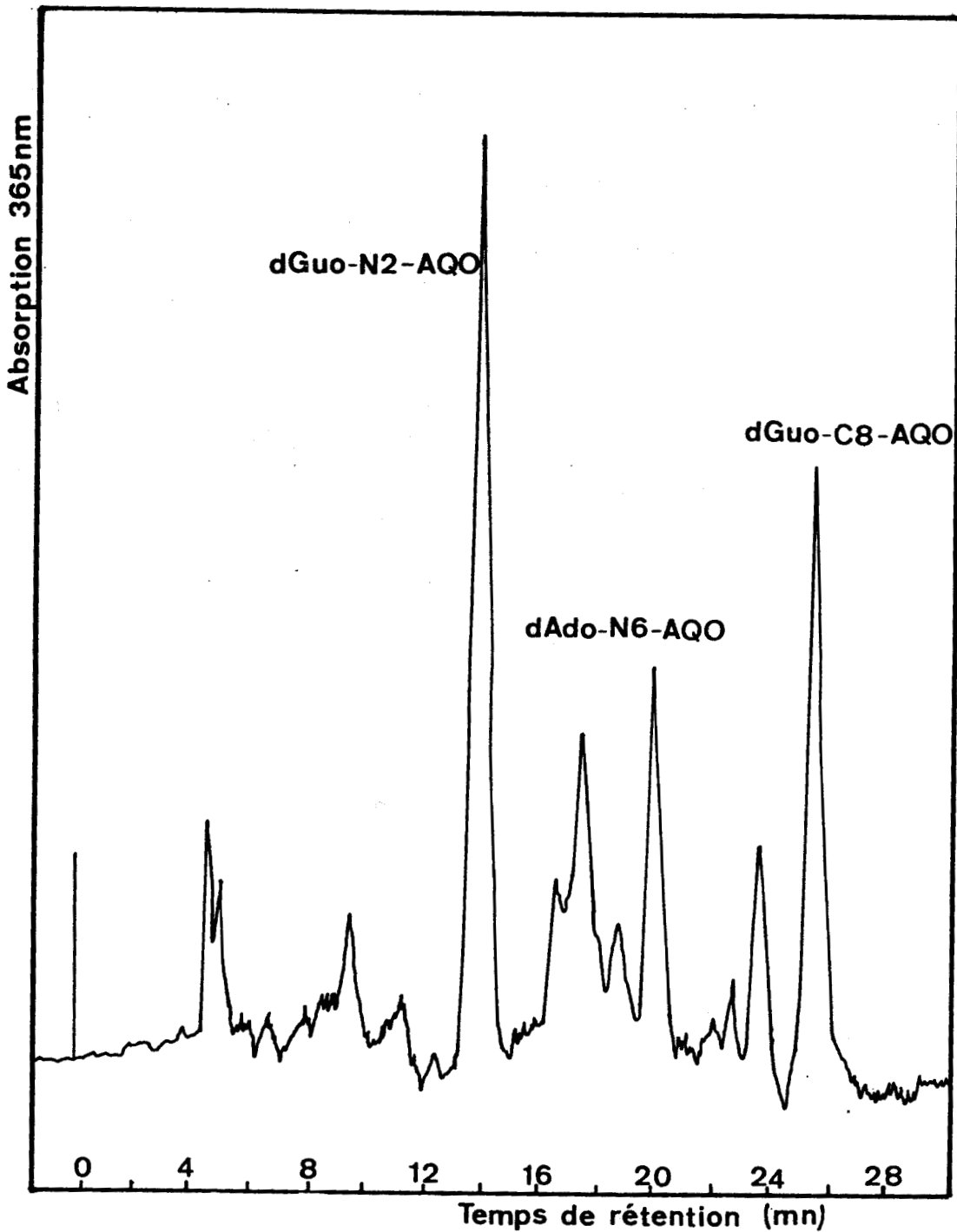


Figure 7 - Profil de clhp semi-préparative d'un hydrolysate d'ADN extrait d'une ascite (hépatome de ZAJDELA) traitée au 4HAQO. 10^9 cellules sont lavées puis mises en survie dans une boîte NUNCLON 150 cm² contenant 100 ml de milieu 199E (Eurobio) additionné de 20 % de sérum de Veau foetal. Une heure 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. 6).

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-ZOITINA, 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 ^d
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

$$\begin{aligned} \frac{A_P^{440}}{A_P^{365}} &= \frac{\epsilon_{b-dG\ III}^{440} [b-dG\ III]}{\epsilon_P^{365} \cdot C_T} \\ &= \frac{\epsilon_{b-dG\ III}^{440}}{\epsilon_P^{365}} \times \% b-dG\ III. \end{aligned}$$

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'aminoacyl-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)	QAI
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 (HEMINKI, 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 modifié.

CHAPITRE III - LES ALTERATIONS STRUCTURALES DE L'ADN

MODIFIE IN VITRO. ETUDES PHYSICOCHIMIQUES ET RECONNAIS-

SANCE ENZYMATIQUE DES LESIONS.

Nous allons tout d'abord décrire, dans ce chapitre, deux études physicochimiques effectuées sur l'ADN modifié *in vitro* par le diAc-4HAQO ou l'Ac-4HAQO :

- des mesures de température de fusion (Tf) qui donnent un renseignement sur la perturbation structurale de l'ADN modifié ;
- des études d'anisotropie optique : dichroïsme et biréfringence linéaires électriques. Ces dernières expériences ont été réalisées à Liège, chez le Dr. C. HOUSIER. Ces mesures fournissent des informations sur la perturbation globale de la structure de l'ADN modifié et sur l'orientation du composé fixé dans la double hélice. Elles peuvent constituer une première approche d'étude de la géométrie de la lésion, mais les résultats obtenus doivent être confrontés à ceux obtenus par d'autres techniques. Ces études feront l'objet d'une publication.

Nous avons également étudié la reconnaissance enzymatique des lésions de l'ADN modifié *in vitro* en utilisant différentes enzymes ou fractions enzymatiques :

- l'endonucléase S₁ d'*Aspergillus oryzae*, qui est une enzyme spécifique des simples brins de l'ADN. Ce travail a été effectué dans le but d'obtenir des informations sur la distorsion de l'ADN introduite au niveau des lésions. Les résultats de cette investigation sont décrits dans la publication n° 9.
- une activité enzymatique de type ADN-glycosylase, présente dans les extraits cellulaires de *Micrococcus luteus*. Cette enzyme conduit à la formation de sites apuriniques, par excision de certaines bases modifiées. Les résultats de cette approche sont également donnés dans la publication n° 9, qui a été réalisée en collaboration avec Jacques LAVAL.
- une méthyltransférase extraite de cerveau de Veau. En effet, de nombreux auteurs ont montré que les cancérigènes chimiques interagissent avec la méthylation de l'ADN, qui joue un rôle dans la régulation de l'expression des gènes chez l'eucaryote. Ces expériences ont été faites en collaboration avec Annie PFOHL-LESZKOWICZ, dans le laboratoire du Professeur G. DIRHEIMER, à Strasbourg. L'isolement et la purification de l'enzyme ont été effectués par Mme LESZKOWICZ. Ce travail est décrit dans la publication n° 10.

La plupart de ces études ont été réalisées dans les années 1979-1981, excepté les études de méthylation de l'ADN. A ce moment nous utilisons encore les deux modèles de cancérigène ultime, diAc-4HAQO et Ac-4HAQO pour modifier l'ADN. C'est pourquoi nous rencontrerons dans ces travaux des études sur les deux types d'ADN modifiés, les modifications structurales de la macromolécule étant semblables dans les deux cas.

a) Mesure des températures de fusion de l'ADN modifié *in vitro* par le diAc-4HAQO et l'Ac-4HAQO

En général la fixation covalente du cancérigène ultime s'accompagne d'une modification de la température de fusion (T_f) de l'ADN modifié. Dans le cas des composés aromatiques encombrants comme les amines aromatiques et les hydrocarbures polycycliques, on observe assez souvent une diminution de la T_f . Ceci correspond à l'introduction de groupements électro-négatifs dans la double hélice qui déstabilisent l'ADN en interagissant avec les groupements phosphates de l'enchaînement phosphodiester.

Nous avons donc mesuré les températures de fusion de plusieurs échantillons d'ADN modifié par le diAc-4HAQO et l'Ac-4HAQO. Les résultats de ces mesures figurent dans les publications n° 1 et n° 2.

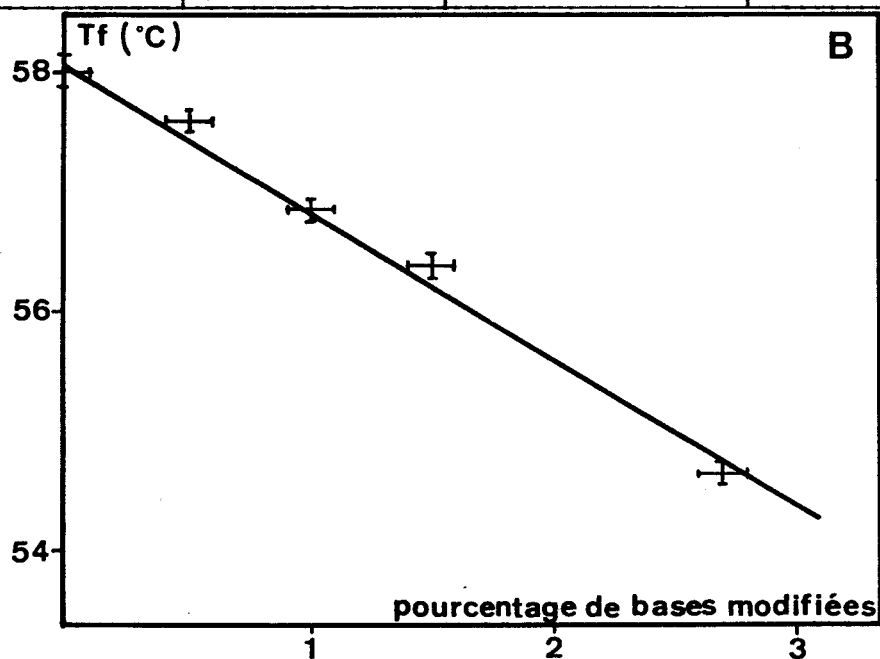
L'appareillage que nous avons utilisé a été mis au point au laboratoire en 1978, par Gérard LECOCQ. Il est décrit en détail dans la publication n° 1.

Nous avons rappelé sur le tableau C les valeurs de T_f que nous avons obtenues pour les différents échantillons d'ADN modifiés, ainsi qu'un graphique donnant l'illustration du phénomène observé. Nous constatons ainsi une diminution linéaire de la température de fusion, le phénomène s'accroissant quand le pourcentage de bases modifiées de l'ADN augmente. La valeur de la déstabilisation pour 1 % de bases modifiées (ΔT_f) est d'environ -1.3°C . Des valeurs de ΔT_f proches ont été trouvées pour d'autres amines aromatiques, telles l'AAF, l'AF et l'acétylaminophénanthrène (FUCHS et al., 1971 ; SPODHEIM-MAURIZOT et al., 1979c; LANG et al., 1977).

Nous avons d'autre part constaté qu'après fusion de l'ADN modifié, la renaturation des molécules n'avait pas lieu : la quinoléine n'induit donc pas de pontages interbrin dans la double hélice. De tels pontages ont été observés dans l'ADN modifié par l'AAF (FUCHS et DAUNE, 1972).

Tableau C - Valeurs des températures de fusion des échantillons d'ADN modifié.

Echantillons	Pourcentage de bases modifiées	Tf (°C)	ΔTf (°C)
ADN modifiés (A) par le diAc-4HAQO	<u>Série 1</u>		
	0	58.20	0
	0.20	58.05	- 0.15
	0.35	57.55	- 0.65
	0.75	56.95	- 1.25
	1.06	56.55	- 1.65
	0.95	56.50	- 1.70
	<u>Série 2</u>		
	0	57.90	0
	0.47	57.25	- 0.65
1.10	56.20	- 1.70	
ADN modifiés (B) par 1'Ac-4HAQO	0	58.05	0
	0.50	57.60	- 0.45
	1.00	56.85	- 1.20
	1.50	56.40	- 1.65
	2.70	54.65	- 3.40



Des déstabilisations de l'ADN identiques ont parfois été constatées par d'autres auteurs pour des cancérogènes induisant des lésions ayant des géométries différentes. Il est donc impossible d'associer la seule valeur du ΔT_f mesuré, pour une lésion donnée (ou un cancérogène donné), à la géométrie de la lésion. Deux exceptions peuvent être citées, dans le cas de la fixation sur le C8 de la guanine de l'AAAF et de ses deux dérivés fluoré et iodé, l'A AFF et l'AAIF. Les ΔT_f obtenus sont respectivement de -1.2°C pour les deux premiers et de -0.4°C pour le dernier, les deux premiers étant à l'intérieur de la double hélice et le dernier à l'extérieur (FUCHS et al., 1976 ; DAUNE, 1981). Dans le cas du benzo(a)pyrène fixé sur le N² de la guanine, où l'on sait que le cancérogène est couché dans le petit sillon à l'extérieur de l'hélice, le ΔT_f est de $-0,75^\circ\text{C}$ (PULKRABEK et al., 1977).

Cependant, pour les deux lésions "externes", le dGuo-C8-AF et le dGuo-O⁶-NA*, pour lesquelles les cancérogènes sont situés dans le grand sillon et induisent une très faible distorsion de l'ADN (KRIEK et SPELT, 1979 ; KADLUBAR et al., 1981), les valeurs du ΔT_f sont respectivement de -1.4°C pour dGuo-C8-AF (SPODHEIM-MAURIZOT et al., 1979^c) et de -1.2°C pour la lésion sur le O⁶ de la guanine (KADLUBAR et al., 1981). Un modèle externe a également été proposé pour l'adduit formé par l'acétylaminophénanthrène sur le N⁶ de l'adénine et la valeur du ΔT_f obtenue est de -1.2°C (LANG et al., 1977).

Dans le cas du 4NQO, nous ferons simplement la remarque suivante : la fixation du cycle quinoléine dans la double hélice d'ADN introduit en son sein un moment dipolaire important, correspondant à la fonction N-oxyde et qui doit déstabiliser la structure de la macromolécule. Plus précisément, l'interaction éventuelle de l'oxygène (O⁻) de cette fonction (-N⁺-O⁻) avec les phosphates de l'enchaînement phosphodiester devrait entraîner une répulsion des deux groupements, ce qui expliquerait la déstabilisation que nous observons.

* dGuo-O⁶-NA : composé de substitution du O⁶ de la guanine par la 1-naphtylamine.

b) Etude électro-optique sur l'ADN et le poly(dG-dC).poly(dG-dC) modifiés par le diAc-4HAQO et l'Ac-4HAQO

Nous avons utilisé les techniques de dichroïsme et de biréfringence linéaires électriques pour obtenir des renseignements sur les changements dans la conformation globale de l'ADN, sur la longueur de la macromolécule et sur l'orientation de la quinoléine par rapport à l'axe de la double hélice.

Les phénomènes d'anisotropie optique, les équations mathématiques les régissant et la mise au point d'un appareil de mesure informatisé et appliqué aux macromolécules biologiques ont été décrits dans l'ouvrage de E. FREDERICQ et C. HOUSIER en 1973 et par C. HOUSIER (1977, 1981a ; et al. 1981b*).

