

N° d'ordre : 2478

THESE

Présentée pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE TOULOUSE

École doctorale : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries

Spécialité : Qualité et Sécurité des Aliments

Par Emilien JAMIN

Développement de méthodes de spectrométrie de masse
pour la caractérisation des Amines Aromatiques Hétérocycliques (AAH)
générées lors de la cuisson des aliments
et l'étude de leur réactivité vis-à-vis des bases de l'ADN

Soutenue le 14 mai 2007 devant le jury composé de :

M.	Olivier LAPREVOTE	Rapporteur
M.	Bruno LE BIZEC	Rapporteur
Mme.	Hélène BUDZINSKI	Examinatrice
M.	Alain PERIQUET	Examineur
M.	Jacques TULLIEZ	Examineur
M.	Laurent DEBRAUWER	Directeur de thèse

à mon père Emile

et ma mère Eliane

Avant-propos

Je tiens tout d'abord à remercier Olivier Laprévotte et Bruno Le Bizec d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail, ainsi que Hélène Budzinski, Alain Périquet et Jacques Tulliez pour leur présence dans ce jury de thèse.

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisés au sein de la plate-forme de chimie analytique et structurale de l'UMR1089 Xénobiotiques INRA-ENVT à Toulouse, et sous la direction de Laurent Debrauwer. Je souhaite le remercier chaleureusement pour m'avoir accompagné tout au long de ces, presque, trois ans de thèse, de m'avoir fait découvrir et apprécier les congrès scientifiques, ainsi que pour les longues soirées consenties pour pouvoir rendre cette thèse dans les temps. Je n'oublie pas également les autres longues soirées un peu moins professionnelles passées avec lui. En outre, j'ai connu deux directeurs d'unité durant mon séjour au laboratoire des xénobiotiques, Jacques Tulliez dans un premier temps, puis Jean-Pierre Cravédi, que je tiens également à remercier.

Cette thèse n'aurait pas pu être réalisée sans le soutien financier du Ministère délégué à la Recherche, sous la forme d'une allocation de recherche versée par Institut National Polytechnique (INP) de Toulouse dans le cadre de l'école doctorale Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB). De plus, je tiens remercier les deux personnes qui m'ont fait connaître l'unité des xénobiotiques et sans lesquelles je n'aurais pas postulé à cette thèse, qui sont Jean-Claude Tabet et Alain Paris. Je remercie également les membres de mon comité de pilotage : Jean-Claude Tabet, Jacques Tulliez, Maurice Rabache et Claude Beaugrand, qui se sont réunis à deux reprises pour me conseiller sur l'orientation de mes travaux.

Ces travaux n'auraient sans doute pas pu être soutenus si rapidement sans l'aide de Alexia Carrere, Delphine Arquier et Catherine Touzet qui m'ont permis par le biais de leurs stages d'avancer mes travaux d'une part, et d'apprendre à former des étudiants et à transmettre mes connaissances d'autre part.

De nombreuses personnes de l'unité des xénobiotiques m'ont également apporté un soutien scientifique, notamment Sylvie Chevolleau, Georges Delous et Nicole Gasc sur les aspects d'extractions et de séparation chromatographique, Estelle Rathahao en spectrométrie de masse, Isabelle Jouanin en synthèse organique, Cécile Canlet en RMN, Marc Audebert sur les aspects de réparation de l'ADN, Patrick Rouimi et Jean-Philippe Jaeg sur des aspects scientifiques généraux et que j'ai pu côtoyer au cours de mes nombreux

déménagements de bureau, ainsi que Delphine Bellocq qui a également réalisé une thèse sur les AAH en parallèle de la mienne.

Travailler avec la source d'ionisation MAB, c'est une expérience à vivre... Cet appareil, particulièrement capricieux, m'a presque fait perdre ma patience, mais pas suffisamment pour ne pas souhaiter le réutiliser un jour. Dans ce combat quotidien contre la machine, je remercie du fond du cœur toutes les personnes qui m'ont soutenu et particulièrement Claude Beaugrand et Jérémie Ponthus qui nous ont apporté leur aide dans la résolution des problèmes techniques.

Plusieurs de mes résultats ont été obtenus au sein de laboratoires extérieurs. A ce titre, je remercie Nathalie Martins et Eric Leroy du service commun de spectrométrie de masse FR2599, de l'Université Paul Sabatier de Toulouse, dirigé par Catherine Claparols pour les analyses en impact électronique et en ionisation chimique. De même, je remercie Estelle Rathahao de l'UMR0214-IAQA Laboratoire de Chimie Analytique INRA/INA Paris-Grignon, ainsi que Denis Lesage de l'UMR7613 LSCOB de l'Université Paris 6, dirigée par Jean-Claude Tabet pour les analyses sur le spectromètre de masse LTQ-Orbitrap®.

Je souhaite également remercier toutes les personnes de l'unité des xénobiotiques que je n'ai pas encore cités et qui ont participé à mon épanouissement au sein de ce laboratoire, en particulier Julian, mon seul compatriote thésard masculin. Je tiens tout particulièrement à remercier Pierre Guénot qui m'a fait découvrir la spectrométrie de masse et qui ma transmis sa passion il y a quelques années. De même, je remercie particulièrement mes parents qui ont accepté mes absences et mes silences prolongés durant mes études réalisées dans des villes éloignées de ma Vendée natale, et qui m'ont permis d'arriver là où j'en suis à ce jour.

Enfin, je tiens à remercier ma merveilleuse Céline pour tout ce qu'elle a fait et accepté pour moi et ma thèse, en particulier durant les derniers mois.

- Sommaire -

Sommaire

Introduction Générale	1
Chapitre 1 : Contexte scientifique de l'étude des amines aromatiques hétérocycliques	7
I <u>Présentation des amines aromatiques hétérocycliques</u>	9
I. 1 Structure des AAH	9
I. 2 Activité mutagène des AAH	12
I. 3 Propriétés cancérigènes des AAH	14
I. 4 Evaluation de l'activité cancérigène des AAH chez l'Homme	15
II <u>Formation et quantités des AAH dans les viandes cuites</u>	17
II. 1 Mécanismes de formation des AAH	17
II. 2 Facteurs influençant la formation d'AAH dans les viandes cuites	20
II. 3 Niveaux d'exposition aux AAH dans les viandes cuites	23
III <u>Méthodologies de quantification des AAH dans les viandes cuites</u>	26
III. 1 Méthodes de calibration	26
III. 2 Protocoles d'extraction et de purification	27
III. 3 Méthodes de séparation et de détection des AAH	31
IV <u>Conclusion et problématique de la quantification des AAH</u>	40
V <u>Activation métabolique et génotoxicité des AAH</u>	41
V. 1 Métabolisme des AAH	41
V. 2 Adduits covalents formés avec les bases de l'ADN	44
V. 3 Génotoxicité des AAH	48
V. 3. a <i>Mécanismes conduisant à l'apparition de mutations : la mutagenèse</i>	49
V. 3. b <i>Mécanismes entraînant l'apparition de cancer : la cancérogenèse</i>	50
V. 3. c <i>Conséquences de la formation des adduits entre les AAH et les bases de l'ADN</i>	50
VI <u>Méthodes analytiques d'étude des adduits à l'ADN</u>	53
VI. 1 Détection et quantification des adduits covalents	53
VI. 1. a <i>Méthodes analytiques de détection des adduits covalents</i>	53
VI. 1. b <i>Quantités d'adduits formés entre les AAH et les bases de l'ADN</i>	57
VI. 2 Analyse par spectrométrie de masse des oligonucléotides modifiés	58
VII <u>Conclusion et problématique de l'étude de la génotoxicité des AAH</u>	62
Bibliographie	64

Chapitre 2 : Application de la spectrométrie de masse avec ionisation par bombardement d'atomes métastables pour la caractérisation des AAH dans les viandes cuites	77
I <u>Présentation de l'étude</u>	79
II <u>Présentation de l'ionisation par Bombardement d'Atomes Métastables (MAB)</u>	80
II. 1 Formation des espèces métastables	80
II. 2 Ionisation par bombardement d'atomes métastables	81
II. 3 Instrumentation	84
III <u>Démarche scientifique et instrumentale</u>	88
III. 1 Caractérisation des AAH par spectrométrie de masse Py-MAB-ToF	89
III. 2 Quantification des AAH par Py-MAB-ToF dans des viandes cuites	90
III. 3 Quantification des AAH par LC-MS/MS dans les viandes cuites	92
IV <u>Conclusions et perspectives</u>	96
V <u>Article 1 : Assessment of metastable atom bombardment (MAB) ionization mass spectrometry for the fast determination of heterocyclic aromatic amines in cooked meat</u>	99
VI <u>Article 2 : Dosage par LC-APCI-MS/MS des amines aromatiques hétérocycliques formées lors de la cuisson des viandes</u>	113
Chapitre 3 : Etude de la formation des adduits covalents entre les désoxynucléosides et les amines aromatiques hétérocycliques	131
I <u>Présentation de l'étude</u>	133
II <u>Démarche scientifique et instrumentale</u>	135
II. 1 Synthèses chimiques des adduits désoxynucléosides – AAH	135
II. 2 Analyses par LC-MS ⁿ des adduits désoxynucléosides – AAH	136
II. 3 Caractérisation structurale des adduits désoxynucléosides – AAH	138
III <u>Conclusions et perspectives</u>	140
IV <u>Article 3 : New insights in the formation of deoxynucleoside adducts with 2-amino-6-phenylimidazo[4,5-<i>b</i>]pyridine (PhIP) and 2-amino-3-methyl-3<i>H</i>-imidazo[4,5-<i>f</i>]quinoline (IQ)</u>	143

Chapitre 4 : Etude de la formation des adduits covalents entre des oligonucléotides modèles et les amines aromatiques hétérocycliques	165
I <u>Présentation de l'étude</u>	167
II <u>Démarche scientifique et instrumentale</u>	168
II. 1 Synthèses chimiques des adduits oligonucléotides – AAH	169
II. 2 Analyses par LC-MS/MS des adduits oligonucléotides – AAH	169
II. 3 Localisation de l'adduit sur la séquence oligonucléotidique	170
II. 4 Développement d'un programme d'attribution des fragments des oligonucléotides	170
II. 5 Comparaison des taux de modification des oligonucléotides	173
II. 6 Analyse d'adduits supplémentaires générés entre les AAH et les oligonucléotides	174
II. 7 Identification des adduits générés avec les oligonucléotides	175
III <u>Conclusions et perspectives</u>	180
IV <u>Article 4 : Mass spectrometric investigation of the sequence selectivity for adduction of Heterocyclic Aromatic Amines with oligonucleotides</u>	185
Conclusion Générale	203
Annexes	209
1 Concentrations des AAH quantifiées dans des viandes cuites	211
2 Spectres de masse Py-MAB-ToF de IQ	219
3 Spectre de masse EI (70eV) de IQ	221
4 Abréviations	223

Liste des Tableaux et Figures

Chapitre 1 : Contexte scientifique de l'étude des amines aromatiques hétérocycliques.

Tableau 1.	Liste des AAH appartenant à la famille des carbolines.	10
Tableau 2.	Liste des AAH appartenant à la famille des quinolines.	10
Tableau 3.	Liste des AAH appartenant à la famille des quinoxalines.	11
Tableau 4.	Liste des AAH appartenant à la famille des pyridines.	11
Tableau 5.	Liste des AAH appartenant aux autres types de structures.	12
Tableau 6.	Activité mutagène dans <i>S. typhimurium</i> d'AAH et de substances cancérigènes.	13
Tableau 7.	Cancers induits par les AAH chez les animaux de laboratoire.	15
Tableau 8.	Exemples de colonnes HPLC utilisées pour la caractérisation des AAH.	33
Tableau 9.	Quantités minimales et maximales d'adduits présents dans des organes d'animaux de laboratoire exposés aux AAH.	55
Figure 1.	Noms, abréviations et structures des aminophényl-β-carbolines.	13
Figure 2.	Mécanisme de formation de norharman à partir du tryptophane.	17
Figure 3.	Mécanisme de formation des quinolines et quinoxalines.	18
Figure 4.	Schéma global de formation de la pyrazine par la réaction de Maillard.	19
Figure 5.	Autre mécanisme proposé pour la formation des quinolines et quinoxalines.	19
Figure 6.	Mécanisme de formation de PhIP à partir de phénylalanine et de créatinine.	20
Figure 7.	Cinétiques de formation de IQx et MeIQx.	21
Figure 8.	Concentrations moyennes des AAH dosées dans la viande cuite de poulet, bœuf, poisson et porc.	25
Figure 9.	Concentrations moyennes des AAH dosées dans la viande cuite de dinde, agneau, bacon et saucisses/merguez.	25
Figure 10.	Protocoles d'extraction et de purification des AAH dans les viandes cuites, proposés par Gross (a) , Gross et Grüter (b) , Perfetti (c) et Messner (d) .	30
Figure 11.	Schéma de la source ESI et principe de l'ionisation/désorption par Electrospray.	36
Figure 12.	Schéma de la source APCI et principe de l'ionisation par APCI.	37
Figure 13.	Principales voies métaboliques des AAH chez l'animal et l'Homme.	42
Figure 14.	Voies métaboliques suivies par les <i>N</i> -hydroxylamines conduisant à la formation d'adduits covalents avec les bases de l'ADN.	43
Figure 15.	Structures des espèces constituant l'ADN.	45
Figure 16.	Mécanismes induits par la formation d'adduits dG-N7 : la dépurination (a) , la formation de lésions FAPy (b) et le réarrangement en adduit dG-C8 (c) .	46
Figure 17.	Structures des adduits formés entre les AAH et les bases de l'ADN.	48
Figure 18.	Stratégie générale d'isolement des adduits à l'ADN avant leur détection.	53
Figure 19.	Méthodologie générale de l'analyse d'adduits par postmarquage au ³² P.	54

Figure 20.	Mécanisme proposé pour la fragmentation d'un désoxynucléoside modifié conduisant à la perte du désoxyribose.	57
Figure 21.	Nomenclature des fragments des oligonucléotides selon McLuckey.	58
Figure 22.	Mécanismes de formation des fragments [M-B], w, a et (a-B) proposés par McLuckey (a) , Rodgers (b) , Barry (c) , Bartlett (d) et Wan (e) .	61

Chapitre 2 : Application de la spectrométrie de masse avec ionisation par bombardement d'atomes métastables pour la caractérisation des AAH dans les viandes cuites.

Tableau 1.	Caractéristiques des états métastables des gaz rares et de l'azote moléculaire utilisables pour l'ionisation MAB.	81
Tableau 2.	Paramètres utilisés pour maintenir un plasma d'atomes métastables.	87
Tableau 3.	Valeurs d'énergie d'ionisation de différents composés constituant la structure des AAH étudiées.	89
Tableau 4.	Ions fragments observés sur les spectres MS/MS des AAH avec un analyseur triple quadripolaire associé à une source d'ionisation APCI en mode positif.	93
Tableau 5.	Quantités d'AAH en ng/g mesurées par LC-MS/MS et Py-MAB-ToF dans deux échantillons de filets de poulet cuits.	96
Figure 1.	Processus d'ionisation Penning d'une molécule BC par une espèce métastable A*.	82
Figure 2.	Schéma du spectromètre de masse Py-MAB-ToF.	85
Figure 3.	Schéma de la canne de pyrolyse modifiée.	86
Figure 4.	Schéma de la source d'ionisation du spectromètre de masse Py-MAB-ToF.	87
Figure 5.	Visualisation du spectromètre de masse Py-MAB-ToF en fonctionnement.	87
Figure 7.	Spectres de masse Py-MAB-ToF N ₂ d'un échantillon de filet de poulet cuit au four micro-ondes, surchargé en AAH (a) et non surchargé (b) .	92

Chapitre 3 : Etude de la formation des adduits covalents entre les désoxynucléosides et les amines aromatiques hétérocycliques.

Tableau 1.	Liste des adduits observés entre les désoxynucléosides et PhIP ou IQ.	140
Figure 1.	Structures de PhIP et IQ.	134
Figure 2.	Schémas de synthèse des adduits entre les désoxynucléosides et PhIP (a) ou IQ (b) .	136
Figure 3.	Schéma du spectromètre de masse LCQ [®] .	138
Figure 4.	Schéma du spectromètre de masse hybride LTQ-Orbitrap [®] .	138

Chapitre 4 : Etude de la formation des adduits covalents entre des oligonucléotides modèles et les amines aromatiques hétérocycliques.

Tableau 1.	Nature des ions fragments issus d'oligonucléotides dont les rapports m/z sont calculés et comparés par le programme d'attribution.	171
Figure 1.	Séquences utilisées pour l'étude de l'effet de la base voisine de la modification sur la formation de l'adduit.	168
Figure 2.	Page de saisie des données du programme d'attribution.	172
Figure 3.	Page de propositions d'attribution des fragments observés.	172
Figure 4.	Page de liste des ions observés.	173
Figure 5.	Spectre MS/MS de l'ion précurseur $[M-3H]^{3-}$ généré par Electrospray négatif à partir de $5'TTTTTA(IQ)TTTTTT3'$.	175
Figure 6.	Spectres MS/MS des ions précurseurs $[M-3H]^{3-}$ (a) et $[M-4H]^{4-}$ (b) de l'oligonucléotide $5'TTTTTG(PhIP)TTTTTT3'$, ainsi que $[M-5H]^{5-}$ de l'oligonucléotide $5'TTTTGTTTTTT3'$ (c) .	177
Figure 7.	Comparaison des spectres MS^3 des ions précurseurs tétrachargés de l'oligonucléotide $5'TTTTTG(PhIP)TTTTTT3'$ (a) et de l'adduit dG-C8-PhIP (b) .	178
Figure 8.	Chromatogrammes obtenus à partir de l'oligonucléotide $5'TTTTTCGTTTTT3'$ modifié par IQ.	179
Figure 9.	Taux de modification des oligonucléotides modèles modifiés par IQ (a) et PhIP (b) en fonction de la nature de la base côté 5' et 3' permettant la comparaison des effets de C et A par rapport à T, ainsi que l'effet de G par rapport à T.	180

Annexe 1 : Concentrations des AAH quantifiées dans les viandes cuites.

Tableau 1.	Concentrations des AAH mesurées dans de la viande cuite de poulet.	211
Tableau 2.	Concentrations des AAH mesurées dans de la viande cuite de bœuf.	212
Tableau 3.	Concentrations des AAH mesurées dans de la viande cuite de porc.	215
Tableau 4.	Concentrations des AAH mesurées dans de la viande cuite de poisson.	216
Tableau 5.	Concentrations des AAH mesurées dans de la viande cuite de dinde.	217
Tableau 6.	Concentrations des AAH mesurées dans de la viande cuite d'agneau.	217
Tableau 7.	Concentrations des AAH mesurées dans du bacon.	218
Tableau 8.	Concentrations des AAH mesurées dans des saucisses et merguez cuites.	218

Liste des Communications Scientifiques

Articles parus ou à paraître dans des journaux internationaux à comité de lecture

- Assessment of metastable atom bombardment (MAB) ionization mass spectrometry for the fast determination of heterocyclic aromatic amines in cooked meat.
Jamin Emilien, Chevolleau S., Touzet C., Tulliez J., Debrauwer L.
Anal. Bioanal. Chem., **387** (2007) 2931-2941. 99
- Dosage par LC-APCI-MS/MS des amines aromatiques hétérocycliques formées lors de la cuisson des viandes.
 Chevolleau S., Touzet C., Jamin Emilien, Tulliez J., Debrauwer L.
Science des Aliments, à soumettre. 113
- New insights in the formation of deoxynucleoside adducts with 2-amino-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) and 2-amino-3-methyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ).
Jamin Emilien L., Arquier D., Canlet C., Rathahao E., Tulliez J., Debrauwer L.
J. Am. Soc. Mass Spectrom., (2007) soumis. 143
- Mass spectrometric investigation of the sequence selectivity for adduction of heterocyclic aromatic amines with oligonucleotides.
Jamin Emilien L., Arquier D., Tulliez J., Debrauwer L.
Rapid Commun. Mass Spectrom., à soumettre. 185

Communications orales

- Amines Aromatiques Hétérocycliques et adduits à l'ADN : études de réactivité à partir de systèmes modèles.
Jamin Emilien, Arquier D., Tulliez J., Debrauwer L.
5ème Journée de Spectrométrie de Masse en Midi-Pyrénées, (2006) Toulouse, France.
- Evaluation de l'ionisation par Bombardement d'Atomes Métastables (MAB) pour une caractérisation rapide des Amines Aromatiques Hétérocycliques générées lors de la cuisson des viandes.
Jamin Emilien, Tulliez J., Debrauwer L.
XIèmes RCJSM, (2006) Carcans-Maubuisson, France.

- Spectrométrie de masse pour caractériser les amines aromatiques hétérocycliques générées lors de la cuisson des viandes et étudier leur réactivité vis-à-vis de l'ADN.
Jamin Emilien, Tulliez J., Debrauwer L.
Journée thématique de l'école doctorale SEVAB, (2005) Toulouse, France.

Communications par affiches

- Heterocyclic Aromatic Amines and DNA Adducts: Investigation of Reactivity from Model Systems.
Jamin Emilien, Arquier D., Tulliez J., Debrauwer L.
55th ASMS Conference, (2007) Indianapolis, In, USA.
- Analyse rapide des Amines Aromatiques Hétérocycliques (AAH) dans les viandes cuites : approche qualitative et quantitative par Py-MAB-ToF-MS.
Jamin Emilien, Tulliez J., Debrauwer L.
5ème Journée de Spectrométrie de Masse en Midi-Pyrénées, (2006) Toulouse, France.
- Développement d'une méthode LC-APCI-MS/MS pour le dosage d'amines aromatiques hétérocycliques dans les viandes cuites.
Chevolleau S., Touzet C., Jamin Emilien, Tulliez J., Debrauwer L.
5ème Journée de Spectrométrie de Masse en Midi-Pyrénées, (2006) Toulouse, France.
- Evaluation de l'ionisation MAB pour une caractérisation rapide des Amines Aromatiques Hétérocycliques (AAH) dans les viandes cuites.
Jamin Emilien, Tulliez J., Debrauwer L.
23èmes JFSM, (2006) Nantes, France.
- Quantification par LC-APCI-MS/MS des Amines Aromatiques Hétérocycliques formées dans les viandes lors de la cuisson.
Chevolleau S., Touzet C., Jamin Emilien, Tulliez J., Debrauwer L.
23èmes JFSM, (2006) Nantes, France.
- Metastable Atom Bombardment ionization (MAB) for a fast characterization of Heterocyclic Aromatic Amines in cooked meats.
Jamin Emilien, Tulliez J., Debrauwer L.
17th IMSC, (2006) Prague, République Tchèque.
- Comparaison de différents modes d'ionisation en spectrométrie de masse pour la caractérisation d'amines aromatiques hétérocycliques (AAH).
Jamin Emilien, Tulliez J., Debrauwer L.
1er SCBA, (2005) Montpellier, France.

- Introduction Générale -

Introduction générale

L'exposition de l'Homme à une multitude de substances chimiques est aujourd'hui l'objet de toutes les suspicions en matière d'effets néfastes sur la santé. Parmi ces substances chimiques, on mentionnera celles contaminant notre environnement du fait de l'industrialisation et des rejets qu'elle engendre, des produits mis en œuvre dans les nouvelles technologies et dont la toxicité n'a jamais été évaluée, des résidus de produits phytosanitaires utilisés pour maîtriser et/ou améliorer les productions agricoles, ou encore des produits que l'on retrouve dans les denrées alimentaires (microconstituants, toxiques naturels ou résidus d'additifs à l'alimentation animale). Cette prise de conscience de ce que l'on appelle « la sécurité des aliments et environnementale » dans les pays développés se traduit par des inquiétudes de la part des consommateurs bien souvent relayées par des médias complaisants.

Chaque année en France, le cancer est aujourd'hui responsable d'environ 150000 décès et de 280000 nouveaux cas, constituant ainsi la première cause de mortalité pour l'homme et la deuxième chez la femme. Une grande part de ces cas correspond à des cancers induits, ou dont le développement a été favorisé, par la consommation de tabac, d'alcool ou par l'exposition à des polluants atmosphériques aux potentialités cancérogènes. En revanche, le lien avec la présence de contaminants dans notre alimentation est beaucoup plus délicat, et s'il est aujourd'hui l'objet de bien des controverses il nécessite des travaux approfondis.

Outre l'exposition aérienne, l'alimentation représente également une voie importante d'ingestion de substances susceptibles de présenter un risque en termes de toxicité pour le consommateur. L'origine de ces substances présentes dans l'alimentation est de deux types. L'aliment peut être contaminé par des substances chimiques comme les pesticides, les phtalates (constituants de plastiques présents dans les emballages), ainsi que toutes les substances domestiques ou industrielles qui peuvent se retrouver dans les cultures ou les animaux d'élevage via l'atmosphère ou l'eau (métaux lourds, dioxines, retardateurs de flamme, etc.) et qui en fonction de leurs propriétés physicochimiques peuvent se concentrer tout au long de la chaîne alimentaire. De même, l'aliment peut être contaminé par des toxines naturelles telles que les mycotoxines. Néanmoins, il est possible de parvenir à limiter la présence de ces contaminants par une maîtrise efficace des conditions conduisant à leur formation, et la mise en place d'une législation stricte et de contrôles sévères (diminution des rejets industriels ou plans de contrôles de résidus de pesticides dans les fruits et légumes

par exemple). Les produits néoformés constituent une autre classe importante de substances présentes dans l'alimentation. Ces produits sont formés lors des processus de transformation des aliments à partir de leurs constituants. Parmi ces produits néoformés, on mentionnera les hydrocarbures aromatiques polycycliques, mais aussi une quantité de produits issus de la réaction de Maillard parmi lesquels on trouve l'acrylamide et les amines aromatiques hétérocycliques. La maîtrise de la présence et de la teneur de ces substances dans nos aliments est plus problématique que pour les contaminants alimentaires en raison d'une part de leur origine liée aux constituants même de l'aliment, et d'autre part du fait qu'ils sont souvent produits lors de la préparation des repas chez le consommateur lui-même.

Les amines aromatiques hétérocycliques (AAH), sont des produits néoformés présents dans les denrées animales, qui ont été découvertes à la fin des années 70. Elles apparaissent lors des processus de cuisson à partir de substances naturellement présentes dans les muscles de mammifères ou de poissons comme les acides aminés, les sucres et la créatine ou la créatinine. L'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer les a classées comme cancérigènes possibles et probables pour l'Homme dès les années 1980 (groupes 2A et 2B), en raison des propriétés mutagènes et cancérigènes importantes chez les animaux de laboratoire. En outre, nous sommes continuellement exposés à ces substances, puisque selon les chiffres de l'organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) en 2006, les habitants des pays développés consomment environ 77 kg de viande par an et par personne. C'est pourquoi, un très grand nombre de travaux a concerné l'étude des AAH durant ces 25 dernières années. Les premières études se sont essentiellement concentrées sur la caractérisation des propriétés génotoxiques des AAH à partir de modèles expérimentaux comme les animaux de laboratoires ou les bactéries. Désormais les études menées sur les AAH se focalisent sur l'Homme afin de tenter de corréler les observations réalisées chez les animaux de laboratoires avec des effets possibles chez l'Homme. Par ailleurs, pour essayer de limiter l'exposition aux AAH, des travaux à caractères technologiques sont à développer. La réalisation de tels objectifs nécessite de disposer d'outils permettant d'une part de mieux estimer les quantités d'AAH présentes dans les viandes et d'autre part de développer des travaux relatifs aux mécanismes biologiques impliqués dans le mode d'action des AAH.

Les connaissances actuelles concernant les AAH indiquent que ces composés sont formés par des mécanismes radicalaires et la réaction de Maillard au cours de la cuisson de toutes les viandes et s'y retrouvent à des concentrations très variables mais extrêmement faibles (quelques ng/g de viande cuite). De nombreux paramètres peuvent influencer les quantités d'AAH formées, ce qui complique l'estimation précise du niveau d'exposition du

consommateur. Suite à leur absorption via l'alimentation, certaines voies métaboliques peuvent activer les AAH sous forme de composés réactifs vis-à-vis des bases de l'ADN conduisant à la formation d'adduits covalents. Il est très probable que la formation de ces adduits soit à l'origine des propriétés mutagènes et cancérigènes des AAH observées. Cependant, les mécanismes précis de formation des adduits ainsi que la corrélation entre les niveaux d'adduits formés et l'induction de tumeurs restent relativement mal connus. Il reste donc important de pouvoir développer des méthodologies analytiques permettant d'une part une détermination simple et rapide des niveaux d'AAH formées dans différentes viandes cuites pour une meilleure évaluation de l'exposition du consommateur et d'autre part la caractérisation des adduits à l'ADN formés par les AAH pour contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes d'initiation de cancers par ces molécules.

Dans ce contexte, les travaux de cette thèse ont été menés selon deux axes de recherche distincts, qui ont tous deux concerné le développement de méthodologies analytiques basées sur l'utilisation de la spectrométrie de masse afin d'obtenir des outils performants en vue de mieux répondre aux questions posées par les AAH. Ce manuscrit est divisé en quatre chapitres. Le premier chapitre est une synthèse bibliographique présentant les différentes AAH connues à ce jour, leur(s) mécanisme(s) de formation ainsi que l'état de l'art actuel sur les méthodes analytiques utilisées pour leur dosage. Dans une deuxième partie de ce chapitre, les propriétés mutagènes et cancérigènes des AAH sont décrites et une partie importante est consacrée à la présentation des méthodes analytiques, impliquant principalement la spectrométrie de masse, permettant la caractérisation des adduits aux bases de l'ADN formés à partir de composés génotoxiques en général, et des AAH en particulier.

Le premier axe de recherche de notre travail a concerné l'évaluation d'une instrumentation prototype de spectrométrie de masse pour caractériser de manière plus simple et plus rapide les AAH présentes dans des viandes cuites. Pour cela, la propriété d'ionisation sélective du mode d'ionisation par bombardement d'atomes métastables (MAB) a été utilisée pour l'analyse directe des AAH présentes dans des extraits de filets de poulet cuits, en s'affranchissant au maximum des étapes préalables de purification, concentration et séparation chromatographique, diminuant ainsi considérablement le temps d'analyse. En parallèle, un protocole de dosage basé sur l'analyse d'extraits purifiés de viandes cuites par couplage entre la chromatographie liquide et la spectrométrie de masse, a été développé afin de valider les résultats obtenus par la méthode utilisant l'ionisation MAB. Les résultats des travaux effectués dans le cadre de ce premier axe sont développés dans le chapitre 2 de ce mémoire. Le second axe de recherche a quant à lui concerné l'étude par spectrométrie de

masse de la formation des adduits covalents entre les AAH et les bases de l'ADN. A partir de deux AAH sélectionnées, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'étude de la formation des adduits AAH-désoxynucléosides afin de mettre en place des procédures de micro-synthèse chimique des adduits et d'obtenir des espèces modèles pour la suite de notre travail. Cette étude, exposée dans le chapitre 3, a été réalisée de manière systématique pour rechercher d'éventuels adduits inconnus. Tous les adduits formés ont été identifiés par la caractérisation de leur structure par spectrométrie de masse en tandem et résonance magnétique nucléaire lorsque les quantités d'adduits formées le permettaient. Dans un deuxième temps, la formation des adduits avec des oligonucléotides modèles a été étudiée afin de caractériser l'influence de l'environnement local de la base modifiée sur la formation des adduits. Ceci fait l'objet du quatrième et dernier chapitre de ce manuscrit. Nous nous sommes intéressés à la caractérisation de l'influence de la base voisine du site modifié sur la formation de l'adduit, afin d'apporter de nouveaux éléments dans la compréhension de la sélectivité de séquence observée pour les mutations induites par certaines AAH.

- Chapitre 1 -

**Contexte scientifique de l'étude des amines aromatiques
hétérocycliques.**

I Présentation des amines aromatiques hétérocycliques

Les premières études concernant les amines aromatiques hétérocycliques remontent à 1939, lorsqu'il a été démontré qu'un extrait de viande cuite de cheval induisait l'apparition de tumeurs dans les glandes mammaires de la souris [1]. Ces études ont été reprises dans les années 70 par l'équipe de Takashi Sugimura, actuellement président émérite du National Cancer Institute japonais, qui a découvert en 1975-1977 que la fumée issue de la cuisson d'aliments protéiques était mutagène [2]. En réalité, la majorité des substances mutagènes ne se trouvait pas dans la fumée de cuisson mais dans les parties carbonisées du poisson ou de la viande [3]. Suite à la confirmation de cette découverte en 1978 [4] et à la caractérisation de l'activité mutagène des pyrolysats de protéines et d'acides aminés [5, 6], la communauté scientifique s'est alors intéressée à l'étude des substances responsables du caractère mutagène, voire cancérigène, de la viande cuite dans des conditions normales de temps et de température.

I. 1 Structure des AAH

Les substances responsables des propriétés mutagènes de la viande cuite ont été identifiées après leur isolement à partir de pyrolysats de protéines et d'acides aminés. Toutes ces substances possèdent une structure aromatique hétérocyclique et une fonction amine primaire. Elles ont donc été appelées Amines Aromatiques Hétérocycliques (AAH ou HAAs en anglais) ou Amines Hétérocycliques (HCAs). A ce jour, environ trente AAH ont pu être caractérisées et sont classées selon leurs familles structurales [7, 8, 9, 10]. Les premières AAH identifiées ont été les pyridoimidazoles et les pyridoindoles que l'on classe dans la famille des amino-carbolines, elles mêmes divisées en α -carbolines (A α C et MeA α C), β -carbolines (H et NH), δ -carbolines (Glu-P-1 et Glu-P-2) et γ -carbolines (Trp-P-1 et Trp-P-2) [11] et dont les structures sont rappelées dans le Tableau 1. Les γ -carbolines ont été les deux premières AAH découvertes dans des pyrolysats de tryptophane [12]. Les autres familles structurales d'AAH sont les quinolines (Tableau 2), les quinoxalines (Tableau 3), et les pyridines (Tableau 4) dont fait partie PhIP découverte dans la viande de bœuf en 1986 [13] et qui représente actuellement l'AAH la plus étudiée. Enfin d'autres types de structures minoritaires ont également été décrits et sont reportés dans le Tableau 5.

Tableau 1. Liste des AAH appartenant à la famille des carbolines.

Abréviation	Nom chimique	Structure
A α C	2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole	
MeA α C	2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole	
H	1-methyl-9H-pyrido[4,3-b]indole	
NH	9H-pyrido[4,3-b]indole	
Glu-P-1	2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole	
Glu-P-2	2-aminodipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole	
Trp-P-1	3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole	
Trp-P-2	3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole	

Tableau 2. Liste des AAH appartenant à la famille des quinolines.

Abréviation	Nom chimique	Structure
IQ	2-amino-3-methyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoline	
MeIQ	2-amino-3,4-dimethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoline	

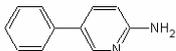
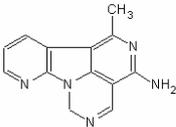
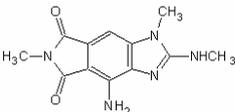
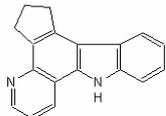
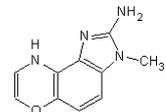
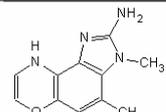
Tableau 3. Liste des AAH appartenant à la famille des quinoxalines.

Abréviation	Nom chimique	Structure
IQx	2-amino-3-méthyl-3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxaline	
MelQx	2-amino-3,8-diméthyl-3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxaline	
4-MelQx	2-amino-3,4-diméthyl-3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxaline	
4,8-DiMelQx	2-amino-3,4,8-triméthyl-3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxaline	
7,8-DiMelQx	2-amino-3,7,8-triméthyl-3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxaline	
TriMelQx	2-amino-3,4,7,8-tétraméthyl-3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxaline	
4-CH ₂ OH-8-MelQx	2-amino-4-hydroxyméthyl-3,8-diméthyl-3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxaline	
7,9-DiMelgQx	2-amino-4,7,9-triméthyl-1 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>g</i>]quinoxaline	

Tableau 4. Liste des AAH appartenant à la famille des pyridines.

Abréviation	Nom chimique	Structure
PhIP	2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine	
DMIP	2-amino-1,6-diméthyl-1 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine	
1,5,6-TMIP	2-amino-1,5,6-triméthyl-1 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine	
3,5,6-TMIP	2-amino-3,5,6-triméthyl-1 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine	
IFP	2-amino-3,7,8-triméthyl-3 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxaline	
4'-OH-PhIP	2-amino-1-méthyl-6-(4-hydroxyphényl)-1 <i>H</i> -imidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine	

Tableau 5. Liste des AAH appartenant aux autres types de structures.

Abréviation	Nom chimique	Structure
Phe-P-1	2-amino-5-phenylpyridine	
Orn-P-1	4-amino-6-methyl-1H-2,5,10,10b-tetraazafluoranthene	
Cre-P-1	4-amino-1,6-dimethyl-2-methylamino-1H,6H-pyrrolo[3,4-f]benzimidazole-5,7-dione	
Lys-P-1	3,4-cyclopentenopyrido[3,2-a]carbazole	
	2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]-4H-1,4-benzoxazine	
	2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]-4H-1,4-benzoxazine	

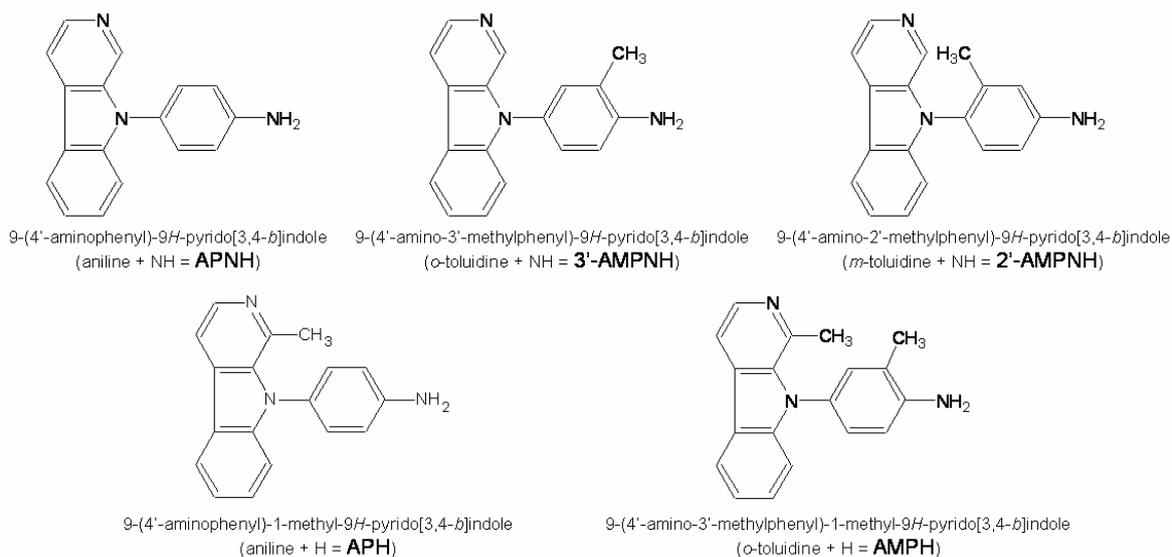
I. 2 Activité mutagène des AAH

L'intérêt porté aux AAH a été principalement causé par leur fort caractère mutagène, supérieur pour plusieurs d'entre elles à celui de substances cancérigènes connues comme l'indiquent les données présentées dans le Tableau 6 [7] où l'on peut voir que l'activité mutagène de IQ est mille fois plus élevée que celle du benzo[a]pyrene, l'un des hydrocarbures aromatiques polycycliques les plus génotoxiques. Ces activités mutagènes ont été obtenues par la méthode de Ames [14], notamment en cultivant une souche de *Salmonella typhimurium*, en présence d'une fraction subcellulaire hépatique (S9) contenant les enzymes de biotransformations cytosoliques et membranaires qui sont impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques. Cette méthode permet de mesurer l'activité mutagène d'une substance en observant le taux de survie de la bactérie cultivée en présence de la substance étudiée. Les souches de bactéries utilisées portent des mutations sur les gènes nécessaires à la synthèse de l'histidine et sont par conséquent dépendantes d'un apport extérieur d'histidine. La culture de ces bactéries se fait dans un milieu contenant la substance à étudier, un mélange d'enzymes pour stimuler le métabolisme, mais ne contenant pas d'histidine. Ainsi, les bactéries doivent subir des mutations induites par la substance étudiée pour pouvoir survivre sans apport d'histidine et le nombre de bactéries survivantes sera d'autant plus élevé que le taux de mutations sera important.

Tableau 6. Activité mutagène dans *S. typhimurium* d'AAH et de substances cancérigènes [7].

AAH	Survivants/ μg	Cancérigène	Survivants/ μg
		1,8-dinitropyrene	94000
MelQ	661000		
IQ	433000		
		1,6-dinitropyrene	230000
4,8-DiMelQx	183000		
7,8-DiMelQx	163000		
MelQx	145000		
Trp-P-2	104200		
4-CH ₂ OH-8-MelQx	99000		
IQx	75000		
Orn-P-1	56800		
Glu-P-1	49000		
		2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acryamide AF-2	42000
Trp-P-1	39000		
		aflatoxine B1	28000
Cre-P-1	19000		
Glu-P-2	1900		
PhIP	1800		
		<i>N</i> -methyl- <i>N</i> '-nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidine	870
7,9-DiMelgQx	670		
		benzo[<i>a</i>]pyrene	660
A α C	300		
MeA α C	200		
Phe-P-1	41		
4'-OH-PhIP	2		
		<i>N,N</i> -diméthylnitrosamine	0,23

Il est également important de noter que deux β -carbolines (harman (H) et norharman (NH), voir Tableau 1) ne sont pas mutagènes avec le test de Ames, mais le deviennent lorsqu'elles sont mises en présence d'aniline ou d'isomères de la toluidine [15, 16] en formant des espèces appelées aminophényl- β -carbolines, dont les structures sont schématisées dans la Figure 1.

**Figure 1.** Noms, abréviations et structures des aminophényl- β -carbolines.

Les relations entre l'activité mutagène des AAH et leur structure ont également été étudiées [17]. Les approches quantitatives de relations structure-activité (QSAR) réalisées à partir de 80 amines de structures différentes, ont montré une forte influence de la taille du système aromatique d'électrons π , et une faible influence du moment dipolaire et de la stabilité théorique de l'ion nitrénium qui est impliqué dans les mécanismes de bioactivation des AAH et que l'on détaillera ultérieurement. De plus, une influence positive de la présence d'un groupement méthyle sur un cycle azoté et une influence négative de l'énergie de l'orbitale moléculaire inoccupée de plus basse énergie (LUMO) de l'amine aromatique ont été décrites [18].

I. 3 Propriétés cancérigènes des AAH

Parmi toutes les AAH connues, dix d'entre elles ont été synthétisées en quantités suffisantes pour permettre leur administration à des rongeurs. Toutes les AAH testées ont induit des cancers de nombreux tissus chez le rat et la souris (Tableau 7). Selon les études considérées dans le Tableau 7, les doses d'AAH administrées varient entre 0,1 et 0,6 mg/g d'aliment et les durées d'exposition s'échelonnaient de 48 à 112 semaines. Outre le système digestif, les glandes mammaires, la peau, le système sanguin, la vessie et les poumons sont affectés par le traitement. De plus, ces résultats montrent qu'il n'y a pas de corrélation quantitative entre l'activité mutagène mesurée sur *S. typhimurium* et l'activité cancérigène. Enfin, IQ a été décrite comme présentant également un caractère cancérigène chez le singe [19], alors que le même type d'expérimentation n'a montré aucune induction de cancer chez le singe avec MeIQx et des résultats non significatifs avec PhIP [20].

Tableau 7. Cancers induits par les AAH chez les animaux de laboratoire.

AAH	Animal	Organe/Tissu	Référence
PhIP	rat	côlon	[21]
		prostate	[22] [23]
		glandes mammaires, gros intestin	[7] [22] [23]
	souris	tissu lymphoïde	[23] [24]
		gros intestin, tissu lymphoïde	[7] [22] [23]
		foie	[23] [25]
IQ	rat	côlon et rectum	[26]
		glandes mammaires	[23] [27]
		peau, foie, intestin grêle, gros intestin, glande zymbale, glande clitoridienne	[7] [22] [23]
	souris	poumons, foie, pré-estomac	[7] [22] [23]
		singe	foie
MeIQ	rat	glandes mammaires, peau, gros intestin, glande zymbale, cavité buccale	[7] [22] [23]
	souris	foie, pré-estomac	[7] [22] [23]
MeIQx	rat	glandes mammaires	[28]
		peau, foie, glande zymbale, glande clitoridienne	[7] [22] [23]
	souris	système hématopoïétique, poumon, foie	[7] [22] [23]
Trp-P-2	rat	tissu lymphoïde	[29]
		foie, vessie	[7] [22]
	souris	foie	[7] [22]
Trp-P-1	rat	foie	[7] [22]
	souris	foie	[7] [22]
A α C	souris	foie, vaisseaux sanguins	[7] [22]
MeA α C	rat	foie	[7] [22]
	souris	foie, vaisseaux sanguins	[7] [22]
Glu-P-1	rat	foie, intestin grêle, gros intestin, glande zymbale, glande clitoridienne	[7] [22]
	souris	foie, vaisseaux sanguins	[7] [22]
Glu-P-2	rat	foie, intestin grêle, gros intestin, glande zymbale, glande clitoridienne	[7] [22]
	souris	foie, vaisseaux sanguins	[7] [22]
APNH	rat	foie, côlon, thyroïde, tissu lymphoïde	[30]

I. 4 Evaluation de l'activité cancérigène des AAH chez l'Homme

En considérant les doses individuelles administrées au cours des études réalisées chez les animaux de laboratoire et les quantités d'AAH présentes dans les viandes cuites (qui seront présentées ultérieurement dans ce chapitre), les AAH ne devraient pas induire de cancer chez l'Homme [7]. Cependant, l'extrapolation à l'Homme des données obtenues chez les rongeurs est délicate. Par exemple, l'activation métabolique des AAH est plus importante chez l'Homme que chez le rat [31]. De plus, plus de 75% des études menées pour évaluer le risque sanitaire lié à la consommation de viandes cuites ont démontré une corrélation entre la consommation de viande cuite et la fréquence d'apparition de certains cancers [32] et plus particulièrement entre le cancer colorectal et la consommation de viande rouge [33]. Lors d'études menées dans plusieurs pays, des corrélations positives ont ainsi été observées entre la consommation de viandes cuites et la fréquence de certains cancers comme le cancer du côlon (Pays-Bas [34], USA [35], Suède [36], Argentine [37]), du poumon (Uruguay [38], USA [39]), du sein (USA [40]), colorectal (USA [41], [42], [43], Suède [36]), du pancréas (USA [44]), de la vessie et du rein (Suède [36]). En France, les résultats ont

indiqué une faible corrélation entre la consommation de viande rouge cuite et le développement du cancer colorectal (OR = 1,02 (intervalle de confiance à 95% : 0,98-1,05)) et pas de corrélation entre le développement de cancer et la consommation de poisson cuit (OR = 0.94 (0.89-1.00)), valeurs qui sont en accord avec les autres pays européens [45].

Cependant, les facteurs de risque moyens observés lors de ces études sont faibles (OR < 1,1) et bien que dans certains cas la relation avec les quantités d'AAH présentes dans les viandes ait pu être observée, les résultats ont été obtenus à partir de données approximatives concernant les AAH et sont à ce titre critiquables [46]. En effet, il est difficile de connaître avec précision les quantités d'AAH absorbées à chaque repas par chaque membre d'un panel étudié. Les études épidémiologiques concernant les AAH en particulier, et les résidus présents dans l'alimentation en général, utilisent des méthodes [47] basées sur des estimations plus ou moins précises des quantités d'AAH présentes dans les viandes consommées [48, 49, 50]. En effet, toutes les AAH connues ne sont pas nécessairement quantifiées dans ces études sans compter les AAH inconnues. De plus, de nombreux facteurs influençant la formation (type de viande, mode de cuisson, etc.) et la biotransformation (individu, promoteurs, inhibiteurs, etc.) des AAH ne sont pas nécessairement tous pris en compte au cours de ces études. L'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) a néanmoins classé neuf AAH (PhIP, MeIQ, MeIQx, Trp-P-1, Trp-P-2, A α C, MeA α C, Glu-P-1 et Glu-P-2) dans le groupe 2B [51, 52] qui correspond aux substances considérées comme cancérigènes possibles pour l'Homme et une AAH (IQ) dans le groupe 2A qui correspond aux substances considérées comme cancérigènes probables pour l'Homme [53]. En réalité, il est très complexe de conclure à une induction de cancers chez l'Homme par les AAH et à l'évaluation du risque lié aux AAH [54, 55]. C'est pourquoi, un consensus général se dégage soulignant la nécessité d'améliorer les méthodes de quantification des AAH dans l'alimentation afin de mieux évaluer le niveau d'exposition d'une part, et de mieux comprendre les mécanismes humains de biotransformation et de génotoxicité des AAH d'autre part [56, 57].

II Formation et quantités des AAH dans les viandes cuites

II. 1 Mécanismes de formation des AAH

Nous avons vu que les AAH pouvaient être classées en différents groupes selon leur structure chimique. Ces composés peuvent également être classés en deux groupes en fonction de leur mode de formation [58]. Le premier groupe est composé des AAH dites apolaires comprenant toutes les carbolines (Tableau 1). Ces dernières sont formées à des températures supérieures à 300°C par des mécanismes radicalaires généralement mal connus lors de la pyrolyse d'acides aminés ou de protéines. Les précurseurs connus des carbolines sont les suivants [59] :

- α -carbolines : tryptophane, albumine, caséine, globuline de soja
- δ -carbolines : glutamate, caséine
- γ -carbolines : tryptophane, protéines animales et végétales
- Lys-P-1 : lysine
- Phe-P-1 : phénylalanine
- Orn-P-1 : ornithine
- Cre-P-1 : créatine
- β -carbolines : tryptophane, protéines, mélanges d'acides aminés, de créatine et de glucose.

A titre d'exemple, un mécanisme de formation de norharman a été proposé à partir du produit de réarrangement d'Amadori issu d'une réaction de Maillard entre le tryptophane et un sucre [60] comme ceci est schématisé dans la Figure 2.

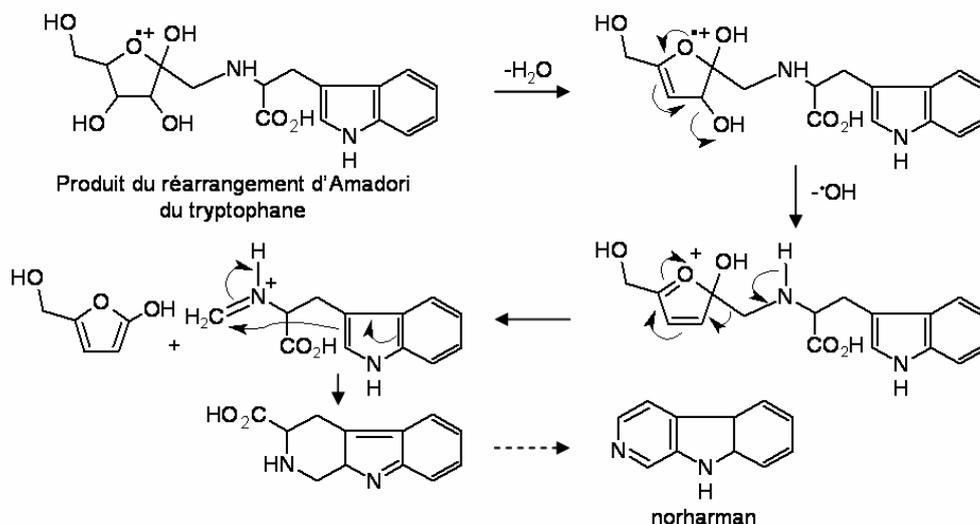


Figure 2. Mécanisme de formation de norharman à partir du tryptophane [60].

Un deuxième groupe est composé des AAH dites polaires comprenant les quinolines (Tableau 2), les quinoxalines (Tableau 3) et les pyridines (Tableau 4). Les AAH de ce second groupe sont également appelées amino-imidazo-azaarènes (AIAs). Ces AAH sont formées à des températures comprises entre 150-200°C à partir de créatin(in)e, d'acides aminés et d'hexoses [60]. Le premier mécanisme proposé pour leur formation a postulé que la partie imidazole des structures provenait de la créatine alors que les autres parties de la structure étaient issues de la réaction de Maillard [61]. Le mécanisme général admis pour la formation des quinolines et quinoxalines est présenté dans la Figure 3 [59].

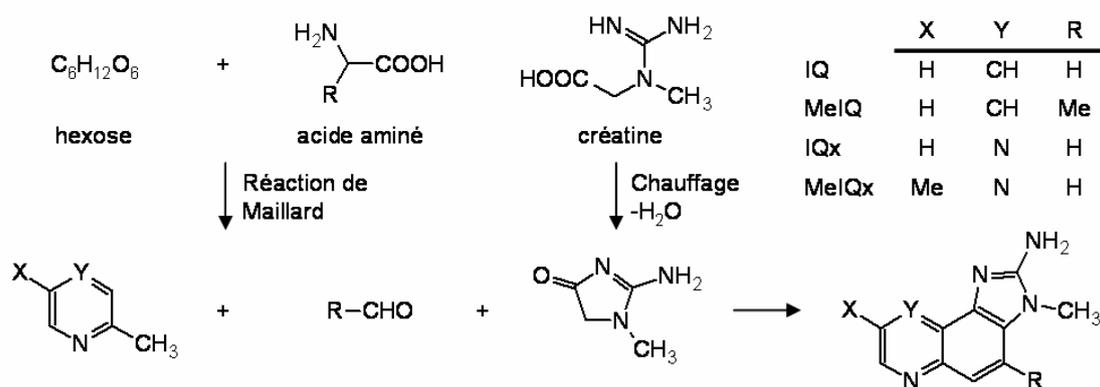


Figure 3. Mécanisme de formation des quinolines et quinoxalines [59].

Des expériences menées à partir de précurseurs marqués au carbone 14 ont démontré l'origine de certains atomes de carbone des quinolines et quinoxalines. Ainsi, la partie pyridine ou pyrazine de ces AAH proviendrait du sucre et d'un acide aminé alors que l'aldéhyde proviendrait uniquement de l'acide aminé [60]. Le schéma général de la formation de la partie pyrazine par la réaction de Maillard est détaillé dans la Figure 4 [62]. La première étape correspond à la condensation de Maillard qui représente l'attaque nucléophile de la fonction amine primaire d'un acide aminé sur la fonction carbonyle d'un ose réducteur. Il s'en suit une transposition dite d'Amadori conduisant à un composé intermédiaire du même nom. L'intermédiaire d'Amadori ainsi formé se réarrange pour générer une réductone qui subit ensuite une dégradation dite de Strecker. La dégradation de Strecker conduit par réaction avec un acide aminé à la formation d'aldéhydes aliphatiques et d' α -aminocétones. Selon le mécanisme proposé en Figure 4, l'aldéhyde formé par la réaction de Strecker provient d'un acide aminé, ce qui est en accord avec les propositions précédentes concernant l'origine des atomes de carbone des quinolines et quinoxalines. Enfin, la structure de type pyrazine peut être obtenue par cyclisation entre deux molécules d' α -aminocétones.

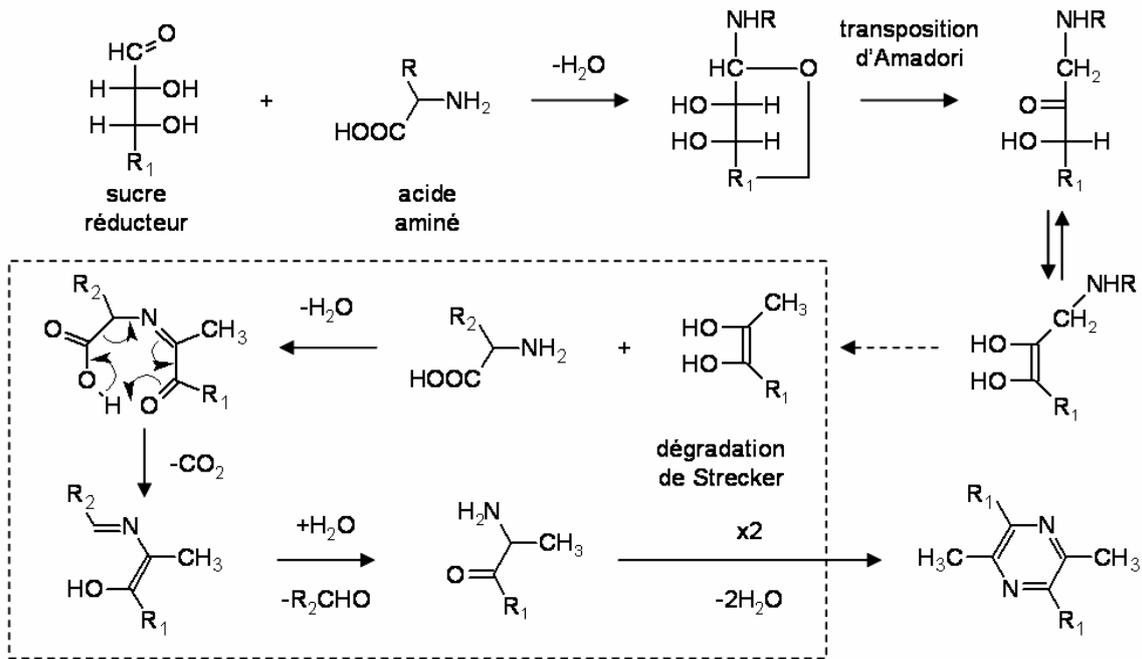


Figure 4. Schéma global de formation de la pyrazine par la réaction de Maillard [62].

Un autre mécanisme a également été proposé pour expliquer la formation des quinolines et quinoxalines [63]. Selon les hypothèses des auteurs, les quinolines seraient formées à partir de la créatine et de radicaux d'alkylpyridine, alors que les quinoxalines seraient formées à partir de la créatine et de radicaux de dialkylpyrazine comme ceci est détaillé dans la Figure 5. Néanmoins, ce mécanisme reste relativement controversé [60] et le schéma proposé contient de nombreuses zones d'ombres comme le devenir du substituant R' par exemple.

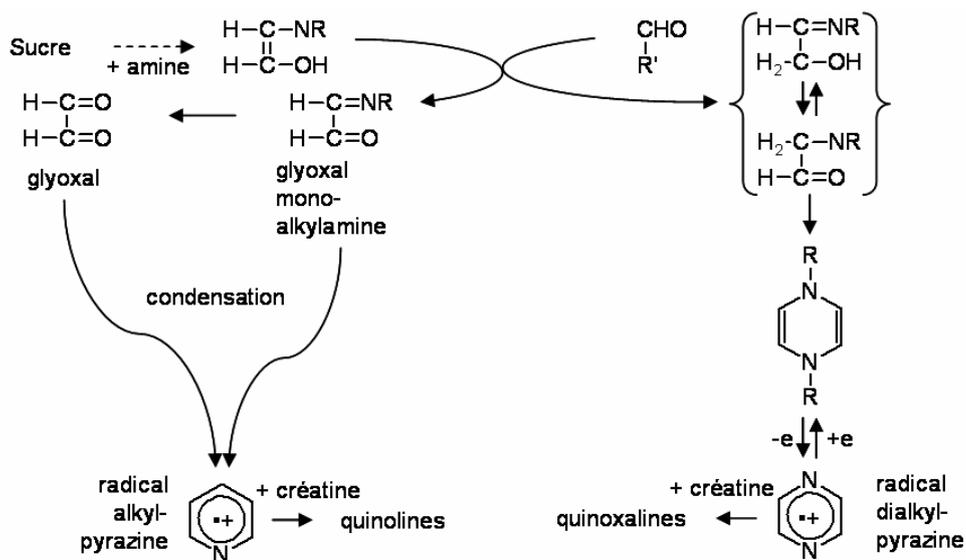
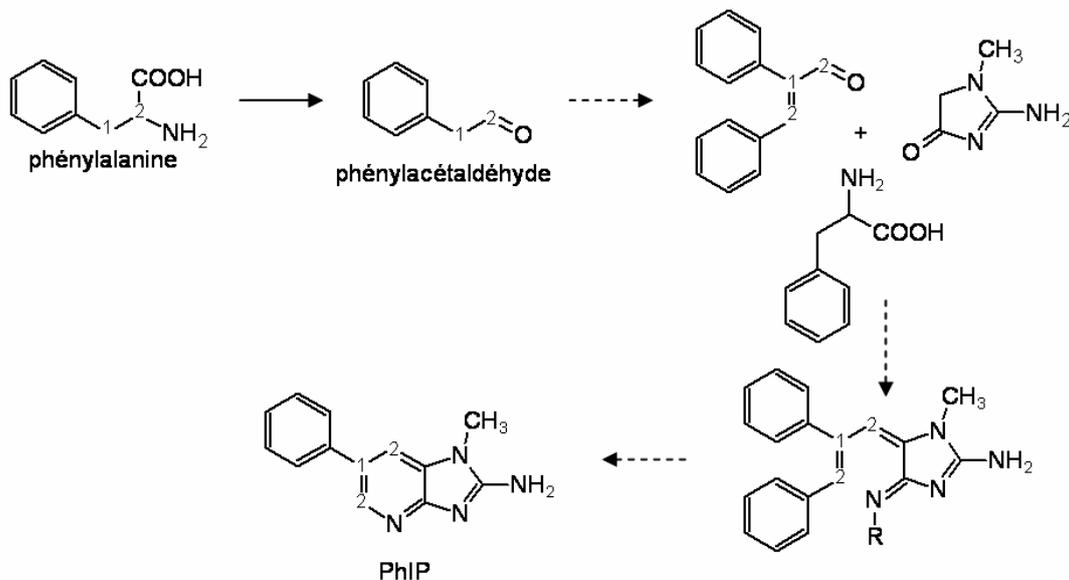


Figure 5. Autre mécanisme proposé pour la formation des quinolines et quinoxalines [63].

PhIP peut être formé par réaction entre la phénylalanine, la créatinine et le glucose, mais également entre la créatine, la leucine, l'isoleucine et la tyrosine [60]. Néanmoins, la formation de PhIP à partir de créatine et de phénylalanine a été la plus étudiée, notamment grâce à l'utilisation de phénylalanine marquée au carbone 13. Un mécanisme de formation de PhIP a pu être proposé [64] et est donné en Figure 6. La première étape concerne la formation de phénylacétaldéhyde par dégradation thermique de la phénylalanine. Une dégradation de Strecker en présence de saccharides a également été proposée pour expliquer la formation de phénylacétaldéhyde [65]. Une espèce intermédiaire formée par réaction intermoléculaire du phénylacétaldéhyde réagirait ensuite sur la créatinine dont la fonction carbonyle serait modifiée en base de Schiff par condensation de la phénylalanine. Dans ce mécanisme, seules certaines espèces intermédiaires ont été formellement caractérisées et par conséquent ce mécanisme repose sur des hypothèses qui restent à vérifier.



¹ et ² : positions des atomes de carbones marqués au carbone 13.

Figure 6. Mécanisme de formation de PhIP à partir de phénylalanine et de créatinine [64].

II. 2 Facteurs influençant la formation d'AAH dans les viandes cuites

Les rendements de formation des AAH dépendent de nombreux facteurs [59, 66, 67]. Le premier d'entre eux est la concentration des précurseurs des AAH parmi lesquels on trouve la créatine, des acides aminés, des protéines et des sucres. Comme toutes ces espèces sont présentes en quantités plus ou moins importantes selon le type de muscle et d'animal considéré, les quantités d'AAH formées pourront être différentes selon le muscle dont provient la viande, l'animal dont provient le muscle et enfin selon la race de l'animal.

L'influence des précurseurs a été étudiée en utilisant des systèmes modèles permettant de modifier la composition en précurseurs de la viande [68, 69]. Ainsi, les quantités d'AAH formées augmentent avec les concentrations en acides aminés, créatine, créatinine et glucose [66, 70, 71].

Au niveau des traitements culinaires appliqués aux viandes, la température et le temps de cuisson sont deux paramètres extrêmement influents sur les rendements de formation des AAH. Il est clairement démontré que plus la température de cuisson est élevée, et plus le temps de cuisson est long, plus les concentrations en AAH formées sont importantes [68, 71, 72, 73, 74, 75, 76]. Cependant, l'influence de la température de cuisson paraît plus importante que celle du temps de cuisson. Par exemple, une cuisson à des températures inférieures à 300°C diminue fortement les rendements de formation des carbolines exclusivement formées par des mécanismes thermiques à des températures supérieures à 300°C. De plus, les études cinétiques réalisées sur la formation des AAH montrent que les quantités d'AAH formées atteignent rapidement un maximum, et d'autant plus rapidement que la température est élevée, comme le montre la Figure 7 [77]. On constate également sur le graphique de MelQx de la Figure 7, que la concentration de MelQx décroît après 5 à 10 minutes pour une température de 225°C. En effet, il a été démontré qu'à partir de certaines températures, les AAH pouvaient se dégrader [78]. Enfin, il faut noter que si de nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de l'influence de différents paramètres de cuisson (notamment la température et le temps) sur les quantités d'AAH formées, il est souvent difficile de comparer les valeurs des résultats obtenus. Ceci est principalement dû au caractère non standardisé des mesures de températures entre les différentes études publiées, en termes de position de la sonde de température par rapport à la viande, de mode de cuisson utilisé, de taille de l'échantillon de viande étudiée, etc.

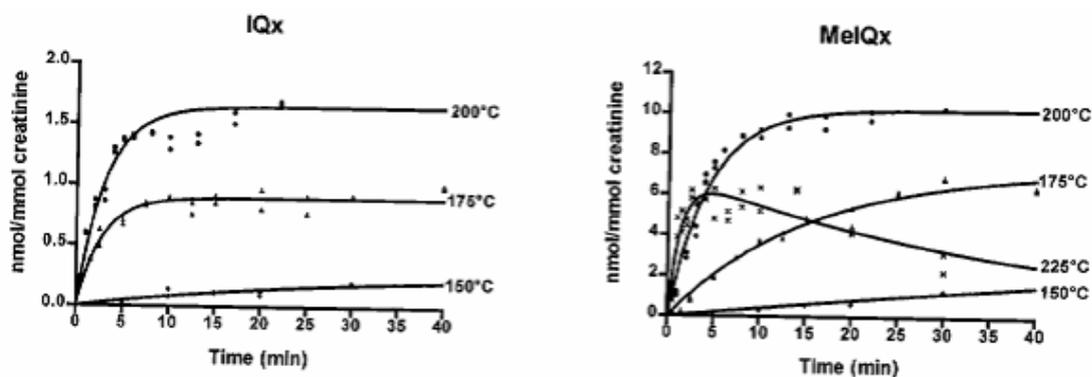


Figure 7. Cinétiques de formation de IQx et MelQx [77].

Un autre paramètre influençant les rendements de formation des AAH est le mode de cuisson. En effet, en fonction du mode de cuisson utilisé, le mode de transfert de chaleur entre la source de chaleur et la viande sera différent. De façon générale, les principaux modes de transfert de chaleur utilisés pour la cuisson des viandes sont les suivants :

- conduction (poêle)
- convection (four (air), friture (liquide gras), cuisson en sauce (liquide aqueux))
- rayonnement (rôtisserie, barbecue vertical)
- convection + rayonnement (barbecue, grill).

Par conséquent, le gradient de température dans la viande sera différent en fonction du mode de cuisson utilisé. Par exemple, ce gradient est moins important dans un système à convection (four) que dans un système à conduction (poêle) [66, 67]. Ainsi, l'épaisseur de viande « chaude » sera moins importante en utilisant une cuisson au four par rapport à une cuisson à la poêle. C'est pourquoi, les concentrations d'AAH dans des viandes cuites au four sont généralement plus faibles que dans les viandes cuites à la poêle. De même, un retournement régulier de la viande durant la cuisson permet de diminuer la formation d'AAH en modifiant le gradient de température dans la viande [79, 80]. La cuisson avec ou sans la peau dans le cas de la volaille ou du poisson, est également un facteur modifiant le gradient de température. La cuisson de viande en émincé a pour conséquence une augmentation de la surface d'échange de chaleur et donc des quantités d'AAH formées. En outre, les précurseurs des AAH étant hydrophiles, ils peuvent être entraînés par des phénomènes de migration d'eau au sein de la viande durant la cuisson. Par exemple, la présence de peau limite la migration de l'eau vers l'extérieur de la viande. De même, la cuisson de viande séchée par définition pauvre en eau, induit une faible migration des précurseurs et donc favorise la formation d'AAH. Lors de la cuisson à la poêle, les précurseurs sont entraînés par l'eau vers la poêle induisant des quantités d'AAH dans les résidus de cuisson (dans la poêle) supérieures aux quantités présentes dans la viande elle-même [81, 82]. De même, lors d'une cuisson en sauce, en rôtisserie ou au four micro-ondes [83], les précurseurs sont éliminés par l'élimination de l'eau de la viande [84]. Enfin, il a été observé que la cuisson de viande marinée mène à de faibles taux d'AAH formées bien que ce phénomène ne soit pas clairement expliqué [85, 86]. A titre indicatif, une étude européenne réalisée en 2002 indique précisément quelles sont les habitudes culinaires de certains pays européens dont la France, en termes de modes de cuisson utilisés, et de types de viandes consommées [87].

Outre les précurseurs des AAH, la viande contient également de nombreux composés pouvant inhiber ou ralentir les réactions de formation des AAH [88]. Ces substances correspondent essentiellement à des antioxydants et à des espèces pouvant piéger les radicaux libres, ce qui perturbe la formation des espèces intermédiaires au cours

de la réaction de Maillard ou des mécanismes radicalaires. Il a ainsi été démontré que l'addition d'antioxydants synthétiques (TBHQ, PG, BHT et BHA) ou naturels (vitamines C et E) lors de la cuisson des viandes, entraînait une diminution des quantités d'AAH formées [67, 68, 75]. Parmi ces antioxydants naturels, on trouve également les caroténoïdes (phytoène, phytofluène, β -carotène et lycopène), l' α -tocophérol et la quercétine [89]. De même, des épices (romarin, thym, sauge, ail, saumure [90, 91]), la levure rouge de riz (Monascus red) et la marjolaine [92] ainsi que des extraits d'écorces de pins et de pépins de raisins [93] perturbent la formation des AAH.

En conclusion de nombreux facteurs peuvent influencer les taux de formation d'AAH au cours de la cuisson des viandes, et il serait intéressant de pouvoir standardiser les protocoles de cuisson dans les différentes études afin de pouvoir comparer les résultats obtenus. Il semble important de pouvoir effectuer de telles comparaisons dans des conditions fiables afin de pouvoir en tirer les conclusions et élaborer d'éventuelles recommandations permettant de limiter les quantités d'AAH formées pendant la cuisson des viandes.

II. 3 Niveaux d'exposition aux AAH dans les viandes cuites

En raison du nombre important de paramètres influençant la formation des AAH lors de la cuisson des viandes, les concentrations d'AAH mesurées dans des échantillons de viandes ou de poisson cuits sont très diverses. En effet, chaque étude utilise ses propres paramètres en termes de mode, de température et de temps de cuisson, de type de viande, de taille d'échantillon, etc. Il est néanmoins possible de réaliser une analyse globale des données disponibles et d'estimer l'ordre de grandeur du niveau d'exposition de l'Homme aux AAH. A partir de l'étude non exhaustive de plusieurs dizaines d'articles publiés indiquant les taux d'AAH observés dans différents types de viandes cuites, les taux moyens de 18 AAH ont pu être calculés pour chaque type de viande sur la base d'un nombre d'articles variable qui est précisé entre parenthèses (n) dans les Figures 8 et 9. Seule la différence du type d'animal dont est issue la viande a été considérée pour classer les résultats afin de ne pas compliquer la lecture des données par les nombreux paramètres influençant la formation des AAH. De plus, les résultats générés à partir d'expérimentations réalisées dans des conditions de temps et de température de cuisson irréalistes du point de vue domestique ont été rejetés. Seules les valeurs maximales communiquées dans les articles retenus ont été utilisées pour calculer les concentrations moyennes exprimées en ng d'AAH par gramme de viande cuite. Les résultats des dosages utilisés pour réaliser ces graphiques ainsi que les références bibliographiques correspondantes sont indiqués dans les tableaux de l'Annexe 1.