1) Présentation de la méthode et définitions

Les résultats de cette étude n'ayant pas encore fait l'objet d'une publication, nous sommes obligés de revenir sur certains aspects théoriques de ces techniques nécessaires à la compréhension du lecteur. Le résultat essentiel obtenu dans cette étude est que le plan du cycle quinoléine est orienté à environ 65 à 75° par rapport à l'axe de l'hélice, ceci représentant un angle moyen pour les trois adduits.

Quand on oriente l'ADN modifié dans un champ électrique, les chromophores fixés sur la macromolécule présentent, comme les bases, un dichroïsme. Pour toutes les longueurs d'onde où le ligand absorbe, le dichroïsme réduit est défini par :

$$\left(\frac{\Delta A}{A} \right)_{\lambda} = \left(\frac{A_{//} - A_{\perp}}{A} \right)_{\lambda} = \left(\frac{\Delta A}{A} \right)_{s} \cdot f(\vec{E}) \quad (1),$$

où $A_{//}$ et A_{\perp} sont les absorptions mesurées avec une lumière polarisée parallèlement et perpendiculairement au champ électrique E appliqué, et A l'absorption en absence de champ. Le terme $f(\vec{E})$ représente le degré d'orientation de la macromolécule ; sa valeur est comprise entre 0 et 1. $\left(\frac{\Delta A}{A} \right)_{s}$ correspond au "dichroïsme à saturation", quand l'orientation des molécules est totale. En général la valeur du $\frac{\Delta A}{A}$ pour l'ADN est de l'ordre de : - 0.5, pour une valeur de E de 12 à 13 kV/cm (HOUSIER, 1981a).

La biréfringence réduite $\left(\frac{\Delta n}{A} \right)_{\lambda}$ se définit de la même manière :

* HOUSIER, C. & O'KONSKI, C.T. (1981b) Electro-optical instrumentation systems with their data acquisition and treatment. Molecular electrooptics. Plenum Publishing Corporation, New-York 10 013, p. 309-339.

$$\left(\frac{\Delta n}{A}\right)_{\lambda} = \left(\frac{n_{//} - n_{\perp}}{A}\right)_{\lambda} \quad (2)$$

où $n_{//}$ et n_{\perp} représentent les indices de réfraction mesurés avec une lumière polarisée parallèlement et perpendiculairement au champ électrique.

Enfin le temps de relaxation (τ) du dichroïsme (ou de la biréfringence) linéaire électrique est défini par l'équation :

$$\Delta A(t) = \Delta A_0 e^{-t/\tau} \quad (3)$$

ΔA_0 représentant le dichroïsme à l'état stationnaire et t , le temps. On mesure en fait un temps de relaxation moyen, le milieu étant polydispersé :

$$\bar{\tau} = \sum_i \frac{\tau_i \Delta A_{0i}}{\Delta A_0}$$

τ est proportionnel au cube de la longueur de la molécule orientée ; la mesure du $\bar{\tau}$ donne donc des informations sur les modifications de longueur des macromolécules.

Le dichroïsme dû à un moment de transition particulier s'exprime ainsi :

$$\left(\frac{\Delta A}{A}\right)_{\lambda} = \frac{3}{2} (3 \cos^2 \theta - 1) \cdot f(\vec{E}) \quad (4)$$

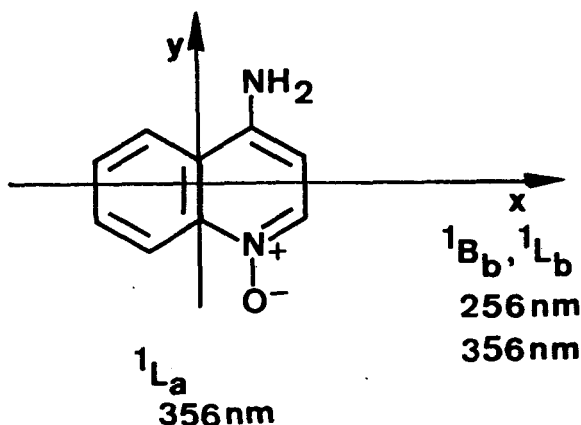
où θ est l'angle entre le moment de transition et l'axe d'orientation, assimilé à l'axe de la double hélice. Ainsi, pour un cancérrogène fixé sur l'ADN, si l'on considère que le degré d'orientation de la macromolécule n'est pas modifié par la fixation, on écrit :

$$\frac{\left(\frac{\Delta A}{A}\right)_{\text{cancérrogène}}}{\left(\frac{\Delta A}{A}\right)_{\text{bases}}} = \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{3 \cos^2 \alpha - 1} \quad (5)$$

où α représente l'angle que fait le plan des bases de l'ADN avec l'axe de l'hélice. Dans l'hélice B, la valeur de α est de 90° . Une autre valeur de α (73°) est actuellement admise dans la littérature (HOGAN et al., 1978 ; LEVITT, 1978). Nous utiliserons la valeur de 90° pour α . La relation (5) permet donc, par le calcul de l'angle θ , de déterminer l'orientation du cancérrogène dans la macromolécule.

En réalité, la connaissance de l'angle θ est liée à celle de l'orientation des moments de transition dans la molécule de cancérrogène étudiée.

Nous avons donc cherché à connaître quelle était l'orientation des moments de transition correspondant aux bandes d'absorption de la quinoléine. Nous ne disposions, au début de cette étude, que de données théoriques (OKANO et al., 1972) indiquant que dans la molécule de 4AQO, la bande d'absorption située à 256 nm correspondait à une transition $\pi \rightarrow \pi^*$ dirigée suivant le grand axe x du plan du cycle quinoléine et que la bande à 356 nm correspondait aux contributions de deux transitions dégénérées (1L_a et 1L_b), dont l'une serait dirigée suivant le petit axe y du plan du cycle et l'autre suivant le grand axe x (voir le schéma ci-dessous) :



(OKANO et al., 1972)

Nous nous sommes intéressés uniquement à la bande à 356 nm puisque celle à 256 nm est masquée par la bande des bases de l'ADN. Nous avons voulu tester ces hypothèses en déterminant expérimentalement les directions relatives des moments de transition dans la région de 300 à 400 nm. Nous avons, pour cela, mesuré la polarisation de fluorescence r en fonction de la longueur d'onde, pour une solution de 4HAQO dans la glycérine, r étant défini comme :

$$r = \frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + 2I_{\perp}}, \text{ où } I_{//} \text{ et } I_{\perp} \text{ représentent les intensités lumineuses dans}$$

les directions parallèle et perpendiculaire à celle de la lumière incidente. Pour une bande d'absorption donnée, s'il y a un seul moment de transition, ou plusieurs moments de transition possédant des orientations parallèles, la polarisation de fluorescence r du cancérigène isolé doit être indépendante

de la longueur d'onde (HOUSIER, 1977). Si par contre, on observe des variations, r gardant cependant le même signe, c'est que cette région spectrale correspond au moins à deux transitions faisant entre elles un angle compris entre 55° et 90° (HOUSIER, 1977).

La figure 8 montre la valeur de r obtenue en fonction de la longueur d'onde ainsi que le spectre d'absorption du 4HAQO. On constate que dans la région spectrale de 400 à 300 nm, la polarisation de fluorescence varie, indiquant que la bande d'absorption centrée à 365 nm contient deux transitions différemment polarisées. L'une serait dirigée selon le petit axe (1La) du plan du cycle et l'autre soit selon le grand axe, soit selon une direction faisant avec le petit axe un angle compris entre 55° et 90° . Ces deux directions de moments de transition définissent un plan que nous assimilons au plan du noyau quinoléine. C'est l'orientation de ce plan que nous déterminerons.

Nous avons donc étudié par ces techniques deux échantillons d'ADN soniqué modifié par le diAc-4HAQO et un échantillon d'ADN soniqué modifié par l'Ac-4HAQO, les pourcentages de fixation variant de 0.2 % à 0.9 % de bases modifiées. De telles expériences doivent en effet être réalisées sur des échantillons faiblement modifiés par le cancérigène (FUCHS, 1976 ; HOUSIER, 1981a ; GEACINTOV et al., 1978). Pour chaque échantillon, nous avons mesuré la variation du ΔA en fonction de la longueur d'onde, dans la bande d'absorption de la quinoléine (de 300 à 400 nm), la variation du ΔA dans la bande d'absorption de l'ADN (à 260 nm) et la variation de Δn , à 550 nm, en fonction de l'intensité E du champ électrique appliqué. Nous avons également effectué des mesures de temps de relaxation de la biréfringence. Toutes ces mesures ont été réalisées sur des solutions ne présentant pas une densité optique supérieure à 1,5.

2) Résultats concernant la modification structurale de l'ADN modifié

La partie A de la figure 9 montre la variation du dichroïsme réduit à 260 nm en fonction du champ électrique, pour les trois échantillons d'ADN modifié comparés à l'ADN témoin. On constate une faible diminution du $\Delta A/A$, en valeur absolue. On obtient en effet, pour les intensités de champ élevées, des valeurs de - 0,47 pour l'ADN témoin et de - 0.45 pour l'ADN modifié à 0.9 %. Ceci indique une très légère désorganisation de la macromolécule

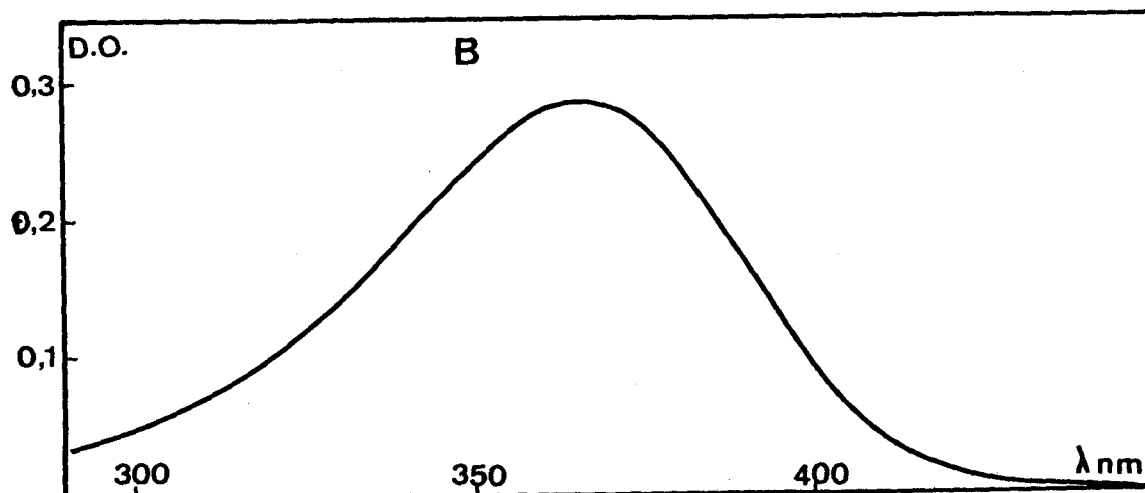
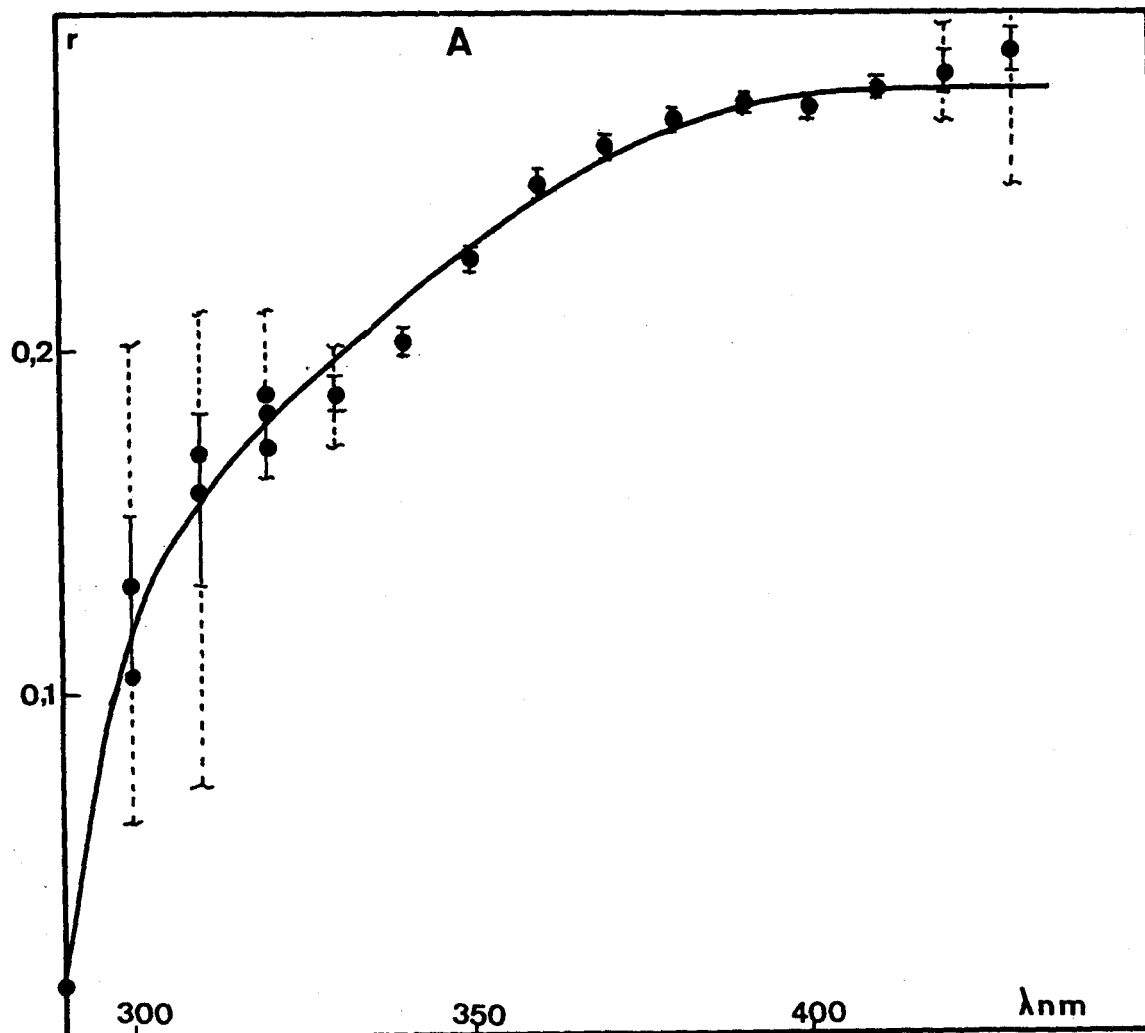


Figure 8.

A - Spectre de polarisation de la fluorescence d'une solution de 4HAQO dans un mélange glycérine-eau à 95 % (v-v), mesurée sur un spectrofluorimètre Baird Atomic SF 100 EE, avec polariseurs à l'excitation et à l'émission. Les résultats sont présentés sous forme de l'anisotropie d'émission ; r , corrigée pour le facteur de transmittivité du monochromateur d'émission.

B - Spectre d'absorption de la solution de 4HAQO étudiée partie A.

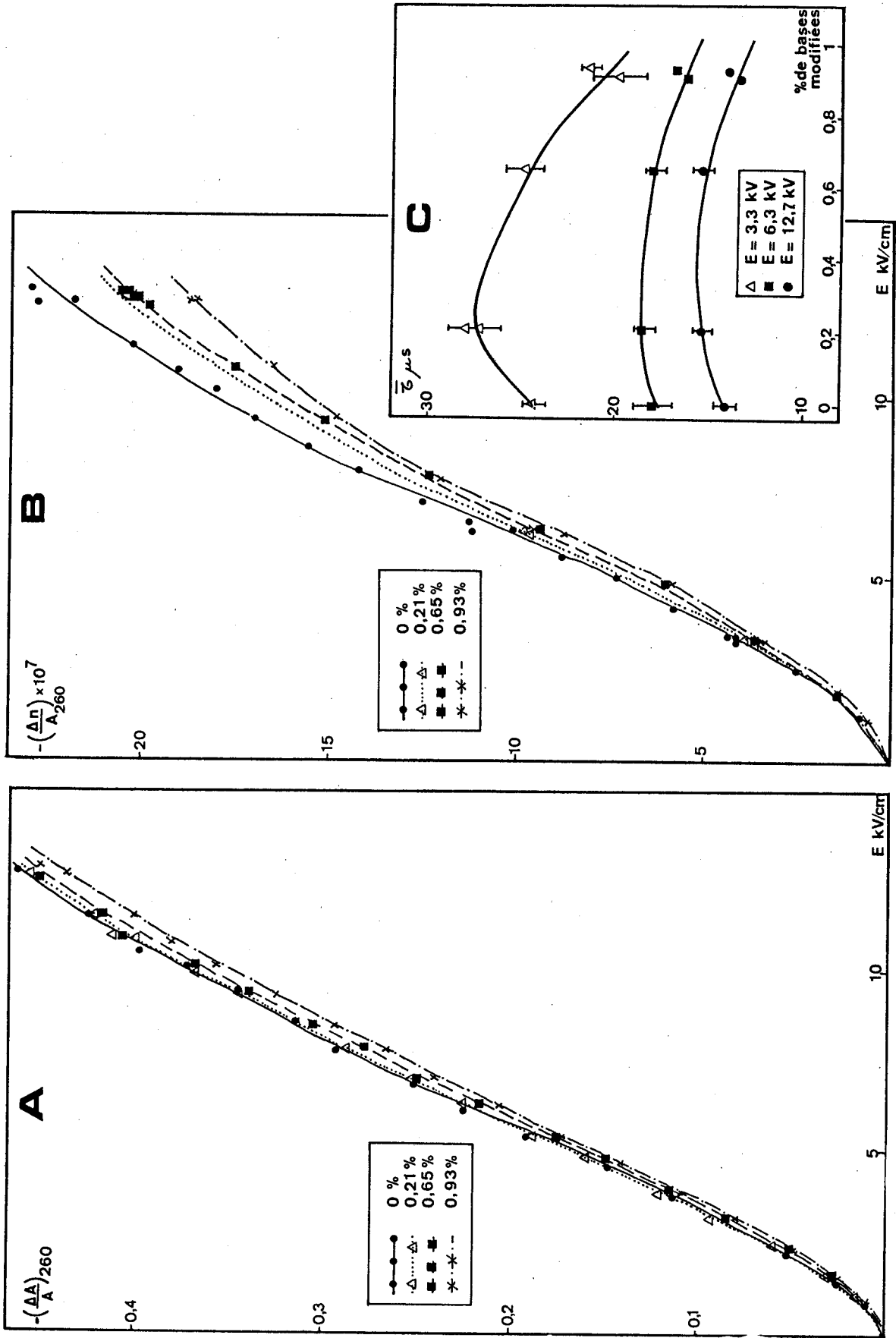


Figure 9 - Mesures électro-optiques (A : dichroïsme linéaire électrique ; B : biréfringence linéaire électrique ; C : temps de relaxation de la biréfringence) des échantillons d'ADN modifiés, en fonction de l'intensité du champ électrique appliqué. La biréfringence est mesurée dans la région visible, à 550 nm et elle est normalisée par rapport à l'absorption de l'échantillon d'ADN, à 260 nm.

l'interaction d'empilement moyenne des bases n'étant que faiblement perturbée étant donné le faible taux de fixation du cancérrogène.

La variation de la biréfringence réduite mesurée à 550 nm en fonction de l'intensité du champ électrique est également représentée sur la figure 9, partie B. On observe une diminution notable du $\frac{\Delta n}{A}$ des ADN modifiés par rapport à l'ADN témoin. Ceci n'est pas incompatible avec la faible variation du $\frac{\Delta A}{A}$ que nous observons, puisque la mesure du Δn dans le visible rend compte de la contribution de toutes les bandes U.V. de l'ADN. De plus, il s'y ajoute une contribution de forme qui est positive et diminue la valeur absolue du Δn (HOUSIER, 1977 ; 1981b).

Nous avons également mesuré les temps de relaxation de la biréfringence des quatre échantillons et la partie C de la figure 9 montre la variation de $\bar{\tau}$ en fonction du pourcentage de bases modifiées, pour différentes valeurs du champ E. On constate une très légère extension de la chaîne aux faibles taux de modification de l'ADN et une légère désorganisation de la structure globale de la double hélice aux taux les plus élevés, qui est reflétée par la légère diminution du $\bar{\tau}$ que nous observons.

En conclusion, ces trois mesures ont montré que la chaîne d'ADN était globalement peu affectée par la fixation du cancérrogène. Ceci est important pour pouvoir calculer les valeurs de l'angle θ , ce que nous abordons maintenant.

3) Détermination de l'orientation du cycle quinoléine dans l'ADN modifié

Si l'on considère, en première approximation, comme négligeable la perturbation de la structure de l'ADN substitué par la quinoléine, il est possible de calculer les angles θ_1 et θ_2 du plan défini par les deux transitions, par rapport à l'axe de l'hélice par la relation (5) :

$$\frac{(\Delta A/A)_{\text{NQO}}}{(\Delta A/A)_{\text{bases}}} = \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{3 \cos^2 \alpha - 1} \quad \text{avec } \alpha = 90^\circ$$

Les valeurs du $\frac{\Delta A}{A}$ du cancérrogène en fonction de la longueur d'onde, dans la région de 300 à 400 nm, sont données sur la figure 10. On constate que le dichroïsme réduit varie, ce qui indique bien que les directions des deux transitions dégénérées contenues dans cette région spectrale

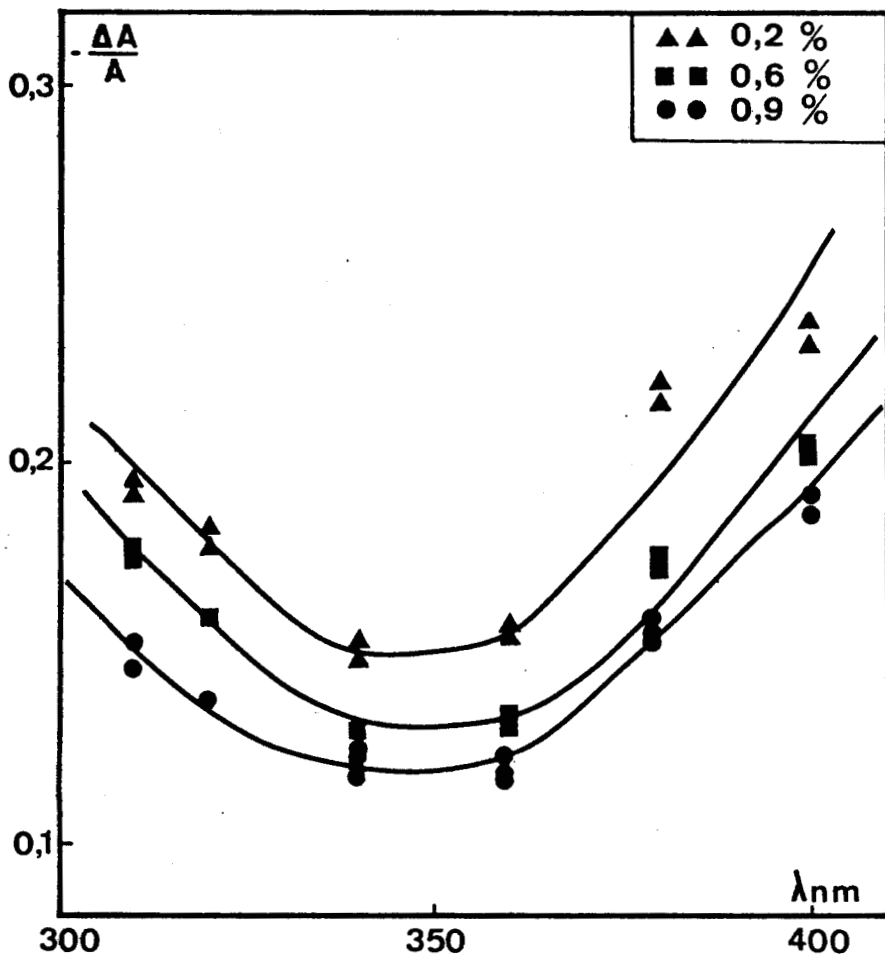


Figure 10.

Variation du dichroïsme réduit de trois échantillons d'ADN modifiés en fonction de la longueur d'onde, dans la bande d'absorption de la quinoléine. Les mesures ont été effectuées avec une intensité de champ électrique de 12,5 kV/cm.

font avec l'axe de l'hélice des angles différents θ_1 et θ_2 (voir la relation 4). L'orientation du noyau quinoléine dans l'ADN sera donc déterminée par la mesure de θ_1 , à 350 nm et de θ_2 , à 390 nm.

Etant donné que les mesures de dichroïsme sur les ADN modifiés, dans la région 300-400 nm sont réalisées à une concentration 8 fois supérieure à celle utilisée pour les mesures sur l'ADN témoin à 260 nm, il est nécessaire de corriger pour cette différence de concentration. Des mesures sur l'ADN modifié et sur l'ADN témoin en fonction de la concentration, à 260 nm et à 290-300 nm (de manière à pouvoir atteindre des concentrations plus élevées), ont permis d'estimer à - 0.13 la correction à apporter au $\frac{\Delta A}{A}$ mesuré.

On obtient ainsi les valeurs suivantes (mesurées à 12,5 kV/cm) :

$$\text{- à 350 nm : } \left(\frac{\Delta A}{A} \right)_{\text{NQO},350} = - (0,14 + 0,13) = - 0,27$$

$$\text{- à 390 nm : } \left(\frac{\Delta A}{A} \right)_{\text{NQO},390} = - (0,20 + 0,13) = - 0,33$$

D'autre part, la valeur du dichroïsme réduit, à 260 nm pour l'ADN est de :

$$\left(\frac{\Delta A}{A} \right)_{\text{bases}} = - 0,45$$

Les valeurs de dichroïsme réduit dans la bande de la quinoléine sont donc négatives et inférieures en valeur absolue à la valeur de $\frac{\Delta A}{A}$ des bases, ce

qui veut dire que le plan de la quinoléine a une inclinaison moyenne comprise entre 55° et 90° par rapport à l'axe de l'hélice (HOUSIER, 1977). Les deux cas suivants sont donc à exclure :

- le plan du cycle perpendiculaire à l'axe (θ_1 et $\theta_2 = 90^\circ$)
- le plan du cycle parallèle à l'axe (θ_1 et $\theta_2 = 0$), le cancéroène étant à l'extérieur de l'hélice.

Nous avons calculé les valeurs de θ_1 et θ_2 à 350 et 390 nm, en utilisant l'équation (5). On obtient :

$$\text{- à 350 nm, } \theta_1 = 68^\circ$$

$$\text{- à 390 nm, } \theta_2 = 74^\circ$$

Ainsi, l'orientation moyenne du noyau quinoléine dans la double hélice correspondrait à une inclinaison d'une vingtaine de degrés par rapport au plan des bases.

4) Essai de détermination de l'orientation de chacun des deux adduits-guanine dans l'ADN, à l'aide du poly(dG-dC).poly(dG-dC) modifié par l'Ac-4HAQO

Il nous a été possible de déterminer le dichroïsme réduit de l'adduit dGuo-C8-AQO dans la bande d'absorption de la quinoléine, sur un échantillon de poly(dG-dC).poly(dG-dC) modifié ; en effet, au laboratoire nous préparons du polymère modifié contenant à 80 % la lésion dGuo-C8-AQO, en faisant la réaction à 95°C (BAILLEUL et al., 1984). Le polymère est ainsi en simple brin et la réaction est alors orientée sur le C8 de la guanine. La renaturation de la macromolécule est ensuite possible, grâce à l'enchaînement des paires de bases GC.

Nous avons ainsi étudié trois échantillons : 1 polymère témoin chauffé à 95°C et deux polymères comportant 0.65 % de bases modifiées ; l'un modifié à 37°C contient les deux adduits majeurs (30 % de dGuo-C8-AQO et 60 % d'autres adduits dont le dGuo-N2-AQO, qui est majeur) et l'autre, modifié à 95°C, comporte à 80 % le dGuo-C8-AQO (BAILLEUL et al., 1984).

Le dichroïsme réduit de l'échantillon de poly(dG-dC).poly(dG-dC) modifié à 37°C est constant dans la région spectrale de 300 à 400 nm. Ceci signifie que dans le polymère synthétique, les deux transitions dégénérées correspondant au plan du cycle quinoléine, auraient la même direction par rapport à l'axe de l'hélice. La valeur de $\frac{\Delta A}{A}$ à 365 nm (au maximum de l'absorbance) suffira donc pour déterminer l'orientation du plan quinoléique, les deux angles θ_1 et θ_2 étant identiques dans ce cas (au lieu de $\theta_1 = 68^\circ$ et $\theta_2 = 74^\circ$, pour l'ADN).

La figure 11 montre les signaux de dichroïsme obtenus à 365 nm et à 300 et 290 nm, pour les trois échantillons.

Connaissant la valeur de $\left(\frac{\Delta A}{A}\right)_{NQO,365}$ pour l'adduit dGuo-C8-AQO,

il est possible de déduire celle de l'adduit dGuo-N2-AQO, sur le polymère modifié à 37°C. La base de l'analyse des valeurs de dichroïsme est la relation suivante qui suppose une additivité simple des dichroïsmes des deux adduits :

Figure 11 - Signaux de dichroïsme linéaire électrique, mesuré dans la direction parallèle au champ, de trois échantillons de poly(dG-dC).poly(dG-dC).

A : polymère témoin, chauffé à 95°C ; B : polymère modifié à 95°C, comportant à 80 % l'adduit dGuo-C8-AQO ; C : polymère modifié à 37°C, contenant les deux adduits, dGuo-N2-AQO et dGuo-C8-AQO. Les signaux enregistrés à 365 nm correspondent au cancérogène et ceux enregistrés à 290 et 300 nm, aux bases du polymère.

L'impulsion électrique est représentée au-dessus de chaque série de signaux. Sa durée est d'environ 30 à 40 μ s. Les mesures ont été effectuées avec une intensité de champ électrique de 6 kV/cm.