Ces résultats illustrent les quantités importantes des β -carbolines harman et norharman formées lors de la cuisson de la viande de bœuf dans des conditions normales, avec notamment une valeur maximale observée de 360 ng/g pour harman [94]. Outre les β -carbolines, l'AAH la plus fréquemment observée dans les viandes cuites est PhIP, excepté dans le poisson où A α C présente des concentrations légèrement supérieures à celles de PhIP. Cette particularité du poisson vient vraisemblablement du fait que les précurseurs de A α C sont présents en quantités supérieures dans les muscles de poisson par rapport aux autres types de viandes. Les concentrations moyennes de PhIP avoisinent 25 ng/g dans la viande de bœuf, de poulet et de bacon. Bien que les concentrations de PhIP mesurées dans ces viandes soient globalement du même ordre de grandeur, il semble que la viande de poulet soit celle qui génère les plus grandes quantités de PhIP, avec notamment une valeur maximale mesurée de 270 ng/g dans du poulet cuit dans des conditions normales [9]. Une autre AAH présente dans la viande de poulet, de porc et de poisson aux alentours de la vingtaine de ppb est DMIP. Néanmoins, ces valeurs moyennes ne sont déterminées que sur peu de mesures (3 au maximum) effectuées sur cette AAH dans ces viandes. Les autres AAH présentes dans les viandes cuites à des concentrations variant entre 1 et 10 ng/g sont 4,8-DiMeIQx, MeIQx, MeIQ, IQ et IFP. Toutes les autres AAH sont présentes dans des proportions variant entre des quantités non détectables et quelques ppb en fonction du type de viande considéré.

La quantité moyenne d'AAH absorbée par personne et par jour est délicate à réaliser et dépend des habitudes alimentaires de la population du pays étudié. Pour réaliser ces estimations, les méthodologies employées ont consisté à combiner des données de quantification d'AAH dans les viandes cuites et des données correspondant aux habitudes culinaires. Plusieurs chiffres ont été publiés et varient selon le pays considéré, mais il semble que la valeur estimée par Skog soit la plus représentative en étant généralement citée, avec une quantité d'AAH absorbée d'au maximum 15 μ g par jour et par individu [54]. Bien que toutes les AAH ne soient pas cancérigènes, cette estimation de 15 μ g représente une valeur non négligeable, d'autant plus qu'un nombre important d'AAH reste très probablement à découvrir.

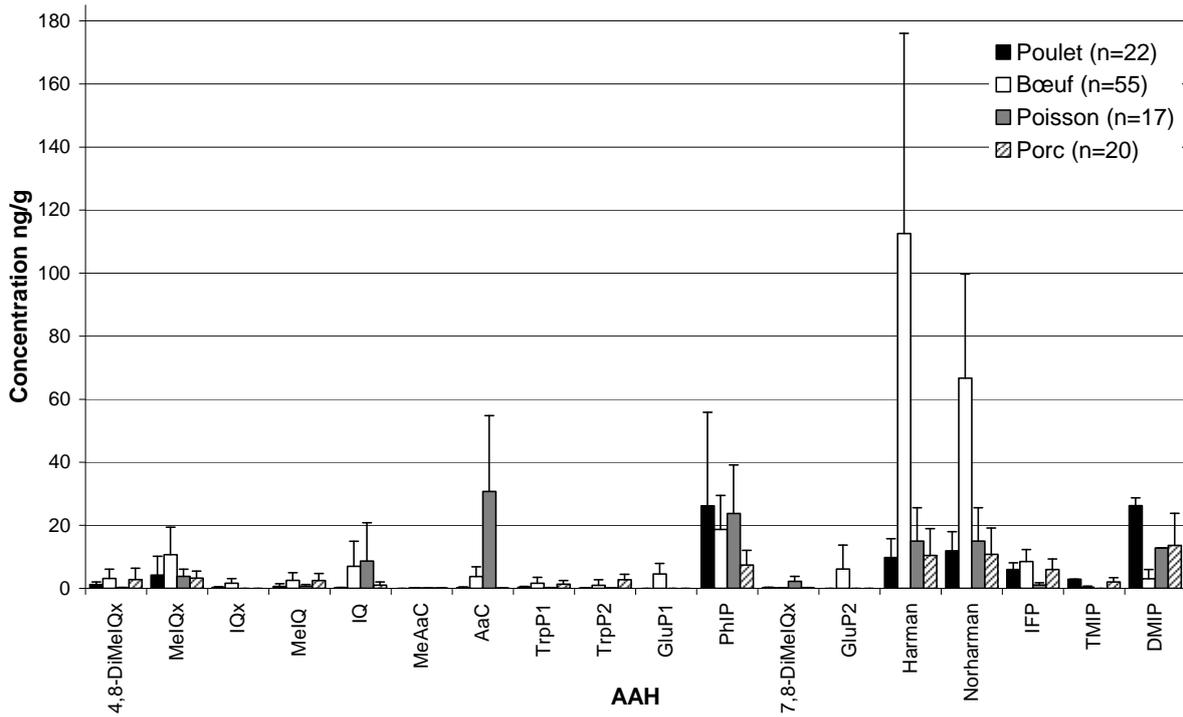


Figure 8. Concentrations moyennes des AAH dosées dans la viande cuite de poulet, bœuf, poisson et porc.

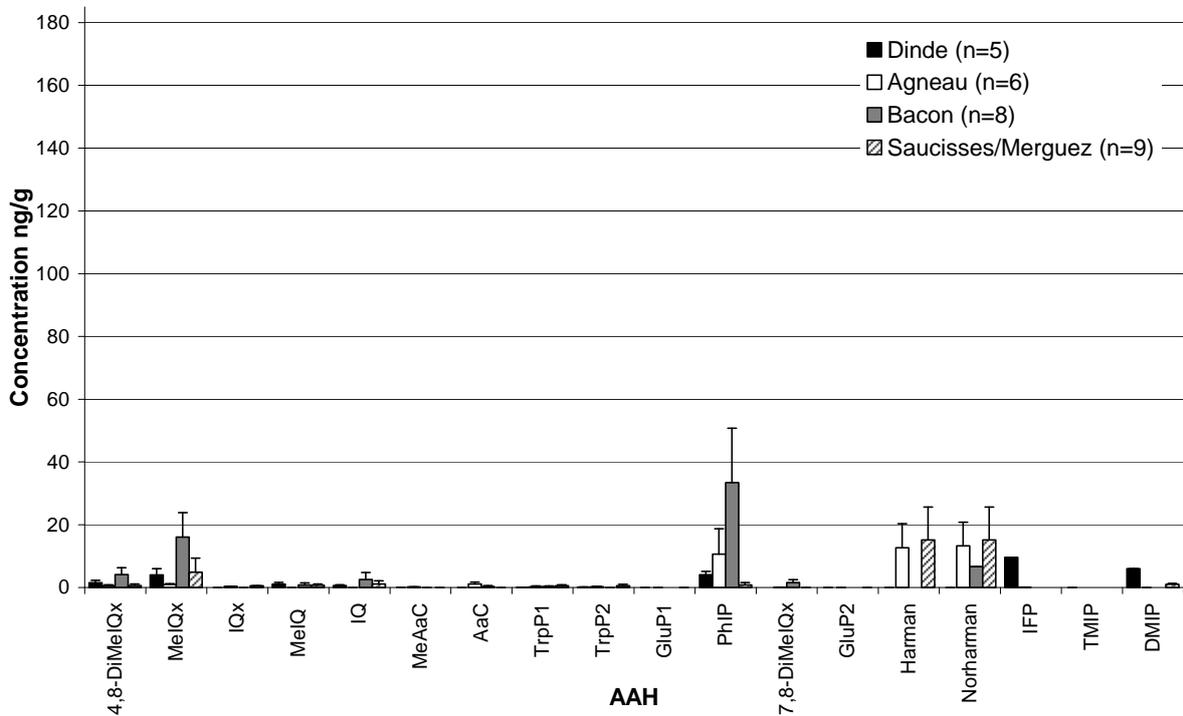


Figure 9. Concentrations moyennes des AAH dosées dans la viande cuite de dinde, agneau, bacon et saucisses/merguez.

III Méthodologies de quantification des AAH dans les viandes cuites

Aussi bien pour l'étude de l'influence de leurs paramètres de formation que pour l'estimation du niveau d'exposition des consommateurs de viandes, de nombreuses méthodologies d'extraction et de dosage des AAH ont été développées. La principale difficulté concerne en fait le dosage simultané d'une quinzaine d'AAH dont les structures et les propriétés physicochimiques sont différentes, dans des matrices aussi complexes que des viandes cuites. Signalons qu'il existe également des méthodologies de caractérisation des AAH dans d'autres matrices que les viandes, comme la fumée de cigarettes [95], la fumée de cuisson [96] ou les cheveux [97]. Néanmoins, ces méthodologies ne sont pas détaillées dans ce manuscrit qui sera volontairement focalisé sur la caractérisation des AAH dans les viandes cuites.

III. 1 Méthodes de calibration

Afin de quantifier une substance dans un milieu, il est nécessaire de calibrer la réponse mesurée lors de la détection de la substance d'intérêt par rapport à sa concentration. Ainsi, plusieurs méthodes de calibration existent. Les méthodes quantitatives par ajouts dosés ou par étalonnage externe n'ont pas (ou peu) été utilisées pour le dosage des AAH dans les viandes cuites [98] et la plupart des dosages présentés ci-après ont été réalisés par étalonnage interne. Cette méthode est basée sur la comparaison des signaux de la substance d'intérêt et d'un composé de référence appelé étalon interne. Elle consiste dans un premier temps à réaliser une courbe de calibration avec des solutions standards de concentrations variables en présence d'une quantité fixe d'étalon interne. Ceci permet de connaître la valeur du rapport entre les signaux du composé recherché et celui de l'étalon interne en fonction de la concentration du composé recherché. Puis, la mesure de ce rapport dans l'échantillon à doser permet d'obtenir la concentration de la substance d'intérêt par l'intermédiaire de la courbe de calibration. L'étalonnage interne permet de s'affranchir des différentes sources d'erreurs dues au manipulateur ou au système analytique qui peuvent se produire au cours d'un étalonnage externe [99]. Cependant, il faut que l'étalon interne possède des propriétés physicochimiques les plus proches possibles de celles de la substance à quantifier de façon à subir les mêmes variations (pertes, erreurs, etc.) que la molécule d'intérêt durant les manipulations. Il existe trois types d'étalon d'interne. Le meilleur d'entre eux correspond à la substance à doser marquée avec des isotopes stables (D, ^{13}C , ^{15}N) et est couramment utilisé en analyse quantitative par spectrométrie de masse. On parle alors d'étalonnage par dilution isotopique. Cependant, ces étalons sont relativement coûteux, et il est nécessaire de posséder un étalon pour chaque substance à doser ce qui est délicat

dans le cas des dosages d'un nombre important de composés. C'est pourquoi, un autre type d'étalon interne correspondant à un homologue de structure des substances d'intérêt peut être utilisé. Dans le cas des AAH, il s'agit de 4,7,8-TriMeIQx qui a servi d'étalon interne dans de nombreux travaux portant sur le dosage des AAH. TriMeIQx est une AAH qui n'est pas présente dans les viandes cuites à des quantités détectables, qui possède un pKa et une polarité qui lui permettent d'avoir un temps de rétention moyen par rapport aux autres AAH en HPLC en phase inverse, qui possède une masse moléculaire peu différente et qui est inerte vis-à-vis des autres AAH. Enfin, la dernière catégorie d'étalons internes est représentée par des substances de même classe chimique que la substance d'intérêt, comme par exemple la caféine dans le cas du dosage des AAH [100]. Selon le type d'application développée et sa nature, l'étalon interne peut être ajouté avant (cas des composés marqués [101]) ou après les étapes d'extraction/purification [102].

III. 2 Protocoles d'extraction et de purification

Les étapes d'extraction et de purification des AAH sont destinées à éliminer les composés interférents présents dans la viande et pouvant co-éluer avec les AAH, ainsi qu'à pré-concentrer les AAH afin d'obtenir des concentrations d'échantillons compatibles avec les limites de quantification des outils analytiques disponibles. Les méthodes de traitement des échantillons utilisées pour le dosage des AAH ont récemment fait l'objet d'un article de revue [8].

La première étape des protocoles développés pour l'extraction des AAH, consiste à homogénéiser et broyer l'échantillon dans des solvants organiques (méthanol, acétone, acétate d'éthyle) ou aqueux (acide chlorhydrique, soude). Un chauffage doux ou un passage aux ultra-sons peut être également réalisé afin d'améliorer la libération et la solubilisation des AAH. Enfin, cette étape se termine par une centrifugation ou une filtration et un changement de solvant si cela est nécessaire. Une extraction par Soxhlet peut également être réalisée [101].

L'étape suivante permet de purifier l'échantillon, et peut également permettre sa concentration. Il s'agit principalement d'une extraction liquide-liquide suivie d'une extraction en phase solide (SPE). L'extraction liquide-liquide au dichlorométhane, acétate d'éthyle ou éther après extraction des AAH en milieu aqueux, permet de solubiliser les AAH dans le solvant organique et d'éliminer les impuretés hydrophiles. Cette étape peut être réalisée avec des solides inertes comme la terre de diatomée (Extrelut NT, etc.) ce qui permet notamment le couplage avec des cartouches d'extraction sur phase solide.

Le principe de l'extraction sur phase solide est basé sur des différences d'affinité d'une substance pour une phase liquide et une phase solide, comme en chromatographie en phase liquide [103]. Une des phases stationnaires utilisées dans le cas de la purification des AAH, correspond à un adsorbant polymérique non ionique à base de polystyrène (Amberlite XAD-2). D'autres types de phases stationnaires ont également été utilisés comme le Blue Cotton, le Blue Rayon et le Blue Chitin qui sont des phases stationnaires spécifiques des composés aromatiques. Leur phase stationnaire est composée de trisulfonate phthalocyanine de cuivre (pigment bleu) qui est fixé de manière covalente à du coton de cellulose dans le cas du Blue Cotton. L'utilisation d'une fibre synthétique comme le rayon (Blue Rayon) ou encore de poly-*N*-acétylglucosamine (Blue Chitin) comme support du pigment permet de fixer 2 à 4 fois plus de pigments que le coton de cellulose améliorant ainsi les performances de cette phase stationnaire [104]. Le système de purification des AAH principalement utilisé depuis une quinzaine d'années est constitué de phases stationnaires greffées apolaires ou échangeuses d'ions, conditionnées sous forme de cartouche contenant 100 à 500 mg de phase solide. Outre la rapidité et les faibles quantités de solvant utilisées, un des avantages de ce système est la possibilité de coupler plusieurs cartouches SPE, ou une cartouche SPE et une cartouche Extrelut d'extraction liquide-liquide. Ces couplages permettent d'éviter d'éventuelles pertes de composés d'intérêt entre les étapes d'extraction et de purification. Concernant l'extraction/purification des AAH, de la terre de diatomée (Extrelut) est mélangée avec l'échantillon de viande cuite précédemment homogénéisée dans la soude. Ce mélange est ensuite placé dans une cartouche vide et les substances d'intérêt sont extraites par du dichlorométhane ou de l'acétate d'éthyle et directement entraînées vers la cartouche SPE.

Ce système de couplage entre cartouches SPE et Extrelut a été le plus utilisé pour l'extraction et la purification des AAH depuis sa proposition par Gross en 1990 [105] (Figure 10a). L'échantillon est homogénéisé dans de la soude molaire, principalement pour dégrader les protéines et rendre le milieu plus homogène pour faciliter la libération des AAH. L'extraction liquide-liquide avec de la terre de diatomée permet d'extraire les AAH avec du dichlorométhane vers une cartouche SPE échangeuse de cations (PRS : gel de silice propylsulfonique). Les AAH retenues sur la cartouche PRS sont lavées par un mélange méthanol/acide chlorhydrique, le méthanol permettant d'éliminer les substances organiques résiduelles et l'acide chlorhydrique permettant le maintien des AAH sous forme cationique et donc leur rétention. Les AAH sont ensuite éluées par de l'acétate d'ammonium (pH 8) vers une cartouche SPE C18. Les AAH, qui sont globalement apolaires sont retenues sur la phase stationnaire C18 apolaire, lavées à l'eau, puis éluées avec un mélange méthanol/ammoniaque. La solution finale est enfin évaporée à sec pour être reprise dans le solvant d'analyse. Le mélange de solvants de lavage de la cartouche PRS a été modifié afin de minimiser les pertes d'AAH durant cette étape soit en maintenant l'activation anionique de

la phase PRS en augmentant la concentration d'acide chlorhydrique, soit en modifiant la proportion méthanol/eau du mélange d'élution, ou encore en modifiant ces deux paramètres. Afin de limiter les pertes d'AAH lors du lavage de la cartouche PRS, Gross et Grüter ont ensuite proposé d'éluer les AAH en deux fractions [106] comme ceci est schématisé dans la Figure 10b. Ainsi, l'élution des AAH dites apolaires (Trp-P-1, Trp-P-2, H, NH, PhIP, A α C et MeA α C) de la cartouche PRS est réalisée en milieu acide, puis les AAH dites polaires (IQ, MeIQ, MeIQx, 4,8-DiMeIQx) sont éluées en milieu basique. Les deux fractions sont finalement purifiées séparément sur une cartouche C18 dans des conditions identiques. Toujours dans le but d'optimiser le protocole d'extraction/purification des AAH, l'utilisation d'une cartouche supplémentaire de type SCX (échangeuse de cations forte) a également été proposée comme indiqué dans la Figure 10c [107]. Plus récemment, un protocole simplifié n'utilisant qu'une seule cartouche SPE de type Oasis[®] a été appliqué avec succès à la purification des AAH (Figure 10d) [68]. La phase stationnaire Oasis[®] est constituée d'une matrice polymérique apolaire greffée par des groupements échangeurs d'ions. Dans la méthode proposée par Messner [68], la cartouche utilisée est de type Oasis[®] MCX, c'est-à-dire que le greffage est de type échangeur de cations faible. Comme dans le cas des cartouches PRS, le lavage a lieu en milieu acide et l'élution en milieu basique, la matrice polymérique assurant une bonne rétention par interactions hydrophobes.

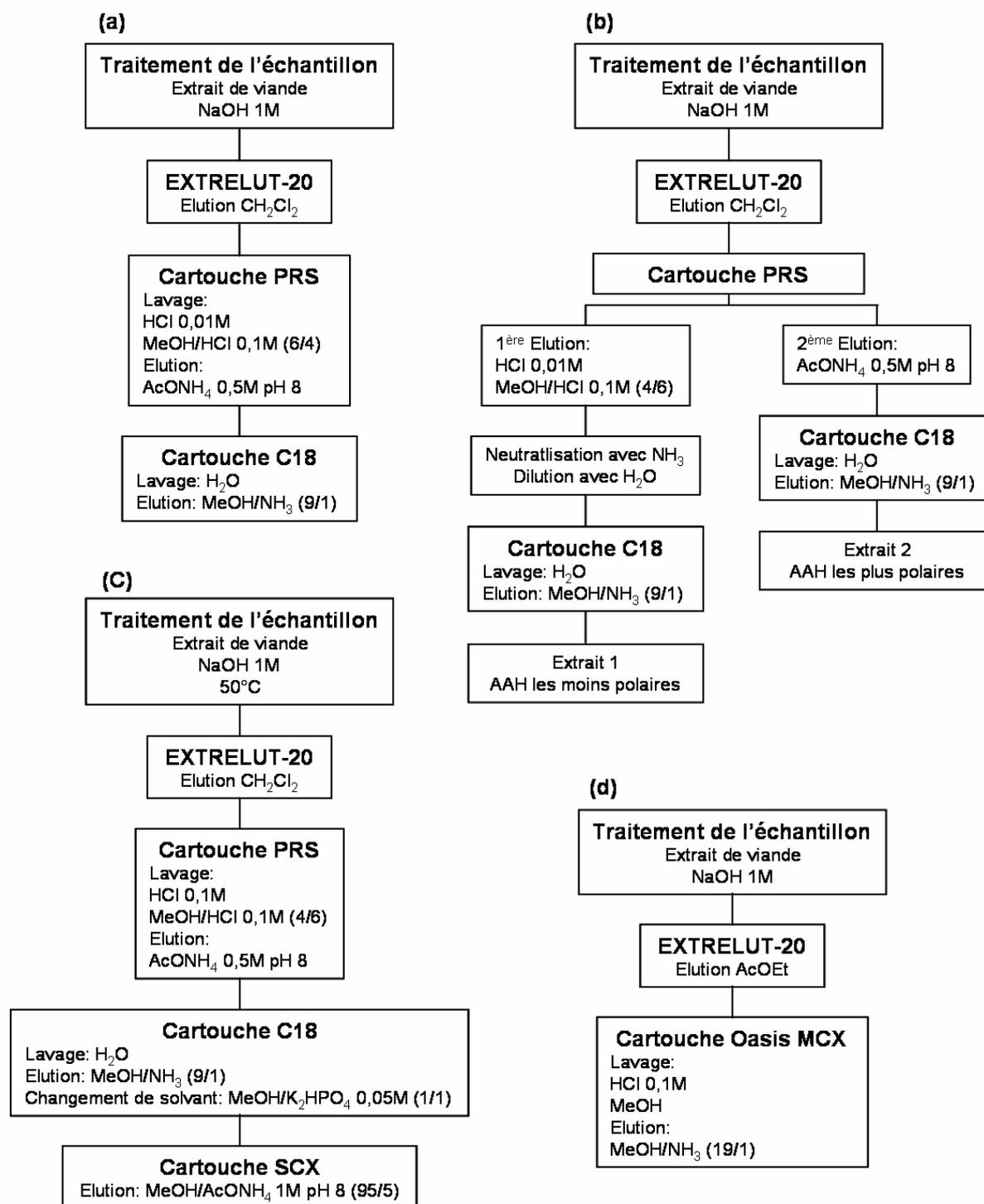


Figure 10. Protocoles d'extraction et de purification des AAH dans les viandes cuites, proposés par Gross [105] (a), Gross et Grüter [106] (b), Perfetti [107] (c) et Messner [68] (d).

Toutes ces méthodes d'extraction/purification ont été développées afin d'optimiser les rendements d'extraction des AAH à partir de viandes cuites, et la pureté des extraits finaux afin de limiter les interférences pouvant co-éluer avec les AAH (effets de matrice). Ainsi, les protocoles basés sur la méthode de Gross et Grüter (Figure 10b) représentent le meilleur compromis entre rendement d'extraction et pureté des extraits [108] mais sont plus longs à

mettre en œuvre. L'automatisation de cette méthode permet de pallier en partie ce problème [109]. Dans le but de diminuer le temps nécessaire à la préparation des échantillons, des protocoles utilisant la micro-extraction en phase solide (SPME) couplée à la chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC) ont été décrits mais nécessitent encore des optimisations du point de vue de la sensibilité [110, 111].

III. 3 Méthodes de séparation et de détection des AAH

Afin de quantifier les AAH présentes à de faibles concentrations dans les extraits obtenus à partir des protocoles que nous venons de décrire, plusieurs techniques de détection des AAH ont été utilisées [112, 113] :

- Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA)
- Chromatographie en phase Gazeuse - Spectrométrie de Masse (GC-MS)
- Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) - :
 - spectrométrie Ultra-Violet (UV)
 - Electrochimie (ED)
 - Fluorescence
 - Spectrométrie de Masse (MS)
- Chromatographie Liquide Ultra Performance - Spectrométrie de masse (UPLC-MS)
- Electrophorèse Capillaire de Zone (CZE).

Des tests d'immuno-affinité de type ELISA basés sur la rétention de substances organiques par des anticorps spécifiques ont été utilisés pour le dosage des AAH. Des anticorps spécifiques de MeIQ, IQ, 4,8-DiMeIQx et PhIP ont été développés grâce au cycle imidazole qui est commun à la structure de ces AAH [112]. Néanmoins la quantification de ces AAH dans des matrices complexes de viandes cuites reste délicate en raison de réactions croisées possibles avec des composés co-extraits qui mènent à une surestimation des quantités d'AAH dosées. Par contre, cette technique a également été utilisée comme méthode de purification avant une analyse par HPLC-UV conduisant ainsi à des limites de détection avoisinant 1 ng/g [113].

L'analyse des AAH par chromatographie en phase gazeuse a essentiellement utilisé la spectrométrie de masse comme système de détection, combinant ainsi l'efficacité de séparation de la GC capillaire avec la sensibilité et la sélectivité de la spectrométrie de masse. Les deux modes d'ionisation utilisés ont été l'impact électronique (EI) conduisant à des fragmentations en source des AAH, et l'ionisation chimique négative (NICI). La détection des AAH a été réalisée en mode « Single Ion Monitoring » (SIM) permettant d'augmenter la sensibilité en ne recherchant que les ions correspondant aux espèces recherchées.

Cependant, les AAH sont des composés peu volatils et la présence d'un groupement amine primaire conduit à la formation de pics larges et asymétriques en raison d'une forte adsorption dans l'injecteur et sur la colonne. Bien qu'une étude ait décrit l'analyse de cinq AAH par GC-MS sans dérivation [114], la grande majorité des analyses d'AAH par GC ont été réalisées après dérivation [113]. Ainsi, le bromure de 3,5-bis-trifluorométhylbenzyle (3,5-bis-TFMBB) a été employé pour l'analyse de MeIQ, IQ, IQx, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, 4,7,8-TriMeIQx, PhIP, Glu-P-1 et Glu-P-2, par GC-EI-MS. Le temps de dérivation de cette méthode est de 48h et les limites de détection obtenues varient entre 1 et 10 ng/g [115]. Cette dérivation a été comparée à la dérivation par l'anhydride heptafluorobutyrique pour l'analyse par GC-MS utilisant l'ionisation chimique négative (NICI) par le méthane [116]. Bien que cette méthode de dérivation soit plus rapide (75 min), les limites de détection obtenues n'étaient pas compatibles avec les quantités d'AAH présentes dans les viandes cuites. Le *N*-méthyl-*N*-(*tert*-butyldiméthylsilyl)trifluoroacétamide (MTBSTFA) est un autre réactif de dérivation qui a été testé pour l'analyse des AAH par GC-EI-MS [117]. Cette méthode permet une dérivation rapide (90 min) de nombreuses AAH et conduit à des limites de détection comprises entre 0,05 et 0,3 ng/g. Cependant, la réaction de dérivation n'est pas complète et les AAH dérivées ne sont pas stables. Par contre, la dérivation en 15 min des AAH sous forme de dérivés de *N*-diméthylaminoéthylène a permis leur analyse par un détecteur sélectif azote-phosphore avec des limites de détection extrêmement faibles (2-15 pg injectés) [118].

Au cours de ces dernières années, la plupart des méthodes de dosage des AAH décrites ont utilisé la chromatographie liquide (HPLC) comme méthode séparative. Les colonnes chromatographiques utilisées pour séparer les AAH possèdent des phases stationnaires à base de silice greffée par des groupements apolaires. Les colonnes polymériques du type TSK Gel[®] (Tosoh, Japon) ont montré une meilleure symétrie des pics et une meilleure efficacité comme ceci a été démontré lors de la comparaison de six colonnes HPLC de mêmes dimensions (150 × 2,1 mm) possédant des phases stationnaires différentes, pour la séparation de 16 AAH [119]. C'est pourquoi ce type de colonne a largement été employé pour séparer les AAH, comme l'indique le Tableau 8. De plus, la diminution du diamètre des colonnes chromatographiques a permis d'augmenter la sensibilité des méthodes chromatographiques. Ainsi, la sensibilité a été multipliée par 3 en utilisant une colonne de 2,1 mm de diamètre intérieur par rapport à une colonne de 4,6 mm [120]. De même, le développement récent de systèmes chromatographiques caractérisés par de faibles tailles de particules (UPLC) a permis d'augmenter par 10 la sensibilité avec une séparation de 16 AAH en deux minutes [121]. Enfin, la nature des phases mobiles et le type d'élution adopté sont fonction du mélange d'AAH à séparer. D'une manière générale,

des gradients d'élution sont employés, bien que quelques exemples d'élution isocratique soient décrits lorsque le détecteur employé l'impose et que le nombre d'AAH à séparer reste faible.

Tableau 8. Exemples de colonnes HPLC utilisées pour la caractérisation des AAH.

Colonne	Greffage	L (mm)	d _{int} (mm)	d _p (μm)	Détecteur	Référence
Acquity BEH C18	C18	50	2,1	1,7	ESI-tQ	[121]
Aquasil C18	C18	100	1	3	ESI-tQ	[122]
Hypersyl DBS C18	C18	250	1	5	ESI-tQ	[123]
LiChrospher 60-RP Select B	C8	100	2	5	ESI-tQ	[124]
LiChrospher 60-RP Select B	C8	250	4	5	ED Fluo	[90] [73] [125]
LiChrospher RP Select B	C8	250	4	5	Fluo	[92]
LiChrospher Superspher 60 RP select B	C8	250	2	4	Fluo	[98]
Nucleosil 120 C18	C18	150	4	5	UV	[126]
ODS 80 TM	C18	250	4,6		DAD Fluo	[127]
ODS Hypersil C18	C18	100	1	5	ESI-tQ	[128]
Purospher Star RP C18	C18	150	2,1	5	ESI-ITMS	[119]
Symmetry C8	C8	150	2,1	5	ESI-ITMS	[71] [119] [129] [130]
Symmetry C8	C8	150	2,1	5	ESI-tQ	[131]
Symmetry C8	C8	150	2,1	5	ESI-Q	[130]
Symmetry C8	C8	150	2,1	5	ESI-QToF	[132]
Symmetry C8	C8	150	2,1	5	ED	[129]
SynChropak RP-8	C8	250	4,6		DAD	[101]
SynChropak SCD-100	Chaîne courte	250	4,6	5	APCI-tQ	[133]
Synergi Max RP	C12	150	2,1	4	ESI-ITMS	[119]
TSK GEL ODS 80	C18	250	4,6		DAD	[72]
TSK GEL ODS 80	C18	250	4,6		DAD Fluo	[82]
TSK GEL ODS 80 T	C18	250	4,6	5	DAD Fluo ED	[102]
TSK GEL ODS 80 T	C18	250	4,6	5	ED	[126]
TSK GEL ODS 80 T	C18	250	4,6	5	APCI-Q	[134]
TSK GEL ODS 80 T	C18	250	4,6	5	DAD	[108]
TSK GEL ODS 80 T	C18	250	4,6	5	APCI-ITMS	[135] [136]
TSK GEL ODS 80 TM	C18	150	4,6	5	DAD	[111]
TSK GEL ODS 80 TM	C18	250	4,6	5	DAD Fluo	[74] [76] [81] [83] [90] [93] [96] [137]
TSK GEL ODS 80 TM	C18	220	4,6	5	DAD Fluo	[9] [69] [70] [100]
TSK GEL ODS 80 TM	C18	250	4,6	5	APCI-tQ	[138]
TSK GEL ODS 80 TM	C18	250	4,6	5	UV	[139]
TSK GEL semi-micro ODS 80 TM	C18	150	2,1	5	ESI-ITMS	[119]
TSK GEL Super ODS	C18	100	4,6	2	ESI-tQ	[140]
TSK ODS 80	C18	250	4,6	5	ESI-Q	[109]
TSK ODS 80 TM	C18	250	4,6	5	DAD	[101]
TSK Super ODS	C18	100	4,6	2	ESI-Q	[109]
Vydac C18	C18	250	2,1	5	APCI-tQ	[141]
Zorbax SB-C8	C8	150	2,1	3,5	ESI-ITMS	[119]
Zorbax SB-C8	C8	100	1		ESI-tQ	[86]

Une technique de détection des AAH très utilisée avec l'HPLC est la spectrométrie d'absorption UV [113]. La plupart des AAH peuvent être détectées simultanément avec des longueurs d'ondes comprises entre 260 et 275 nm. L'utilisation de détecteurs à barrettes de diodes (DAD) permet d'obtenir un spectre d'absorbance UV de la substance éluée autorisant une comparaison avec le spectre de la molécule standard. Les limites de détection obtenues sont comprises entre le dixième et la dizaine de ng/g en fonction de la pureté de l'échantillon

analysé. En effet, la détection par absorption UV est peu sélective compliquant la détection des AAH dans des extraits complexes de viandes cuites.

La détection par fluorescence n'est possible que pour les carbolines, et quelques AAH de la famille des pyridines comme PhIP, IFP, DMIP et 1,5,6-TMIP, qui sont les seules AAH possédant des propriétés fluorescentes. Les longueurs d'onde d'excitation utilisées pour les AAH sont comprises entre 263 et 360 nm, et les longueurs d'onde d'émission entre 370 et 450 nm. Malgré une bonne sélectivité de détection, la fluorescence ne permet pas de confirmer l'identité des espèces détectées. C'est pourquoi, ce mode de détection a souvent été utilisé en parallèle d'une détection DAD ou MS afin de confirmer l'identité des espèces détectées par fluorescence. Bien que ce mode de détection ne soit pas applicable à la quantification de toutes les AAH, il peut être jusqu'à 400 fois plus sensible que la détection UV [142]. Enfin, une fluorescence des dérivés acétylés de MeIQ et IQ a pu être observée dans certains solvants, notamment le DMSO ou le dichlorométhane [113]. Une dérivatisation des AAH par des composés fluorescents a également été tentée sans obtenir des résultats satisfaisants [143].

Dans le cas de méthodes développées pour l'analyse des AAH avec détection électrochimique, les potentiels utilisés varient entre +190 et +1000 mV. La composition de la phase mobile influençant la sensibilité et la sélectivité de la détection électrochimique, les détecteurs ampérométriques [73, 90, 102, 125, 129, 144] et coulométriques [145] sont associés à une élution isocratique, ce qui rend l'analyse simultanée d'un grand nombre d'AAH délicate. Néanmoins, la plupart des interférences observées en UV ne sont pas oxydées aux potentiels nécessaires à la détection des AAH, ce qui permet d'obtenir des limites de détection 2 à 3 fois plus faibles que celles obtenues avec une détection UV [113].

Durant ces dernières années, le couplage entre l'HPLC et la spectrométrie de masse (LC-MS) s'est imposé comme la méthode de choix pour quantifier les AAH dans les viandes cuites. En effet, bien que ce mode de détection ait une sensibilité comparable à la fluorescence ou à l'électrochimie, la spectrométrie de masse est la seule technique permettant d'identifier sans ambiguïté les substances détectées. Comme pour le couplage GC-MS, la détection en mode SIM permet d'obtenir une bonne sensibilité et a été largement utilisée. Néanmoins, l'étude des fragmentations des AAH ionisées est nécessaire afin de confirmer l'identité des composés détectés. Ainsi, le mode SIM est aujourd'hui remplacé par les modes « Single Reaction Monitoring » (SRM) ou « Multiple Reactions Monitoring » (MRM) afin de détecter spécifiquement des espèces de rapports m/z recherchés générant des fragments spécifiques de leurs structures lors d'expériences MS/MS. De plus, ce mode d'acquisition peut être plus sensible que le mode SIM en fonction du type d'extrait analysé [130]. Plusieurs modes d'ionisation ont été utilisés pour l'analyse des AAH par LC-MS, parmi lesquels l'ionisation par Thermospray (TSP) a été le premier. Plusieurs études ont décrit le

dosage d'AAH à des concentrations voisines du ng/g par LC-TSP-MS [120, 146] ce qui représente une sensibilité équivalente aux méthodes de dosage des AAH par LC-UV.