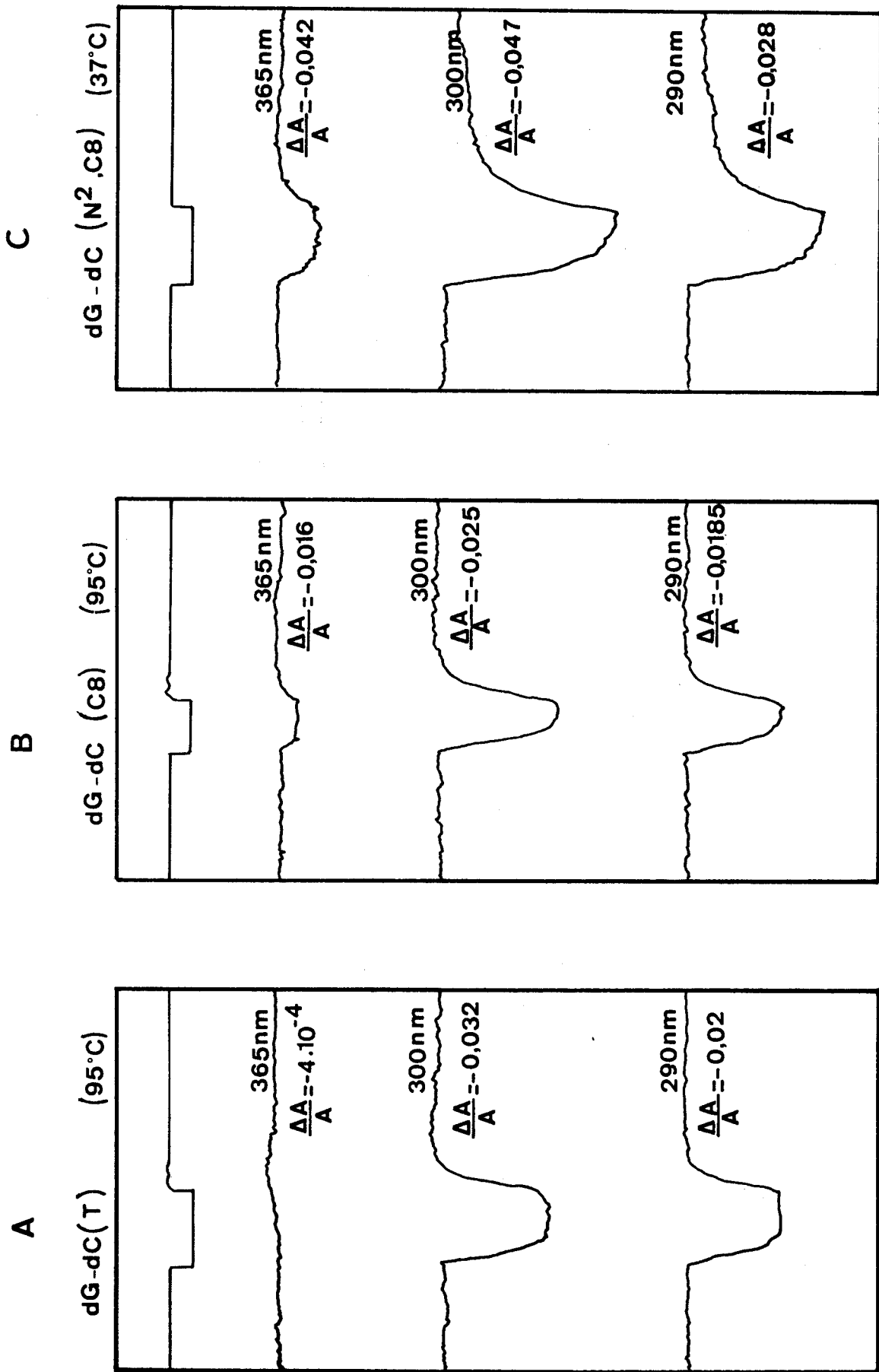


Figure 11.

$$\Delta A_{\text{mes}} = \Delta A_1 + \Delta A_2$$

$$\Delta A_{\text{mes}} = \frac{\Delta A_1}{A_1} \cdot A_1 + \frac{\Delta A_2}{A_2} \cdot A_2$$

où 1 et 2 se rapportent aux adduits en C8 et N² respectivement. Le poly(dG-dC).poly(dG-dC) modifié à 80 % en C8 donne pour $\Delta A/A$, une valeur de - 0,016 à 365 nm. Comme cet échantillon porté à 95°C montre un dichroïsme à 290 et 300 nm abaissé d'un facteur $\approx 1,4$ à 1,6 par rapport à l'échantillon porté à 37°C, la valeur corrigée de $\Delta A_1/A_1$ vaut - 0,024 à 365 nm, en supposant que seul l'adduit en C8 contribue à l'absorption.

Pour le poly(dG-dC).poly(dG-dC) qui contient les deux adduits en N² et C8, il est possible de déduire du ΔA_{mes} la valeur de $\Delta A_2/A_2$ pour l'adduit N² à partir de la relation :

$$\frac{\Delta A_{\text{mes}}}{A_{\text{mes}}} = \frac{\Delta A_1}{A_1} \varphi_1 + \frac{\Delta A_2}{A_2} \varphi_2$$

(φ_1 = proportion d'adduit 1)

(φ_2 = proportion d'adduit 2)

en supposant que les coefficients d'extinction des adduits 1 et 2 soient les mêmes à 365 nm. Nous avons montré dans le chapitre II que ces valeurs sont très proches. Pour une absorbance totale $A_{365} \approx 0.047$, les contributions de 1 (30 %) et 2 (60 %) à l'absorbance seraient d'environ 0,016 (avec $\varphi_1 = 0,33$) et 0,031 (avec $\varphi_2 = 0,66$) de sorte que l'on obtient :

$$\frac{\Delta A_{\text{mes}}}{A_{\text{mes}}} = - 0.042 = - 0,024 \times 0,33 + \frac{\Delta A_2}{A_2} \times 0,66$$

ce qui donne pour l'adduit N² :

$$\frac{\Delta A_2}{A_2} = - 0.051$$

Le dichroïsme réduit de l'adduit en N² serait donc environ deux fois plus élevé (en valeur absolue) que celui de l'adduit en C8.

L'extrapolation d'un tel calcul à l'ADN peut se faire si l'on admet que les adduits dGuo-C8-AQO et dGuo-N2-AQO ont la même orientation dans l'ADN et dans le poly(dG-dC).poly(dG-dC). Le raisonnement appliqué aux données obtenues sur l'ADN, en supposant un rapport 2 entre les dichroïsmes réduits des adduits 1 et 2, fournit les résultats suivants.

A 365 nm où les coefficients d'extinction sont considérés comme équivalents :

$$\frac{\Delta A_{\text{mes}}}{A_{\text{mes}}} = \frac{1}{2} \frac{\Delta A_2}{A_2} \psi_1 + \frac{\Delta A_2}{A_2} \psi_2$$

$$- 0,27 = \frac{\Delta A_2}{A_2} \left(\frac{1}{2} \psi_1 + \psi_2 \right)$$

- 0,27 représente la valeur de $(\Delta A/A)_{365}$ qui est donnée à la p. 176 .

On obtient : $\frac{\Delta A_2}{A_2} = - 0,33$

On peut donc écrire :

$$\frac{\Delta A_2/A_2}{(\Delta A/A)_{\text{bases}}} = \frac{- 0,33}{- 0,45} = 0,74$$

- 0,45 étant la valeur mesurée à 260 nm.

En appliquant la relation (5) :

$$\frac{(\Delta A/A)_{\text{N}^2\text{O}}}{(\Delta A/A)_{\text{bases}}} = \frac{3 \cos^2 \theta - 1}{3 \cos^2 \alpha - 1}$$

on obtient :

- pour l'adduit N², $\theta = 72^\circ$

- pour l'adduit C8, $\theta = 62^\circ$

La valeur d'un facteur deux entre les dichroïsmes réduits des adduits en N² et en C8, ne se traduit que par un décalage de l'ordre de 10° dans l'inclinaison moyenne du plan de la molécule par rapport à l'axe de la double hélice.

En conclusion, quoique le calcul que nous venons de proposer soit approximatif, nous pouvons penser que les deux adduits majeurs possèdent tous deux des contraintes de positionnement dans l'ADN telles que l'inclinaison du plan du cancérogène par rapport à l'axe de l'hélice soit voisine pour les deux adduits, le dGuo-N2-AQO étant moins incliné par rapport au plan des bases.

5) Bilan

Avant de donner les conclusions concernant cette étude, nous voudrions revenir sur les difficultés expérimentales liées à ces déterminations. En effet :

- dans la région spectrale de 300 à 400 nm, la mesure du ΔA est difficile à cause de la faible valeur de la densité optique (de l'ordre de quelques centièmes d'unité).
- les deux transitions électroniques de la bande d'absorption étudiée se recouvrent.
- deux adduits sur la guanine sont présents en quantité notable sur l'ADN, ce qui conduit à déterminer une orientation moyenne.

Tous ces facteurs nous ont rendu la tâche difficile et, de ce fait, le résultat reste imprécis. Nous pensons cependant qu'il constitue une approche qui peut être intéressante.

Une première amélioration des résultats pourrait être fournie par des mesures de dichroïsme réduit sur un ADN contenant à 80 % l'adduit dGuo-N2-AQO. Nous sommes capables de fabriquer un tel échantillon, la méthode de préparation a été mise au point tout récemment.

Les mesures que nous avons réalisées avec le Dr. C. HOUSSIER nous permettent cependant de proposer deux hypothèses, quant à la géométrie de l'interaction hélice B-quinoléine :

- soit une fixation externe, en particulier dans le cas de l'adduit sur le C8 de la guanine. En effet, dans le cas du dérivé iodé de l'AAF fixé sur le C8 de la guanine, à l'extérieur de l'hélice, les auteurs ont trouvé des valeurs d'environ 60° pour l'angle que nous appelons θ . (FUCHS et al., 1976).
- soit une insertion du cancérogène, avec ou sans interaction d'empilement

entre le cycle quinoléine et les bases. Cette hypothèse est à rapprocher de la littérature concernant les agents intercalants, pour lesquels les valeurs de θ sont comprises entre 62° et 90° (HOGAN, 1979 ; HOUSSIER, 1981a). Nos valeurs de θ (comprises entre 65° et 75°) ne semblent donc pas incompatibles avec l'insertion du cancérogène dans l'ADN en hélice B.

D'autres techniques devraient être abordées pour essayer de préciser la géométrie des lésions, par exemple des mesures de RMN du proton et du carbone 13, effectuées sur des oligonucléotides ou des dinucléotides modifiés, soit à 80 % sur le C8 de la guanine, soit à 80 % sur le N². Ceci permettrait peut-être d'évaluer la force de l'interaction d'empilement éventuelle entre le cycle quinoléine et le plan des bases. En effet, WINKLE et al. (1978 ; 1979) ont montré, par ces techniques de RMN, qu'il existait une interaction forte entre le plan du 4NQO et celui des bases de l'ADN, le cancérogène étant intercalé. Nous ne savons pas si une telle interaction peut exister quand le cancérogène est fixé de façon covalente, la liberté de mouvement du cycle quinoléine étant alors limitée. Il serait intéressant de pouvoir l'étudier.

Une aide précieuse nous serait également apportée par la confection de modèles moléculaires et macromoléculaires qui permettraient de connaître les contraintes stériques imposées par l'hélice B et par la quinoléine elle-même.

Nous allons aborder maintenant une série d'études concernant la reconnaissance enzymatique des lésions sur l'ADN modifié.

c) Etude de la reconnaissance enzymatique *in vitro* des lésions créées sur l'ADN par l'Ac-4HAQO ou le diAc-4HAQO

1) Reconnaissance enzymatique des lésions par l'endonucléase S_1 d'*Aspergillus oryzae*

Dans les deux paragraphes précédents, nous avons constaté que l'ADN modifié par les dérivés de la quinoléine était déstabilisé, que sa structure était faiblement altérée, le stacking des bases étant légèrement modifié. Nous avons évalué approximativement l'orientation du noyau quinoléine comme étant incliné de 65° à 75° par rapport à l'axe de l'hélice. Ces valeurs d'angles étant compatibles avec aussi bien une insertion qu'une fixation externe, une question reste alors posée : la fixation du cancérogène, principalement sur le N^2 et le C8 de la guanine, induit-elle une distorsion importante de la chaîne, avec la présence éventuelle de zones dénaturées ?

Pour essayer de répondre à cette question, nous avons effectué le test classique de l'hydrolyse par l'endonucléase S_1 d'*Aspergillus oryzae*. Cette enzyme est spécifique des zones simples brins dans l'ADN et son utilisation est d'usage courant dans les études conformationnelles des ADNs modifiés par les cancérogènes. En effet, de nombreux auteurs ont associé la plus ou moins grande sensibilité de l'ADN modifié à l'attaque par cette enzyme avec la distorsion plus ou moins importante introduite dans la macromolécule.

FUCHS et al. et YAMASAKI et al. ont montré que l'ADN modifié par l'AAF est très notablement sensible à la S_1 et que cette endonucléase excisait préférentiellement les nucléotides modifiés, l'adduit sur le C8 de la guanine étant spécifiquement libéré dans le milieu (FUCHS, 1975 ; YAMASAKI et al., 1977a et b). KRIEK et SPELT (1979) ont constaté que dans des conditions expérimentales identiques, l'ADN modifié par l'AF était beaucoup moins sensible à l'endonucléase S_1 que l'ADN-AAF ; ils en ont conclu que l'AF induisait sur l'ADN des distorsions beaucoup plus faibles que son homologue acétylé. Ces résultats sont en accord avec les deux modèles proposés pour ces deux lésions : l'une interne (AAF) et l'autre externe (AF).

PULKRABEK et al. (1977) ont étudié la reconnaissance par cette enzyme de l'ADN modifié par le dioléoxyde du benzo(a)pyrène. Ils ont noté une faible attaque de l'ADN modifié par l'enzyme : pour 1.5 % de bases modifiées, la cinétique d'hydrolyse de l'ADN modifié est confondue avec celle de l'ADN témoin, et pour 2 % de bases modifiées, une légère hydrolyse est observée. D'autres auteurs ont comparé la sensibilité à l'attaque par la S_1 d'ADNs

modifiés par différents hydrocarbures aromatiques polycycliques (dont les deux diolépoxydes du benzo(a)pyrène), par l'AAF et par les U.V. (HEFLICH et al., 1977). Ils ont observé que ces ADNs étaient hydrolysés dans des proportions très différentes, les moins hydrolysés étant ceux qui étaient modifiés par les diolépoxydes du benzo(a)pyrène. Leurs résultats sont donc en accord avec ceux de PULKRABEK et al. et avec le modèle externe proposé pour le benzo(a)pyrène, qui implique une faible distorsion dans l'ADN au niveau des lésions (GRUNBERGER et WEINSTEIN, 1978).

Nous avons testé l'hydrolyse par l'endonucléase S_1 de trois échantillons d'ADN modifiés : l'un par le diAc-4HAQO, l'autre par l'Ac-4HAQO et le troisième par l'AAF (cet échantillon a été fourni par Robert FUCHS). Ces trois échantillons d'ADN modifiés, étudiés exactement dans les mêmes conditions expérimentales, sont notablement sensibles à la S_1 ; en effet, les cinétiques d'hydrolyse montrent un pourcentage de libération des nucléotides qui est intermédiaire entre ceux obtenus pour l'ADN natif et l'ADN dénaturé. Ceci indique la présence sur ces macromolécules de zones de distorsion, qui sont assimilables en première analyse à des zones dénaturées.

Nous avons également observé que l'endonucléase S_1 ne reconnaît pas les lésions créées par le 4NQO de manière identique à celles créées par l'AAF. Ceci n'a rien de surprenant, les adduits n'étant pas les mêmes dans les deux cas. De plus, les deux molécules de cancérrogènes sont très différentes, d'une part par leur taille et, d'autre part, par la présence de la fonction N-oxyde dans la molécule de 4NQO.