Cependant, l'ionisation par TSP a été de moins en moins utilisée en raison des développements des sources d'ions à pression atmosphérique (APCI, ESI) et des colonnes chromatographiques de plus faibles diamètres. Les techniques d'ionisation par ESI et APCI étant de nos jours les plus utilisées pour l'analyse des AAH par LC-MS, nous allons en décrire brièvement les principes. Le processus d'ionisation/désorption par Electrospray se déroule à température ambiante et à pression atmosphérique. La solution provenant de la colonne chromatographique entre dans la source d'ions par un capillaire porté à un haut potentiel à l'extrémité duquel des gouttelettes chargées vont se former par l'intermédiaire du champ électrique intense produit entre le capillaire et le système de contre-électrodes constitué par le dispositif d'introduction des ions dans le spectromètre de masse. Un cône de Taylor puis un spray de gouttelettes chargées sont alors formés à la sortie du capillaire comme le montre la Figure 11. Durant le transfert entre le capillaire et le spectromètre de masse, le solvant des gouttelettes s'évapore jusqu'à la limite de Rayleigh. A ce stade, les répulsions coulombiennes des molécules chargées deviennent supérieures aux tensions superficielles des gouttelettes induisant l'explosion des celles-ci. Ce mécanisme se répète plusieurs fois en cascade jusqu'à l'évaporation presque totale du solvant. On parle de chaîne d'explosions coulombiennes. Deux modèles sont communément admis pour la production d'ions en phase gazeuse à partir de ces gouttelettes chargées. Il s'agit d'une part du modèle de Dole et d'autre part du modèle d'Iribarne et Thomson, qui sont décrits en détail dans un ouvrage dédié à l'ionisation par Electrospray [147]. Les dernières molécules de solvants sont éliminées par l'échantillonneur ou l'écrémeur (skimmer) formé par la contre-électrode. L'évaporation du solvant peut être facilitée par l'application d'un gaz (N_2) et/ou d'un capillaire de transfert chauffé. Dans le cas de petites molécules organiques comme les AAH, le mode d'ionisation par Electrospray forme généralement des espèces protonées $[M+H]^+$ ou déprotonées $[M-H]^-$, même si différents ions adduits peuvent également être observés. Ainsi, de nombreuses méthodes de dosage d'AAH par LC-ESI-MS ont été publiées (Tableau 8) avec une sensibilité comprise entre 0,01 et 1 ng/g selon les AAH considérées.

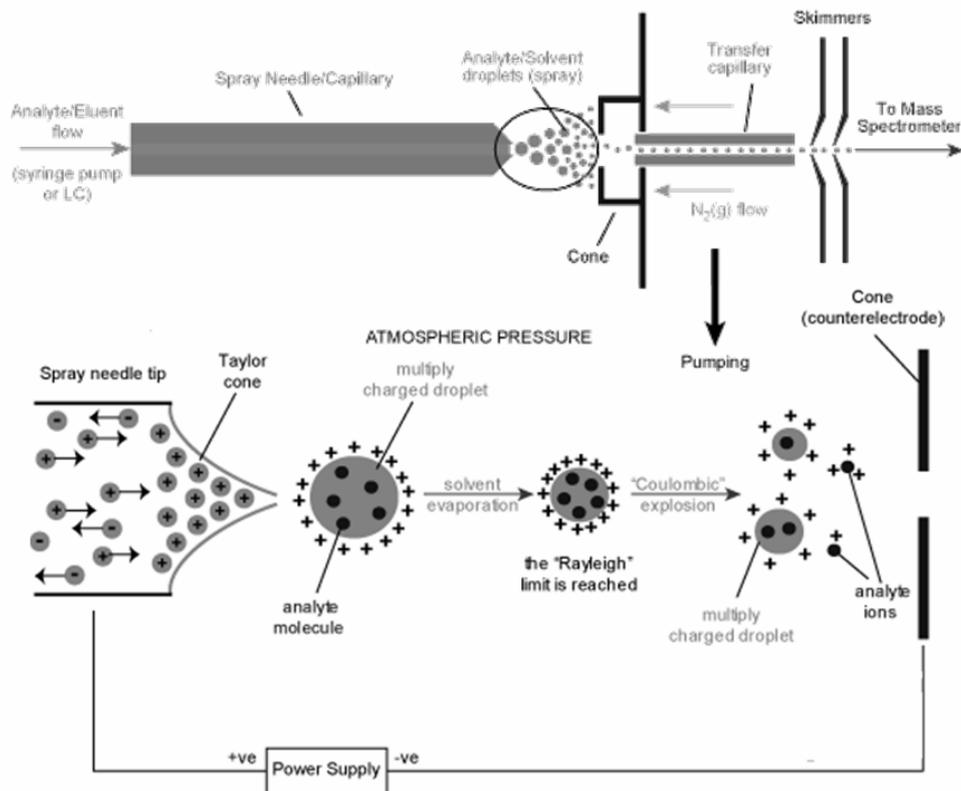


Figure 11. Schéma de la source ESI et principe de l'ionisation/désorption par Electrospray [148].

L'autre mode d'ionisation principalement employé pour l'analyse des AAH par LC-MS est l'APCI. Contrairement à l'ESI dont le processus d'ionisation conduit à la formation d'ions en phase liquide au sein des gouttelettes, les ions sont formés en phase gazeuse dans une source d'ions APCI. Dans un premier temps, les molécules sont vaporisées par chauffage et application d'un gaz nébuliseur (Figure 12). Puis, le processus d'ionisation intervient en phase gazeuse selon un mécanisme comparable à celui de l'ionisation chimique mais à pression atmosphérique [149]. Pour cela, des électrons sont produits par une décharge couronne qui génère un plasma d'ions produits à partir de l'azote moléculaire présent dans l'air et des molécules de solvants présentes en phase gazeuse (Figure 12). A partir de ces ions, des processus de transfert de proton sont envisageables entre le solvant ionisé et les molécules d'intérêt selon les affinités protoniques des espèces en présence. Les espèces ioniques formées sont majoritairement du type $[M+H]^+$ ou $[M-H]^-$. Plusieurs dosages d'AAH par LC-APCI-MS ont également été décrits (Tableau 8), et les sensibilités atteintes sont globalement équivalentes à celles obtenues par les méthodes LC-ESI-MS.

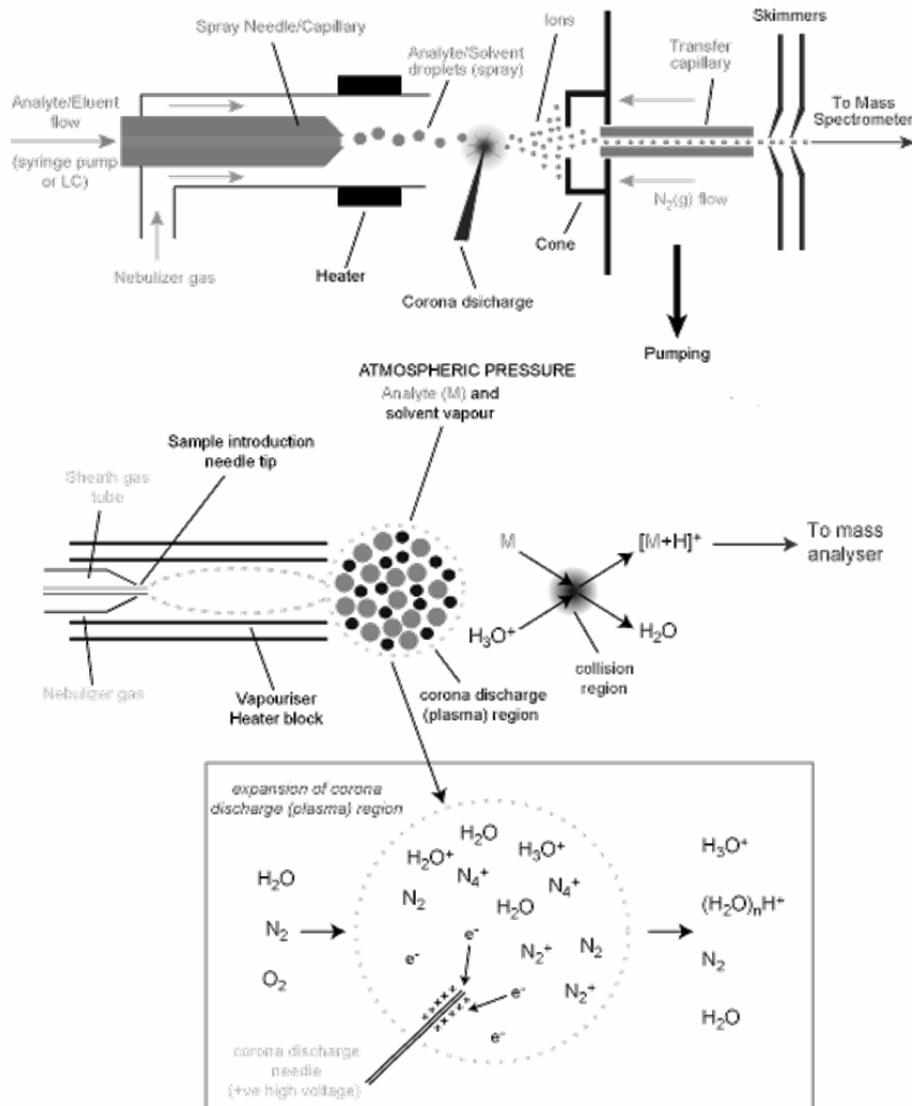


Figure 12. Schéma de la source APCI et principe de l'ionisation par APCI [148].

Différents types d'analyseurs de masse ont été utilisés au cours des dosages d'AAH par LC-MS. Le premier d'entre eux est le simple quadripôle, analyseur basse résolution qui autorise la fragmentation des ions uniquement par des collisions en source ce qui manque de sélectivité et produit généralement un bruit chimique important. Bien que répandu dans un grand nombre de laboratoires, l'analyseur simple quadripolaire est relativement peu adapté à l'analyse de composés présents à l'état de traces au sein de matrices relativement complexes, principalement en raison de son manque relatif de sélectivité de détection. Les analyseurs principalement utilisés pour la quantification des AAH dans les viandes cuites sont d'une part le triple quadripôle, et d'autre part la trappe d'ions, bien qu'un instrument hybride de type quadripôle-temps de vol ait également été employé, comme l'indique le Tableau 8.

L'analyseur triple quadripolaire est considéré comme le meilleur outil pour l'analyse quantitative de traces, et à ce titre a été utilisé dans de nombreuses études portant sur la quantification d'AAH dans des extraits de viandes cuites (voir Tableau 8). Cet analyseur est employé en exploitant ses fonctions de suivi de réactions multiples (MRM) permettant, avec les progrès de l'électronique, de suivre un grand nombre de transitions dans la même seconde, ce qui en fait l'analyseur de choix pour les méthodes d'analyse multi-résidus.

La capacité de la trappe d'ion à piéger et fragmenter successivement les ions lors de séquences temporelles MS^n confère à cet analyseur une excellente aptitude à l'analyse structurale en permettant l'établissement des filiations ioniques. Cette propriété a été mise à profit dans un travail consacré à l'étude des fragmentations des AAH en MS^n [150]. Cependant la trappe d'ions a également été utilisée dans plusieurs études consacrées au dosage des AAH, comme ceci est rapporté dans le Tableau 8. Le mode d'acquisition utilisé est généralement l'acquisition en spectre complet puisque cet analyseur présente une sensibilité de détection quasiment équivalente en mode spectre complet comparé au mode équivalent au SRM dans une trappe d'ions.

Enfin, le QqToF est un spectromètre MS/MS hybride associant un simple quadripôle et un analyseur à temps de vol, séparés par une cellule de collision quadripolaire permettant de fragmenter les ions par CID. L'analyseur à temps de vol de ce spectromètre de masse peut être équipé d'un réflecteur électrostatique qui lui permet de mesurer la masse exacte des ions en raison de sa haute résolution. Le spectromètre de masse hybride QqToF a également été utilisé pour doser des AAH dans des viandes cuites avec une sensibilité comparable à celle de l'analyseur triple quadripolaire [132] en raison de sa bonne transmission d'ions et la possibilité de réaliser des acquisitions en mode SRM.

Une étude a comparé les limites de détection obtenues par dosage d'AAH dans un même extrait avec une trappe d'ions, un simple quadripôle et un triple quadripôle et a démontré que le système triple quadripolaire était le plus sensible, grâce à une bonne transmission d'ions et à la réalisation d'expériences SRM [130].

Enfin, la dernière méthode séparative décrite pour l'analyse des AAH est l'électrophorèse capillaire de zone (CZE) qui est nettement plus efficace de l'HPLC mais moins utilisée. Les substances chargées en solution sont séparées en fonction de leur mobilité électrophorétique par un champ électrique dans un capillaire. Cette mobilité électrophorétique dépend du pKa des composés à séparer, du pH de la solution tampon, de la concentration de la solution tampon, de la température, de la force du champ électrique et de la présence de molécules organiques modifiant la mobilité. Le premier mode de détection utilisé pour la caractérisation des AAH par CZE a été la spectrométrie UV mais cette technique conduit à des limites de détection incompatibles avec les quantités d'AAH présentes dans les viandes cuites [151, 152]. Cette sensibilité a été améliorée de manière

importante par la séparation électrophorétique micellaire des AAH avec un détecteur électrochimique, ce qui a permis d'atteindre des limites de détection comparables à celle observées en HPLC-ED [153]. Enfin, l'électrophorèse capillaire a été associée à la spectrométrie de masse utilisant une ionisation par nano-ESI, ce qui a permis d'atteindre une sensibilité comparable à celle des expériences menées en LC-APCI-MS/MS [154].

IV Conclusion et problématique de la quantification des AAH

De nombreuses méthodologies d'extraction et de quantification des AAH permettant d'estimer les niveaux d'exposition de l'Homme aux AAH, ont été décrites au cours des vingt dernières années. Néanmoins, avec l'optimisation progressive de ces méthodologies, elles tendent aujourd'hui à converger vers quelques méthodes d'extraction et de détection considérées comme standards. Ceci a été vérifié au cours d'un exercice inter-laboratoires Européen dont les conclusions ont été communiquées en 2004 [155]. Ainsi, un protocole d'extraction et de purification basé sur la méthode de Gross et Grüter (Figure 10b) [106] a été appliqué par quatre laboratoires sur des échantillons standardisés [131]. De plus, deux méthodes d'extractions supplémentaires basées sur la méthode de Gross (Figure 10a) [105] et de Messner (Figure 10d) [68] ont également été utilisées au cours de cette étude. Tous les dosages ont été réalisés par HPLC avec différentes colonnes chromatographiques (C8 et C18), avec différents détecteurs (ITMS, Q, tQ, DAD, Fluo et ED) et avec différents types d'étalons internes (4,7,8-TriMeIQx et D₃-IQ, D₃-MeIQx, D₃-PhIP). La comparaison des résultats obtenus a permis de démontrer que les trois méthodes d'extraction pouvaient être recommandées pour l'analyse des AAH, que la caractérisation par HPLC-Fluo permettait de doser certaines AAH mais que le couplage LC-MS/MS représentait la méthode la plus adaptée au dosage de nombreuses AAH dans des matrices complexes, et enfin que l'étalonnage interne par 4,7,8-TriMeIQx était le meilleur compromis entre précision de la mesure et coût de l'étalon.

Néanmoins, la grande variabilité des quantités d'AAH présentées précédemment dans les Figures 8 et 9 souligne l'importance des facteurs influençant les taux de formation des AAH. Le nombre de ces facteurs et la complexité de leur contrôle interdisent en outre toute estimation précise des quantités d'AAH absorbées quotidiennement sans un grand nombre de dosages. Or, toutes les méthodologies de quantification validées par l'étude inter-laboratoire présentée précédemment nécessitent des manipulations longues et délicates à mettre en œuvre. Ceci constitue une des limitations pour la réalisation d'études pertinentes sur l'effet des AAH chez l'Homme [47]. C'est pourquoi, le développement de méthodologies rapides de dosage serait nécessaire.

V Activation métabolique et génotoxicité des AAH

V. 1 Métabolisme des AAH

Suite à la formation des AAH dans les viandes cuites et à leur ingestion, les AAH sont absorbées dans le système digestif et transférées dans la circulation générale. Néanmoins, la biodisponibilité des AAH est variable selon la polarité de chaque AAH, et diminue avec l'augmentation du degré de cuisson de la viande [137]. De plus, la biodisponibilité des AAH semble totale avec une élimination de 100% de la dose administrée de PhIP au bout de 96h chez la souris (90% dans l'urine et 10% dans les fèces), avec une demi-vie plasmatique de 1 heure et une concentration maximale dans les tissus atteinte en 3 heures [156]. Enfin, seulement 1 à 5 % de la dose d'AAH ingérée est retrouvée sous forme non métabolisée dans les urines indiquant une biotransformation importante de ces substances par l'organisme [157,137].

Il existe deux grandes voies de transformations métaboliques des AAH : la détoxification favorisant leur élimination, et la bioactivation formant des substances génotoxiques. En effet, il est nécessaire que les AAH soient bioactivées pour être mutagènes, puis cancérigènes [23]. Les enzymes impliquées dans le métabolisme des AAH sont à la fois des enzymes de phase I et II comprenant des cytochromes P450 (CYP), des sulfotransférases (SULT), des UDP-glucuronosyltransférases (UGT), des *N*-acétyltransférases (NAT) et des glutathion *S*-transférases (GST). Les voies métaboliques majoritaires de quelques AAH (PhIP, MeIQx, IQ et A α C) ont été décrites [20, 158, 159] et sont résumées dans la Figure 13.

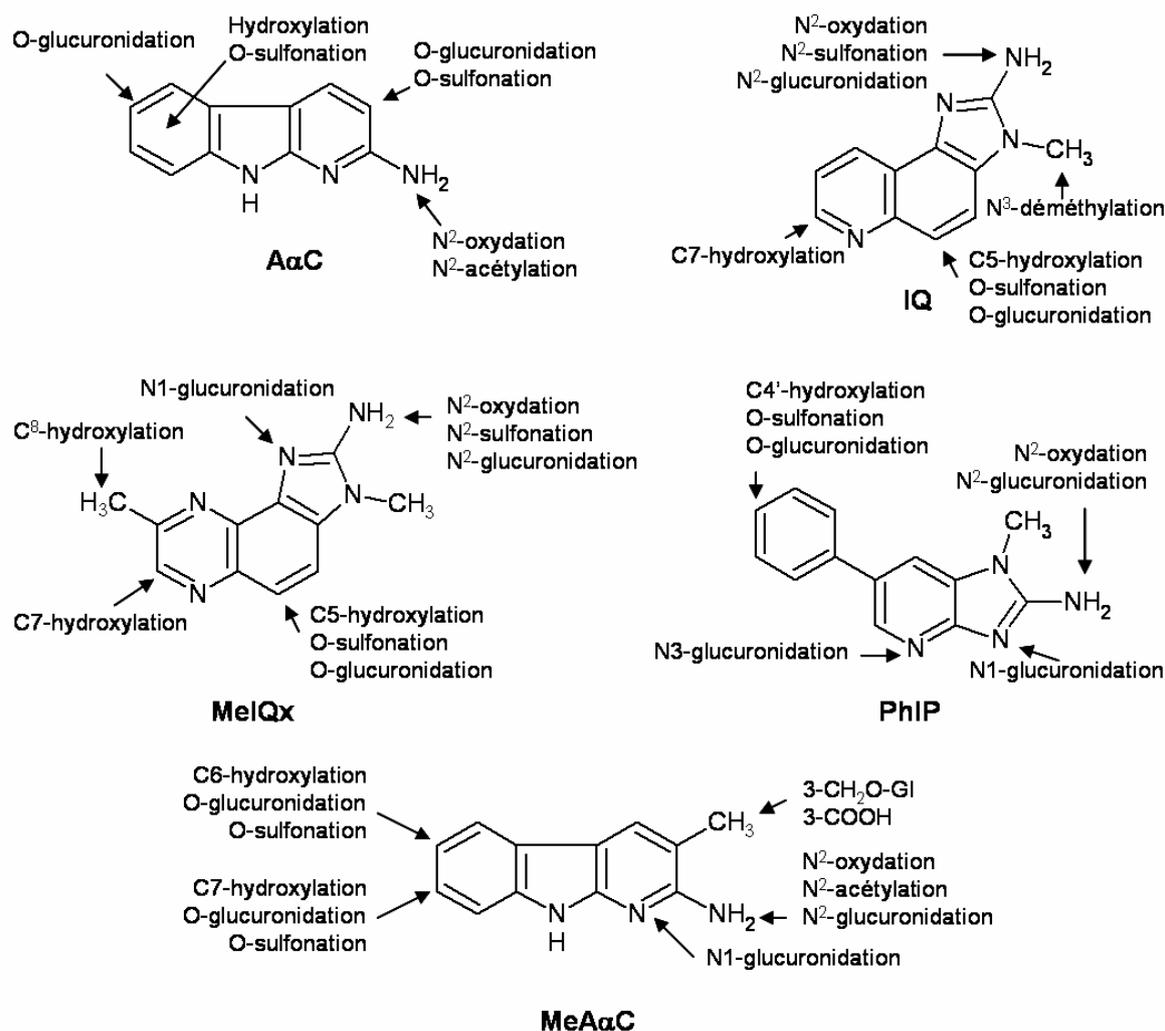


Figure 13. Principales voies métaboliques des AAH chez l'animal et l'Homme [20, 158, 159].

Toutes ces voies métaboliques, à l'exception d'une seule, correspondent à des processus de détoxification des AAH et conduisent à leur élimination. Le mécanisme général des processus métaboliques activant les AAH en espèces réactives vis-à-vis des bases de l'ADN est détaillé dans la Figure 14. Les AAH sont dans un premier temps *N*-hydroxylées par un métabolisme hépatique de phase I, puis estérifiées au cours d'un métabolisme de phase II directement dans les tissus cibles [28]. Les enzymes de phase I impliquées dans la *N*-hydroxylation des AAH sont des cytochromes P450, et majoritairement CYP1A2 bien que les CYP1A1, 3A4, 2C9/10, 2A3 et 1B1 puissent intervenir de façon minoritaire. Les enzymes de phase II impliquées dans les réactions de conjugaison des *N*-hydroxylamines sont des *N*-acétyltransférases (NAT), des sulfotransférases (SULT), des ARNt synthétases et des phosphorylases [23]. Enfin, la liaison N-O des *N*-hydroxylamines conjuguées subit une rupture hétérolytique formant des ions arylnitronium extrêmement électrophiles pouvant réagir avec les sites nucléophiles des bases de l'ADN [160]. Il faut également noter que d'autres transformations métaboliques peuvent détoxifier les AAH bioactivées, par réaction

avec le glutathion (GSH) de façon spontanée ou catalysée par des glutathion S-transférases (GST), ou bien par action d'une réductase NADPH-dépendante et d'UDP-glucuronosyltransférases (UGT) [158].

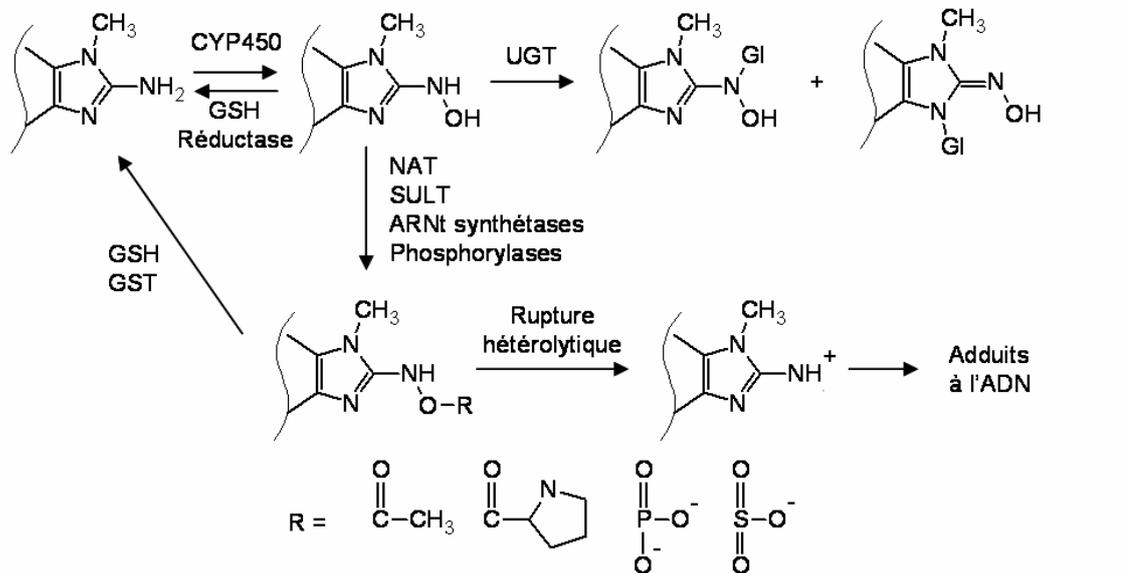


Figure 14. Voies métaboliques suivies par les *N*-hydroxylamines conduisant à la formation d'adduits covalents avec les bases de l'ADN [23, 158].

L'oxydation des AAH en *N*-hydroxylamines a essentiellement lieu dans le foie où agit majoritairement le CYP1A2. Les métabolites formés dans le foie seraient ensuite distribués dans l'organisme via la circulation sanguine [161] où ils peuvent se fixer aux protéines [162] mais dans une faible proportion puisque seulement 0,01% de la dose administrée de IQ et MeIQx est retrouvée fixée à l'hémoglobine et l'albumine [163]. Le métabolisme de phase II intervient dans différents organes, essentiellement dans les tissus extrahépatiques. Par exemple, l'activité *N*-acétyltransférase chez le rat est 16 fois plus importante dans les glandes mammaires que dans le foie [28]. L'efficacité de ce métabolisme de phase II dépend essentiellement de l'organe considéré ce qui permettrait d'expliquer en partie les variations de quantités d'adduits formés en fonction de l'organe étudié [164].

Selon qu'il s'agisse d'un modèle animal ou de l'Homme, les activités métaboliques observées sont également différentes [165, 166]. Il a ainsi été montré que l'efficacité catalytique du cytochrome P450 1A2 humain était 16 fois plus élevée que son équivalent chez le rat [31]. De même, la voie de détoxification majoritaire de PhIP chez le rat impliquant la formation de 4'-OH-PhIP qui est ensuite glucuro-conjugué et sulfo-conjugué, est minoritaire chez l'Homme. Néanmoins, par rapport aux rongeurs, le métabolisme humain de PhIP est dominé par des glucuronidations qui forment des métabolites non-réactifs [167]. De plus, de nombreux gènes humains codants pour des enzymes métaboliques sont

polymorphes (variations génétiques au niveau d'un allèle d'un gène), induisant des phénotypes (expressions) différents. De ce fait, l'activité métabolique vis-à-vis des AAH diffère d'un individu à l'autre. Il existe au moins dix allèles différents dans les séquences codantes des gènes exprimant le CYP1A2 ou l'enzyme NAT2, et au moins deux ont été mises en évidence pour la NAT1. Les enzymes SULT, UGT et GST présentent également un polymorphisme [158]. Cependant, bien qu'un individu exprimant fortement le gène correspondant au CYP1A2 présente un risque élevé vis-à-vis des AAH, les conséquences biologiques induites par les polymorphismes touchant les autres enzymes sont plus difficilement prévisibles [168]. En effet, l'action de ces autres enzymes peut entraîner soit une détoxification soit une bioactivation selon l'organe [169].

Enfin, de nombreux composés présents dans l'alimentation peuvent interférer avec le métabolisme des AAH. Par exemple, le café et la bière contiennent des substances pouvant diminuer l'activité métabolique du CYP1A2 [170, 171]. Au contraire, l'indol-3-carbinol (I3C) ou d'autres composés indoliques présents dans les crucifères comme les brocolis augmentent l'activité métabolique du CYP1A2 d'une part, mais augmentent simultanément l'activité métabolique d'enzymes de phase II, ce qui peut favoriser les voies de détoxification [172, 173]. Ainsi, il existe un grand nombre de substances inhibitrices ou inductrices de la bioactivation des AAH pouvant interagir au niveau de chacune des étapes de bioactivation des AAH [88, 174].

V. 2 Adduits covalents formés avec les bases de l'ADN

Les transformations métaboliques successives des AAH *in vivo* peuvent conduire à la formation des ions arylnitrenium électrophiles pouvant réagir avec les bases de l'ADN. Préalablement à la présentation des adduits covalents formés entre les bases de l'ADN et les AAH, il semble important de rappeler quelques données de nomenclature de ces aspects. Rappelons d'abord que l'ADN est un polymère de nucléotides qui sont formés d'un groupement phosphate, d'un désoxyribose et d'une base (ou nucléobase) purique : adénine (A) et guanine (G), ou pyrimidique : thymine (T) et cytosine (C). Un oligonucléotide représente une chaîne courte de nucléotides. Le côté 5' correspond au groupement CH₂OH du désoxyribose alors que le côté 3' correspond au groupement hydroxyle du 2-désoxyribose comme l'indique la Figure 15. Un désoxynucléoside (dN) est composé du désoxyribose et d'une base (dA, dG, dT, dC). Les structures des bases de l'ADN ainsi que la numérotation de leurs atomes constitutifs sont illustrées dans la Figure 15. La règle de nomenclature des atomes des hétérocycliques est la suivante : l'atome est représenté par son symbole chimique (C, N, O, etc.) suivi du numéro de sa position sur la structure. Dans le cas d'un substituant, le symbole chimique de l'atome est suivi du numéro de la position de

l'atome du cycle auquel il est lié. Ce numéro est placé en exposant pour signaler que l'on a affaire à un atome ou groupement exocyclique. Les bases de l'ADN sont liées au désoxyribose via une liaison covalente impliquant l'atome d'azote N9 des bases puriques et N1 des bases pyrimidiques.

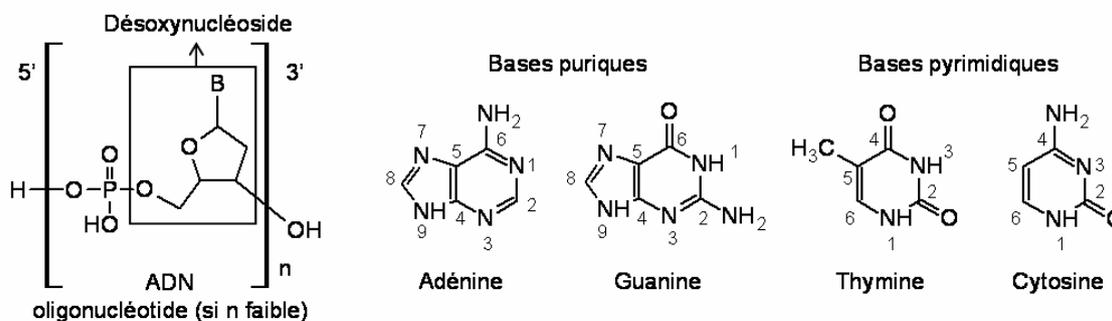


Figure 15. Structures des espèces constituant l'ADN.

En fonction de la famille chimique de l'espèce cancérigène étudiée, les voies métaboliques empruntées, et par conséquent les espèces réactives vis-à-vis des bases de l'ADN seront différentes. Ainsi, les mécanismes de formation des adduits et la position de la liaison covalente entre le composé génotoxique et la base seront différents en fonction de la famille chimique étudiée. Les espèces réagissant avec les bases de l'ADN peuvent être divisées en trois groupes [175] :

- les agents alkylants
- les agents aralkylants polycycliques
- les dérivés arylhydroxylamines.

Le groupe des agents alkylants inclut notamment les nitrosamines, les époxydes aliphatiques, les aflatoxines, les lactones, etc. Les principaux sites nucléophiles avec lesquels ils forment des adduits sont N7 et O⁶ pour dG, N1, N3 et N7 pour dA, O² pour dC ainsi que O² et O⁴ pour dT. Les adduits majoritaires concernent l'atome N7 de dG ou de dA entraînant des processus de dépurination de l'ADN qui seront présentés ultérieurement. Par exemple, les catéchols œstrogènes issus du métabolisme de l'œstradiol-17β peuvent former à la fois des adduits dG-N² stables et des adduits dG-N7 dépurinants [176]. De même, l'acrylamide est également connu pour former un adduit dépurinant dG-N7 [177].

Les agents aralkylants sont représentés notamment par une grande partie des hydrocarbures aromatiques polycycliques et leurs équivalents nitro-aromatiques, qui sont bioactivés sous la forme d'un époxyde dihydrodiol. Ces espèces réagissent majoritairement avec les atomes d'azote exocycliques des nucléobases (dG-N², dA-N⁶ et dC-N⁴). Par exemple, la forme bioactivée du dibenzo[*a,l*]pyrène forme un adduit dA-N⁶ [178].

Enfin, les arylamines représentent un groupe constitué des amines aromatiques, des amides aromatiques, des colorants aminoazoïques et des amines aromatiques hétérocycliques. Ces substances ne réagissent qu'avec les bases puriques dA et dG et en particulier avec les atomes C8 et N⁶ de dA, C8, N² et minoritairement O⁶ de dG. Par exemple, la formation d'adduits dG-C8 et dG-N² a été décrite pour le 2-acétylaminofluorène [179].

Tous les adduits formés aux positions citées ci-dessus sont des espèces stables se traduisant par la formation de bases modifiées sur l'ADN, excepté pour les adduits impliquant la position N7 de dA ou dG. La réactivité de cette position est particulière car l'atome N7 représente le site le plus nucléophile et par conséquent le site potentiellement le plus réactif vis-à-vis des espèces électrophiles [180]. L'alkylation de la position N7 induit la formation d'une charge positive sur la guanine qui devient ainsi un bon groupe partant pour une réaction de type S_N1 assistée par un hétéroatome. Le mécanisme de cette réaction de dépurination illustré dans la Figure 16a, entraîne la formation d'un site abasique sur la séquence de l'ADN. Néanmoins, la dépurination n'est pas la seule réaction induite par la formation d'un adduit dG-N7. En effet, la formation d'un tel adduit peut également entraîner l'ouverture du cycle imidazole pour former une lésion FAPy (Figure 16b) comme cela a été décrit avec l'aflatoxine B₁ par exemple [181]. Enfin, il a été proposé dans le cas de la réaction entre dG et l'ion nitrenium du 2-aminofluorène que l'adduit dG-N7 conduirait à un adduit dG-C8 par réarrangement (Figure 16c) [182]. Ceci a ensuite été confirmé avec le 4-aminobiphényle [183] puis avec la caractérisation structurale d'adduits dG-N7 stables par spectrométrie RMN [184, 185].

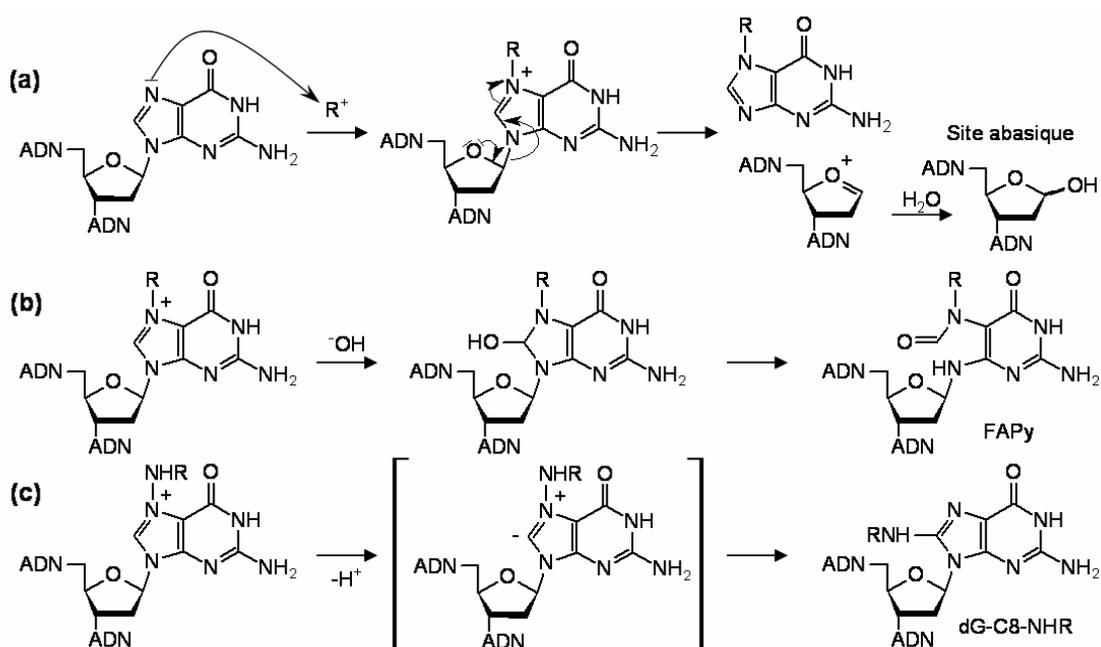


Figure 16. Mécanismes induits par la formation d'adduits dG-N7 : la dépurination [180] **(a)**, la formation de lésions FAPy [180] **(b)** et le réarrangement en adduit dG-C8 [182] **(c)**.