L'ADN modifié par le 4NQO est beaucoup plus sensible à la S_1 que les ADN modifiés par l'AF et le benzo(a)pyrène, caractérisés par le fait que les cancérrogènes sont situés à l'extérieur de l'hélice. Ceci nous amène à penser que, en particulier pour l'adduit en N^2 qui est majeur, le cancérrogène serait peut-être inséré dans la double hélice. Il en résulterait l'existence d'un moment dipolaire élevé au sein de la macromolécule, introduisant une perturbation suffisamment importante dans la chaîne pour être facilement reconnue par la S_1 . L'adduit en C8 pourrait avoir un rôle similaire puisque, comme nous l'avons calculé à partir du poly(dG-dC).poly(dG-dC) modifié, les contraintes d'orientation du cancérrogène dans l'ADN sont voisines pour les deux adduits.

Dans une étude de sensibilité à la nucléase S_1 il est important de s'assurer que les ADN modifiés ne possèdent pas, à l'avance, de cassure de chaînes qui pourrait fausser les résultats. C'est dans ce but que trois échantillons d'ADN ont été étudiés en gradient de sucrose alcalin, donc dénaturant. Les résultats nous ont indiqué que les ADN modifiés par l'Ac-4HAQO et le diAc-4HAQO sont très proches de l'ADN témoin. Si les faibles variations observées avaient cependant une signification, elles pourraient être attribuées à la présence de quelques sites apuriniques sur l'ADN, dans la solution à pH neutre, qui se seraient transformés en cassures simple brin dans le milieu très alcalin du gradient. Cette hypothèse est à rapprocher de l'observation des chercheurs d'une équipe japonaise qui suggèrent l'existence *in vivo* de sites apuriniques (IKENAGA et al., 1981a ; 1981b ; ANDOH et IDE, 1972). Il semblerait, d'après les travaux de KRIEK et SPELT (1979) que les sites apuriniques eux-mêmes pourraient être reconnus par la S_1 , comme dans le cas de l'ADN modifié par l'AF.

Nous pouvons ainsi conclure que c'est principalement la fixation de la quinoléine sur la macromolécule qui crée cette importante distorsion dans l'ADN, probablement assimilable à une zone dénaturée, reconnue et excisée par la S_1 .

Ce travail a fait l'objet d'une publication (publication n° 9) qui sera insérée dans ce chapitre, p.188.

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

Carcinogenesis, 1982.

2) La reconnaissance enzymatique par des extraits cellulaires de *Micrococcus luteus*

Cette étude préliminaire effectuée en collaboration avec J. LAVAL a été entreprise pour essayer de comprendre les résultats des travaux de REGAN et SETLOW, sur la réparation. Ils ont montré que les lésions induites par le 4NQO étaient réparées selon deux mécanismes d'excision, dont celui impliqué dans la réparation des lésions induites par les agents alkylants et les rayons X (REGAN et SETLOW, 1974).

Les mécanismes d'excision des lésions induites par les agents alkylants ont été très bien étudiés par plusieurs équipes dont celle de

Jacques LAVAL. Ces auteurs ont pu montrer que ces lésions étaient réparées par un mécanisme impliquant tout d'abord l'excision de la base modifiée (et non celle du nucléotide modifié comme dans le cas des U.V.). Deux enzymes effectuent cette étape : une ADN-glycosylase, qui coupe la base modifiée, entraînant la formation de sites apuriniques ; puis une endonucléase spécifique des sites apuriniques (AP-endonucléase) qui incise la chaîne d'ADN au niveau de ce site apurinique (LAVAL, 1978 ; PIERRE & LAVAL, 1980a et b). C'est Jacques LAVAL qui a, le premier, isolé et purifié du Microcoque les deux types d'enzymes (LAVAL, 1977). Au moment où nous avons fait cette étude et encore actuellement, ces mécanismes n'avaient pas été mis en évidence dans le cas des cancérigènes chimiques polyaromatiques, qui sont en général réparés par un mécanisme analogue à celui impliqué dans le cas des U.V. (REGAN et SETLOW, 1974). Puisque dans le cas du 4NQO, il existe un mécanisme assimilable à celui impliqué dans le cas des alkylants, une question se pose : une fraction des adduits-NQO seraient-ils réparés par excision de base ?

Un ensemble d'autres faits peut être rapproché de l'observation de REGAN et SETLOW, en particulier l'éventuelle existence d'un adduit sur la guanine, instable, se dégradant spontanément pour conduire *in vivo* à des sites apuriniques (IKENAGA et al., 1981a). La présence de ces sites apuriniques indiquerait donc qu'il y a eu excision de bases modifiées. Nous avons évoqué ce phénomène dans le paragraphe précédent. S'il est possible, comme nous en avons émis l'hypothèse, que quelques sites apuriniques aient été créés spontanément sur l'ADN modifié *in vitro*, il doit exister une fraction d'adduits qui peut être reconnue par une enzyme capable d'effectuer ce processus d'excision de base.

L'action d'une ADN-glycosylase sur un tel ADN doit donc pouvoir être mise en évidence. C'est dans ce but que nous avons incubé l'ADN modifié par l'Ac-4HAQO avec l'extrait cellulaire de Microcoque, dans les conditions optimales d'action de l'ADN glycosylase. Nous avons en effet mis en évidence une excision qui pourrait être une excision de base, mais malheureusement l'analyse fine des produits n'a pu être effectuée.

Plusieurs auteurs ont observé des dépurinations de la guanine modifiée dans le cas d'amines aromatiques comme l'AAF et le 4-aminoazobenzène

(TARPLEY et al., 1982) et dans le cas du benzo(a)pyrène (* KING et al., 1979) et de l'aflatoxine B₁ (* WANG et CERUTTI, 1980). Dans tous ces cas, le cancérogène se trouvait fixé sur le N7 de la guanine.

Si ces observations préliminaires que nous avons faites avec Jacques LAVAL venaient à être confirmées à l'avenir, ceci pourrait signifier que le 4NQO induirait, lui aussi, une lésion mineure sur le N7 de la guanine, ou sur le O⁶ ou sur un autre atome de cette base. Cette lésion correspondrait à l'un des pics mineurs que nous n'avons pu identifier dans les hydrolysats d'ADN et pourrait aussi expliquer, comme le proposent les Japonais, la formation du 4AQO et les résultats de REGAN et SETLOW.

Cette étude préliminaire est décrite dans la publication n° 9, que nous avons reproduite ci-après.

* KING, H.W.S., OSBORNE, M.R. & BROOKES, P. (1979) The in vitro and in vivo reaction at the N⁷-position of guanine of the ultimate carcinogen derived from benzo(a)pyrene. Chem. Biol. Interact., 24 : 345-353.

* WANG, T.V. & CERUTTI, P. (1980) Spontaneous reactions of aflatoxin B₁ modified deoxyribonucleic acid in vitro. Biochemistry, 19 : 1692-1698.

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

S.Galiègue¹, B.Bailleul¹, M.H.Loucheux-Lefebvre¹ and J.Laval^{2,3}

¹Institut de Recherches sur le Cancer de Lille and U.124 INSERM, BP 311, 59020 Lille Cédex, and ²LA 147 CNRS and U.140 INSERM, Institut Gustave Roussy, 94800, Villejuif, France.

(Received on 3 October 1981; accepted on 16 February 1982)

Abstract

Purified DNA was modified *in vitro* by ³H-labelled O-acetyl or O,O'-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide (Ac-4HAQO or diAc-4HAQO). It was then subjected to the action of the single-stranded DNA specific nuclease S₁ and the digested fractions were analysed. For both types of modified DNA, the release of non-modified nucleotides was faster than the release of modified nucleotides. This result is at variance with that obtained with acetoxy-acetylaminofluorene-modified DNA: in the latter case, the modified nucleotides were preferentially released. The results suggest that the S₁ endonuclease can recognize different conformational changes in DNA, which depend on the carcinogen used. The enzymatic activity (or activities) present in *Micrococcus luteus* cell extracts released ethanol-soluble products from Ac-4HAQO modified DNA.

Introduction

Most chemical carcinogens and/or their metabolites are highly reactive electrophiles, which bind covalently to the cellular DNA and other macromolecules (1). 4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO)* is a potent carcinogen, and some of its biological properties, as well as preliminary findings on its mode of action, have been reported (for reviews see 2,3). It has been shown that the O,O'-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide (diAc-4HAQO) binds covalently to DNA, RNA and proteins *in vitro* (4). We have shown that DNA modified *in vivo* by the proximate carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide (4HAQO) (5) and purified DNA treated *in vitro* by diAc-4HAQO have the same emission fluorescence spectrum (6). This finding suggests that diAc-4HAQO may be found *in vivo* and, if so, could be one of the ultimate metabolites of 4NQO. An analysis of the modified nucleotides has shown that five adducts were formed, one of them being the N(deoxy-guanosine-C⁸-yl)-4-aminoquinoline-1-oxide (dG III) (7). This adduct was also found in DNA extracted from cells treated with 4HAQO (7). We have, on the other hand, shown that a monoacetyl derivative of 4HAQO, the O-acetyl-4-

hydroxyaminoquinoline-1-oxide (Ac-4HAQO) interacts with nucleosides, giving rise to the same adducts as diAc-4HAQO (7). It interacts also with purified DNA *in vitro*, with a much better efficiency than the diacetyl derivative (unpublished results).

In both cases, diAc-4HAQO and Ac-4HAQO, the covalent binding of the quinoline moiety to DNA induced a destabilization of the double helix, as indicated by the melting temperatures of the modified DNA (8). One of the aims of this work has, therefore, been the recognition of 4NQO adducts by the single-stranded DNA specific endonuclease S₁. It has previously been shown, using DNA modified by another chemical carcinogen N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene (AAAF) that local denaturation can be recognized by S₁ endonuclease (9,10).

A second enzymatic recognition of 4NQO adducts could be provided by enzymes involved in DNA repair. It has been shown that the removal of such NQO adducts could be performed by nucleotide excision since bacterial mutants with a defective u.v. repair system as well as xeroderma pigmentosum cells, were also defective in 4NQO repair (11,12). Regan and Setlow (13) have shown that 4NQO is repaired by two mechanisms, a "long patch repair" mechanism characteristic of u.v. lesions and a "short patch repair" mechanism which occurs after X-ray irradiation and treatment with drugs such as alkylating agents. The latter case involves excision of the modified bases by a DNA glycosylase (14,15).

Since the modifications of DNA by 4HAQO derivatives seem to be essentially the same *in vivo* and *in vitro*, we have studied *in vitro* the recognition of 4NQO adducts in DNA by S₁ endonuclease and by *Micrococcus luteus* extracts.

We find that the two enzymatic systems are able to recognize the lesions and liberate part of the 4NQO adducts from double-stranded DNA.

Materials and Methods

Reagents

All chemicals were reagent grade. The carcinogen 4NQO was obtained from Fluka. Its derivative diAc-4HAQO was synthesized from 4HAQO (4) as previously described (16). Ac-4HAQO was prepared from diAc-4HAQO (7). The 4N[2-³H]QO was obtained from Amersham (specific activity 941 mCi/nmol). DiAc-4HA[2-³H]QO and Ac-4HA[2-³H]QO were prepared as described for the unlabelled compounds; they had the same specific activity: 18.41 mCi/nmol. S₁ endonuclease was prepared according to Vogt (17) and was a gift from Dr.M.Guerineau. The *M. luteus* extracts were prepared as described by Laval, *et al* (18).

DNA preparation

Native DNA was obtained from chicken erythrocytes. It had the following characteristics: S_{20,w}, 22 S; hyperchromicity at 260 nm, 41%; melting temperature (in 0.1 M NaCl), 87°C. It was a gift from Pr. M.P.Daune.

Denatured DNA was prepared just before each experiment by heating for 10 min in a boiling water bath, then chilling in an ice bath.

Preparation of modified DNAs

The reaction of diAc-4HA[2-³H]QO with DNA was carried out as previously described (6,8). The diAc-4HAQO-modified DNA contained 0.75% of modified bases and its specific activity was 115 d.p.m./nmol.

Ac-4HAQO-modified DNA was prepared as described for the diAc-4HAQO derivative, but Ac-4HA[2-³H]QO was dissolved in dimethylsulphoxide and incubated with DNA for 15 min. The preparation of Ac-4HAQO

*To whom all correspondence should be addressed at I.A 147 CNRS and U.140 INSERM, Institut Gustave Roussy, 16 bis, Avenue Paul-Vaillant-Couturier, 94800 Villejuif, France.

*Abbreviations: 4NQO, 4-nitroquinoline-1-oxide; diAc-4HAQO, O,O'-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide; 4HAQO, 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide; Ac-4HAQO, O-acetyl-4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide; AAAF, N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene.

modified DNA contained 2.2% of modified bases and its specific activity was 840 d.p.m./nmol.

The AAAF-modified DNA was a gift from Dr. R.P.P. Fuchs. It contained 1.43% modified bases and its specific activity was 5456 d.p.m./nmol.

Kinetics of S_1 hydrolysis

S_1 enzymatic hydrolysis was performed as described by Vogt (17). The standard incubation mixture (1.91 ml) contained the various DNA (75.6 nmol of monoacetyl-modified DNA, or 67.6 nmol of diacetyl modified DNA, or 78.1 nmol of untreated native DNA, or 78.1 nmol of untreated denatured DNA) and the enzyme (0.9 unit of S_1 nuclease) in 0.03 M sodium acetate, 0.05 M sodium chloride, 0.001 M zinc acetate, 5% glycerol, final pH 4.7. The hydrolysis was performed at 37°C; 180 μ l aliquots were removed after increasing lengths of time and poured over 200 μ l of a chilled solution containing 0.2 mg/ml of calf thymus DNA (Choay, Paris) and 2 mg/ml of bovine serum albumin (Boehringer, FRG). The mixtures were kept at 0°C for 5 min, then 800 μ l of precooled (-20°C) ethanol were added. After an additional 5 min at 0°C, the precipitates were removed by centrifuging at 12 500 g for 10 min at 0°C. The optical density of the supernatants at 260 nm were measured, and the radioactivity was evaluated on aliquots of the fractions. The percentage of DNA digestion was calculated from the A_{260nm} released in the supernatants, assuming that a 70% hyperchromicity was associated with hydrolysis (10).

Preparation and assay of *M. luteus* extracts

The cells were grown and the extracts prepared as previously described (18). The enzymatic activities of the *M. luteus* extracts were evaluated by measuring the release of ethanol-soluble products from Ac-4HA[2- 3 H]NQO modified DNA. The assay mixture (100 μ l) contained 41.7 nmol of DNA, 5 μ l of *M. luteus* extract at 28 mg/ml in 20 mM potassium phosphate buffer, 2 mM EDTA, 4 mM magnesium chloride and 5 mM dithiothreitol (final pH 7.5). The mixture was incubated at 37°C for 20 min, chilled to 0°C and the DNA was precipitated as described for the S_1 enzyme assay. The ethanol in the supernatants was removed by evaporation under a stream of nitrogen and the residual supernatants were analyzed by Biogel P2 chromatography.

Chromatography on Biogel P2 column of the ethanol-soluble products liberated by *M. luteus* extracts

Chromatography on Biogel P2 (minus 400 mesh) was performed using a column (0.6 x 58 cm) equilibrated with 0.002 M sodium citrate (pH 7.0). The flow rate was 5 ml/h, fractions of 1.0 ml were collected and the radioactivity measured. The column was calibrated with deoxyadenosine 5' monophosphate, deoxyguanosine 5' monophosphate, deoxyadenosine and deoxyguanosine.

Results and Discussion

Kinetics of hydrolysis of Ac-4HA[2- 3 H]NQO and DiAc-4HA[2- 3 H]NQO modified DNA by S_1 endonuclease

The kinetics of hydrolysis of Ac-4HA[2- 3 H]NQO modified native DNA by S_1 nuclease is represented in Figure 1. The release of total ethanol-soluble material increased with the time of incubation and was intermediate between those obtained with unmodified double-stranded and single-stranded DNAs. The liberation of the total ethanol-soluble products from modified DNA reached ~50% of the total DNA after 180 min. The liberation of ethanol-soluble tritiated products (NQO-modified nucleotides) increased less rapidly with time and reached only 30% of the total radioactivity in 180 min.

Under our experimental conditions, 2% of the nucleotides were modified by the radioactive carcinogen. Therefore the contribution of radioactive-modified nucleotides was, at the most, 2% of the total ethanol-soluble material as measured by optical density. Figure 1 also shows that the release of ethanol-soluble radioactivity was not due to spontaneous liberation during incubation, since incubation at 37°C without enzyme did not liberate any detectable radioactivity. The results obtained with the same modified DNA but after heat denaturation are shown in the insert of Figure 1. Under these conditions, the total nucleotides were released with the same kinetics as observed in the case of unmodified DNA. However, it should be emphasized that, if the initial release of radioactive ethanol-soluble material followed the same kinetics as that of the total nucleotides, it levelled off after

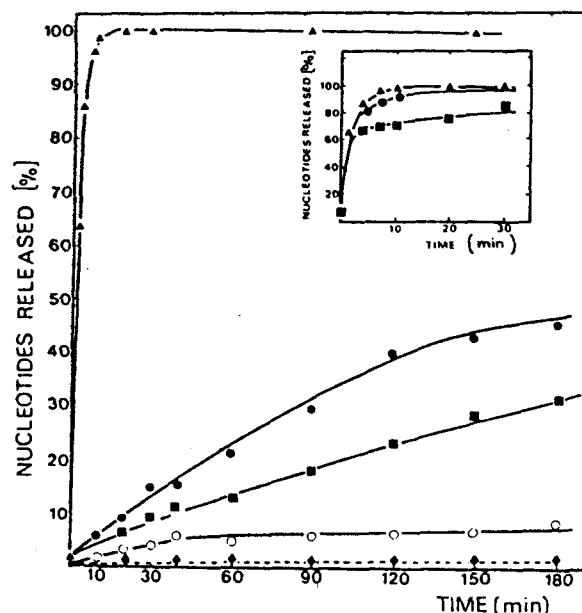


Fig. 1. Kinetics of hydrolysis of native, Ac-4HA[2- 3 H]NQO modified DNA by S_1 endonucleases. Ac-4HA[2- 3 H]NQO modified DNA (2.2% modified bases) was incubated with S_1 nuclease for the indicated periods of time. The released ethanol-soluble nucleotides (A_{260nm}) and [2- 3 H]NQO derivatives were measured as described in Materials and Methods. As control, the activity of S_1 nuclease was optically measured on native and denatured unmodified DNA. ●, A_{260nm} released by S_1 nuclease from Ac-4HA[2- 3 H]NQO modified DNA; ■, [3 H]NQO derivatives released from the same DNA; ◆, spontaneous release of [3 H]NQO derivatives after incubation without S_1 nuclease; ○, A_{260nm} material released from native unmodified DNA; ▲, A_{260nm} material released from the same DNA heat-denatured before incubation with S_1 nuclease. *Insert:* Kinetics of hydrolysis of heat-denatured, Ac-4HA[2- 3 H]NQO modified DNA by S_1 nuclease. The DNAs (modified or not) used in the above experiment were heat-denatured before their hydrolysis by S_1 nuclease. ●, A_{260nm} material released by S_1 nuclease from heat-denatured, Ac-4HA[2- 3 H]NQO-modified DNA; ■, radioactive derivatives released under the same conditions; ▲, A_{260nm} material released from heat-denatured, unmodified DNA.

60% of the total radioactivity was released.

A similar digestion profile was obtained in the case of diAc-4HA[2- 3 H]NQO-modified native DNA, as shown in Figure 2. In both cases (i.e., for Ac-4HA[2- 3 H]NQO or for diAc-4HA[2- 3 H]NQO-modified DNAs) the change in sensitivity of the modified DNAs to S_1 nuclease means that the NQO nucleotide adducts (or part of them) induced a local denaturation of the double-stranded DNA helix. In the case of the mono- or diacetyl derivatives, the release of total nucleotides (as monitored by optical density) was faster than the release of modified nucleotides (as followed by radioactivity). In both cases the kinetics were similar, and this is in good agreement with the previous findings that both at the nucleoside and DNA levels, the identified adducts were the same (7, and unpublished results). From the data obtained with denatured modified DNA (Figure 1 insert) it is clear that the enzyme selectively and rapidly excised some adduct(s) which account for ~60% of the total modified bases. The remaining modified bases became ethanol-soluble at ~1% of the initial rates. Here again the kinetics are similar with Ac- and diAc-4HA[2- 3 H]NQO-modified DNAs.

Under our conditions, the length of oligonucleotides remaining ethanol-precipitable is estimated to be at least 10 nucleotides long (20). The eventual presence of modified

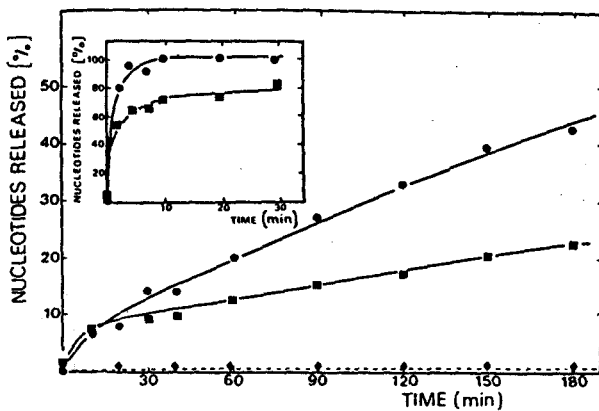


Fig. 2. Kinetics of hydrolysis of native, diAc-4HA[2-³H]QO-modified DNA by *S*₁ endonuclease. DiAc-4HA[2-³H]QO modified DNA (0.75% modified DNA bases) was incubated with *S*₁ nuclease as described in Figure 1. The symbols are the same as in Figure 1 except ■ which represents in this figure the radioactivity released from diAc-4HA[2-³H]QO-modified DNA. *Insert*: Kinetics of hydrolysis of denatured, diAc-4HA[2-³H]QO modified DNA by *S*₁ nuclease. The conditions and symbols are the same as in Figure 1.

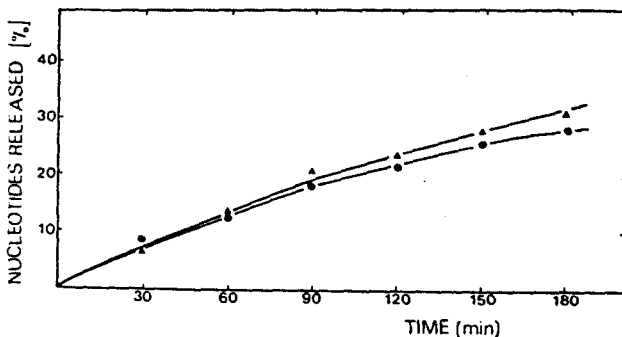


Fig. 3. Kinetics of hydrolysis of native, AAAF-modified DNA by *S*₁ nuclease. AAAF-modified DNA (1.43% modified bases; 8800 c.p.m./μg) was treated with *S*₁ endonuclease as described in Materials and Methods for NQO-modified DNA. ●, O.D._{260nm}; ▲, radioactivity.

mononucleotides in the supernatant fractions was checked by chromatographic analysis. An aliquot of the solutions of Ac- or diAc-4HAQO-modified DNA was hydrolysed for 180 min (Figures 1 and 2) and analysed on Biogel P2. This chromatographic system separates nucleotides, nucleosides, pyrimidines, and purine bases (18,19). The radioactivity profiles were essentially the same, whether the samples were or were not treated with bacterial alkaline phosphatase (data not shown).

Using AAAF-modified DNA, Fuchs (9) and Yamasaki, *et al.* (10) found that, when *S*₁ nuclease was challenged with DNA-AAAF, the carcinogen-modified nucleotides were excised somewhat more rapidly (9) than the nonmodified nucleotides. Since in his experiments, Fuchs used a DNA containing 5% modified bases, carried out the enzymatic hydrolysis at 45°C and measured the acid precipitable oligonucleotides, it seemed important to repeat this experiment under our experimental conditions. We used an AAAF-DNA containing 1.43% modified bases. Our results (Figure 3) are in agreement with those of Fuchs: they show a small preferential release of modified nucleotides. Therefore the difference in activity of *S*₁ endonuclease on Ac-, diAc-4HAQO, and AAAF-modified DNAs is not due to the different number of

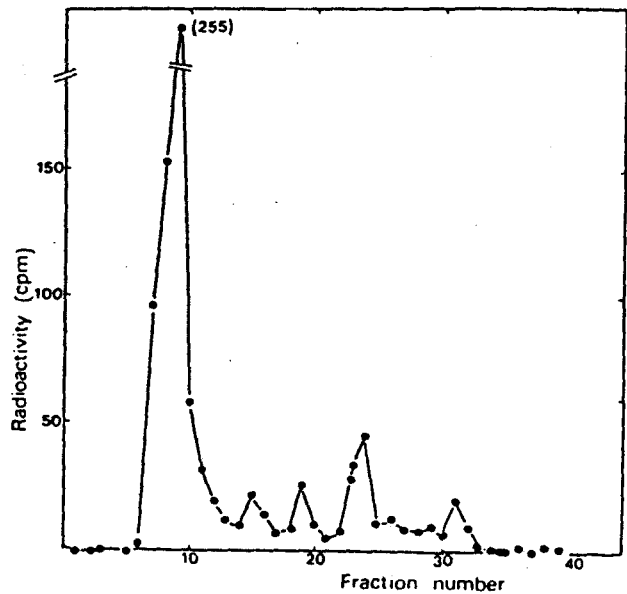


Fig. 4. Chromatographic analysis by Biogel P2 of the ethanol-soluble material released from Ac-4HA[2-³H]QO-modified DNA by a *M. luteus* extract. For details see Materials and Methods.

modified bases, nor to the incubation temperature, nor to the mode of precipitation of the oligonucleotides. This result rather suggests that the behavior of the *S*₁ endonuclease depends on the modifications imposed by the different bulky carcinogens. In the case of 4NQO, the fact that non-modified nucleotides are not removed preferentially could be explained by a specific configuration of the DNA macromolecules due to a particular structure of the modified nucleotides. It should be recalled that the melting temperature depression value for 1% modified bases is of 1.4°C for diAc-4-HAQO-modified DNA (8) and 1.15°C for AAAF-modified DNA (21,22). The possibility also exists that nucleotides bearing certain types of adducts exhibit low affinity for the enzyme. Our results imply that the enzyme recognizes less efficiently regions bearing certain types of modified nucleotides than non modified regions. This could be explained by a steric hindrance due to some types of lesions, or to the presence of clusters of adducts if the covalent binding of the carcinogen is a cooperative phenomenon.

Enzymatic release of ethanol-soluble products from Ac-4HA[2-³H]QO modified DNA by extracts of *M. luteus*

As shown in Figure 4, crude extracts of *M. luteus* liberated ethanol-soluble products from Ac-4HAQO-modified DNA. When the extract was omitted, no radioactivity was released (Figure 1 and data not shown). The first and major peaks comigrated with dAMP and represented nucleotides and/or oligonucleotides (19). It was not possible to identify the four other peaks, since the structure of all the adducts is, as yet, not known. The elution volume of the peaks suggests that they represent modified bases (18,19). However, it cannot be excluded, though it seems unlikely, that the bulky substituted base modified the elution volume compared to the unmodified base.

In conclusion, we have shown that the DNA lesions due to 4NQO may be recognized *in vitro* by two enzymatic systems. It suggests that lesions created by bulky carcinogens may be recognized by specific enzymatic systems (23,24).

Acknowledgements

We wish to thank Pr.G.Biserte for help and valuable discussions. This work was supported by grants from INSERM No.79.5.172.3A and ATP 77.79.109.

Relation to deoxyribonucleic acid structure and conformation and effects on transcriptional activity, *Biochemistry (Wash.)*, **18**, 5128-5134.

References

1. Miller, J.A. (1970), Carcinogenesis by chemicals: An overview, G.H.A. Clowes Memorial Lecture, *Cancer Res.*, **30**, 559-576.
2. Endo, H., Ono, T., and Sugimura, T. (1971), Chemistry and biological actions of 4-nitroquinoline 1-oxide, *Recent Results Cancer Res.*, **34**, 1-99.
3. Nagao, M., and Sugimura, T. (1976), Molecular biology of the carcinogen, 4-nitroquinoline 1-oxide, *Adv. Cancer Res.*, **23**, 132-169.
4. Enomoto, M., Sato, K., Miller, E.C., and Miller, J.A. (1968), Reactivity of the diacetyl derivative of the carcinogen 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide with DNA, RNA and other nucleophiles, *Life Sci.*, **17**, 1025-1032, part II.
5. Sugimura, T., Okabe, K., and Nagao, M. (1966), 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.
6. Galiègue, S., Bailleul, B., and 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, *Eur. J. Cancer*, **16**, 1283-1287.
7. 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 nucleoside, *Cancer Res.*, **41**, 4559-4565.
8. Galiègue, S., Lecocq, G., and 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.
9. 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.
10. Yamasaki, H., Pulkrabek, P., Grundberger, O., and Weinstein, I.B. (1977), 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.
11. Ikenaga, M., Ichikawa-Ryo, H., and Kondo, S. (1975), The major cause of inactivation and mutation by 4-nitroquinoline 1-oxide in *Escherichia coli*: excisable 4 NQO-purine adducts, *J. Mol. Biol.*, **92**, 341-354.
12. Ikenaga, M., Takebe, H., and Ishii, Y. (1977), Excision repair of DNA base damage in human cells treated with the chemical carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide, *Mutat. Res.*, **43**, 415-427.
13. Regan, J.D., and 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.
14. Laval, J. (1977), Two enzymes are required for strand incision in repair of alkylated DNA, *Nature (Lond.)*, **269**, 829-832.
15. Laval, J., and Laval, F. (1980), Enzymology of DNA repair, in Montesano, R., Bartsch, H. and Tomatis, L. (eds.), *Molecular and Cellular Aspects of Screening Tests*, IARC, Lyon, France, **27**, pp. 55-73.
16. Kawazoe, Y., and Araki, M. (1967), Studies on chemical carcinogens. V. O,O'-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide, *Gann*, **58**, 485-487.
17. Vogt, V.M. (1973), Purification and further properties of single-strand specific nuclease from *Aspergillus oryzae*, *Eur. J. Biochem.*, **33**, 192-200.
18. Laval, J., Pierre, J., and Laval, F. (1981), Release of 7 methyl-guanine residues from alkylated DNA by extracts of *Micrococcus luteus* and *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 852-855.
19. Khym, J.X. (1974), Group separation of ribonucleotides, ribonucleosides, and purine and pyrimidine bases on polyacrylamide gel columns, *Anal. Biochem.*, **58**, 638-641.
20. Cleaver, J.E., and Boyer, H.W. (1972), Solubility and dialysis limits of DNA oligonucleotides, *Biochim. Biophys. Acta*, **262**, 116-124.
21. Fuchs, R.P.P., and Daune, M.P. (1973), Physical bases of chemical carcinogenesis by N-2-fluorenylacetyl derivatives and analogs, *FEBS Lett.*, **34**, 295-298.
22. Fuchs, R.P.P., Lefevre, J.P., Pouyet, J., and Daune, M.P. (1976), Comparative orientation of the fluorene residue in native DNA modified by N-acetoxy-N-2-acetylaminofluorene and two 7-halogeno derivatives, *Biochemistry (Wash.)*, **15**, 3347-3351.
23. Heflich, R.H., Dorney, D.J., Maher, V.M., and McCormick, J.J. (1977), Reactive derivatives of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenzo[a]anthracene cause S₁ nuclease sensitive sites in DNA and "UV-like" repair, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**, 634-641.
24. Pulkrabek, P., Leffler, S., Grunberger, D., and Weinstein, I.B. (1979), Modification of deoxyribonucleic acid by a diol epoxide of benzo[a]pyrene.

d) Etude *in vitro* de la méthylation enzymatique de l'ADN modifié par l'Ac-4HAQO

Il existe une relation entre la méthylation de l'ADN en des sites spécifiques et la régulation des gènes chez l'eucaryote.