Concernant les AAH, le caractère cancérogène de certaines d'entre elles chez des animaux de laboratoire a conduit à la recherche et à la détection d'adduits covalents formés avec les bases de l'ADN. Les structures des différents adduits caractérisés ont été obtenues par comparaison entre les adduits générés *in vivo* et des adduits modèles synthétisés *in vitro* et analysés par spectrométrie UV, de masse et RMN. Tous les adduits identifiés à ce jour entre les AAH et les bases de l'ADN concernent uniquement la guanine et les AAH suivantes : Glu-P-1 et Trp-P-2 [186], MeIQ [187], 4,8-DiMeIQx [188], PhIP [189, 190, 191], MeA α C [192], A α C [193], IQ [194, 195] et MeIQx [194, 196]. Toutes ces AAH bioactivées génèrent *in vivo* des adduits covalents entre leur atome d'azote N² et l'atome de carbone C8 de la guanine (dG-C8-AAH). De plus, IQ et MeIQx mènent également à la formation d'un adduit supplémentaire minoritaire entre leur atome de carbone C5 et l'atome d'azote N² de la guanine (dG-N²-AAH) par délocalisation de la charge de l'ion nitrénium sur l'atome de carbone en position 5 de ces AAH [194]. Quantitativement, l'adduit dG-N² est 5 à 10 fois moins abondant que l'adduit dG-C8 [197]. Les structures des adduits formés *in vivo* entre les AAH et les bases de l'ADN sont présentées dans la Figure 17. Signalons enfin, qu'aucune dépurination n'a été observée à ce jour sous l'action des AAH, ni de lésion FAPy.

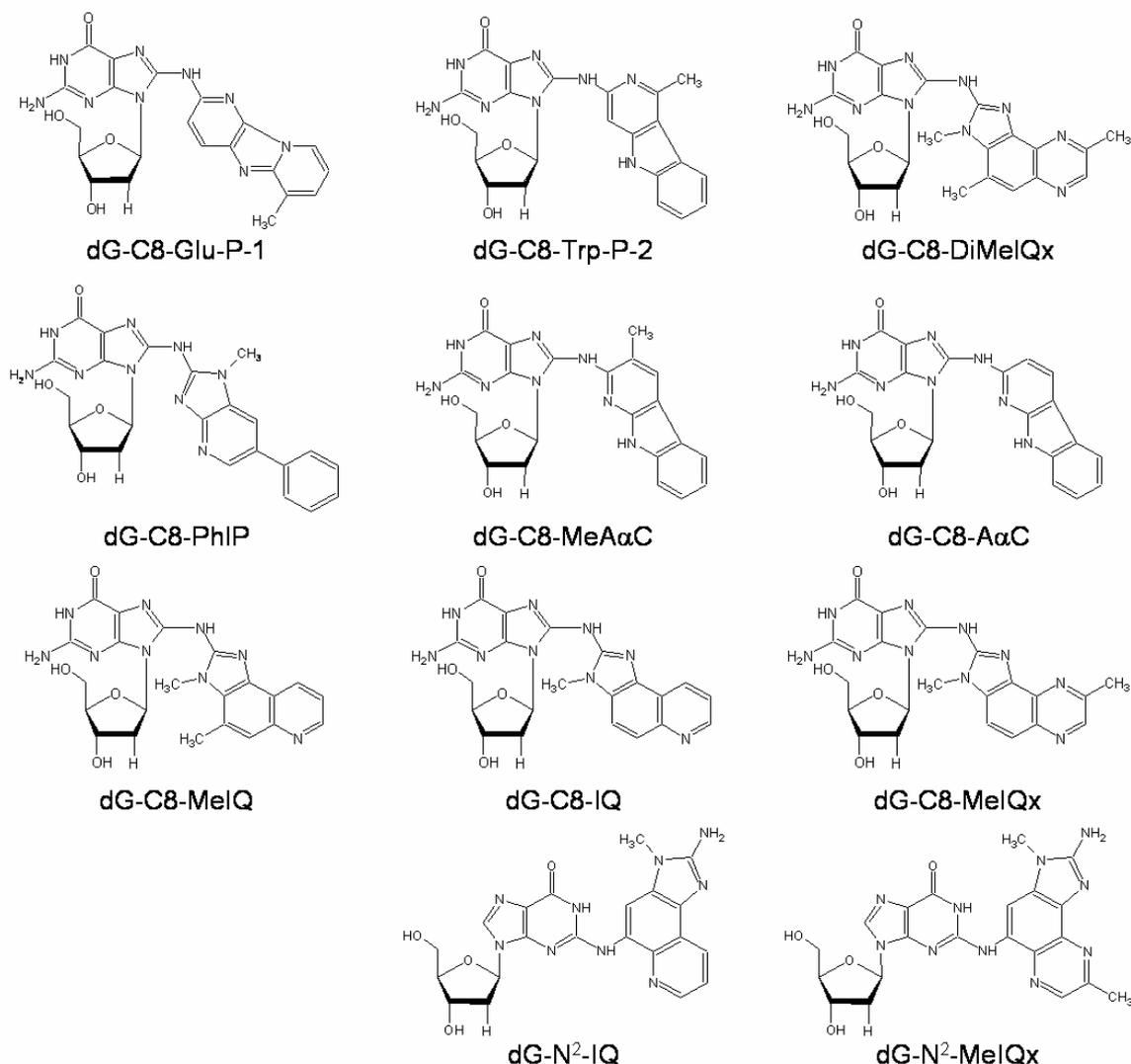


Figure 17. Structures des adduits formés entre les AAH et les bases de l'ADN [197].

V. 3 Génotoxicité des AAH

La formation d'adduits covalents induit une déformation importante de la conformation de l'ADN comme ceci a été démontré par modélisation structurale par RMN des adduits dG-PhIP et dG-IQ dans des doubles brins [198, 199]. Ces dommages peuvent entraîner l'activation des mécanismes de réparation plus ou moins efficaces de l'ADN et/ou la génération d'erreurs au cours de la réplication. Lorsque que ces erreurs de réparation ou de réplication sont transmises à la cellule fille, le code génétique de celle-ci est alors différent de celui de la cellule mère, ce qui constitue une mutation. Les mutations classiquement rencontrées sont la délétion (perte d'un ou plusieurs nucléotides), l'addition (gain d'un ou plusieurs nucléotides) et des substitutions (changement d'un nucléotide par un autre).

V. 3. a Mécanismes conduisant à l'apparition de mutations : la mutagenèse

La cellule possède un équipement enzymatique, notamment des enzymes ADN *N*-glycosylases, capables de détecter des distorsions de l'ADN et de les réparer. La réparation par excision de bases (BER) permet de corriger les bases endommagées par un adduit ou les sites abasiques. Le schéma général de la réparation par excision de bases consiste dans un premier temps à repérer et éliminer la base modifiée par l'intermédiaire des ADN *N*-glycosylases. Puis l'AP endonucléase I coupe la chaîne nucléotidique en 5' permettant la réplication du brin complémentaire par des ADN polymérases [200]. Une autre voie de réparation similaire est la réparation par excision de nucléotides (NER) qui constitue la voie principale de réparation des lésions induisant une déformation de l'ADN. La modification est alors repérée par un complexe de protéines provoquant le déroulement de l'ADN sur environ 30 bases sous l'action d'hélicases. Une protéine et un complexe de protéines vont alors s'ancrer respectivement en 3' et 5' autorisant la coupure de la chaîne nucléotidique modifiée (24 à 32 nucléotides). Puis, des ADN polymérases réalisent la réplication du brin complémentaire [200]. Néanmoins, ces deux voies de réparation (BER et NER) peuvent entraîner des erreurs de réplication du brin complémentaire.

Dans ce cas, les mécanismes de réplication assurés ensuite par des ADN polymérases de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' du brin d'ADN, peuvent réparer ces erreurs. En effet, les ADN polymérases γ , δ et ϵ sont dotées d'une activité exonucléase allant dans le sens 3' vers 5' permettant de vérifier la fidélité de la réplication et corriger les mauvais appariements des nucléotides. De plus, la polymérase β intervient exclusivement dans la réparation de certaines modifications de l'ADN. Ainsi, les ADN polymérases contrôlent à posteriori le produit de leur intervention. Enfin, les mésappariements de paires de bases peuvent également être corrigés par des enzymes spécifiques [201]. Malgré leur nombre et leur efficacité, ces processus de réparation de l'ADN ne permettent pas de corriger la totalité des erreurs, et le taux d'erreur de la réplication est environ de 1 pour 10^{10} à 10^9 bases. Les erreurs de réplication sont transmises à la cellule fille et induisent donc des mutations.

Cependant, si la réplication de l'ADN se produit avant que les mécanismes de réparation décrits précédemment aient été mis en œuvre, les ADN polymérases se trouvent bloquées au niveau de la modification. De plus, lors de la réplication, les deux brins complémentaires de l'ADN sont désappariés, ce qui ne permet pas la correction du brin modifié par son brin complémentaire. Il peut alors se produire une réparation par recombinaison par interaction avec une molécule d'ADN homologue non modifiée qui est répliquée afin de remplacer le morceau d'ADN altéré [201]. Cependant, cette réplication peut commettre des erreurs qui seront transmises à la cellule fille. Le processus de réparation

appliqué en dernier recours est le système SOS. Ce mécanisme est mis en œuvre par la cellule uniquement lorsque les altérations de l'ADN sont suffisamment graves pour arrêter sa synthèse. Cependant, le système SOS privilégie la viabilité de la cellule par rapport à la fidélité de la réplication, au risque d'une altération de l'information génétique. Ainsi, le complexe de réplication du système SOS ignore la lésion et la remplace par un nucléotide « au hasard » pouvant induire une substitution, ou élimine le nucléotide modifié induisant une délétion [202]. Ce système de réparation entraîne donc un taux de mutation important.

V. 3. b Mécanismes entraînant l'apparition de cancer : la cancérogenèse

Les conséquences des mutations génétiques sur la fonction des protéines correspondantes sont variées. En premier lieu, il est nécessaire que la mutation touche la partie codante d'un gène pour qu'elle induise une conséquence. En effet, l'ADN possède de longues séquences nucléotidiques qui ne sont pas exprimées. En revanche, lorsque que la mutation correspond à un gène exprimé, la mutation a alors un effet direct sur la protéine issue de la traduction de ce gène. Cependant, la modification d'un nucléotide d'un codon ne modifie pas forcément la nature de l'acide aminé. De même, il se peut que l'acide aminé issu de la mutation soit peu différent de l'acide aminé d'origine, n'entraînant pas de modification importante de la structure tridimensionnelle et/ou de la fonction de la protéine. Dans ces situations, la mutation est dite muette ou silencieuse. Dans les autres cas, la modification du nucléotide entraîne un changement important du code génétique comme l'apparition d'un codon stop ou d'un acide aminé influençant de manière importante la structure et/ou la fonction de la protéine correspondante. La fonction normalement assurée par cette protéine ne peut donc plus s'exercer normalement, ce qui peut entraîner de graves conséquences sur la vie de la cellule et de l'organisme. Néanmoins, plusieurs séries de mutations sont nécessaires pour qu'il y ait un effet génotoxique sur une cellule ou un organisme. Dans le cas où le gène muté code pour des protéines intervenant dans les mécanismes de mitose comme les télomérases, de suppression des tumeurs comme les protéines *p53* et *Apc*, ou de promotion de la prolifération (oncogènes) comme le gène *c-myc*, la prolifération de la cellule devient incontrôlable, et la cellule se divise indéfiniment jusqu'à la formation d'une tumeur maligne, c'est-à-dire d'un cancer.

V. 3. c Conséquences de la formation des adduits entre les AAH et les bases de l'ADN

La génotoxicité des AAH a été largement étudiée sur des modèles *in vitro* et *in vivo*, et les résultats obtenus ont démontré qu'il n'existait pas de corrélation directe entre le nombre d'adduits formés, la fréquence de mutations et le développement de cancers. Par

contre, il est clairement établi que la formation d'adduits par les AAH bioactivées est nécessaire [23, 203]. L'étude des mutations induites par la présence d'un adduit sur un système modèle a démontré que le nucléotide muté correspondait non seulement au nucléotide modifié par une AAH bioactivée, mais également au nucléotide complémentaire de la base modifiée [204]. Cependant, les relations entre la structure des adduits et leur génotoxicité restent floues si l'on se réfère aux études menées chez le singe et le rat pour dG-C8-IQ et dG-N²-IQ [205, 206]. Outre les mutations, des coupures de brins ont également été constatées en présence d'AAH, coupures qui sont issues soit des mécanismes de réparation des adduits détaillés précédemment (ADN *N*-glycosylases, voir Partie V.3.a), soit de la formation d'adduits dépurinants qui pourraient être induits par les AAH mais qui n'ont encore jamais été mis en évidence à ce jour.

De plus, il existe des portions d'ADN plus ou moins longues qui sont préférentiellement mutées et qui sont nommées « Hot Spots ». Dans le cas des AAH, ces séquences préférentiellement mutées ont été partiellement caractérisées. On sait par exemple que A α C induit des mutations préférentielles G:C→T:A au niveau des nucléotides 86, 95, et 116 du type 5'CGT^{3'} du gène *LacI* de la souris [207]. Des substitutions préférentielles similaires induites par MeIQ ont également été observées au cours de cette étude, sur les nucléotides 186, 198, 201, et 790 du type 5'GC^{3'}. Un résultat similaire concernant MeIQ a été obtenu avec le gène *Ha-ras* du rat et de la souris, avec une substitution préférentielle G→T du codon 5'GGC^{3'} [208]. Par contre, des mutations préférentielles induites par MeIQ du gène codant pour la β -caténine ont été observées chez la souris avec des délétions sur les codons 34 et 35 et une substitution G→A du codon 34 5'GGA^{3'} [209]. A la vue de ces résultats, MeIQ ne semble pas posséder de séquence « Hot Spot » particulière et semble induire des mutations de guanines ou de cytosines complémentaires pouvant présenter divers nucléotides dans leur voisinage. L'action de IQ entraîne des mutations du gène *Apc*, avec des substitutions T→C du codon 523 5'CTG^{3'}, C→T du codon 921 5'ACG^{3'} [208, 210] et des codons 955-956 5'ACG^{3'} chez la souris [211]. La mutation préférentielle induite par IQ au niveau du gène de la β -caténine du rat concerne une substitution C→A du codon 37 5'TCT^{3'} [212], tandis qu'elle concerne une substitution de la guanine des séquences 5'CGC/T^{3'} et une délétion d'un G des séquences 5'CGGA^{3'} au niveau du gène *LacI* du rat [213]. Enfin, le gène *hprt* humain subit préférentiellement des délétions de guanines dans des séquences poly-G ainsi que des substitutions des paires 5'GC^{3'} en présence de IQ. Tout comme MeIQ, IQ semble pouvoir induire des mutations sur des portions de séquences variées. De plus, des mutations de thymines ont été observées alors que ces nucléotides ne sont pas connus pour former des adduits avec IQ d'après les résultats présentés dans la Partie V.2. Les études concernant PhIP sont nettement plus nombreuses et ont permis de caractériser des délétions de guanine(s) et/ou des

substitutions. Un « Hot Spot » de PhIP du type $5'GGGA^{3'}$ a été décrit sur le gène *Apc* du rat [210]. Des résultats similaires ont également été observés sur le gène *LacI* du rat [214, 215, 216] et de la souris [207]. Enfin, une séquence $5'GGA^{3'}$ préférentiellement mutée en présence de PhIP a été décrite sur le gène *Apc* de la souris [211], et 64% des mutations observées sur ce gène correspondaient à la séquence $5'GA^{3'}$ [217].

VI Méthodes analytiques d'étude des adduits à l'ADN

La formation d'adduits covalents à l'ADN est une étape clef dans le développement de certains cancers justifiant l'étude des mécanismes conduisant à la formation de ces modifications de l'ADN. Ainsi, suite à l'identification des adduits formés avec les composés génotoxiques, il est nécessaire de pouvoir détecter et quantifier ces adduits générés *in vivo*. La mesure des adduits formés avec l'ADN constitue en effet l'un des meilleurs outils à l'heure actuelle pour la détermination de biomarqueurs d'exposition et de génotoxicité concernant les substances génotoxiques [218].

VI. 1 Détection et quantification des adduits covalents

VI. 1. a Méthodes analytiques de détection des adduits covalents

La détection, quantification et identification des adduits présents à l'état de traces dans des échantillons issus de milieux biologiques nécessitent des outils analytiques performants [219]. En effet, les taux de modification des bases de l'ADN *in vivo* varient en général entre une base modifiée pour 10^6 à 10^9 bases non modifiées ($1/10^6$ - 10^9). C'est pourquoi, après une étape de libération des adduits par digestion enzymatique de l'ADN extrait, une étape de purification/concentration sur cartouche SPE est nécessaire avant la caractérisation des adduits selon la stratégie générale présentée dans la Figure 18 [220]. En fonction de la méthode de détection utilisée et de l'objectif de l'étude, les adduits sont isolés sous différentes formes (désoxynucléosides, nucléotides ou oligonucléotides) en employant pour cela des méthodologies de digestion enzymatique différentes.

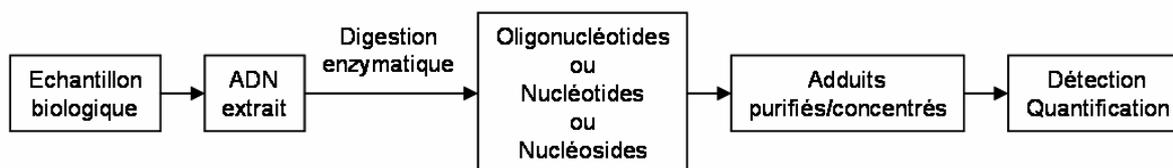


Figure 18. Stratégie générale d'isolement des adduits à l'ADN avant leur détection [220].

Plusieurs méthodes analytiques sont disponibles pour mesurer les quantités d'adduits covalents formés avec l'ADN [219, 221] et ont été utilisées pour détecter les adduits formés avec les AAH [197, 222] :

- le postmarquage radioactif au ^{32}P
- la fluorescence
- la spectrométrie de masse par accélération (AMS)
- la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide.

La détection des adduits par postmarquage au ^{32}P nécessite l'introduction d'un radioisotope sur l'adduit après hydrolyse de l'ADN. La méthodologie générale du postmarquage au ^{32}P est présentée dans la Figure 19. Elle consiste à digérer l'ADN en 3'-mononucléotides, à concentrer les adduits (3'-mononucléotides modifiés), à les phosphoryler à l'aide de ^{32}P -ATP par l'intermédiaire d'une kinase pour former des 5'-[^{32}P]-3'-bisnucléotides, à séparer et quantifier les adduits marqués au ^{32}P [223, 224]. Classiquement, la séparation est effectuée par chromatographie sur couche mince (CCM) à deux dimensions. Bien que moins sensible que la CCM, la séparation des adduits marqués peut également être réalisée par HPLC en y associant une détection en ligne de la radioactivité du ^{32}P . La méthode du postmarquage au ^{32}P est extrêmement sensible avec une limite de détection voisine d'un adduit pour 10^{10} nucléotides non modifiés [197] et nécessite donc une faible quantité initiale d'ADN (2-15 μg) [219]. Ainsi, le postmarquage au ^{32}P reste à ce jour la technique principale de détection et quantification des adduits et a largement été utilisé pour l'étude des adduits formés entre les AAH et l'ADN comme le montre le Tableau 9 présenté ci-après. Néanmoins, cette méthode présente des inconvénients importants. En effet, cette technique nécessite l'utilisation de ^{32}P , élément radioactif délicat et dangereux à manipuler puisqu'il s'agit d'un émetteur β . De plus, l'absence de bons étalons internes ne permet pas de mesurer avec précision les rendements de digestion et de marquage. Enfin, le postmarquage au ^{32}P ne donne aucune information structurale sur les adduits détectés ce qui nécessite une comparaison avec des adduits standards ou l'utilisation d'une technique d'analyse structurale dédiée à l'analyse de composés radioactifs.

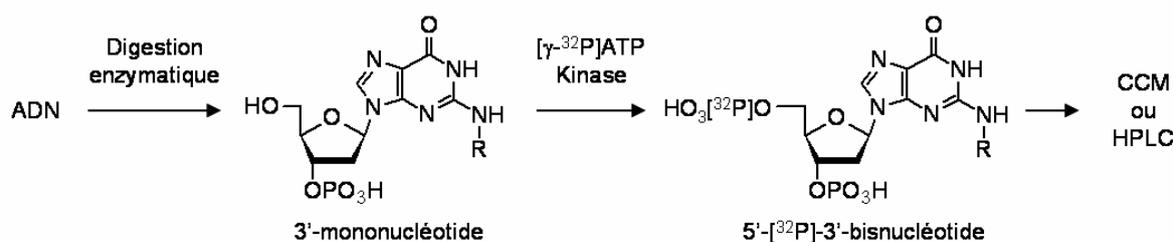


Figure 19. Méthodologie générale de l'analyse d'adduits par postmarquage au ^{32}P .

Tableau 9. Quantités minimales et maximales d'adduits présents dans des organes d'animaux de laboratoire exposés aux AAH.

Adduit	Quantités ^a	Technique	Organe	Animal	Référence
G-MeIQ	0,4-350/10 ⁷	³² P	Foie, cœur, côlon, pré-estomac, moelle	Souris	[187] [203]
G-IQ	3-13/10 ⁸	³² P	Foie, côlon, rein, glandes mammaires	Souris	[225]
	2,7-70/10 ⁷	³² P	Foie, placenta, tissus fœtaux,	Singe	[226]
	1/10 ⁸	nanoLC-ESI-MS/MS	Pancréas	Singe	[227]
G-C8-IQ	0,9-4,6/10 ⁸	³² P	Foie, côlon, rein	Rat	[26]
	3,3-38/10 ⁸	nanoLC-ESI-MS/MS	Foie	Rat	[228]
	8,4-80/10 ⁸	nanoLC-ESI-MS/MS+ ³² P	Rein	Singe	[229]
G-N ² -IQ	0,2-1,3/10 ⁸	³² P	Foie, côlon, rein	Rat	[26]
	10,7-240/10 ⁸	nanoLC-ESI-MS/MS+ ³² P	Rein	Singe	[229]
dG-MeIQx	3,2-10,7/10 ⁶	³² P	Pancréas, foie	Rat	[230]
	5/12 ¹² -50/10 ⁸	AMS	Foie, côlon	Rat	[231] [166]
	1-1,5/10 ¹⁰	AMS	Foie, côlon	Souris	[231]
G-C8-MeIQx	4-178/10 ⁹	LC-ESI-MS/MS	Foie	Rat	[232]
G-N ² -MeIQx	4-12,8/10 ⁸	LC-ESI-MS/MS	Foie	Rat	[232]
G-MeAαC	6-2000/10 ⁹	³² P	Foie, pancréas, cœur, estomac, côlon	Rat	[230]
G-AαC	1,4-39/10 ⁸	³² P	Foie, estomac, intestin grêle, côlon, rein, glandes mammaires	Rat	[233] [193]
G-Glu-P-1	2,3/10 ⁶	³² P	Foie	Rat	[230]
	6/10 ⁷	³² P	Pancréas	Rat	[230]
G-PhIP	0,57-13,11/10 ⁷	³² P	Glandes mammaires, foie, côlon, pancréas, rate, estomac, prostate	Rat	[193] [203]
	1/10 ¹²	AMS	Côlon	Rat	[166]
	3-60/10 ⁸	³² P	Glandes mammaires, foie, rein, côlon	Souris	[225]

^avaleurs exprimées en nombre de bases modifiées par nombre de bases non modifiées.

Les adduits covalents formés par les AAH étant fluorescents, il est possible de les détecter et les quantifier par HPLC associée à un détecteur de fluorescence [219]. La sensibilité de cette technique est de l'ordre d'un adduit pour 10⁸ nucléotides non modifiés, ce qui est moins sensible que le postmarquage au ³²P. De plus, il est nécessaire de connaître la structure des adduits recherchés avant leur analyse afin de sélectionner les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission utilisées. Ainsi, cette méthode a rarement été utilisée pour l'étude des adduits formés par les AAH, avec à notre connaissance seulement une seule référence [222].

La spectrométrie de masse par accélération (AMS) est une technique particulière de la spectrométrie de masse qui consiste à mesurer les quantités de carbone 14 avec une sensibilité de l'ordre de l'attomole (10⁻¹⁸ mol) [197]. Ainsi, les limites de détection de cette méthode sont voisines d'un adduit pour 10¹² nucléotides non modifiés et a donc été utilisée pour étudier les adduits formés entre les AAH et l'ADN (Tableau 9). Cependant, cette technique ne fournit pas d'information structurale sur les espèces détectées et nécessite l'emploi de composés standards marqués au carbone 14. De plus, l'instrumentation nécessaire est extrêmement coûteuse et peu répandue.

La spectrométrie de masse organique est quant à elle utilisée depuis une dizaine d'années pour étudier les adduits covalents, majoritairement associée à l'HPLC, dans certains cas avec la chromatographie en phase gazeuse [234] ou avec l'électrophorèse

capillaire [235]. Un des avantages de cette technique est la possibilité d'utiliser des étalons internes correspondant notamment à un adduit formé entre la base marquée par des isotopes stables (^{13}C , D, etc.) et la substance étudiée, permettant ainsi la quantification précise des adduits détectés. Ainsi, la spectrométrie de masse associée à la chromatographie liquide haute performance est de plus en plus utilisée pour caractériser les adduits à l'ADN en raison de son excellente sélectivité de détection et des possibilités d'identification structurale des adduits observés [236]. Le couplage LC-MS a été initialement appliqué à la détection d'adduits à l'ADN en utilisant des modes d'ionisation comme le bombardement d'atomes rapides (Continuous Flow-FAB) ou le Thermospray (TSP), aujourd'hui remplacés par l'Electrospray [237]. Pour la caractérisation d'adduits par LC-MS, les espèces modifiées sont généralement analysées en mode positif sous forme de désoxynucléosides après digestion de l'ADN. Lors d'analyses en MS/MS, la fragmentation majoritaire des désoxynucléosides correspond à la perte du désoxyribose (-116 u) après rupture de la liaison entre le désoxyribose et la base, selon le mécanisme présenté en Figure 20. C'est pourquoi, cette transition est classiquement utilisée en mode SRM sur des triples quadripôles afin de détecter spécifiquement les désoxynucléosides (modifiés ou non) avec une bonne sensibilité [220]. Des systèmes chromatographiques opérant à des nano-débits ont également été couplés à la spectrométrie de masse (nanoLC-MS/MS) par l'intermédiaire d'une source nano-Spray (nano-ESI) afin de caractériser des adduits formés entre les AAH et les bases de l'ADN [238]. Le système nanoLC-MS/MS peut être équipé d'un dispositif de préconcentration en ligne ce qui permet un gain de temps et de sensibilité en améliorant les taux de récupération des AAH durant l'étape de purification [239]. La sélectivité de la méthode de détection par spectrométrie de masse peut également être améliorée grâce à la réalisation d'expériences MS^3 en utilisant un analyseur de type trappe d'ions comme cela a récemment été montré pour la caractérisation d'adduits de PhIP à l'ADN [240]. En effet, comme ceci a été mentionné précédemment, la seule fragmentation observée lors d'expériences MS/MS d'un ion précurseur de type $[\text{dGAAH}+\text{H}]^+$ est une perte du désoxyribose (Figure 20) utile pour la détection des adduits, mais inutile pour leur identification. Ainsi, bien que la LC-MS/MS soit moins sensible que le postmarquage au ^{32}P (ce qui est de moins en moins vrai grâce aux systèmes nanoLC-MS/MS), elle a été employée dans plusieurs études afin de détecter et surtout identifier des adduits formés entre les AAH et les bases de l'ADN comme l'indique le Tableau 9, avec une sensibilité décrite variant entre un adduit pour 10^7 à 10^9 bases non modifiées [197].

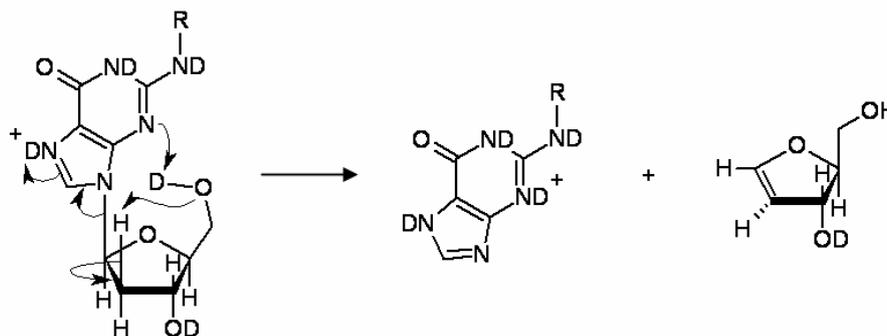


Figure 20. Mécanisme proposé pour la fragmentation d'un désoxynucléoside modifié conduisant à la perte du désoxyribose [241].

VI. 1. b Quantités d'adduits formés entre les AAH et les bases de l'ADN

Toutes les méthodologies analytiques présentées ci-dessus ont été mise en œuvre afin de quantifier les adduits générés par les AAH *in vivo* à partir d'échantillons issus d'organes ou d'organismes ayant développé des tumeurs. Une liste non exhaustive des quantités d'adduits mesurées dans différents organes d'animaux de laboratoire ayant ingéré des AAH, est présentée dans le Tableau 9. Les proportions d'AAH absorbées en dose unique ou répétée sur des périodes prolongées dans les rations alimentaires variaient selon les études entre quelques ppm et plusieurs centaines de ppm. En fonction des quantités d'AAH administrées, du modèle animal utilisé et de l'organe considéré, les quantités d'adduits détectés sont en fait très variables, pouvant atteindre 1 modification pour 10^6 bases non modifiées pour dG-MeIQx [230]. Néanmoins, il semble que le niveau d'adduits formés *in vivo* évolue linéairement en fonction de la dose administrée et diminue ensuite pour des doses élevées en raison d'effets cytotoxiques [242]. De plus, des adduits covalents formés entre les AAH et les bases de l'ADN ont été détectés à partir d'échantillons humains issus de patients atteints d'un cancer. En particulier, des adduits formés avec MeIQx ont été caractérisés par postmarquage au phosphore 32 dans le rein, le côlon et le rectum à des niveaux compris entre 1,8 et $18/10^8$ [16]. De même, la spectrométrie de masse par accélération a permis de détecter des adduits formés par MeIQx et PhIP dans le côlon et le sein à des niveaux avoisinant $1/10^{10}$ bases modifiées [166, 231, 243]. Par comparaison, les niveaux d'adduits mesurés chez les animaux de laboratoire ayant été exposés à des fortes doses d'AAH sont du même ordre de grandeur que ceux mesurés chez l'Homme (voir Tableau 9). Ces résultats sont surprenants si l'on considère le faible niveau d'exposition de l'Homme à la vue des quantités d'AAH absorbées quotidiennement (voir Partie II.3). Il semblerait donc qu'un plus grand nombre d'adduits par unité de dose d'AAH absorbée soit formés chez l'Homme comparé à l'animal [244] ce qui est en accord avec activités métaboliques vis-à-vis des AAH présentées précédemment (voir Partie V.1).

VI. 2 Analyse par spectrométrie de masse des oligonucléotides modifiés

L'étude de la formation d'adduits covalents entre les composés génotoxiques et des oligonucléotides peut apporter des informations complémentaires par rapport aux nucléotides ou désoxynucléosides, en particulier sur le contexte de séquence de la base modifiée, dont nous avons vu l'importance dans le cas des « Hot Spots » par exemple. En effet, si les méthodes de caractérisation et de quantification des adduits sous forme de désoxynucléosides après digestion complète de l'ADN fournissent des informations très précieuses sur la nature et la quantité d'adduits formés, elles ne permettent pas d'appréhender les éléments de séquence au niveau de la modification. Concernant les oligonucléotides, la spectrométrie de masse en tandem permet leur séquençage et la localisation des adduits sur leur séquence [245] comme ceci a été réalisé avec l'aflatoxine B1 [181], le benzo[c]phénanthrène [28] ou l'œstradiol-2,3-quinone [246] par exemple. Cependant, les spectres MS/MS des oligonucléotides sont souvent complexes à analyser en raison de la grande variété de fragments formés, issus en particulier de ruptures des différentes liaisons P-O et C-O de la chaîne phosphodiester avec un positionnement de la charge côté 3' ou 5'. La nomenclature des fragments proposée par McLuckey est aujourd'hui considérée comme standard et appliquée à la dénomination des fragments observés sur les spectres MS/MS des oligonucléotides [247]. Cette nomenclature est illustrée en Figure 21 sur l'exemple d'un tétranucléotide trichargé. Les quatre ruptures possibles des liaisons de la chaîne phosphodiester sont notées avec les lettres minuscules a, b, c, d pour les fragments incluant le groupement hydroxyle côté 5', et w, x, y, z pour les fragments possédant le groupement hydroxyle côté 3'. Un chiffre en indice indique le nombre de bases présentes depuis le début de la chaîne phosphodiester jusqu'à la position de la rupture. La lettre B indique les bases, numérotées en indice selon leur position à partir du côté 5', la nature de la base pouvant être indiquée entre parenthèses. Outre les ruptures de la chaîne phosphodiester, des pertes de bases, des pertes de H₂O et des fragmentations consécutives peuvent également être observées.

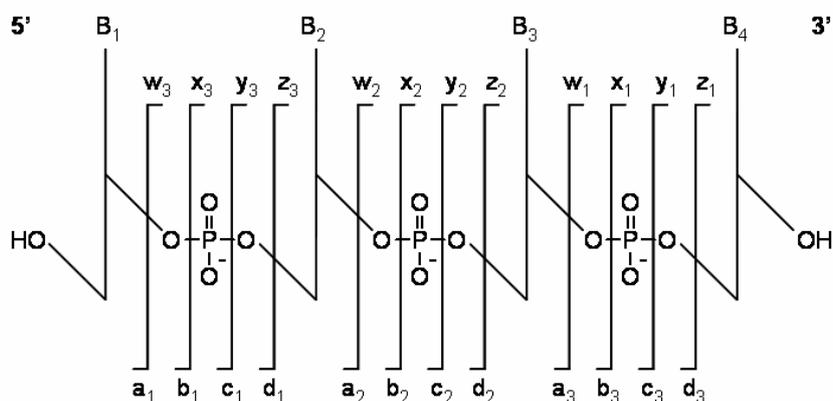


Figure 21. Nomenclature des fragments des oligonucléotides selon McLuckey [247].

Le type et l'abondance relative des fragments des oligonucléotides observés sur les spectres MS/MS dépendent notamment des paramètres suivants [248] :

- l'état de charge des ions (charges négatives dans la majorité des études)
- le mode d'ionisation (FAB, ESI, MALDI, etc.)
- la méthode d'excitation des ions (CID, PSD, IRMPD, BIRD, SORI, ECD, EPD [249], EDD [250])
- le temps d'observation et l'énergie au centre de masse des ions (le type d'analyseur).

Les connaissances actuelles concernant les types de fragments observés selon les différents paramètres présentés ci-dessus et les mécanismes conduisant à ces fragmentations ont récemment fait l'objet d'un article de revue [248]. Néanmoins, il semble important de résumer l'état actuel des connaissances concernant les analyses réalisées en ESI-ITMS, qui représente l'instrumentation que nous avons utilisé dans notre travail. L'ionisation par Electrospray permet de former des espèces multichargées [147] ce qui autorise l'analyse de molécules de taille importante comme les oligonucléotides par des analyseurs ayant une gamme de masse limitée comme les trappes d'ions. De plus, les oligonucléotides possédant sur leur structure des groupements phosphates acides, l'ionisation par Electrospray est plus efficace en mode négatif qu'en mode positif. Les règles générales résumant les fragmentations majoritaires induites par CID des oligonucléotides en ESI-ITMS [248] sont les suivantes :

- la première étape de dissociation concerne une perte de base neutre ou chargée selon l'état de charge de l'ion précurseur par rapport à son nombre de groupements phosphates
- il en résulte une fragmentation consécutive de la liaison 3'C-O du sucre dont la base a été éliminée, formant majoritairement les ions complémentaires w et (a-B)
- de façon générale, la perte de la base terminale côté 5' est favorisée par rapport à la base terminale côté 3'.

Par contre, à la vue de nombreux résultats [248, 251, 252, 253, 254], il n'existe pas de règle générale traduisant l'importance relative de la perte d'une base par rapport à une autre, qu'elle soit chargée ou non. Ceci dépend de plusieurs facteurs dont la charge de l'ion précurseur, la taille de l'oligonucléotide, la position de cette base sur la séquence et le contexte de la séquence. Par exemple, dans le cas de tétranucléotides monochargés riches en T [252], l'ordre préférentiel de perte de base neutre est $G > C > A > T$ conformément à l'ordre des affinités protoniques de ces bases [255], et la perte de la base terminale côté 3' est favorisée par rapport à la perte de base côté 5'. Au contraire, pour les trinucleotides monochargés, l'ordre préférentiel de perte de base neutre est $A > T > G > C$ et la perte de la

base terminale côté 5' est favorisée par rapport à la base côté 3' [254].

Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer la formation des ions w, a et (a-B) [248]. Le mécanisme initialement proposé par McLuckey et Habibi-Goudarzi pour expliquer la formation des fragments w et (a-B) à partir de la perte de base est détaillé dans la Figure 22a [256]. Rodgers *et al.* ont ensuite proposé un mécanisme faisant intervenir un complexe ion-dipôle pour expliquer l'influence du groupement phosphate en 3' sur la perte de la base (Figure 22b) [257]. Le mécanisme proposé par Barry *et al.* explique quant à lui la formation des fragments w et (a-B) par catalyse du groupement phosphate en 5' (Figure 22c) [258]. Bartlett *et al.* ont proposé l'implication d'un groupement phosphate éloigné ou un mécanisme à 6 centres pour former les ions a et w afin d'expliquer la perte de base terminale en 3' qui ne possède pas de groupement phosphate en 3' comme ceci est représenté dans la Figure 22d [259]. Enfin, un mécanisme basé sur la formation de zwitterions proposé par Wan *et al.* est décrit dans la Figure 22e [252, 253]. La première étape de ce mécanisme consiste à protoner la base, ce qui permet d'expliquer l'élimination préférentielle des bases d'affinité protonique forte. De plus, en augmentant le nombre de charges sur l'ion précurseur, le nombre de protons des groupements phosphates diminue, et donc la formation d'un zwitterion est défavorisée ainsi que les pertes de bases neutres. Cependant, ce mécanisme ne permet pas d'expliquer les pertes de bases chargées ni pourquoi l'ordre préférentiel de perte de bases neutres n'est pas toujours en accord avec leurs affinités protoniques respectives. Ainsi, il est probable que tous ces mécanismes participent à la fragmentation des oligonucléotides de manière complémentaire et dans des proportions variables en fonction de la charge de l'ion précurseur, du type de base éliminée, de la taille de l'oligonucléotide et de sa séquence.

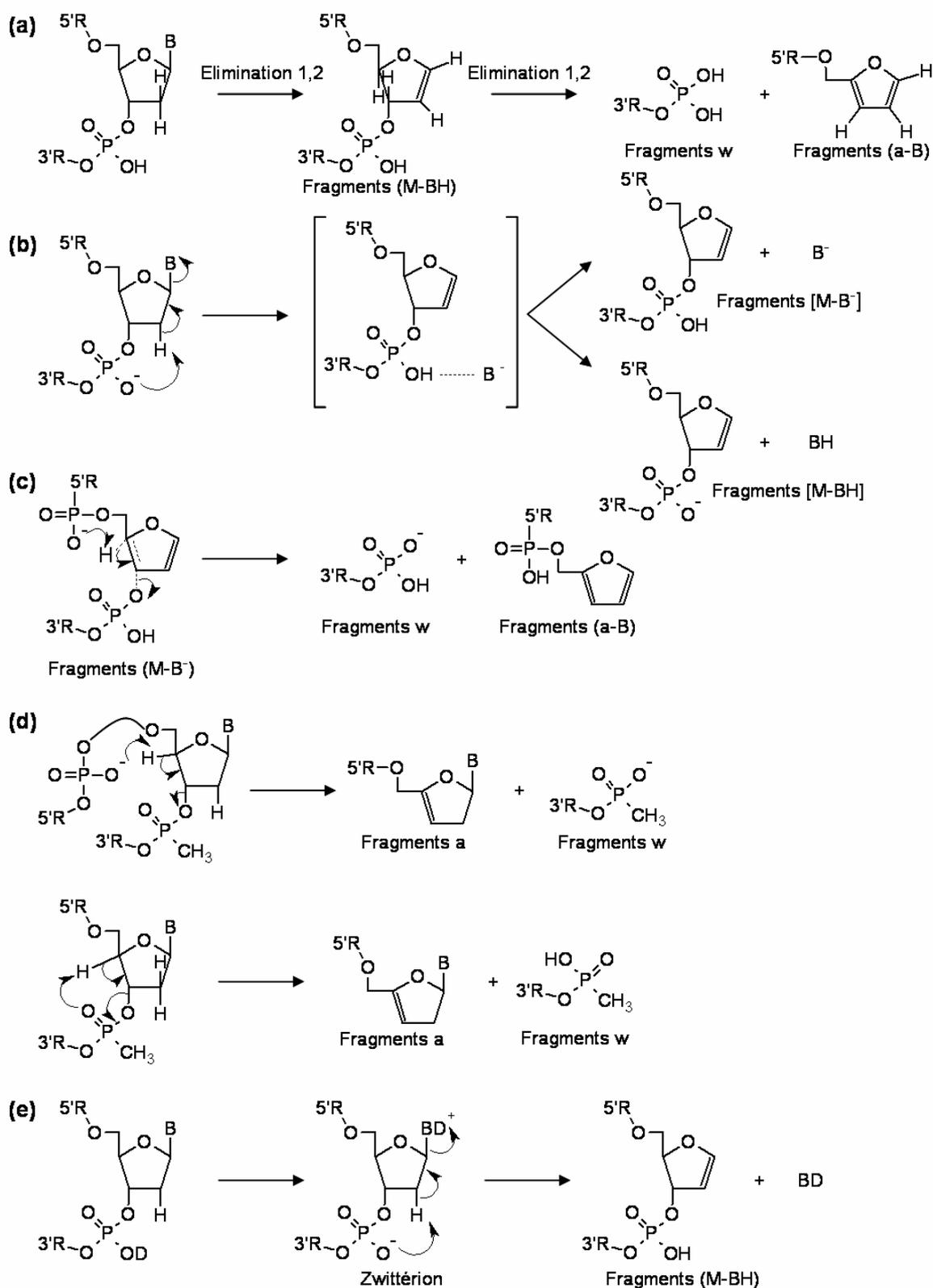


Figure 22. Mécanismes de formation des fragments [M-B], w, a et (a-B) proposés par McLuckey [256] (a), Rodgers [257] (b), Barry [258] (c), Bartlett [259] (d) et Wan [252] (e).

VII Conclusion et problématique de l'étude de la génotoxicité des AAH

L'étude de la réactivité des AAH vis-à-vis des bases de l'ADN concerne des problématiques variées et nécessite à ce titre le développement d'outils analytiques adaptés. Pour la formation de ces adduits, il est maintenant bien établi qu'une activation métabolique préalable des AAH est nécessaire. Cependant, il reste de nombreuses zones d'ombre concernant les voies métaboliques impliquées dans l'activation ou la détoxification des AAH *in vivo*, notamment dans les tissus extrahépatiques. De même, le transport des AAH ou de leurs métabolites dans l'organisme (par exemple le mode de fixation des AAH ou de leurs métabolites aux protéines) est presque totalement inconnu. En outre, aucune étude systématique n'a revisité depuis une dizaine d'années la caractérisation structurale des adduits formés et la recherche d'éventuels adduits minoritaires, alors que les outils analytiques se sont considérablement améliorés en termes de sensibilité. Bien qu'au cours de ces dernières années les méthodes de détection et de caractérisation des adduits formés *in vivo* se soient améliorées avec notamment le développement des méthodes de couplage nanoLC-MS/MS, leur application n'a concerné que la quantification des adduits connus jusqu'à présent. Il paraît donc important de mettre à profit ces outils analytiques performants afin de compléter les informations structurales sur ces adduits et de rechercher d'éventuels nouveaux adduits. Par exemple, la détection de mutations de thymines ou d'adénines induites par IQ reste inexplicée par la formation d'adduits avec la guanine. La recherche d'adduits générés entre IQ et ces nucléotides mériterait donc d'être engagée.

Un autre point intéressant concerne l'observation des « Hot Spots », notamment avec PhIP. Les processus susceptibles d'induire une sélectivité de séquence mutée concernent tout d'abord la formation d'un adduit, suivie des erreurs de réparation et de réplication. Les paramètres à prendre en compte dans ces mécanismes peuvent être la nature du contexte de séquence de la base modifiée, mais aussi l'organe ou l'individu concerné, ainsi que des éléments extérieurs perturbateurs. Concernant les effets du contexte de la séquence, il a été démontré par l'utilisation d'oligonucléotides modèles modifiés par PhIP et insérés dans l'ADN de cellules de mammifères, que la nature de la base coté 5' de l'adduit jouait un rôle sur les taux de mutations constatés selon l'ordre suivant : $G > C > T > A$ [260]. D'après la méthodologie décrite dans cette étude, ces résultats sont principalement dus aux effets des erreurs de réparation et de réplication. Cependant, le contexte de la séquence pourrait également influencer la formation de l'adduit avec certaines guanines présentant un environnement favorable. En effet, ceci a précédemment été démontré pour les isomères *anti*-(-) et *anti*-(+)-benzo[a]pyrène avec une modification préférentielle de la guanine centrale des séquences $5'AGG^3'$, $5'CGG^3'$ et $5'TGG^3'$ [261] et l'adénine centrale de la séquence $5'AAG^3'$ avec le benzo[c]phénanthrène [262].

Aucune étude de la sélectivité de formation des adduits par les AAH n'a été réalisée à ce jour. Une méthodologie intéressante a récemment été développée par l'équipe de Paul Vouros de Northwest University à Boston, permettant d'étudier la sélectivité de formation des adduits formés par le *N*-acétoxy-2-acétylamino-fluorène [263]. Cette approche pseudo-combinatoire consiste à digérer partiellement l'ADN modifié par des enzymes afin d'obtenir des oligonucléotides trimères modifiés sur leur base centrale et à les analyser par LC-MS/MS afin de comparer leur abondance relative en fonction de la nature des bases voisines. Cependant, la digestion enzymatique partielle ne génère pas uniquement des trimères mais des oligonucléotides de tailles comprises entre des dimères et des décamères [264], ce qui complique l'analyse LC-MS/MS et l'interprétation des résultats. C'est pourquoi un logiciel a été spécialement développé afin de détecter et d'identifier les adduits formés [265]. Enfin, cette méthode s'applique à de l'ADN modifié qui est un bon modèle pour la compréhension des mécanismes de formation se déroulant *in vivo*, mais qui ne permet pas d'évaluer précisément l'influence propre de la base voisine de la modification, en raison d'éventuels effets des bases plus éloignées de l'adduit et de la distribution inégale des paires de bases A:T et G:C dans l'ADN. C'est pourquoi, il nous a également paru intéressant de développer un autre type de méthodologie, à partir d'oligonucléotides modèles afin d'étudier spécifiquement l'influence de la base voisine de la modification sur la formation de l'adduit.

Bibliographie

1. Widmark E.M.P., *Nature*, **143** (1939) 984.
2. Sugimura T., Nagao M., Kawachi T., Honda M., Yahagi T., Seino Y., Sato S., Matsukura N., Matsushima T., Shirai A., Sawamura M., Matsumoto H., *Origins of Human Cancer (Book C)*, Eds Hiatt H.H., Watson J.D., Winstein J.A. (1977) Cold Spring Harbour Laboratory, Cold Spring Harbour, New York, p.1561-1577.
3. Nagao M., Honda M., Seino Y., Yahagi T., Sugimura T., *Cancer Lett.*, **2** (1977) 221-226.
4. Commoner B., Vithayathil A.J., Dolara P., Nair S., Madyastha P., Cuca G.C., *Science*, **201** (1978) 913-916.
5. Nagao M., Honda M., Seino Y., Yahagi T., Kawachi T., Sugimura T., *Cancer Lett.*, **2** (1977) 335-340.
6. Kosuge T., Tsuji K., Wakabayashi K., Okamoto T., Shudo K., Iitaka Y., Itai A., Sugimura T., Kawachi T., Nagao M., Yahagi T., Seino Y., *Chem. Pharm. Bull*, **26** (1978) 611-619.
7. Sugimura T., *Mutat. Res.*, **376** (1997) 211-219.
8. Toribio F., Galceran M.T., Puignou L., *J. Chromatogr., B*, **747** (2000) 171-202.
9. Knize M.G., Salmon C.P., Hopmans E.C., Felton J.S., *J. Chromatogr., A*, **763** (1997) 179-185.
10. Murkovic M., *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **106** (2004) 777-785.
11. Hatch F.T., Knize M.G., Healy S.K., Slezak T., Felton J.S., *Environ. Mol. Mutagen.*, **12** (1988) 1-85.
12. Sugimura T., Kawachi T., Nagao M., Yahagi T., Seino Y., Okamoto T., Shudo K., Kosuge T., Tsuji K., Wakabayashi K., Iitaka Y., Itai A., *Proc. Jpn. Acad.*, **53** (1977) 58-61.
13. Felton J.S., Knize M.G., Shen N.H., Lewis P.R., Andresen B.D., Happe J., Hatch F.T., *Carcinogenesis*, **7** (1986) 1081-1086.
14. Yahagi T., Nagao N., Seino Y., Matsushima T., Sugimura T., Okada M., *Mutat. Res.*, **48** (1977) 121-130.
15. Totsuka Y., Takamura-Enya T., Nishigaki R., Sugimura T., Wakabayashi K., *J. Chromatogr., B*, **802** (2004) 135-141.
16. Wakabayashi K., Totsuka Y., Fukutome K., Oguri A., Ushiyama H., Sugimura T., *Mutat. Res.*, **376** (1997) 253-259.
17. Hatch F.T., Knize M.G., Colvin M.E., *Environ. Mol. Mutagen.*, **38** (2001) 268-291.
18. Hatch F.T., Colvin M.E., *Mutat. Res.*, **376** (1997) 87-96.
19. Adamson R.H., Thorgeirsson U.P., Snyderwine E.G., Thorgeirsson S.S., Reeves J., Dalgard D.W., Takayama S., Sugimura T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **81** (1990) 10-14.
20. Snyderwine E.G., Turesky R.J., Turteltaub K.W., Davis C.D., Sadrieh N., Schut H.A.J., Nagao M., Sugimura T., Thorgeirsson U.P., Adamsson R.H., Thorgeirsson S.S., *Mutat. Res.*, **376** (1997) 203-210.

21. Ito N., Hasegawa R., Sano M., Tamano S., Esumi H., Takayama S., Sugimura T., *Carcinogenesis*, **12** (1991) 1503-1506.
22. Sugimura T., *Carcinogenesis*, **21** (2000) 387-395.
23. Schut H.A.J., Snyderwine E.G., *Carcinogenesis*, **20** (1999) 353-368.
24. Rao C.V., Rivenson A., Zang E., Steele V., Kelloff G., Reddy B.S., *Cancer Res.*, **56** (1996) 3395-3398.
25. Dooley K.L., Von Tungeln L.S., Bucci T., Fu P.P., Kadlubar F.F., *Cancer Lett.*, **62** (1992) 205-209.
26. Turesky R.J., Markovic J., *Carcinogenesis*, **16** (1995) 2275-2279.
27. Tanaka T., Barnes W.S., Williams G.M., Weisburger J.H., *Jpn. J. Cancer Res.*, **76** (1985) 570-576.
28. Snyderwine E.G., Venugopal M., M. Yu, *Mutat. Res.*, **506-507** (2002) 145-152.
29. Nagao M., *Mutat. Res.*, **431** (1999) 3-12.
30. Kawamori T., Totsuka Y., Uchiya N., Kitamura T., Shibata H., Sugimura T., Wakabayashi K., *Carcinogenesis*, **25** (2004) 1967-1972.
31. Turesky R.J., Constable A., Richoz J., Varga N., Markovic J., Martin M.V., Cuengerich F.P., *Chem. Res. Toxicol.*, **11** (1998) 925-936.
32. Wogan G.N., Hecht S.S., Felton J.S., Conney A.H., Loeb L.A., *Seminars in Cancer Biology*, **14** (2004) 473-486.
33. Norat T., Lukanova A., Ferrari P., Riboli E., *Int. J. Cancer*, **98** (2002) 241-256.
34. Diergaarde B., Van Geloof W.L., Van Muijen G.N.P., Kok F.J., Kampman E., *Carcinogenesis*, **24** (2003) 283-290.
35. Butler L.M., Sinha R., Millikan R.C., Martin C.F., Newman B., Gammon M.D., Ammerman A.S., Sandler R.S., *Am. J. Epidemiol.*, **157** (2003) 434-445.
36. Augustsson K., Skog K.I., Jägerstad M.I., Dickman P.W., Steineck G., *The Lancet*, **353** (1999) 703-707.
37. Navarro A., Munoz S.E., Lantieri M.J., Del Pilar Diaz M., Cristaldo P.E., de Fabro S.P., Eynard A.R., *Nutrition*, **20** (2004) 873-877.
38. Brennan P., Ronco A., Fierro L., Correa P., Boffetta P., Deneo-Pellegrini H., Barrios E., *Lung Cancer*, **38** (2002) 1-7.
39. Sinha R., Kulldorff M., Curtin J., Brown C.C., Alavanja M.C., Swanspn C.A., *Cancer Causes Control*, **9** (1998) 621-630.
40. Zheng W., Gustafson D.R., Sinha R., Cerham J.R., Moore D., Hong C.-P., Anderson K.E., Kushi L.H., Sellers T.A., Folsom A.R., *J. Natl. Cancer Inst.*, **90** (1998) 1724-1729.
41. Sinha R., Chow W.H., Kulldorff M., Denobile J., Butler J., Garcia-Closas M., Weil R., Hoover R.N., Rothman N., *Cancer Res.*, **59** (1999) 4320-4324.
42. Nowell S., Coles B., Sinha R., MacLeod S., Stotts C., Kadlubar F.F., Ambrosone C.B., Lang N.P., *Mutat. Res.*, **506-507** (2002) 175-185.
43. Le Marchand L., Hankin J.H., Pierce L.M., Sinha R., Nerurkar P.V., Franke A.A., Wilkens L.R., Chang W., *Mutat. Res.*, **506-507** (2002) 205-214.

44. Anderson K.E., Sinha R., Kulldorff M., Gross M., Lang N.P., DiMagno E., Bliss R., Kadlubar F.F., *Mutat. Res.*, **506-507** (2002) 225-231.
45. Norat T., Bingham S., Ferrari P., Slimani N., Jenab M., Mazuir M., Overvad K., Olsen A., Tjønneland A., Clavel F., Boutron-Ruault M.-C., Kesse E., Boeing H., Bergmann M.M., Nieters A., Linseisen J., Trichopoulou A., Trichopoulos D., Tountas Y., Berrino F., Palli D., Panico S., Tumino R., Vineis P., Bueno-de-Mesquita H.B., Peeters P.H.M., Engeset D., Lund E., Skeie G., Ardanaz E., González C., Navarro C., Quirós J.R., Sanchez M.-J., Berglund G., Mattisson I., Hallmans G., Palmqvist R., Day N.E., Khaw K.-T., Key T.J., San Joaquin M., Hémon B., Saracci R., Kaaks R., Riboli E., *J. Natl. Cancer Inst.*, **97** (2005) 906-916.
46. Stavric B., *Food Chem. Toxicol.*, **32** (1994) 977-994.
47. Sinha R., *Mutat. Res.*, **506-507** (2002) 197-204.
48. Keating G.A., Bogen K.T., *J. Chromatogr., B*, **802** (2004) 127-133.
49. Kobayashi M., Hanaoka T., Nishioka S., Kataoka H., Tsugane S., *Mutat. Res.*, **506-507** (2002) 233-241.
50. Keating G.A., Bogen K.T., *Food Chem. Toxicol.*, **39** (2001) 29-43.
51. IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, **40** (1987) 222.
52. IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, **31** (1987) 247.
53. IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, **56** (1993) 165.
54. Skog K., *Food Chem. Toxicol.*, **40** (2002) 1197-1203.
55. Sinha R., Rothman N., *Mutat. Res.*, **376** (1997) 195-202.
56. Knasmüller S., Murkovic M., Pfau W., Sontag G., *J. Chromatogr., B*, **802** (2004) 1-2.
57. Snyderwine E.G., Sinha R., Felton J.S., Ferguson L.R., *Mutat. Res.*, **506-507** (2002) 1-8.
58. Jägerstadt M., Skog K., Grivas S., Olsson K., *Mutat. Res.*, **259** (1991) 219-233.
59. Jägerstadt M., Skog K., Arvidsson P., Solyakov A., *Z. Lebensm. Unters Forsch A*, **207** (1998) 419-427.
60. Murkovic M., *J. Chromatogr., B*, **802** (2004) 3-10.
61. Jägerstad M., Laser Reuterswärd A., Oste R., Dahlqvist A., Olsson K., Grivas S., Nyhammar T., *The Maillard Reaction in Foods and Nutrition*, Eds Waller G., Feather M. (1983) Washington, GC, p.507-519.
62. Debrauwer L., Thèse de Doctorat de l'Université d'Aix-Marseille III, (1989) Aix-Marseille.
63. Pearson A.M., Chen C., Grey J.I., Aust S.D., *Free Radic. Biol. Med.*, **13** (1992) 161-167.
64. Murkovic M., Weber H.J., Geiszeler S., Fröhlich K., Pfannhauser W., *Food Chem.*, **65** (1999) 233-237.
65. Zöchling S., Murkovic M., *Food Chem.*, **79** (2002) 125-134.
66. Skog K.I., *Food Chem. Toxicol.*, **31** (1993) 655-675.

67. Skog K.I., Johansson M.A.E., Jägerstad M.I., *Food Chem. Toxicol.*, **36** (1998) 879-896.
68. Messner C., Murkovic M., *J. Chromatogr., B*, **802** (2004) 19-26.
69. Pais P., Salmon C.P., Knize M.G., Felton J.S., *J. Agric. Food Chem.*, **47** (1999) 1098-1108.
70. Pais P., Tanga M.J., Salmon C.P., Knize M.G., *J. Agric. Food Chem.*, **48** (2000) 1721-1726.
71. Bordas M., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T., *J. Chromatogr., B*, **802** (2004) 11-17.
72. Jackson L.S., Hargraves W.A., *J. Agric. Food Chem.*, **43** (1995) 1678-1684.
73. Murkovic M., Pfannhauser W., *Fresenius J. Anal. Chem.*, **366** (2000) 375-378.
74. Knize M.G., Dolbeare F.A., Carroll K.L., Moore D.H., Felton J.S., *Food Chem. Toxicol.*, **32** (1994) 595-603.
75. Lan C.M., Kao T.H., Chen B.H., *J. Chromatogr., B*, **802** (2004) 27-37.
76. Ahn J., Grün I.U., *J. Food Sci.*, **70** (2005) C173-C179.
77. Arvidsson P., Van Boekel M.A.J.S., Skog K., Jägerstad M., *J. Food Sci.*, **62** (1997) 911-916.
78. Chiu C.P., Chen B.H., *Food Chem.*, **68** (2000) 267-272.
79. Tran N.L., Salmon C.P., Knize M.G., Colvin M.E., *Food Chem. Toxicol.*, **40** (2002) 673-684.
80. Salmon C.P., Knize M.G., Panteleakos F.N., Wu R.W., Nelson D.O., Felton J.S., *J. Natl. Cancer Inst.*, **92** (2000) 1773-1778.
81. Johansson M.A.E., Fredholm L., Bjerne I., Jägerstad M.I., *Food Chem. Toxicol.*, **33** (1995) 993-1004.
82. Skog K.I., Augustsson K., Steineck G., Stenberg M., Jägerstad M.I., *Food Chem. Toxicol.*, **35** (1997) 555-565.
83. Felton J.S., Fultz E., Dolbeare F.A., Knize M.G., *Food Chem. Toxicol.*, **32** (1994) 897-903.
84. Felton J.S., Knize M.G., Roper M., Fultz E., Shen N.H., Turteltaub K.W., *Cancer Res.*, **52** (1992) 2103s-2107s.
85. Salmon C.P., Knize M.G., Felton J.S., Zhao B., Seom A., *Food Chem. Toxicol.*, **44** (2006) 484-492.
86. Salmon C.P., Knize M.G., Felton J.S., *Food Chem. Toxicol.*, **35** (1997) 433-441.
87. Rohrmann S., Linseisen J., Becker N., Norat T., Sinha R., Skeie G., Lund E., Martínez C., Barricarte A., Mattisson I., Berglund G., Welch A., Davey G., Overvad K., Tjønneland A., Clavel-Chapelon F., Kesse E., Lotze G., Klipstein-Grobusch K., Vasilopoulou E., Polychronopoulos E., Pala V., Celentano E., Bueno-de-Mesquita H.B., Peeters P.H.M., Riboli E., Slimani N., *Eur. J. Clin. Nutr.*, **56** (2002) 1216-1230.
88. Dashwood R.H., *Mutat. Res.*, **511** (2002) 89-112.
89. Vitaglione P., Monti S.M., Ambrosino P., Skog K., Fogliano V., *Eur. Food Res. Technol.*, **215** (2002) 108-113.

90. Balogh Z., Gray J.I., Gomaa E.A., Booren A.M., *Food Chem. Toxicol.*, **38** (2000) 395-401.
91. Murkovic M., Steinberger D., Pfannhauser W., *Z. Lebensm. Unters Forsch A*, **207** (1998) 477-480.
92. Zöchling S., Murkovic M., Pfannhauser W., *J. Biochem. Biophys. Methods*, **53** (2002) 37-44.
93. Ahn J., Grün I.U., *J. Food Sci.*, **70** (2005) C263-C268.
94. Toribio F., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T., *J. Chromatogr., A*, **880** (2000) 101-112.
95. Smith C.J., Qian X., Zha Q., Moldoveanu S.C., *J. Chromatogr., A*, **1046** (2004) 211-216.
96. Thiébaud H.P., Knize M.G., Kuzmicky P.A., Felton J.S., Hsieh D.P., *J. Agric. Food Chem.*, **42** (1994) 1502-1510.
97. Kobayashi M., Hanaoka T., Hashimoto H., Tsugane S., *Mutat. Res.*, **588** (2005) 136-142.
98. Ristic A., Cichna M., Sontag G., *J. Chromatogr., B*, **802** (2004) 87-94.
99. de Hoffmann E., Charette J., Stroobant V., *Spectrométrie de masse*, Ed Dunod (1999) Paris, p.166-173.
100. Knize M.G., Sinha R., Rothman N., Brown E.D., Salmon C.P., Levander O.A., Cunningham P.L., Felton J.S., *Food Chem. Toxicol.*, **33** (1995) 545-551.
101. Janoszka B., Balszczyk U., Warzecha L., Strosyk M., Damasiewicz-Bodzek A., Bodzec D., *J. Chromatogr., A*, **938** (2001) 155-165.
102. Galceran M.T., Pais P., Puignou L., *J. Chromatogr., A*, **719** (1996) 203-212.
103. Rosset R., Caude M., Jardy A., *Chromatographies en phases liquide et supercritique*, Ed. Masson (1991) Paris.
104. Skog K.I., *J. Chromatogr., B*, **802** (2004) 39-44.
105. Gross G.A., *Carcinogenesis*, **11** (1990) 1597-1603.
106. Gross G., Grüter A., *J. Chromatogr.*, **592** (1992) 271-278.
107. Perfetti G.A., *J. AOAC Int.*, **79** (1996) 813.
108. Toribio F., Puignou L., Galceran M.T., *J. Chromatogr., A*, **836** (1999) 223-233.
109. Fay L.B., Ali D., Gross G.A., *Mutat. Res.*, **376** (1997) 29-35.
110. Kataoka H., Pawliszyn J., *Chromatographia*, **50** (1999), 532-538.
111. Cardenes L., Ayala J.H., Afonso A.M., Gonzalez V., *J. Chromatogr., A*, **1030** (2004) 87-93.
112. Kataoka H., *J. Chromatogr., A*, **774** (1997) 121-142.
113. Pais P., Knize M.G., *J. Chromatogr., B*, **747** (2000) 139-169.
114. Skog K.I., Solyakov A., Arvidsson P., Jägerstad M.I., *J. Chromatogr., A*, **803** (1998) 227-233.
115. Richling E., Kleinschnitz M., Schreier P., *Eur. Food Res. Technol.*, **210** (1999) 68-72.
116. Tikkanen L.M., Sauri T.M., Latva-Kala K.J., *Food Chem. Toxicol.*, **31** (1993) 717-721.

117. Casal S., Mendes E., Fernandes J.O., Oliveira M.B.P.P., Ferreira M.A., *J. Chromatogr., A*, **1040** (2004) 105-114.
118. Kataoka H., Kijima K., *J. Chromatogr., A*, **767** (1997) 187-194.
119. Barcelo-Barrachina E., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T., *J. Chromatogr., B*, **802** (2004) 45-59.
120. Gross G.A., Turesky R.J., Fay L.B., Stillwell W.G., Skipper P.L., Tannenbaum S.R., *Carcinogenesis*, **14** (1993) 2313-2318.
121. Barcelo-Barrachina E., Moyano E., Galceran M.T., Lliberia J.L., Bago B., Cortes M.A., *J. Chromatogr., A*, **1125** (2006) 195-203.
122. Holland R.D., Taylor J., Jones R.C., Freeman J.P., Miller D.W., Lake B.G., Gooderham J., Turesky R.J., *Chem. Res. Toxicol.*, **17** (2004) 1121-1136.
123. Pais P., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T., *J. Chromatogr., A*, **775** (1997) 125-136.
124. Richling E., Herderich M., Schreier P., *Chromatographia*, **42**, (1996), 7-11.
125. Murkovic M., Friedrich M., Pfannhauser W., *Z. Lebensm. Unters Forsch A*, **205** (1997) 347-350.
126. Rivera L., Curto M.J.C., Pais P., Galceran M.T., Puignou L., *J. Chromatogr., A*, **731** (1996) 85-94.
127. Thiébaud H.P., Knize M.G., Kuzmicky P.A., Hsieh D.P., Felton J.S., *Food Chem. Toxicol.*, **33** (1995) 821-828.
128. Galceran M.T., Moyano E., Puignou L., Pais P., *J. Chromatogr., A*, **730** (1996) 185-194.
129. Bermudo E., Ruiz-Calero V., Puignou L., Galceran M.T., *Anal. Chim. Acta*, **536** (2005) 83-90.
130. Barcelo-Barrachina E., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T., *J. Chromatogr., A*, **1023** (2004) 67-78.
131. Bermudo E., Busquets R., Barcelo-Barrachina E., Puignou L., Santos F.J., Galceran M.T., *J. Chromatogr., B*, **802** (2004) 61-68.
132. Barcelo-Barrachina E., Moyano E., Galceran M.T., *J. Chromatogr., A*, **1054** (2004) 409-418.
133. Holder C.L., Preece S.W., Conway S.C., Pu Y.-M., Doerge D.R., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11** (1997) 1667-1672.
134. Pais P., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T., *J. Chromatogr., A*, **778** (1997) 207-218.
135. Toribio F., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T., *J. Chromatogr., A*, **948** (2002) 267-281.
136. Toribio F., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T., *J. Chromatogr., A*, **869** (2000) 307-317.
137. Klup K.S., Forston S.L., Knize M.G., Felton J.S., *Food Chem. Toxicol.*, **41** (2003) 1701-1710.
138. Stavric B., Lau B.P.-Y., Matula T.I., Klassen R., Lewis D., Downie R.H., *Food Chem. Toxicol.*, **35** (1997) 185-197.
139. Warzecha L., Janoszka B., Blaszyk U., Strosyk M., Bodzek D., Dobosz C., *J. Chromatogr., B*, **802** (2004) 95-106.

140. Klassen R.D., Lewis D., Lau B.D.-Y., Sen N.P., *Food Research International*, **35** (2002) 837-847.
141. Guy P.A., Gremaud E., Richoz J., Turesky R.J., *J. Chromatogr., A*, **883** (2000) 89-102.
142. Chen B.H., Yang D.J., *Chromatographia*, **48** (1998) 223-230.
143. Schwarzenbach R., Gubler D., *J. Chromatogr., A*, **624** (1992) 491-495.
144. Galceran M.T., Pais P., Puignou L., *J. Chromatogr., A*, **655** (1993) 101-110.
145. Gerbl U., Cichna M., Zivkovits M., Knasmüller S., Sontag G., *J. Chromatogr., B*, **802** (2004) 107-113.
146. Yamaizumi Z., Kasai H., Nishimura S., Edmonds C.G., McCloskey J.A., *Mutat. Res.*, **173** (1986) 1-7.
147. Electrospray ionization mass spectrometry, fundamentals, instrumentation and applications, Ed Cole R.B. (1997) John Wiley & Sons.
148. Gates P., *Mass spectrometry source (atmospheric pressure chemical ionization)*, University of Bristol (2004) www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/apci-ionisation.html.
149. de Hoffmann E., Charette J., Stroobant V., *Spectrométrie de masse*, Ed Dunod (1999) Paris, p.114-116.
150. Toribio F., Moyano E., Puignou L., Galceran M.T., *J. Mass Spectrom.*, **37** (2002) 812-828.
151. Puignou L., Casal J., Santos F.J., Galceran M.T., *J. Chromatogr., A*, **769** (1997) 293-299.
152. Mardones C., Arce L., Rios A., Valcarcel M., *Chromatographia*, **48** (1998) 700-706.
153. Olsson J.C., Dyremark A., Karlberg B., *J. Chromatogr., A*, **765** (1997) 329-335.
154. Viberg P., Nilsson S., Skog K., *Anal. Bioanal. Chem.*, **378** (2004) 1729-1734.
155. Santos F.J., Barcelo-Barrachina E., Toribio F., Puignou L., Galceran M.T., Persson E., Skog K., Messner C., Murkovic M., Nabinger U., Ristic A., *J. Chromatogr., B*, **802** (2004) 69-78.
156. Turteltaub K.W., Vogel J.S., Frantz C., Buonarati M.H., Felton J.S., *Environ. Health Perspect.*, **99** (1993) 183-186.
157. Gooderham N.J., Murray S., Lynch A.M., Edwards R.J., Yadollahi-Farsani M., Bratt C., Rich K.J., Zhao K., Murray B.P., Bhadresa S., Crosbie S.J., Boobis A.R., Davies D.S., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **42** (1996) 91-98.
158. Turesky R.J., *Mol. Nutr. Food Res.*, **49** (2005) 101-117.
159. Frederiksen H., *Mol. Nutr. Food Res.*, **49** (2005) 263-273.
160. Novak M., Rajagopal S., Xu L., Kazerani S., Toth K., Brooks M., Nguyen T.-M., *J. Phys. Org. Chem.*, **17** (2004) 615-624.
161. Kaderlik K.R., Minchin R.F., Mulder G.J., Ilett K.F., Daugaard-Jenson M., Teitel C.H., Kadlubar F.F., *Carcinogenesis*, **15** (1994) 1703-1709.
162. Chepanoske C.L., Brown K., Turteltaub K.W., Dingley K.H., *Food Chem. Toxicol.*, **42** (2004) 1367-1372.
163. Turesky R.J., Stillwell W.G.S., Skipper P.L., Tannenbaum S.R., *Environ. Health Perspect.*, **99** (1993) 123-128.

164. Dubuisson J.G., Murph W.S., Griffin S.R., Gaubatz J.W., *J. Nutr. Biochem.*, **12** (2001) 518-528.
165. Turteltaub K.W., Dingleton K.H., Curtis K.D., Malfatti M.A., Turesky R.J., Garner R.C., Felton J.S., Lang N.P., *Cancer Lett.*, **143** (1999) 149-155.
166. Garner R.C., Lightfoot T.J., Cupid B.C., Russel D., Coxhead J.M., Kutschera W., Priller A., Rom W., Steier P., Alexander D.J., Leveson S.H., Dongley K.H., Mauthe R.J., Turteltaub K.W., *Cancer Lett.*, **143** (1999) 161-165.
167. Felton J.S., Knize M.G., Bennett L.M., Malfatti M.A., Colvin M.E., Klup K.S., *Toxicology*, **198** (2004) 135-145.
168. Airoidi L., Magagnotti C., Pastorelli R., Fanelli R., *J. Chromatogr., B*, **802** (2004) 175-181.
169. Hein D.W., *Mutat. Res.*, **506-507** (2002) 65-77.
170. Turesky R.J., Richoz J., Constable A., Curtis K.D., Dingleton K.H., Turteltaub K.W., *Chemico-Biological Interactions*, **145** (2003) 251-265.
171. Nozawa H., Nakao W., Takata J., Arimoto-Kobayashi S., Kondo K., *Cancer Lett.*, **235** (2006) 121-129.
172. Dashwood R.H., Xu M., *Food Chem. Toxicol.*, **41** (2003) 1185-1192.
173. Knize M.G., Kulp K.S., Salmon C.P., Keating G.A., Felton J.S., *Mutat. Res.*, **506-507** (2002) 153-162.
174. Edenharder R., Sager J.W., Glatt H., Muckel E., Platt K.L., *Mutat. Res.*, **521** (2002) 57-72.
175. Dipple A., *Carcinogenesis*, **16** (1995) 437-441.
176. Jouanin I., Debrauwer L., Fauglas G., Paris A., Rathahao E., *Steroids*, **67** (2002) 1091-1099.
177. Farmer P.B., Brown K., Tompkins E., Emms V.L., Jones D.J.L., Singh R., Philips D.H., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **207** (2005) 293-301.
178. Roberts K.P., Lin C.-H., Jankowiak R., Small G.J., *J. Chromatogr., A*, **853** (1999) 159-170.
179. Shibutani S., Gentles R., Johnson F., Grollman A.P., *Carcinogenesis*, **12** (1991) 813-818.
180. Gates K.S., Nooner T., Dutta S., *Chem. Res. Toxicol.*, **17** (2004) 839-856.
181. Marzilli L.A., Wang D., Kobertz W.R., Essigmann J.M., Vouros P., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **9** (1998) 676-682.
182. Humphreys W.G., Kadlubar F.F., Guengerich F.P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89** (1992) 8278-8282.
183. Kennedy S.A., Novak M., Kolb B.A., *J. Am. Chem. Soc.*, **119** (1997) 7654-7664.
184. Guengerich F.P., Mundkowski R.G., Voehler M., Kadlubar F.F., *Chem. Res. Toxicol.*, **12** (1999) 906-916.
185. Kaiya T., Fujiwara T., Kohda K., *Chem. Res. Toxicol.*, **13** (2000) 993-1001.
186. Hashimoto Y., Shudo K., Okamoto T., *Mutat. Res.*, **105** (1982) 9-13.

187. Tada A., Ochiai M., Wakabayashi K., Nukaya H., Sugimura T., Nagao M., *Carcinogenesis*, **15** (1994) 1275-1278.
188. Frandsen H., Grivas S., Turesky R.J., Andersson R., Dragstedt L.O., Larsen J.C., *Carcinogenesis*, **15** (1994) 2553-2558.
189. Frandsen H., Grivas S., Andersson R., Dragstedt L., Larsen J.C., *Carcinogenesis*, **13** (1992) 629-635.
190. Lin D.-X., Kaderlik K.R., Turesky R.J., Miller Jr. D.W., Lay J.O., *Chem. Res. Toxicol.*, **5** (1992) 691-697.
191. Brown K., Guenther E.A., Dingley K.H., Cosman M., Harvey C.A., Shields S.J., Turteltaub K.W., *Nucleic Acids Research*, **29** (2001) 1951-1959.
192. Pfau W., Brockstedt U., Shirai T., Schukze C., Neurath G., Marquardt H., *Carcinogenesis*, **17** (1996) 2727-2732.
193. Pfau W., Schulze C., Shirai T., Hasegawa R., Brockstedt U., *Chem. Res. Toxicol.*, **10** (1997) 1192-1197.
194. Turesky R.J., Rossi S.C., Welti D.H., Lay J.O., Kadlubar F.F., *Chem. Res. Toxicol.*, **5** (1992) 479-490.
195. Snyderwine E.G., Roller P.P., Adamson R.H., Sato S., Thorgeirsson S.S., *Carcinogenesis*, **9** (1988) 1061-1065.
196. Ochiai M., Nagaoka H., Wakabayashi K., Tanaka Y., Kim S.-B., Tada A, Nukaya H, Sugimura T., Nagao M., *Carcinogenesis*, **24** (1993) 2165-2170.
197. Turesky R.J., Vouros P., *J. Chromatogr., B*, **802** (2004) 155-166.
198. Brown K., Hingerty B.E., Guenther E.A., Krishnan V.V., Broyde S., Turteltaub K.W., Cosman M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98** (2001) 8507-8512.
199. Wu X., Shapiro R., Broyde S., *Chem. Res. Toxicol.*, **12** (1999) 895-905.
200. Audebert M., Thèse de Doctorat de l'Université Denis Diderot Paris 7 (2002).
201. Campus Virtuel, Université Paris-Sud, Faculté des Sciences d'Orsay (2001) <http://formation.etud.u-psud.fr/biologie/genetique/mutations/index.htm>
202. Baynton K., Fuchs R.P.P., *Trends Biochem. Sci.*, **25** (2000) 74-79.
203. Nagao M., Ochiai M., Okochi E., Ushijima T., Sugimura T., *Mutat. Res.*, **477** (2001) 119-124.
204. Shibutani S., Fernandes A., Suzuki N., Zhou L., Johnson F., Grollman A.P., *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A*, **207** (1998) 459-463.
205. Turesky R.J., Gremaud E., Markovic J., Snyderwine E.G., *Chem. Res. Toxicol.*, **9** (1996) 403-408.
206. Turesky R.J., Markovic J., Aeschlimman J.-M., *Chem. Res. Toxicol.*, **9** (1996) 397-402-408.
207. Okonogi H., Ushijima T., Zhang X.B., Heddle J.A., Suzuki T., Sofumi T., Felton J.S., Tucker J.D., Sugimura T., Nagao M., *Carcinogenesis*, **18** (1997) 745-748.
208. Nagao M., Ushijima T., Toyota M., Inoue R., Sugimura T., *Mutat. Res.*, **376** (1997) 161-167.
209. Huang H., Ushijima T., Nagao M., Sugimura T., Ohgaki H., *Cancer Lett.*, **198** (2003) 29-35.

210. Kakiuchi H., Watanabe M., Ushijima T., Toyota M., Imai K., Weisburger J.H., Sugimura T., Nagao M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92** (1995) 910-914.
211. Andreassen A., Mollersen L., Vikse R., Steffensen I.-L., Mikalsen A., Paulsen J.E., Alexander J., *Mutat. Res.*, **517** (2002) 157-166.
212. Blum C.A., Xu M., Orner G.A., Fong A.T., Bailey G.S., Stoner G.D., Horio D.T., Dashwood R.H., *Carcinogenesis*, **22** (2001) 315-320.
213. Bol S.A.M., Horlbeck J., Markovic J., de Boer J.G., Turesky R.J., Constable A., *Carcinogenesis*, **21** (2000) 1-6.
214. Okonogi H., Stuart G.R., Okochi E., Ushijima T., Sugimura T., Glickman B.W., Nagao M., *Mutat. Res.*, **395** (1997) 93-99.
215. Okochi E., Watanabe N., Shimada Y., Takahashi S., Wakazono K., Shirai T., Sugimura T., Nagao M., Ushijima T., *Carcinogenesis*, **20** (1999) 1933-1998.
216. Yu M., Jones M.L., Gong M., Sinha R., Schut H.A.J., Snyderwine E.G., *Carcinogenesis*, **23** (2002) 877-884.
217. Mollersen L., Vikse R., Andreassen A., Steffensen I.-L., Mikalsen A., Paulsen J.E., Alexander J., *Mutat. Res.*, **557** (2004) 29-40.
218. Farmer P.B., *Biomarkers of carcinogen exposure and early effects*, Eds Farmer P.B., Emery J.M. (2006) ECNIS, Univ. Leicester, Leicester, UK, p. 17-18.
219. de Kok T.M.C.M., Moonen H.J.J., van Delft J., van Schooten F.J., *J. Chromatogr., B*, **778** (2002) 345-355.
220. Apruzzese W.A., Vouros P., *J. Chromatogr., A*, **794** (1998) 97-108.
221. Phillips D., Möller L., Singh R., van Schooten F.J., Godschalk R., *Biomarkers of carcinogen exposure and early effects*, Eds Farmer P.B., Emery J.M. (2006) ECNIS, Univ. Leicester, Leicester, UK, p. 18-39.
222. Marsch G.A., Goldman E.N., Flutz E., Shen .H., Turteltaub K.W., *Chem. Res. Toxicol.*, **8** (1995) 659-670.
223. Randerath K., Vijayaraj Reddy M., Gupta R.C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **78** (1981) 6126-6129.
224. Randerath K., Rabderath E., Agrawal H.P., Gupta R.C., Schurdak M.E., Vijayaraj R., *Environ. Health Perspect.*, **62** (1985) 57-65.
225. Snyderwine E.G., Yu M., Schut H.A.J., Knight-Jones L., Kimura S., *Food Chem. Toxicol.*, **40** (2002) 1529-1533.
226. Josyula S., lu L.-J.W., Salazar J.J., Nerukar P.V., Butler Jones A., Grady J.J., Snyderwine E.G., Anderson L.M., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **166** (2000) 151-160.
227. Gangl E.T., Turesky R.J., Vouros P., *Anal. Chem.*, **73** (2001) 2397-2404.
228. Soglia J.R., Turesky R.J., Paehler A., Vouros P., *Anal. Chem.*, **73** (2001) 2819-2827.
229. Gangl E.T., Turesky R.J., Vouros P., *Chem. Res. Toxicol.*, **12** (1999) 1019-1027.
230. Pfau W., Brockstedt U., Shirai T., Ito N., Marquardt H., *Mutat. Res.*, **378** (1997) 13-22.
231. Turteltaub K.W., Mauthe R.J., Dingley K.H., Vogel J.S., Frantz C.E., Garner R.C., Shen N., *Mutat. Res.*, **376** (1997) 243-252.
232. Paehler A., Richoz J., Soglia J., Vouros P., Turesky R.J., *Chem. Res. Toxicol.*, **15** (2002) 551-561.

233. Snyderwine E.G., Sadrieh N., King R.S., Schut H.A.J., *Food Chem. Toxicol.*, **36** (1998) 1033-1041.
234. Crosbie S.J., Murray S., Boobis A.R., Gooderham N.J., *J. Chromatogr., B*, **744** (2000) 55-64.
235. Schrader W., Linscheid M., *J. Chromatogr., A*, **717** (1995) 117-125.
236. Koc H., Swenberg J.A., *J. Chromatogr., B*, **778** (2002) 323-343.
237. Esmans E.L., Broes D., Hoes I., Lemièrre F., Vanhoutte K., *J. Chromatogr., A*, **794** (1998) 109-127.
238. Rindgen D., Turesky R.J., Vouros P., *Chem. Res. Toxicol.*, **8** (1995) 1005-1013.
239. Vanhoutte K., Van Dongen W., Hoes I., Lemièrre F., Esmans E.L., Van Onckelen H., Van den Eeckhout E., van Soest R.E.J., Hudson A.J., *Anal. Chem.*, **69** (1997) 3161-3168.
240. Goodenough A.K., Schut H.A.J., Turesky R.J., *Chem. Res. Toxicol.*, **20** (2007) 263-276.
241. Debrauwer L., Rathahao E., Jouanin I., Paris A., Clodic G., Molines H., Convert O., Fournier F., Tabet J.C., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **14** (2003) 364-372.
242. Brockstedt U., Pfau W., *Z. Lebensm. Unters Forsch A*, **207** (1998) 472-476.
243. Lightfoot T.J., Coxhead J.M., Cupid B.C., Nicholson S., Garner R.C., *Mutat. Res.*, **472** (2000) 119-127.
244. Felton J.S., Pais P., Salmon C.P., Knize M.G., *Z. Lebensm. Unters Forsch A*, **207** (1998) 434-440.
245. Glover R.P., Lamb J.H., Farmer P.B., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12** (1998) 368-372.
246. Debrauwer L., Rathahao E., Couve C., Poulain S., Pouyet C., Jouanin I., Paris A., *J. Chromatogr., A*, **976** (2002) 123-134.
247. McLuckey S.A., Van Berkel G.J., Glish G.L., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **3** (1992) 60-70.
248. Wu J., McLuckey S.A., *Int. J. Mass Spectrom.*, **237** (2004) 197-241.
249. Gabelica V., Tabarin T., Antoine R., Rosu F., Compagnon I., Broyer M., De Pauw E., Dugourd P., *Anal. Chem.*, **78** (2006) 6564-6572.
250. Yang J., Mo J., Adamson J.T., Hakansson K., *Anal. Chem.*, **77** (2005) 1876-1882.
251. Habibi-Goudarzi S., McLuckey S.A., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **6** (1995) 102-113.
252. Wan K.X., Gross J., Hillenkamp F., Gross M.L., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **12** (2001) 193-205.
253. Wan K.X., Gross M.L., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **12** (2001) 580-589.
254. Vrkic A.K., O'Hair R.A.J., Foote S., *Austr. J. Chem.*, **53** (2000) 307-319.
255. Hunter E.P., Lias S.G., *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **27** (1998) 413-656.
256. McLuckey S.A., Habibi-Goudarzi S., *J. Am. Chem. Soc.*, **115** (1993) 12085-12095.
257. Rodgers M.T., Campbell S., Marzluff J.L., Beauchamp J.L., *Int. J. Mass Spectrom. Ion Process.*, **137** (1994) 121-149.

258. Barry J.P., Vouros P., Van Schepdael A., Law S.J., *J. Mass Spectrom.*, **30** (1995) 993-1006.
259. Bartlett M.G., McCloskey J.A., Manalili S., Griffey R.H., *J. Mass Spectrom.*, **31** (1996) 1277-1283.
260. Shibutani S., Fernandes A., Suzuki N., Zhou L., Johnson F., Grollman A.P., *J. Biol. Chem.*, **274** (1999) 27433-27438.
261. Rill R.L., Marsch G.A., *Biochemistry*, **29** (1990) 6050-6058.
262. Harsch A., Sayer J.M., Jerina D.M., Vouros P., *Chem. Res. Toxicol.*, **13** (2000) 1342-1348.
263. Andrews C.L., Harsch A., Vouros P., *Int. J. Mass Spectrom.*, **231** (2004) 169-177.
264. Liao Q., Chiu N.H.L., Shen C., Vouros P., *Proc. 54th ASMS Conference*, (2006) Seattle, Washington, USA.
265. Shen C., Liao Q., Vouros P., *Proc. 54th ASMS Conference*, (2006) Seattle, Washington, USA.
266. Busquets R., Bordas M., Toribio F., Puignou L., Galceran M.T., *J. Chromatogr., B*, **802** (2004) 79-86.
267. Ferguson L.R., *Mutat. Res.*, **506-507** (2002) 215-224.
268. Murray S., Lynch A.M., Knize M.G., Gooderham N.J., *J. Chromatogr.*, **616** (1993) 211-219.
269. Sinha R., Rothman N., Brown E.D., Salmon C.P., Knize M.G., Swanson C.A., Rossi S.C., Mark S.D., Levander O.A., Felton J.S., *Cancer Res.*, **55** (1995) 4516-4519.
270. Knize M.G., Salmon C.P., Shilpi S.M., Felton J.S., *Mutat. Res.*, **376** (1997) 129-134.
271. Wakabayashi K., Ushiyama H., Takahashi M., Nukaya H., Kim S.-B., Hirose M., Sugimura T., Nagao M., *Environ. Health Perspect.*, **99** (1993) 129-133.
272. Solyakov A., Skog K.I., *Food Chem. Toxicol.*, **40** (2002) 1205-1211.
273. Knize M.G., Sinha R., Brown E.D., Salmon C.P., Levander O.A., Felton J.S., Rothman N., *J. Agric. Food Chem.*, **46** (1998) 4648-4651.
274. Sinha R., Salmon C.P., Brown E.D., Swanson C.A., Rhodes D., Rossi S., Felton J.S., Levander O.A., *Food Chem. Toxicol.*, **36** (1998) 279-287.
275. Holder C.L., Cooper W.M., Churchwell M.I., Doerge D.R., Thompson H.C., *J. Muscle Foods*, **7** (1996) 281-290.
276. Johansson M., Jägerstad M., *Carcinogenesis*, **15** (1994) 1511-1518.
277. Sinha R., Rothman N., Brown E.D., Mark S.D., Hoover R.N., Caporaso N., Levander O.A., Knize M.G., Lang N.P., Kadlubar F., *Cancer Res.*, **54** (1994) 6154-6159.
278. Skog K., Steineck G., Augustsson K., Jägerstad M., *Carcinogenesis*, **16** (1995) 861-867.
279. Thomson B.M., Lake R.J., Cressey P.J., Knize M.G., *Proc. Nutr. Soc.*, **21** (1996) 106-115.
280. Sugimura T., Sato S., Wakabayashi K., *Chemical Induction of Cancer, Structural Bases and Biological Mechanisms*, Eds Woo Y.T., Lai D.Y., Acros J.C., Argus M.F. (1998) Academic Press, New York, NY, p.681-710.

281. Turesky R.J., Bur H., Huynh-Ba T., Aeschbacher H.U., Milon H., *Food Chem. Toxicol.*, **26** (1988) 501-509.
282. Felton J.S., Knize M.G., Wood C., Wuebbles B.J., Healy S.K., Stuermer D.H., Bjeldanes L.F., Kimble B.J., Hatch F.T., *Carcinogenesis*, **5** (1984) 95-102.
283. Reistad R., Rosslund O.J., Latva-Kala K.J., Rasmussen T., Vikse R., Becher G., Alexander J., *Food Chem. Toxicol.*, **35** (1997) 945-955.
284. Knize M.G., Dolbeare F.A., Cunningham P.L., Felton J.S., *Heterocyclic Amines in Cooked Foods : Possible Human Carcinogens*, Eds Adamson R.H., Gustafsson J.-A., Ito N., Nagao M., Sugimura T., Wakabayashi K., Yamazoe Y. (1995) Princeton Scientific Publishing Co, Princeton, NJ, p. 30-36.
285. Wakabayashi K., Nagao M., Esumi H., Sugimura T., *Cancer Res.*, **52** (1992) 2092s-2098s.
286. Borgen E., Skog K., *Mol. Nutr. Food Res.*, **48** (2004) 292-298.
287. Keating G.A., Sinha R., Layton D., Salmon C.P., Knize M.G., Bogen K.T., Lynch C.F., Alavanja M., *Cancer Causes Control*, **11** (2000) 731-739.
288. Sinha R., Knize M.G., Salmon C.P., Brown E.D., Rhodes D., Felton J.S., Levander O.A., Rothman N., *Food Chem. Toxicol.*, **36** (1998) 289-297.
289. Vahl M., Gry J., Nielsen P.A., *Mutat. Res.*, **203** (1988) 239.
290. Wu J., Wong M.-K., Lee H.-K., Lee B.-I., Shi C.-y., Ong C.-N., *Food Add. Contaminants*, **13** (1996) 851-861.
291. Tikkanen L.M., Sauri T.M., Latva-Kala K.J., *Food Chem. Toxicol.*, **26** (1993) 717-721.
292. Kasai H., Yamaizumi Z., Wakabayashi K., Nagao M., Sugimura T., Spingarn N.E., Weisbruger J.H., Yokoyama S., Miyazawa T., *J. Chem Soc.*, **1** (1981) 2290-2293.
293. Zhang X.M., Wakabayashi K., Liu Z.-C., Sugimura T., Nagao M., *Mutat. Res.*, **201** (1988) 181-188.

- Chapitre 2 -

Application de la spectrométrie de masse avec ionisation par bombardement d'atomes métastables pour la caractérisation des AAH dans les viandes cuites.

I Présentation de l'étude

Nous avons vu dans le Chapitre 1 que parmi toutes les méthodes actuellement disponibles pour quantifier les AAH dans les viandes cuites, aucune ne permet la caractérisation de ces substances de manière rapide. Par conséquent, l'étude de l'influence de différents paramètres de cuisson, liés aux habitudes alimentaires de différentes catégories de populations, et donc l'estimation précise du niveau d'exposition de l'Homme à ces composés est particulièrement délicate dans le cadre d'études d'ampleur importante. Néanmoins, il semble désormais acquis que la spectrométrie de masse, en particulier associée à la chromatographie en phase liquide, constitue l'outil analytique le plus approprié à la quantification des AAH dans les viandes cuites. En effet, cette technique possède la sensibilité requise pour la caractérisation des AAH aux niveaux où elles sont présentes dans les viandes cuites, et permet une identification précise des substances détectées par la réalisation d'expériences MS/MS. Cependant, le temps total d'analyse par LC-MS/MS des AAH, entre la cuisson de l'échantillon et le résultat de l'analyse, peut dépasser une journée.

Dans la première partie de ce travail de thèse nous nous sommes intéressés au développement d'une méthode rapide de caractérisation des AAH dans les viandes cuites. Cette méthode, dont le développement est décrit dans le premier article de ce chapitre, est basée sur l'utilisation du mode d'ionisation par Bombardement d'Atomes Métastables (MAB) associé à la spectrométrie de masse. En effet, l'ionisation MAB couplée à un système de pyrolyse a déjà permis de caractériser des substances directement dans des matrices complexes sans étape préalable de purification et de séparation chromatographique [1], permettant ainsi de réduire considérablement le temps d'analyse. C'est pourquoi nous avons choisi d'explorer le potentiel de cette technique pour la détection directe des AAH dans des extraits non purifiés de viandes cuites. Une approche quantitative a également été développée pour une estimation rapide des quantités d'AAH présentes dans les échantillons analysés. En parallèle de ces travaux, un protocole plus classique de dosage des AAH par LC-APCI-MS/MS a également été développé afin de vérifier la validité des résultats obtenus.

1. Beaugrand C., Martin P., Forest A., Faubert D., Sanchez G., Bertrand M.J., *Proc. 48th ASMS Conference*, (2000) Long Beach, California, USA.

II Présentation de l'ionisation par Bombardement d'Atomes Métastables (MAB)

Le mode d'ionisation MAB est basé sur l'ionisation Penning [2] qui résulte de l'interaction entre une espèce excitée dans un état métastable et un atome ou une molécule. L'application de ce mode d'ionisation à la chimie analytique remonte au début des années 1990 par l'équipe du Pr. Bertrand au Canada [3].

II. 1 Formation des espèces métastables

Les espèces métastables permettant l'ionisation MAB sont générées dans une partie de la source appelée « canon MAB » (MAB gun) à partir de différents gaz et au moyen d'un courant de décharge autoentretenu dans un gradient de pression. Ces décharges électriques sont dites luminescentes car elles sont comprises entre 1 mA et 15 mA. Seule l'application d'une tension importante permet l'amorçage d'une décharge électrique dans un gaz. Cette tension, dite disruptive, dépend de la pression et de la distance séparant les électrodes entre lesquelles la différence de potentiel est appliquée. Le champ électrique ainsi créé peut être renforcé par « effet de pointe » si la cathode est en forme de pointe. Lorsque la tension appliquée devient supérieure ou égale à la tension disruptive du gaz, un phénomène de multiplication électronique s'amorce à partir de quelques électrons présents dans le gaz. Les électrons créés par la multiplication électronique ionisent alors le gaz neutre à proximité de la cathode, et le gaz ionisé est ainsi accéléré vers la cathode où il donne naissance à des électrons secondaires. Pour que le courant de décharge se maintienne il faut que chaque électron primaire émis par la cathode soit remplacé par un électron secondaire, ce qui dépend de la différence de potentiel entre les électrodes.

Trois types d'états excités sont engendrés par des électrons ou des ions libres dans une décharge électrique :

- les états radiatifs
- les états de Rydberg
- les états métastables qui participent à l'ionisation MAB.

Un état excité métastable représente en fait un état électronique dont toutes les transitions vers des états inférieurs ont une faible probabilité d'après les règles de rayonnement dipolaire [4]. Ces espèces excitées sont dites métastables et possèdent un

2. Penning F.M., *Naturwissenschaften*, **15** (1927) 818.

3. Faubert D., Paul G.J.C., Giroux J., Bertrand M.J., *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Processes*, **124** (1993) 69-77.

4. Delcroix J.L., Ferreira C.M., Ricard A., *Atomes et molécules métastables dans les gaz ionisés*, Ed. CNRS (1975) Paris.

temps de vie relativement long ($> 10^{-4}$ s) comme ceci est indiqué dans le Tableau 1. Les espèces métastables seraient principalement produites par l'impact d'électrons énergétiques sur des atomes ou des molécules neutres ou chargées [5]. Néanmoins, les espèces métastables peuvent être désactivées vers leur état fondamental par rayonnement ou par collision inélastique avec le gaz lui-même, les parois ou des molécules entraînant dans ce cas leur ionisation.

Tableau 1. Caractéristiques des états métastables des gaz rares [6] et de l'azote moléculaire [7] utilisables pour l'ionisation MAB.

Gaz	Etat Métastable	Energie (eV)	Temps de vie (s)	Population approximative (%)
Xe	3P_0	9,45	$7,8 \cdot 10^{-2}$	< 7
	3P_2	8,32	$1,5 \cdot 10^2$	> 93
Kr	3P_0	10,56	$4,9 \cdot 10^{-1}$	< 10
	3P_2	9,92	$8,5 \cdot 10^1$	> 90
Ar	3P_0	11,72	$4,5 \cdot 10^1$	14
	3P_2	11,55	$5,6 \cdot 10^1$	86
Ne	3P_0	16,72	$4,3 \cdot 10^2$	20
	3P_2	16,62	$2,4 \cdot 10^1$	80
He	1S_0	20,61	$2,0 \cdot 10^{-2}$	10
	3S_1	19,82	$9,0 \cdot 10^3$	90
N ₂	E $^3\Sigma_g^+$	11,88	$2,0 \cdot 10^{-4}$	< 15
	W $^1\Delta_u$	9,02	$1,0 \cdot 10^{-4} - 5,0 \cdot 10^{-4}$	
	a $^1\Pi_g$	8,67	$1,0 \cdot 10^{-4} - 1,5 \cdot 10^{-4}$	> 85
	a' $^1\Sigma_u^-$	8,52	1,4	
	W $^3\Delta_u$	7,32	17	
A $^3\Sigma_g^+$	6,17	1,0 - 2,6	?	

II. 2 Ionisation par bombardement d'atomes métastables

Le processus majoritaire d'ionisation mis en jeu dans une source d'ions MAB est l'ionisation Penning, bien qu'un processus d'ionisation associative semble également intervenir de façon minoritaire selon l'espèce métastable utilisée [8]. Par définition, l'ionisation Penning représente une réaction de transfert d'un électron à partir d'une orbitale d'un corps cible vers une espèce électrophile. La description du processus d'ionisation par la mécanique quantique est très complexe et la plupart des études réalisées dans ce domaine

5. Siska P.E., *Rev. Mod. Phys.*, **65** (1993) 337-412.
6. Siska P.E., *Comments on Atomic and Molec. Phys.*, **15** (1984) 155.
7. Slanger T.G., Fontijn A., Clyne M.A.A., *Reactions of Small Transient Species*, Academic Press (1983) Toronto, p.231.
8. Smith R.L., Serxner D., Hess K.R., *Anal. Chem.*, **61** (1989) 1103-1108.

ont concerné de petits systèmes [9]. Néanmoins, l'ionisation Penning peut être représentée par les réactions (1) et (2) décrites ci-dessous entre une espèce métastable A^* et une molécule neutre BC conduisant au retour de l'espèce A à son état fondamental tandis que la molécule BC est ionisée par transfert d'électron et qu'un électron de l'espèce métastable est éjecté dans un état continu comme proposé par M. Bertrand et représenté dans la Figure 1 [3].

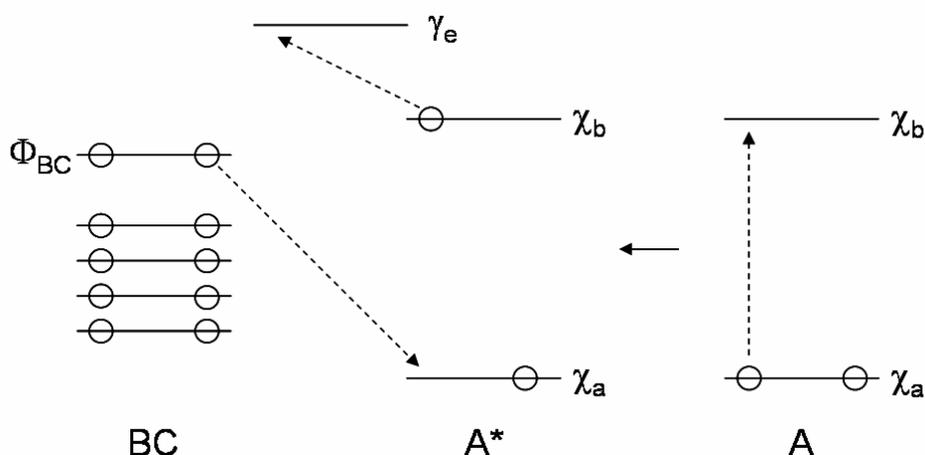
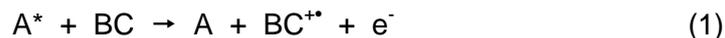


Figure 1. Processus d'ionisation Penning d'une molécule BC par une espèce métastable A^* [3].

Selon le mécanisme précédemment décrit, l'ionisation Penning se produit seulement dans le cas où l'énergie d'ionisation de la molécule BC est inférieure à l'énergie d'excitation de l'espèce métastable A^* . Dans ce cas, l'énergie interne (E_{int}) communiquée à l'ion formé (BC^{*+}) est donnée par l'équation (3) où $E_{méta}$ représente l'énergie d'excitation de l'espèce métastable A^* , $E_{I_{BC}}$ représente l'énergie d'ionisation de la molécule BC et E_{c_e} représente l'énergie cinétique de l'électron éjecté. Cet électron peut être éjecté avec une distribution d'énergie cinétique comprise entre 0 et $E_{méta} - E_{I_{BC}}$, induisant ainsi une distribution d'énergie interne de l'ion formé également comprise entre 0 et $E_{méta} - E_{I_{BC}}$. De cette manière, si la différence entre l'énergie d'excitation de l'espèce métastable et l'énergie d'ionisation de la molécule BC est faible, la distribution d'énergie interne de BC^{*+} sera étroite avec une valeur maximale faible, induisant ainsi la réaction (1). Au contraire, si la valeur de $E_{méta} - E_{I_{BC}}$ est importante, la distribution d'énergie interne de l'ion formé sera large avec une valeur

9. Herman Z., Cermak V., *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.*, **31** (1966) 649-658.

maximale importante, induisant ainsi la réaction (2) et conduisant à des fragmentations de l'ion BC^{**} . Néanmoins, la distribution d'énergie interne de l'ion formé peut être modifiée par la contribution d'un transfert d'énergie cinétique de l'espèce métastable vers la molécule à ioniser dont l'énergie interne augmentera.

$$E_{int} = E_{méta} - EI_{BC} - E_{C_e} \quad (3)$$

Il est également à noter que, l'équation 3 ne tient pas compte de l'énergie thermique de la molécule BC (E_{Th}) qui peut lui être communiquée par la température de la source d'ionisation (463 K dans les conditions analytiques utilisées lors de cette étude) ainsi que par le processus de pyrolyse intervenant avant le transfert de BC dans le volume d'ionisation dans le cas de notre dispositif expérimental. L'énergie interne totale communiquée aux ions est représentée par l'équation (4). Dans le cas d'une différence entre $E_{méta}$ et EI_{BC} négligeable, la distribution d'énergie interne des ions formés devient alors comprise entre 0 et E_{Th} . Ce paramètre devient significatif lorsque l'énergie d'activation nécessaire à la fragmentation d'un ion BC^{**} est inférieure à E_{Th} .

$$E_{int} = E_{Th} + E_{méta} - EI_{BC} - E_{C_e} \quad (4)$$

Si l'on se réfère aux processus communément admis dans l'état actuel de nos connaissances, les caractéristiques de l'ionisation Penning confèrent à l'ionisation MAB plusieurs propriétés intéressantes. En effet, pour une même molécule (EI_{BC} fixe), il est possible de contrôler l'énergie interne communiquée aux ions formés en faisant varier $E_{méta}$, c'est-à-dire en utilisant des gaz produisant des espèces métastables situées sur des niveaux d'énergie différents. Les gaz utilisés pour l'ionisation MAB figurent dans le Tableau 1. Il s'agit en fait d'atomes de gaz rares ou d'azote moléculaire. Tous ces gaz présentent des états métastables d'énergies différentes permettant (en théorie) de contrôler de manière discrète l'énergie interne communiquée aux ions formés. Ainsi, les gaz peuvent être classés dans l'ordre énergétique croissant selon l'expression (5). Il faut noter qu'un même gaz peut présenter plusieurs niveaux métastables avec des populations variables (Tableau 1), ce qui participe également à l'élargissement de la distribution interne des ions formés. Néanmoins, il semble que cette distribution d'énergie interne reste plus étroite que celle des ions générés par impact électronique. Ceci a permis un contrôle plus efficace des fragmentations en source par le choix de l'espèce métastable comparé au contrôle de l'énergie des électrons dans l'ionisation par impact électronique, comme cela a été montré dans plusieurs travaux

relatifs à l'analyse de molécules organiques [10], de dioxines [11], d'isocyanates [12], de paraffines chlorées [13] ou de foranes [14] ou encore de composés de l'industrie pétrochimique [15]. Cette propriété de l'ionisation MAB est illustrée avec IQ en annexe 2 où l'on constate que l'abondance relative des ions fragments de cette AAH est de plus en plus importante en fonction du gaz MAB utilisé selon l'équation 5. De plus, les rapports m/z des ions fragments générés avec l'hélium métastable sont similaires à ceux obtenus avec une ionisation par impact électronique (70eV) (annexe 3).



Une autre propriété intéressante de l'ionisation MAB est son caractère sélectif pour l'analyse de composés d'intérêt au sein de mélanges complexes. En effet, comme une molécule n'est ionisée que si son potentiel d'ionisation est inférieur à l'énergie d'excitation de l'espèce métastable, toute autre molécule présentant un potentiel d'ionisation supérieur ne sera pas ionisée. Cette propriété devient particulièrement intéressante dans le cas de molécules de faible potentiel d'ionisation pour lesquelles un gaz métastable faiblement énergétique peut être utilisé pour ioniser sélectivement les molécules d'intérêt au sein de mélanges et ainsi simplifier les spectres obtenus.

II. 3 Instrumentation

La source d'ionisation par bombardement d'atomes métastables a été mise au point à l'Université de Montréal au début des années 1990 [3]. Suite à l'optimisation de sa géométrie [16], cette source a été implantée sur des spectromètres de masse spécialement développés dans le cadre de l'exploitation de cette technologie comme le « Daxel » (MGP Instruments, Lamanon, France) ou le « Py-MAB-ToF » (Dephy Technologies, Montréal,

-
10. Faubert D., Mireault P., Bertrand M.J., *Proc. 43rd ASMS Conference*, (1995) Atlanta, Georgia, USA.
 11. Moore S., *Chemosphere*, **49** (2002) 121-125.
 12. Boutin M., Lesage J., Ostiguy C., Bertrand M.J., *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **70** (2003) 505-517.
 13. Moore S., Vromet L., Rondeau B., *Chemosphere*, **54** (2004) 453-459.
 14. Ponthus J., Walker J., Debrauwer L., Tabet J.C., *Proc. 52nd ASMS Conference*, (2004) Nashville, Tennessee, USA.
 15. Ponthus J., *Thèse de Doctorat de l'Université Paris 6*, (2005) Paris.
 16. Faubert D., L'Heureux A., Peraldi O., Mousselm M., Sanchez G., Bertrand M.J., *Adv. Mass Spectrom.*, Ed. Emilio Gelpi, vol. 15 (2001) John Wiley and Sons, p.431.

Québec, Canada) [17]. C'est ce dernier instrument qui a été utilisé dans ce travail et son schéma est présenté sur la Figure 2. Le dispositif expérimental utilisé associe l'ionisation MAB à un système de vaporisation rapide des substances à ioniser au moyen d'un pyrolyseur. Dans le cadre de l'application que nous souhaitons développer concernant la caractérisation des AAH dans les viandes cuites, ceci présente l'intérêt de pouvoir analyser directement des mélanges complexes en ne ionisant que les molécules d'intérêt, comme cela a déjà été décrit pour l'identification d'additifs dans les polymères [18] ou pour la détection de mycotoxines dans une matrice alimentaire [1]. Le spectromètre de masse MAB-ToF peut également être couplé à la chromatographie en phase gazeuse. Enfin, le spectromètre de masse est composé d'un analyseur à temps de vol particulièrement bien adapté à la détection d'espèces vaporisées rapidement par la pyrolyse et choisi en raison de sa fréquence d'acquisition élevée. Dans le but de développer un instrument transportable destiné notamment à l'analyse sur le terrain, un analyseur de dimensions réduites a volontairement été développé par la société « Dephy Technologies ». Cependant, afin d'obtenir une résolution suffisante des rapports m/z observés, cet analyseur est muni d'un réflecteur électrostatique portant la distance de vol à 60 cm et d'une accélération orthogonale.