Cette méthylation a lieu juste après la réplication de l'ADN. Elle est effectuée par des méthyltransférases qui méthylent le C5 de la cytosine, principalement dans des séquences 5'-C_p-G-3' (voir pour revue RIGGS et JONES, 1983).

Une école particulièrement brillante dans ce domaine est celle de Walter DOERFLER qui a surtout travaillé sur les génomes de petite taille que sont ceux des virus, en particulier les adénovirus. Ses travaux ont permis de montrer que l'hypométhylation d'un gène et plus précisément dans ses régions de contrôle peut conduire à son expression (VARDIMON et al., 1982 ; KRUCZEK et DOERFLER, 1983 ; LANGNER et al., 1984). La dernière revue publiée par cette équipe en 1984 est particulièrement bien documentée (DOERFLER et al., 1984).

L'influence des cancérogènes chimiques sur la réaction de méthylation de l'ADN a été très étudiée (voir pour revues, WILSON et JONES, 1983 ; BOEHM et DRAHOVSKY, 1983^a). Dans la majorité des cas, on observe une hypométhylation des ADNs modifiés par les cancérogènes.

Les agents alkylants comme le MNU^{*}, le DMS^{*} et le MNNG^{*} inhibent la réaction de méthylation, en modifiant soit l'enzyme, soit le substrat d'ADN (BOEHM et al., 1981a et b ; COX, 1980 ; PFOHL-LEZKOWICZ et al., 1983a). Par exemple, le MNNG vient se fixer sur le site actif de l'enzyme.

Des cancérogènes organiques plus encombrants, comme le benzo(a)pyrène et l'AAF, auraient, en se fixant sur l'ADN, une action de blocage de l'enzyme (WILSON et JONES, 1983). Le cas de l'AAF a été étudié par l'équipe du Professeur DIRHEIMER, à Strasbourg. Ces auteurs ont examiné l'influence des lésions induites par l'AAF sur la réaction de méthylation de l'ADN modifié

* MNU : méthylnitrosourée

DMS : diméthylsulfate

MNNG : N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

in vitro (SALAS et al., 1978 ; PFOHL-LESZKOWICZ et al., 1981). Ils ont observé une hypométhylation, associée à une augmentation de l'affinité de l'enzyme pour le substrat d'ADN modifié ; ils ont proposé pour leurs résultats l'explication suivante : la fixation de la méthyltransférase sur le substrat d'ADN serait irréversible, l'enzyme se trouvant bloquée au niveau des lésions, et ne pouvant plus se détacher de son substrat (PFOHL-LESZKOWICZ et al., 1981).

Nous avons voulu savoir quelle était l'influence des lésions du 4NQO sur la méthylation de l'ADN *in vitro*. Pour cela, nous avons entrepris, en collaboration avec Mme Annie LESZKOWICZ de l'équipe du Pr. DIRHEIMER, l'étude de la méthylation d'échantillons d'ADN modifié par l'Ac-4HAQO. Nous avons utilisé une (cytosine-5-) méthyltransférase de cerveau de Veau extraite et purifiée par Mme LESZKOWICZ (PFOHL-LESZKOWICZ et al., 1981). Les résultats obtenus ont été les suivants : la vitesse initiale de la réaction et le pourcentage de méthylation de l'ADN modifié sont augmentés par rapport à l'ADN témoin, tandis que l'affinité de l'ADN modifié pour l'enzyme décroît en fonction du pourcentage de modification de la macromolécule.

L'hyperméthylation observée serait due à une augmentation de la vitesse maximale de méthylation qui est alors plus rapide que la diminution d'affinité du substrat d'ADN pour l'enzyme. La méthyltransférase méthylerait plus vite son substrat, en s'attachant moins fortement à l'ADN. Il a été suggéré une "marche" de l'enzyme le long de la chaîne d'ADN, rendue possible grâce à l'induction, par la quinoléine, d'une structure tertiaire particulière.

Ces résultats sont totalement opposés à ceux obtenus par cette même équipe dans le cas de l'ADN modifié par l'AAF. Ceci n'a rien de trop surprenant, puisque les deux cancérogènes sont reconnus de façon différente par l'endonucléase S_1 (publication n° 9) et induisent des modifications structurales différentes, en particulier au niveau de la transition B \rightarrow Z (BAILLEUL et al., 1984). L'équipe du Professeur DIRHEIMER a cependant obtenu un résultat similaire à celui du 4NQO dans le cas de l'ADN modifié par l'AF. Une comparaison intéressante a alors pu être faite avec l'ADN-AAF (PFOHL-LESZKOWICZ et al., 1984).

En conclusion, les résultats assez originaux qui ont été obtenus dans le cas du 4NQO semblent constituer une première approche d'un phénomène peut-être important. Cette hyperméthylation de l'ADN modifié devrait

être testée *in vivo*, le 4NQO semblant un modèle intéressant pour faire cette étude.

Ce travail est décrit dans la publication n° 10 :

"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 Letters, 1983.

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

A. Pfohl-Leszkowicz, S. Galiegue-Zouitina⁺, B. Bailleul⁺, M.H. Loucheux-Lefebvre⁺ and G. Dirheimer

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS et Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex and ⁺Institut de Recherches sur le Cancer de Lille et U124 INSERM BP 311, 59020 Lille Cedex, France

Received 8 July 1983

Both the initial velocity and the overall methylation of Ac-4HAQO modified DNA by a calf brain DNA (cytosine-5-)-methyltransferase are increased as compared to native DNA. The affinity of the modified DNA for the enzyme decreases as a function of the extent of the modification. Heat-denatured, single-stranded DNA shows exactly the opposite results: the more it is modified, the less it is methylated. The poly(dG-dC) · poly(dG-dC) modified by 4NQO is as well methylated as the non-modified one. The carcinogen may induce a tertiary structure favouring the 'walking' of the enzyme along the DNA. The hypermethylation caused by this carcinogen could have a significance in gene activity and cellular differentiation.

<i>DNA methylation</i>	<i>4-Nitroquinoline-1-oxide</i> <i>Poly(dG-dC) · poly(dG-dC)</i>	<i>DNA(cytosine-5-)-methyltransferase</i> <i>Chemical carcinogen</i>	<i>Brain</i>
------------------------	---	---	--------------

1. INTRODUCTION

4-Nitroquinoline-1-oxide (4NQO) is a potent carcinogen (reviews [1,2]). The *0,0'*-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide (diAc-4HAQO) reacts covalently with DNA [3,4]. The monoacetyl derivative, 4-acetoxyaminoquinoline-1-oxide (Ac-4HAQO), constitutes a very attractive model of

Abbreviations: 4NQO, 4-nitroquinoline-1-oxide; 4HAQO, 4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide; SAM, S-adenosyl-L-methionine; Ac-4HAQO, 4-acetoxyaminoquinoline-1-oxide; diAc-4HAQO; *0,0'*-diacetyl-4-hydroxyaminoquinoline-1-oxide; AAF, 2-acetylaminofluorene; AAAF, *N*-acetoxyacetylaminofluorene; DNA-AAF, DNA modified by AAAF; DNA-NQO, DNA modified by Ac-4HAQO; poly(dG-dC)-NQO, poly(dG-dC) · poly(dG-dC) modified by Ac-4HAQO

ultimate carcinogen for the *in vitro* study of carcinogenesis by 4NQO [5]. The reaction between the purine nucleosides and Ac-4HAQO yields 5 adducts, of which only one is well characterized: *N*-(deoxyguanosine-*C*⁸-yl) 4-aminoquinoline-1-oxide [6]. This adduct is recovered from the substituted DNA *in vivo* [6] and *in vitro* [5]. The covalent binding of the quinoline moiety to DNA induces a destabilization of the double helix [4,5]. A destabilization is also observed for AAAF-modified DNA [7]. We found that the enzymatic methylation of this DNA-AAF was decreased [8] as compared to native unmodified DNA. The same is true for DNA alkylated by methylnitrosourea [9-11]. Therefore, it was interesting to determine whether the modification of DNA by Ac-4HAQO has an influence on its enzymatic methylation.

Thus, we modified DNA and poly(dG-dC) · po-

ly(dG-dC) by Ac-4HAQO and utilized these modified products as substrates for enzymatic methylation by a calf brain DNA(cytosine-5-)methyltransferase.

2. MATERIALS AND METHODS

Chicken erythrocyte DNA was a gift from Professor Daune and prepared as in [12]. Poly(dG-dC)·poly(dG-dC) was purchased from PL Biochemicals. Heat-denatured DNA was prepared by incubation in a boiling water bath for 3 min followed by rapid chilling in ice. S-Adenosyl-L-[methyl-³H]methionine (SAM) (spec. act. 20 Ci/mmol) was from the Commissariat à l'Energie Atomique (CEA, Saclay); non-radioactive SAM was from Boehringer (Mannheim); 4NQO was obtained from Fluka (Buchs); Ac-4HAQO was prepared as in [6]. All other reagents were of analytical grade.

The reaction of native and denatured DNA with Ac-4HAQO and subsequent purification of modified DNA were described in [5]; 0.3–2% of modified bases were present. The reaction of poly(dG-dC)·poly(dG-dC) with Ac-4HAQO was done in the same way as for DNA. The two samples prepared correspond to 2.7% and 3.7% of modified bases.

2.1. Methylation of chicken erythrocyte DNA by calf brain DNA(cytosine-5-)-methyltransferase

The standard assay mixture contained in 80 μ l 50 mM Tris-HCl (pH 7.6) and 0.5 mM DTE, 16 μ g DNA, 1.75 μ g pancreatic RNase, 50 μ g enzyme preparation, 1 μ Ci [³H]SAM and 0.5 nmol SAM. The mixture was incubated at 37°C for various times after which 20 μ l proteinase K (1 mg/ml) in a buffer containing: Tris-HCl 10 mM, NaCl 10 mM, SDS 0.5% and EDTA 10 mM (pH 8) were added and the tubes were incubated for 10 min at 60°C. The DNA was collected as in [13]. This method permits a quantitative recovery of the methylated DNA [13]. Calf brain DNA methylase was obtained from nuclei as in [8].

3. RESULTS

3.1. Kinetics of enzymatic methylation of double-stranded DNA-NQO

Fig.1. shows the kinetics of enzymatic methyla-

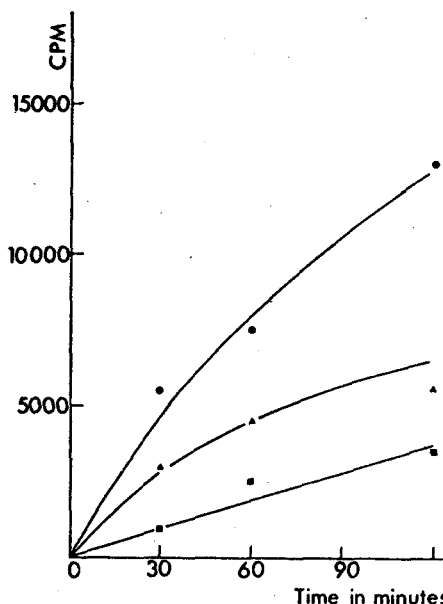


Fig.1. Kinetics of enzymatic methylation of DNA-NQO: (■—■) native DNA; (▲—▲) 0.5% of modified bases; (●—●) 2% of modified bases.

tion of DNA. The reaction reaches a plateau after about 6 h (not shown). For DNA-NQO both the initial velocity of methylation and the overall methylation plateau are increased.

We calculated the pmol CH₃ incorporated into 1 mg DNA for 30 min. Fig.2 shows a linear variation between the degree of modification and the initial velocity of the methylation.

3.2. Lineweaver-Burk plot

The initial methylation reaction velocities of variable amounts of modified DNA were measured. Plotting 1/v vs 1/S gave the following K_m expressed in phosphate residues: 150 μ M, 400 μ M, 770 μ M, 1430 μ M and 2500 μ M, respectively for 0%, 0.3%, 0.5%, 1.5% and 2% of modified bases. Thus, the affinity of the enzyme for the modified DNA decreases with the extent of modification. This decrease is linear.

3.3. Enzymatic methylation of heat-denatured DNA-NQO

We had shown that denatured, unmodified DNA was less methylated than the native form and that its K_m for the enzyme was increased [8]. When heat-denatured DNA-NQO was used as a

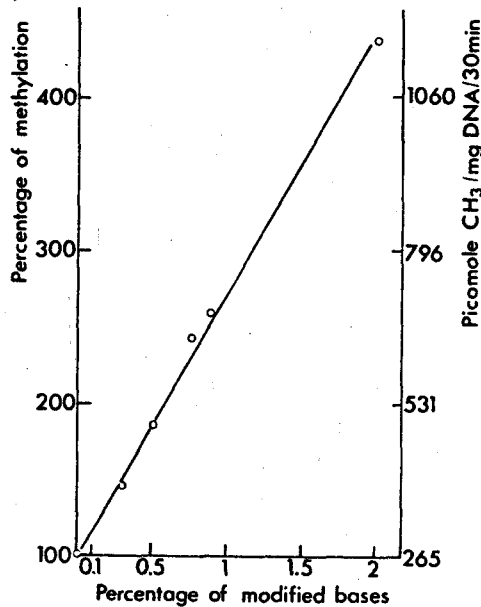


Fig.2. Initial velocity of the enzymatic methylation of DNA-NQO as a function of modified bases.

substrate for the enzyme, this methylation further decreased as a function of the level of substitution (table 1). Thus, we obtained the inverse result of that with double-stranded DNA-NQO. On the other hand, the K_m is the same for unmodified and modified, denatured DNA (400 μ M).

3.4. Enzymatic methylation of poly(dG-dC)-NQO

Finally, we tested the methylation of modified poly(dG-dC)·poly(dG-dC). Table 2 shows that its modification does not affect the enzymatic methylation.

4. DISCUSSION

Here, we have analyzed the in vitro enzymatic

Table 1

Enzymatic methylation of heat-denatured DNA modified by 4NQO after 1 h of incubation

	Non-modified control	Percentage of modified bases		
		0.55	1.5	2.0
cpm	1845	1420	1300	1000
% Methylation	100	77	70	54

Table 2

Enzymatic methylation of 4NQO modified poly(dG-dC)·poly(dG-dC)

Time (h)	Percentages of modified bases		
	0	2.7	3.7
1	3730*	3970	3740
2	7590	7250	-
3	13650	13150	13365

*Values are expressed in cpm

methylation of DNA and poly(dG-dC)·poly(dG-dC) modified by the ultimate carcinogen of 4-nitroquinoline-1-oxide.

We have observed a hypermethylation of DNA-NQO which contrasts with the hypomethylation observed with the DNA-AAF [8] and DNA alkylated with methylnitrosourea [9,10]. For double-stranded DNA the initial velocity of methylation is a linear function of the extent of modification (fig.2). However, the affinity of the DNA-NQO is decreased, the K_m increasing with the level of modification. The hypermethylation is in fact due to an increase in the maximal velocity of the enzymatic methylation, which is more rapid than the decrease in affinity of the modified DNA for the DNA methylase.

No difference was found between the methylation of poly(dG-dC)·poly(dG-dC) treated or not with Ac-4HAQO. One could assume that the substitution modifies the tertiary structure in a way favouring the 'walking' of the methylase along the DNA strands [14]. Against this hypothesis is the result obtained with poly(dG-dC)·poly(dG-dC). However, as the structure of this synthetic polynucleotide is very tight, the substitution of only 3.7% of the bases, which is the highest modification performed, might have a lower effect on it than on DNA. Concerning the methylation, the results obtained with DNA-NQO are just the opposite of those obtained with DNA-AAF [8]. Since it could be expected that a relationship exists between the type of structural modification observed on the substituted DNA by these two carcinogens and their methylation, let us establish a comparison between DNA-NQO and DNA-AAF from a conformational viewpoint. For both modified DNA, a thermal destabilization was

observed and the melting temperature depression had about the same value for the two samples: -1.2°C [5] and -1.13°C [7] per 1% of modified bases for DNA-NQO and DNA-AAF, respectively. As expected these two modified DNA are sensitive to digestion by S_1 endonuclease which is specific of single-stranded DNA, but the enzyme differently recognizes the lesions by NQO and AAF [15]. In addition it was established that poly(dG-dC)-AAF is almost completely resistant to S_1 endonuclease digestion [17] and this result provides evidence for the lack of denatured regions and for a particular restructuring (Z-form) of the modified polymer [16] essentially due to the guanyl C-8 arylamination of poly(dG-dC). Poly(dG-dC) which in this case represents 80% of the total modification. On the contrary, poly(dG-dC)-NQO is sensitive to the S_1 endonuclease and this result has to be related to the circular dichroism study which shows that poly(dG-dC)-NQO does not exhibit an induction of the Z-form [18]. Since in this case the C-8 guanine adduct represents only about 30% of the total polymer modification [19] we can think that the role played by the adducts other than the C-8 guanine adduct in conformational modification is more important in the case of 4NQO. The characterization of the other NQO adducts is in progress in our laboratory as well as their influence on the conformation of DNA-NQO. Finally, with single-stranded DNA, the substitution with 4NQO inhibits methylation as was already found with AAF [8]. The result showing that the K_m of the enzyme is the same for single stranded DNA, modified or not, must confirm the conclusion that the enzyme is essentially sensitive to the type of the double helix.

Methylation of cytosine is the only replicational modification detected so far in DNA of higher eucaryotes. The degree of methylation of cytosine has been shown to be important in the control of gene activity, hypomethylation being associated with gene expression (reviews [20-24]). If the hypermethylation we observed *in vitro* also occurs *in vivo*, this could play an inhibitory role in gene expression.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche

Médicale (CRL Nos 82.3004 and ATP 004) and the Fondation pour la Recherche Médicale.

REFERENCES

- [1] Endo, H., Ono, T. and Sugimura, T. (1971) *Recent Results Cancer Res.* 34, 1-99.
- [2] Nagao, M. and Sugimura, T. (1976) *Adv. Cancer Res.* 23, 132-169.
- [3] Enomoto, M., Sako, K., Miller, E.C. and Miller, J.A. (1968) *Life Sci.* 17 pt II, 1025-1032.
- [4] Galiègue, S., Lecocq, G. and Loucheux-Lefebvre, M.H. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 609, 383-391.
- [5] Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B. and Loucheux-Lefebvre, M.H. (1983) *Carcinogenesis* 4, 249-254.
- [6] Bailleul, B., Galiègue, S., Loucheux-Lefebvre, M.H. (1981) *Cancer Res.* 41, 4559-4565.
- [7] Fuchs, R.P.P., Lefèvre, J.P., Pouyet, J. and Daune, M.P. (1976) *Biochemistry* 15, 3347-3351.
- [8] Pfohl-Leszkowicz, A., Salas, C.E., Fuchs, R.P.P. and Dirheimer, G. (1981) *Biochemistry* 20, 3020-3024.
- [9] Pfohl-Leszkowicz, A., Fuchs, R.P.P., Keith, G. and Dirheimer, G. (1982) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 103, 318-319.
- [10] Pfohl-Leszkowicz, A., Fuchs, R.P.P., Keith, G. and Dirheimer, G. (1983) *Recent Results Cancer Res.* 84, 193-201.
- [11] Cox, R. (1982) *Biochem. Int.* 5, 787-792.
- [12] Kay, F.R.M., Simmons, N.S. and Dounce, A.L. (1952) *J. Ann. Chem.* 74, 1724-1726.
- [13] Pfohl-Leszkowicz, A. and Dirheimer, G. (1982) *Biochimie* 64, 293-296.
- [14] Drahovsky, D. and Morris, N.R. (1971) *J. Mol. Biol.* 57, 475-489; 61, 343-356.
- [15] Galiègue, S., Bailleul, B., Loucheux-Lefebvre, M.H. and Laval, J. (1982) *Carcinogenesis* 3, 435-438.
- [16] Sage, E. and Leng, M. (1981) *Nucleic Acids Res.* 9, 1241-1250.
- [17] Sage, E. and Leng, M. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4597-4601.
- [18] Bailleul, B., Galiègue-Zouitina, S. and Loucheux-Lefebvre, M.H. (1983) *in preparation.*
- [19] Galiègue-Zouitina, S., Bailleul, B. and Loucheux-Lefebvre, M.H. (1983) *Anal. Biochem.* *in press.*
- [20] Naveh-Manly, T. and Cedar, H. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4246-4250.
- [21] Razin, A. and Friedman, J. (1981) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 25, 33-51.
- [22] Ehrlich, M. and Wang, R.Y.H. (1981) *Science* 212, 1350-1357.
- [23] Lindahl, T. (1981) *Nature* 290, 363-365.
- [24] Felsenfeld, G. and McGhee, J. (1982) *Nature* 296, 602-603.

e) Discussion

Nous avons présenté dans ce chapitre une série d'études préliminaires, qui avait pour but d'appréhender les modifications structurales de l'ADN modifié par l'Ac-4HAQO et d'essayer de les relier à la géométrie des lésions. Les résultats que nous avons obtenus fournissent quelques éléments de réponse au problème posé, mais ces études restent malgré tout incomplètes et imprécises, ceci pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, au moment où nous avons débuté ce travail de physicochimie et de reconnaissance enzymatique des lésions, la nature et la structure des principaux adduits n'était pas connue, mis à part le dGuo-C8-AQO, qui ne représente d'ailleurs que 30 % de la modification totale de l'ADN. Devant l'impossibilité d'approfondir les études physicochimiques, nous nous sommes orientés vers la détermination des autres adduits et de leurs proportions relatives sur l'ADN.

Les structures de deux autres lésions ont donc été identifiées, et ceci très récemment (voir publication n° 7). De plus, c'est également tout récemment que nous avons pu orienter la réaction en faveur d'une des lésions, soit le dGuo-C8-AQO, soit le dGuo-N2-AQO, obtenus à 80 %, soit sur le poly (dG-dC).poly(dG-dC), soit sur l'ADN. Il est en effet important de pouvoir étudier spécifiquement la géométrie de chaque lésion, si l'on veut effectuer une étude physicochimique approfondie de l'ADN modifié.

Il semble cependant qu'il existe une certaine cohésion entre nos résultats, qui ont été obtenus par des approches différentes. Nous allons essayer d'en faire une synthèse rapide.

Tout d'abord, comme nous l'avons déjà souligné, l'association de deux résultats importants tels que la détermination de l'orientation moyenne du plan de la quinoléine par rapport à l'axe de l'hélice (65° à 75°) et l'attaque notable de l'ADN modifié par l'endonucléase S_1 permettent d'émettre (tout en restant prudent) l'hypothèse de l'insertion du cancérigène dans l'ADN.

Cette insertion de la quinoléine dans la double hélice pourrait avoir lieu soit pour les deux adduits sur la guanine, soit uniquement pour le dGuo-N2-AQO, l'adduit dGuo-C8-AQO se trouvant dans le grand sillon, à l'extérieur de l'hélice. En effet, la fixation sur le C8 de la guanine, site proche de la grande gorge dans l'ADN natif et la valeur de 65° à 75° obtenue pour l'angle θ sont compatibles avec cette position externe. Par contre, la fixation sur le N² de la guanine ne semble pas compatible dans le cas du 4NQO avec

la présence du cancérrogène dans le petit sillon, proche de cet atome dans l'hélice B. GEACINTOV et al. ont en effet obtenu une valeur de θ de 30° dans le cas du benzo(a)pyrène fixé sur le N^2 de la guanine (GEACINTOV et al., 1978 ; GRUNBERGER et WEINSTEIN, 1978).

La sensibilité notable de l'ADN à l'endonucléase S_1 , suggérant l'existence d'une forte distorsion locale de la chaîne, n'est pas en contradiction avec la faible variation du dichroïsme réduit $\frac{(\Delta A)}{A}$ des bases dans l'ADN modifié (voir figure 9, p.173). En effet, la mesure du $\frac{\Delta A}{A}$ reflète la perturbation globale de la macromolécule et correspond ainsi à la moyenne des interactions d'empilement des bases (modifiées et non modifiées) dans l'ADN, alors que le test à la S_1 donne des informations sur la déformation locale de la chaîne, au niveau des lésions.

La nature de la distorsion locale induite par les lésions peut être assimilée en première analyse à une zone dénaturée, la S_1 étant spécifique des simples brins. Cependant, d'après notre étude de la méthylation de l'ADN modifié, la macromolécule semble être également un bon substrat pour la méthyltransférase, qui préfère l'ADN double brin. Afin de pouvoir trancher cette question, il faudrait déterminer si les bases sont encore appariées ou non au voisinage des lésions. Notons que dans le cas du 4NQO la fixation de la quinoléine sur le N^2 de la guanine, suivie de son insertion dans l'ADN, devrait introduire le moment dipolaire de la fonction N-oxyde profondément dans l'hélice, ceci entraînant une distorsion de la chaîne telle que la S_1 puisse la reconnaître, sans qu'il y ait réellement dénaturation.

Il serait très intéressant d'essayer de savoir si l'un des deux adduits (en C8 ou en N^2) est préférentiellement reconnu et excisé par l'endonucléase S_1 . YAMASAKI et al. (1977) ont en effet montré que dans le cas de l'AAAF, la lésion dGuo-C8-AAF était excisée préférentiellement par la S_1 , et ont associé cette reconnaissance spécifique à la distorsion locale importante induite par cette lésion dans l'ADN.

L'insertion du cancérrogène dans l'hélice B d'ADN pourrait être stabilisée par une forte interaction d'empilement du plan de la quinoléine avec le plan des bases, ceci étant à rapprocher des travaux de WINKLE et al. (1978 ; 1979) et d'ORNSTEIN et REIN (1979). Nous avons indiqué dans le bilan des études électro-optiques, p.182, une manière possible d'aborder ce problème.

De plus, il paraît important de pouvoir connaître les éventuelles contraintes des composés de substitution base-cancérogène au niveau de la liaison glycosidique. En d'autres termes, la conformation syn ou anti est-elle préférentiellement adoptée ou pas par les adduits ?

L'hypothèse que nous proposons ici n'est qu'intuitive et demande à être étayée (ou rejetée) par d'autres résultats expérimentaux. Le débat reste ainsi ouvert.

Au laboratoire, le travail d'équipe réalisé en collaboration avec Bernard BAILLEUL a permis d'aborder d'autres études physicochimiques, concernant la transition B \rightarrow Z étudiée sur le poly(dG-dC).poly(dG-dC) modifié par l'Ac-4HAQO. Une synthèse de tous les résultats obtenus au laboratoire sera faite dans les "CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES".

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 mono-acétylé 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 cancérogénèse 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 cancérogène 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 cancérogène 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 cancérogène 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 cancérogène 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 N^2 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.

B I B L I O G R A P H I E

- 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-N₂O) 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 promoter 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. & PO YET, 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 cancérrogène : 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-ZOUITINA, 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'O, 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. & RANDERATH, 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) Determination de l'importance des facteurs environnementaux dans le cancer humain : rôle de l'épidémiologie. Bull. Cancer (Paris) 64 : 365-384.
- HOGAN, M., DATTAGUPTA, N. & CROTHERS, D.M. (1978) Transient electric dichroism of rod-like DNA molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75 : 195-199.
- HOGAN, M., DATTAGUPTA, 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. (1981a) Investigating nucleic acids, nucleoproteins, polynucleotides, and their interactions with small ligands by electro-optical methods, in : Molecular electro-optics, Ed. S. Krauss, New-York, p. 363-398.
- HOWARD, P.C., CASCIANO, D.A., BELAND, F.A. & SHADDOCK, Kr.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-hydroxy-aminoquinoline-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 mutagénèse 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-hydroxyaminoquinoline 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 acetyltransferase 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 promoteur 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 B₁. *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 $\text{d}(\text{pCpG})_n \cdot \text{d}(\text{pCpG})_n$ DNA sequences from right- to left-handed helical structure by salt, Co (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-acetamidephenanthrene 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. (1979)^a 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. (1979)^b 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. (1979)^c 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-nitroquinoline 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 ben(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 B. Bailleul et moi-même.



Cette thèse a été dactylographiée et imprimée

par

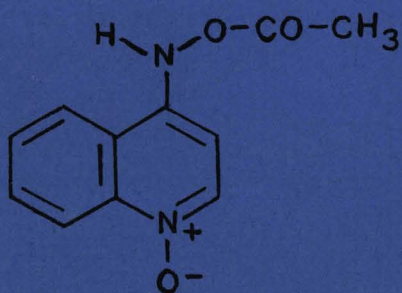
le Service Polycopie

de l'ASSOCIATION CORPORATIVE DES

ETUDIANTS EN MEDECINE DE LILLE

Le 4-nitroquinoléine 1-oxyde (4NQO) est un composé cancérigène qui, après métabolisation, se fixe de façon covalente sur les macromolécules cellulaires, en particulier l'ADN.

Un système d'étude in vitro de la cancérogénèse induite par ce composé a été élaboré, l'acétoxyaminoquinoléine 1-oxyde étant choisie comme modèle de cancérogène ultime du 4NQO.



Les principaux sites d'attaque du cancérogène sur les bases de l'ADN ont été déterminés, la guanine étant la base la plus concernée.

La perturbation structurale de l'ADN induite par ces lésions a été étudiée à l'aide de techniques physico-chimiques. L'étude de la reconnaissance des lésions par différentes enzymes a également été abordée. Un modèle rendant compte de l'interaction de l'ADN avec le cancérogène a été proposé.

Mots-clefs : CANCÉROGÉNÈSE CHIMIQUE - CANCÉROGÈNE ULTIME - DNA - QUINOLÉINE DÉRIVÉ - MÉTABOLISATION - ADDUIT MOLÉCULAIRE - STRUCTURE - ENZYME.