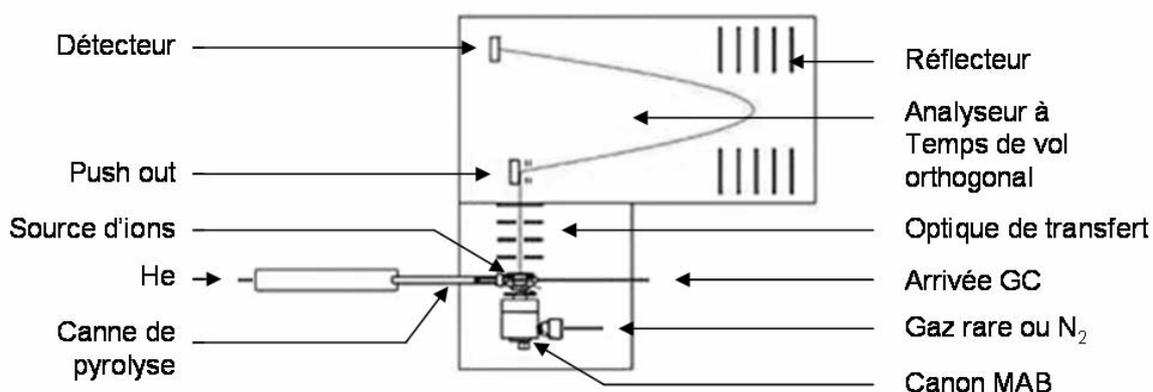


Figure 2. Schéma du spectromètre de masse Py-MAB-ToF.

17. Moussalami S.A., Peraldi O., Sanchez G., Bertrand M.J., *Proc. 52nd ASMS Conference*, (2004) Nashville, Tennessee, USA.
18. Boutin M., Lesage J., Ostiguy C., Bertrand M.J., *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **15** (2004) 1315-1319.

Le pyrolyseur utilisé dans ce travail était un système Pyroprobe 2000 (CDS Analytical, Oxford, PA) équipé d'une canne de pyrolyse à filament de platine chauffé (Figure 3). L'échantillon solide ou liquide (0,3 μL) est introduit manuellement dans un tube de quartz ($L = 25 \text{ mm}$, $d_{\text{int}} = 1.9 \text{ mm}$) interchangeable entouré par le filament de platine chauffé. Cette canne de pyrolyse a été modifiée afin de permettre le passage d'un courant d'hélium dans le tube de quartz pour entraîner plus rapidement les espèces vaporisées vers la source d'ions. La température de pyrolyse est programmable avec une température maximale du filament de 1100°C et une vitesse d'augmentation de température programmable comprise entre $0,01^\circ\text{C}/\text{min}$ et $20^\circ\text{C}/\text{ms}$.

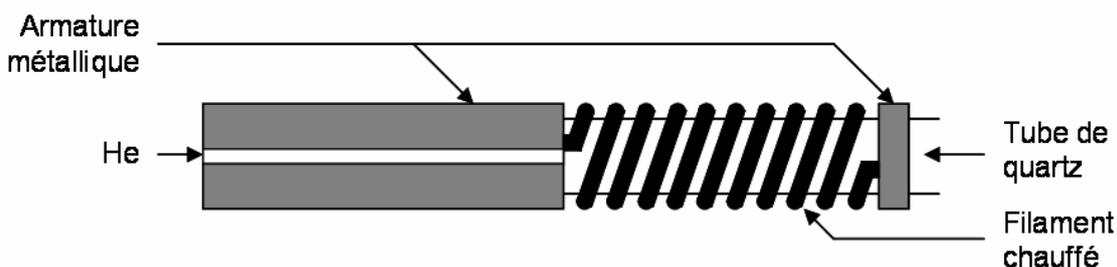


Figure 3. Schéma de la canne de pyrolyse modifiée.

La source d'ionisation proprement dite, représentée sur la Figure 4, est composée d'une chambre d'ionisation et d'un canon MAB. Les espèces métastables sont produites dans le canon MAB comme précédemment décrit. Le gradient de pression est réalisé par l'utilisation d'une céramique percée ($\phi = 140 \mu\text{m}$) en bout de canon. La décharge de plasma est maintenue entre une cathode en cuivre en forme de pointe (350 V) et une anode en acier inoxydable (750 V). La stabilité du plasma dépend de la pression du gaz et du courant de la décharge. C'est pourquoi, ces paramètres sont ajustés en fonction du gaz utilisé pour former des espèces métastables (Tableau 2). Un déflecteur (900V) est placé entre le canon MAB et le volume d'ionisation afin d'éliminer les espèces chargées présentes dans le plasma. Il permet donc d'empêcher les ions de gaz de pénétrer dans le volume d'ionisation ce qui pourrait concurrencer le processus d'ionisation Penning. Cependant, du point de vue pratique, des ions issus du gaz (Ar^{++} , N_2^{++} , Kr^{++} , He^{++} et Xe^{++}) peuvent être observés sur les spectres de masse. Afin de ne pas compliquer l'interprétation des spectres obtenus, les pics correspondant à ces ions ont été éliminés soit en modifiant la borne inférieure de l'échelle de rapports m/z , soit en retraitant les spectres. La deuxième partie de la source MAB est constituée du volume d'ionisation dans lequel se déroule le processus d'ionisation Penning. Le volume d'ionisation est chauffé (190°C) afin de ne pas condenser les composés vaporisés sur les parois de la source d'ions. Ce volume est délimité par une lentille accélératrice et par le déflecteur qui agit également comme repousseur des ions formés. Les molécules à ioniser entrent dans ce volume en phase gazeuse et de manière perpendiculaire

à l'axe d'accélération des ions. Latéralement, deux orifices d'entrée sont présents permettant soit l'introduction de la canne de pyrolyse, soit l'arrivée de molécules issues d'un chromatographe en phase gazeuse ou du réservoir de calibrant FC43 (tris(nonafluorobutyl)-amine).

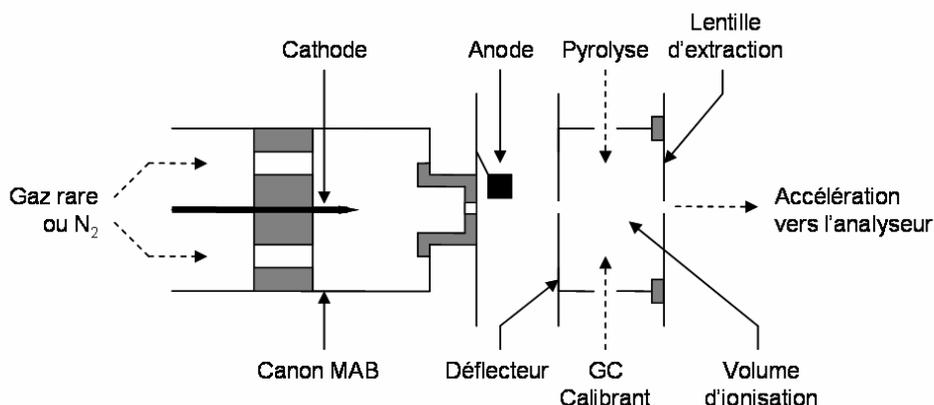


Figure 4. Schéma de la source d'ionisation du spectromètre de masse Py-MAB-ToF.

Tableau 2. Paramètres utilisés pour maintenir un plasma d'atomes métastables.

Gaz	Xe	Kr	Ar	He	N ₂
Décharge (mA)	8	8	10	10 - 11	10 - 12
Pression (mBar) ^a	20	20 - 30	40	130	35 - 45

^a dans le canon MAB

Une visualisation du spectromètre de masse Py-MAB-ToF en fonctionnement est donnée en Figure 5. Ces photographies montrent une vue globale de la source d'ionisation MAB avec le canon MAB générant un plasma d'azote métastable, la canne de pyrolyse chauffée introduite dans la source et une partie du compartiment renfermant l'analyseur à temps de vol. Deux agrandissements permettent d'observer plus précisément le filament en platine de la canne de pyrolyse ainsi que le plasma d'azote métastable.

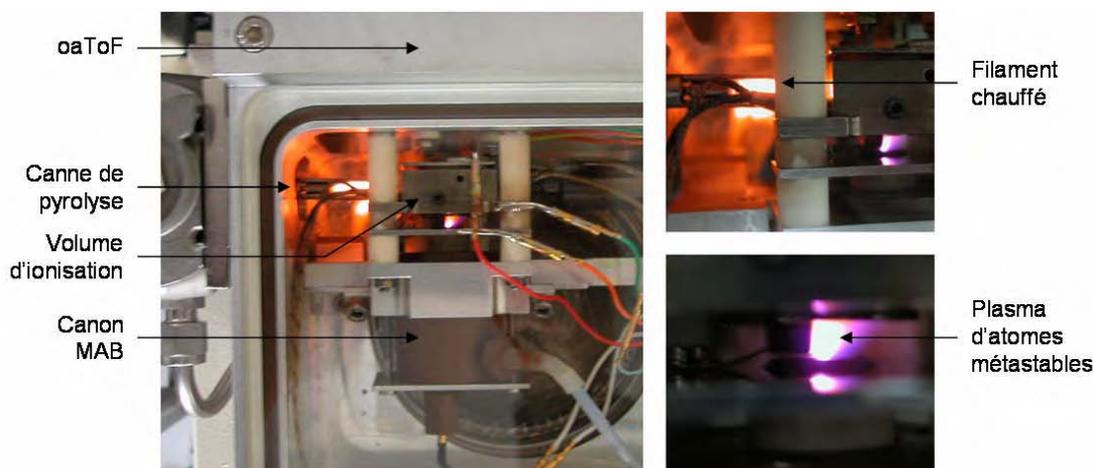


Figure 5. Visualisation du spectromètre de masse Py-MAB-ToF en fonctionnement.

III Démarche scientifique et instrumentale

Comme nous l'avons évoqué dans la présentation de ce chapitre, l'objectif de notre travail était de pouvoir proposer une méthodologie rapide de quantification des AAH dans les viandes cuites et pour cela, d'évaluer le potentiel du système Py-MAB-ToF déjà utilisé dans le même esprit [1]. La première partie de notre travail, décrite dans le premier article de ce chapitre, a donc concerné l'évaluation du spectromètre de masse prototype Py-MAB-ToF afin de caractériser les AAH directement dans des extraits non purifiés de viandes cuites. Dans un premier temps l'analyse d'AAH standards par spectrométrie de masse Py-MAB-ToF a été étudiée et optimisée en testant les différents gaz d'ionisation disponibles. Une étude approfondie de la nature et de l'identité des ions formés (moléculaires et fragments) a été réalisée. La sélectivité de l'ionisation MAB a été démontrée par l'analyse d'échantillons de poulet surchargés. Une approche quantitative a ensuite été développée et appliquée à la quantification d'AAH dans des filets de poulet cuits. Dans un deuxième temps, afin de vérifier les résultats obtenus par la méthodologie Py-MAB-ToF, une méthode de dosage par LC-MS/MS considérée comme la méthode de référence pour cette application [19] a été développée et fait l'objet du deuxième article présenté à la fin de ce chapitre. Dans ce travail, les paramètres analytiques concernant la purification et la concentration des échantillons, la séparation chromatographique et l'analyse par spectrométrie de masse en tandem sur un triple quadripôle ont été optimisés. Cette méthode a ensuite été appliquée à l'analyse des mêmes échantillons que ceux étudiés par Py-MAB-ToF.

Dans les deux cas, les AAH étudiées appartenaient aux familles structurales majoritaires des AAH :

- carbolines (A α C, MeA α C, Glu-P-1, Trp-P-1 et Trp-P-2)
- quinolines et quinoxalines (IQ, MeIQ, IQx, MeIQx et 4,8-DiMeIQx)
- pyridines (PhIP).

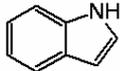
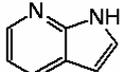
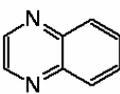
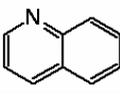
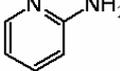
Rappelons que les AAH sélectionnées sont des substances formées dans les viandes cuites à des concentrations différentes. De plus, dans le contexte de l'exploration de la technique MAB pour l'analyse rapide des AAH, le type de viande choisi a été le filet de poulet. En effet, cette viande représente une des matrices générant les plus fortes quantités de PhIP (Chapitre 1), et étant potentiellement susceptible de fournir des quantités d'AAH compatibles avec les capacités de détection de notre dispositif expérimental Py-MAB-ToF dans son état actuel de développement.

19. Santos F.J., Barcelo-Barrachina E., Toribio F., Puignou L., Galceran M.T., Persson E., Skog K., Messner C., Murkovic M., Nabinger U., Ristic A., *J. Chromatogr., B*, **802** (2004) 69-78.

III. 1 Caractérisation des AAH par spectrométrie de masse Py-MAB-ToF

Comme nous l'avons vu précédemment, l'énergie mise en jeu dans le mode d'ionisation par bombardement d'atomes métastables dépend de la nature du gaz utilisé pour produire les espèces métastables. Les molécules ionisées possèdent donc une énergie interne fonction de la nature des espèces métastables utilisées. Bien que les valeurs de potentiel d'ionisation des AAH ne soient pas connues, on peut estimer que les AAH sont ionisables par tous les gaz utilisés en MAB si l'on se réfère aux énergies d'ionisation d'un certain nombre d'hétérocycles azotés présentant des éléments de structure communs comme l'indique le Tableau 3. Cette hypothèse a été vérifiée après une étude approfondie du comportement des 11 AAH étudiées vis-à-vis de l'ionisation MAB décrite en détail dans l'Article 1 de ce chapitre. A l'issue de cette étude, l'azote a été sélectionné comme gaz MAB pour la suite du développement méthodologique de la caractérisation des AAH par spectrométrie de masse Py-MAB-ToF. En effet, l'azote métastable permet de ioniser toutes les AAH étudiées sans fragmentation notable (annexe 2) et génère en outre un courant ionique plus intense que le xénon. De plus, au niveau expérimental, le plasma d'azote est plus stable que le plasma de xénon au sein du canon MAB, et l'azote constitue le gaz le moins coûteux de tous ceux utilisés pour générer des espèces métastables.

Tableau 3. Valeurs d'énergie d'ionisation de différents composés constituant la structure des AAH étudiées [20].

Structure	Nom	Energie d'ionisation (eV) ^a
	Indole	7,8
	1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine	8,1
	Quinoxaline	9,0
	Quinoline	8,6
	2-Aminopyridine	8,1
	1H-imidazole	8,8

^a Valeurs les plus récemment proposées

20. <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

Comme nous l'avons également précisé au début de ce chapitre, la pyrolyse a été choisie comme mode d'introduction dans la source MAB. Les conditions de pyrolyse pouvant influencer la forme des pics observés sur les pyrogrammes, la programmation de température du dispositif de pyrolyse a également été optimisée. En effet, plus les pics seront fins sur les pyrogrammes, et plus la sensibilité de détection sera importante. Des vitesses de gradient de température plus lentes que les conditions maximales supportées par le système de pyrolyse ont été testées et les résultats obtenus ont montré un élargissement des pics sur les pyrogrammes. Ainsi, les conditions finales de pyrolyse retenues sont les conditions maximales supportées par le système (de 20°C à 1100°C à 20°C/ms). Bien que ces températures de pyrolyse puissent paraître élevées, aucune fragmentation des AAH n'a été observée ni avec le xénon ni avec l'azote, indiquant que l'énergie thermique communiquée aux AAH dans ces conditions n'est pas suffisante pour fragmenter ces substances. Il faut cependant préciser que les températures mentionnées concernent la température du filament et non la température réelle de l'échantillon qui est nettement plus faible notamment en raison de l'inertie thermique du tube en quartz utilisé et du courant d'hélium balayant celui-ci. C'est pourquoi, le terme de pyrolyse paraît en réalité inadapté à ce type d'étude. Un autre paramètre influençant la largeur des pics des pyrogrammes concerne le débit d'hélium traversant la canne de pyrolyse. Bien que ce débit n'ait en réalité que peu d'influence, les pics obtenus sans débit d'hélium étaient plus larges et un débit de 1 mL/min a été adopté. Enfin, le solvant utilisé pour solubiliser les AAH et réaliser les dépôts à l'intérieur du creuset en quartz constitue également un paramètre important pouvant modifier la forme des pics. Cependant, le choix du système de solvant est également dicté par la solubilité des AAH. Ainsi, plusieurs compositions de solvants ont été testées et un mélange MeOH/CH₂Cl₂ a finalement été sélectionné pour une solubilisation efficace de toutes les AAH étudiées. Nous avons constaté que les pics des pyrogrammes étaient d'autant plus fins que la proportion de CH₂Cl₂ dans les mélanges MeOH/CH₂Cl₂ augmentait, probablement en raison de la faible viscosité de ce solvant permettant d'effectuer des dépôts répétables au sein du creuset en quartz, et de sa bonne volatilité. Cependant, un mélange MeOH/CH₂Cl₂ (50/50, v/v) a finalement été utilisé pour permettre une meilleure solubilisation des AAH dans les extraits préparés tout en conservant une bonne finesse des pics obtenus.

III. 2 Quantification des AAH par Py-MAB-ToF dans des viandes cuites

A l'issue de cette phase de mise au point, une approche quantitative de l'analyse des AAH par Py-MAB-ToF a été développée en intégrant les pics observés sur les pyrogrammes de la même manière que des pics chromatographiques. Une méthode par étalonnage

interne a été préférée afin de minimiser les variations de résultats causés par la difficulté de réaliser des dépôts d'échantillon répétables dans la canne de pyrolyse (volumes de 300 nL d'échantillon à introduire manuellement avec une seringue dans un tube de 1,9 mm de diamètre intérieur). En effet, la qualité du dépôt de l'échantillon dans le tube de quartz influence la distribution de l'échantillon dans le creuset et par conséquent le profil de vaporisation des substances. Dans le cas de notre système qui fait intervenir un dépôt manuel avec une seringue, les paramètres influents sont les suivants :

- le manipulateur
- la température du creuset lors du dépôt (temps de refroidissement entre deux analyses)
- la position du dépôt dans le creuset (de longueur 25 mm)
- la vitesse de dépôt (écoulement des 300 nL à la sortie de l'aiguille de la seringue)
- le retrait de la seringue du creuset (traînée éventuelle de la gouttelette déposée).

L'étalon interne sélectionné a été le 4,7,8-TriMeIQx qui est une amine aromatique hétérocyclique présente à des concentrations non détectables dans les viandes cuites. De plus, elle possède des propriétés physicochimiques (masse moléculaire, solvation, vaporisation, comportement vis-à-vis de l'ionisation MAB, etc.) proches de celles des AAH recherchées. Enfin, la linéarité des surfaces des pics en fonction de la concentration des AAH a été vérifiée pour établir les droites de calibration permettant ainsi de quantifier les AAH.

L'objectif de cette étude étant de proposer une méthode de quantification rapide des AAH, une attention particulière a été portée à la simplification des étapes de traitement des échantillons. Afin de mettre au point la méthode d'extraction, des échantillons de viande de poulet cuite ne contenant pas d'AAH ont été surchargés. Pour cela, une cuisson au four micro-ondes a été choisie car ce mode de cuisson ne forme pas d'AAH en quantités détectables [21]. Cette donnée a malgré tout été vérifiée en analysant ces échantillons par Py-MAB-ToF et en obtenant comme attendu des spectres de masse ne montrant la présence d'aucune AAH dans la zone des ions moléculaires attendus comme l'indique la Figure 7b par comparaison à un spectre de masse correspondant à un échantillon surchargé en AAH (Figure 7a). De plus, ces analyses ont indiqué qu'il n'y avait pas de substances ionisées pouvant interférer avec les AAH étudiées dans la gamme de rapports m/z d'intérêt. Ces échantillons cuits au four micro-ondes ont ensuite été surchargés avec un mélange équimolaire d'AAH pour la mise au point du protocole d'extraction. Les rendements d'extraction des différentes AAH ont ainsi pu être déterminés par Py-MAB-ToF en comparant les résultats obtenus à partir d'échantillons surchargés avant et après le protocole

21. Felton J.S., Fultz E., Dolbeare F.A., Knize M.G., *Food Chem. Toxicol.*, **32** (1994) 897-903.

d'extraction. Parallèlement, les rendements d'extraction obtenus par Py-MAB-ToF ont été vérifiés pour deux AAH (PhIP et MeIQx) pour lesquelles nous disposons de composés marqués au carbone 14. Enfin, la méthodologie développée a été appliquée à la quantification des AAH dans des filets de poulets cuits par différents modes de cuisson et à différentes températures. La méthodologie utilisée et les résultats obtenus figurent dans l'Article 1 de ce chapitre.

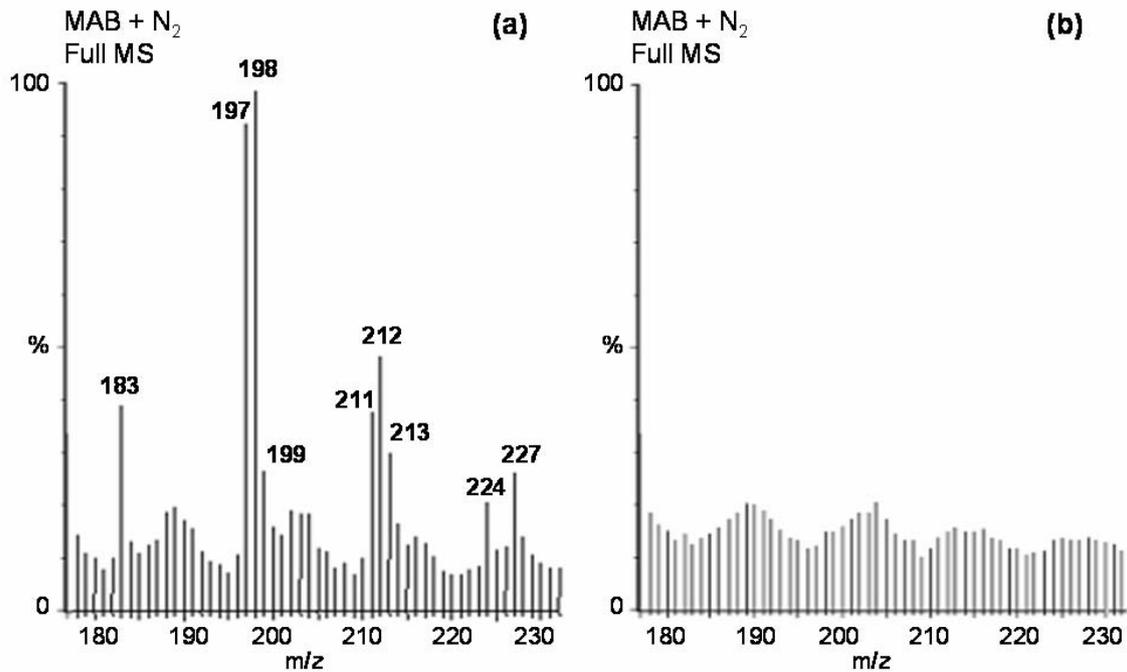


Figure 7. Spectres de masse Py-MAB-ToF N₂ d'un échantillon de filet de poulet cuit au four micro-ondes, surchargé en AAH (a) et non surchargé (b).

III. 3 Quantification des AAH par LC-MS/MS dans les viandes cuites

Afin de vérifier et valider les résultats obtenus par la méthode Py-MAB-ToF, une méthode de dosage par LC-MS/MS des AAH présentes dans les filets de poulet cuits a été développée. Le développement de la méthode et son application au dosage des AAH dans les viandes cuites, sont détaillés dans le deuxième article présenté à la fin de ce chapitre.

Le développement de cette méthode de dosage a consisté dans un premier temps à optimiser les conditions chromatographiques et spectrométriques à partir de solutions d'AAH standards. Ainsi, plusieurs colonnes chromatographiques et phases mobiles ont été testées afin d'optimiser la séparation du mélange des 10 AAH étudiées. De même, les conditions de spectrométrie de masse ont été optimisées afin d'optimiser la sensibilité de notre méthode. Ainsi, un analyseur triple quadripolaire a été choisi en raison de son excellente sensibilité et de sa très bonne répétabilité en réalisant des acquisitions en mode SRM, comme nous

l'avons vu dans le Chapitre 1. La comparaison des courants ioniques observés pour les différentes AAH standards en conditions de débit chromatographique a indiqué que le mode d'ionisation le mieux adapté au dosage des AAH dans nos conditions analytiques était l'APCI. Le mode d'acquisition par MRM a été employé en suivant deux transitions par AAH. Pour une sensibilité maximale, la transition sélectionnée pour quantifier a été celle menant à l'ion fragment le plus abondant sur le spectre MS/MS alors que la transition sélectionnée pour confirmer l'identité de l'espèce observée devait correspondre à un fragment caractéristique de la structure. Pour cela, les spectres MS/MS de solutions standards d'AAH ont été étudiés et les fragments observés sont résumés dans le Tableau 4. L'attribution des ions fragments a été réalisée sur la base de travaux publiés à partir d'AAH marquées au deutérium et au carbone 13 avec un analyseur triple quadripolaire [22, 23] ou en haute résolution sur un spectromètre de masse hybride de type QqToF [24]. A partir de ces données, des expériences de spectrométrie de masse résolue en énergie (ERMS) représentant l'évolution des abondances relatives des fragments en fonction de l'énergie de collision ont été réalisées, ce qui a permis de sélectionner l'énergie de collision conduisant à l'abondance relative la plus importante pour le fragment utilisé pour quantifier l'AAH. Ces expériences ne sont pas reprises dans ce manuscrit, et seules les valeurs des énergies de collision optimales retenues pour chaque transition étudiée sont reportées dans le Tableau 2 figurant dans l'Article 2 présenté à la fin de ce chapitre, où figurent également l'ensemble des paramètres expérimentaux retenus pour l'analyse des AAH par LC-MS/MS.

Tableau 4. Ions fragments observés sur les spectres MS/MS des AAH avec un analyseur triple quadripolaire associé à une source d'ionisation APCI en mode positif.

AAH	[M+H] ⁺	E _{coll} (eV)	Fragments m/z	Abondance relative (%)	Attribution
TriMeIQx	242	30	227 ^a	100	- [•] CH ₃
			226 ^b	47	- [•] CH ₃ -H
			201	25	-CH ₃ CN
			186	11	- [•] CH ₃ -CH ₃ CN
			174	19	-CH ₃ CN-HCN
			145	16	- [•] CH ₃ -2CH ₃ CN
			4,8-DiMeIQx	228	34
212 ^a	100	- [•] CH ₃ -H			
187	9	-CH ₃ CN			
186	8	- [•] CH ₃ -HCN ou -CH ₂ N ₂			
185	8	- [•] CH ₃ -H-HCN			
170	10	-CH ₃ CN-NH ₃			
160	26	-C ₃ H ₄ N ₂ ou - [•] CH ₃ -C ₃ H ₃ N			
145	15	- [•] CH ₃ -CH ₃ CN-HCN			

22. Holland R.D., Taylor J., Schoenbachler L., Jones R.C., Freeman J.P., Miller D.W., Lake B.G., Gooderham J., Turesky R.J., *Chem. Res. Toxicol.*, **17** (2004) 1121-1136.

23. Guy P.A., Gremaud E., Richoz J., Turesky R.J., *J. Chromatogr., A*, **883** (2000) 89-102.

24. Barcelo-Barrachina E., Moyano E., Galceran M.T., *J. Chromatogr., A*, **1054** (2004) 409-418.

Tableau 4. suite.

MelQx	214	30	199 ^a	100	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$
			197	4	-NH ₃
			187	8	-HCN
			173	15	-CH ₃ CN
			172	16	-CH ₂ N ₂ ou - $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -HCN
			156	8	-CH ₃ CN-NH ₃
			146 ^b	19	-C ₃ H ₄ N ₂ ou - $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -C ₃ H ₃ N
			131	19	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -CH ₃ CN-HCN
IQx	200	32	185 ^a	100	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$
			183	4	-NH ₃
			173	3	-HCN
			159	8	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -CN
			158	30	-CH ₂ N ₂ ou - $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -HCN
			156	9	-NH ₃ -HCN
			146	10	-2HCN
			132	17	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -CN-HCN
			131 ^b	25	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -2HCN
			MelQ	213	28
197 ^b	35	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -H			
196	3	-NH ₃			
172	4	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -CN			
170	5	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -H-HCN			
145	6	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -CN-HCN			
IQ	199	32			
			157 ^b	34	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -HCN
			156	16	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -H-HCN
			142	5	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -CH ₂ N ₂
			131	10	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -CN-HCN
			130	8	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -C ₂ H ₂ N ₂
PhIP	225	32	210 ^a	100	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$
			183 ^b	14	-CH ₂ N ₂ ou - $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -HCN
			181	5	-NH ₃ -HCN
			167	7	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -NH ₃ -CN
			154	4	-C ₂ H ₅ N ₃
			140	9	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -NH ₃ -CN-HCN
Trp-P-1	212	26	197	5	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$
			195 ^a	100	-NH ₃
			180	10	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -NH ₃
			168	48	-NH ₃ -HCN
			167 ^b	32	-NH ₃ -HCN- H
Trp-P-2	198	30	141	6	-NH ₃ -2HCN
			181 ^b	39	-NH ₃
			156	6	-CH ₂ N ₂ ou - $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -HCN
			154 ^a	100	-NH ₃ -HCN
			130	10	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -HCN-CN
			128	13	-NH ₃ -HCN-CN
MeAαC	198	26	127	26	-NH ₃ -2HCN
			183	38	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$
			181 ^a	100	-NH ₃
			154 ^b	39	-NH ₃ -HCN
			129	32	- $\dot{\text{C}}\text{H}_3$ -2HCN
			128	14	-NH ₃ -CN-HCN
AαC	184	32	127	17	-NH ₃ -2HCN
			167 ^b	35	-NH ₃
			140 ^a	100	-NH ₃ -HCN
			113	4	-NH ₃ -2HCN

^a Fragment utilisé pour quantifier^b Fragment utilisé pour confirmer l'identité de l'AAH.

Outre les paramètres expérimentaux utilisés en LC-MS, les conditions d'extraction et de purification ont également été optimisées. Bien que la méthode d'extraction/purification de Gross et Grüter ait été proposée comme méthode standard pour le dosage des AAH [25], nous avons sélectionné pour ce travail la méthode de Messner [26] qui ne nécessite qu'une seule étape d'extraction sur phase solide (cartouche SPE), ce qui diminue le temps d'analyse (voir Figure 10 dans le Chapitre 1). Cependant, nous avons également optimisé la méthode de Messner afin d'améliorer les rendements d'extraction comme ceci est détaillé dans l'Article 2 de ce chapitre.

Les performances de la méthode LC-MS/MS ainsi développée ont été évaluées en termes de linéarité, de répétabilité, de sensibilité, d'effet matrice et de rendements d'extraction. Enfin, cette méthode a été appliquée au dosage des AAH présentes non seulement dans les mêmes échantillons que ceux analysés par Py-MAB-ToF mais également dans des échantillons cuits dans d'autres conditions de temps et de température de cuisson. Les résultats obtenus sont détaillés dans l'Article 2 présenté ci-après.

-
25. Santos F.J., Barcelo-Barrachina E., Toribio F., Puignou L., Galceran M.T., Persson E., Skog K., Messner C., Murkovic M., Nabinger U., Ristic A., *J. Chromatogr., B*, **802** (2004) 69-78.
 26. Messner C., Murkovic M., *J. Chromatogr., B*, **802** (2004) 19-26.

IV Conclusions et perspectives

Les deux méthodes de dosage développées au cours de cette étude ont permis de quantifier des AAH dans des échantillons de filets de poulet cuits. Les résultats obtenus par les deux méthodes sont équivalents comme ceci apparaît dans le Tableau 5. Cependant, ces résultats ont pu être obtenus en seulement deux heures par la méthode Py-MAB-ToF en injectant directement dans la source d'ionisation un extrait non purifié de viande cuite, tandis que l'obtention des extraits pour l'analyse LC-MS/MS a nécessité plus de 24 heures en raison des étapes préalables de purification et de séparation. De plus, le gain de temps apporté par la méthode Py-MAB-ToF induit également une diminution du coût de l'analyse qui nécessite moins de solvant, pas de cartouche SPE et pas de système chromatographique. Enfin, la méthode Py-MAB-ToF permet de réaliser des analyses à haut débit car les AAH sont détectées en moins de 30 secondes de pyrolyse et le temps nécessaire pour équilibrer la température de la canne de pyrolyse à la température ambiante après l'analyse est de l'ordre de deux à trois minutes. Il est donc possible de réaliser une analyse par Py-MAB-ToF toutes les trois ou quatre minutes alors que par LC-MS/MS, la séparation des AAH et le temps d'équilibrage de la colonne nécessite 30 minutes dans notre méthode (ce temps pourrait néanmoins être ramené à une dizaine de minutes). Ainsi, avec un temps de préparation d'échantillons de moins de deux heures, un temps d'analyse par Py-MAB-ToF de trois minutes, la quantification d'un grand nombre d'échantillons devient plus simple à réaliser, permettant une estimation plus précise des quantités d'AAH absorbées quotidiennement par les consommateurs. Il devient également possible d'étudier plus facilement l'influence des différents paramètres de cuisson (temps, température, type de cuisson, nature de la viande, etc.) sur les quantités d'AAH formées.

Tableau 5. Quantités d'AAH en ng/g mesurées par LC-MS/MS et Py-MAB-ToF dans deux échantillons de filets de poulet cuits.

AAH	Echantillon A		Echantillon B	
	LC-MS/MS	Py-MAB-ToF	LC-MS/MS	Py-MAB-ToF
DiMeIQx	16,6	nd	2,9	nd
PhIP	1079,8	1024,7	427,5	424,2
MeIQx	26,4	trace	22,3	nd
IQx	13,2	nd	3,5	nd
A α C	63,6	nd	0,4	nd

nd : non détecté

Il faut néanmoins préciser que pour certains des échantillons analysés au cours de cette étude, aucune AAH n'a pu être détectée par la méthode Py-MAB-ToF, alors que les concentrations des AAH étaient mesurables par la méthode LC-MS/MS. Ceci souligne la principale limitation de la méthode Py-MAB-ToF dans l'état actuel de développement de

notre instrument prototype. En effet, les limites de détection estimées pour cette méthode ne sont pas encore compatibles avec les quantités d'AAH formées dans les viandes cuites dans des conditions normales de temps et de température de cuisson. Pour appliquer la technologie Py-MAB-ToF à une plus large gamme d'échantillons, il faudrait améliorer sa sensibilité au minimum d'un facteur 10. Ceci est tout à fait envisageable si on considère l'état de développement actuel du spectromètre de masse prototype utilisé au cours de cette étude. En effet, de nombreux paramètres techniques de la source MAB peuvent encore être optimisés afin d'améliorer le rendement d'ionisation. Des sources MAB dites de seconde génération sont maintenant disponibles et offrent des rendements d'ionisation 20 à 50 fois supérieurs à celle utilisée dans ce travail. Par exemple, la position relative de la sortie du tube de quartz par rapport à l'axe du plasma d'atomes métastables ou encore la taille du volume d'ionisation peuvent être optimisés. De même, l'utilisation d'un analyseur autorisant des expériences de spectrométrie de masse en tandem permettrait d'améliorer la sensibilité, notamment en augmentant la sélectivité de détection (diminution du bruit de fond). Notons enfin que le système de pyrolyse utilisé n'autorisait le dépôt que d'un faible volume d'extrait dans le tube de quartz alors qu'il existe des systèmes de pyrolyse permettant de déposer jusqu'à dix fois plus d'échantillon dans un tube de quartz de 6 mm de diamètre intérieur (au lieu de 1,9 mm dans notre travail). L'utilisation d'un tel tube de quartz imposerait toutefois la modification du volume d'ionisation pour que le creuset puisse y pénétrer.

La répétabilité des mesures des surfaces des pics de pyrolyse dans la méthode Py-MAB-ToF développée est relativement élevée (bien qu'acceptable) avec des déviations standard des mesures de l'ordre de 20%. Comme ceci est discuté dans l'Article 1 présenté à la fin de ce chapitre, cette faible répétabilité est principalement causée par la variabilité du dépôt manuel des échantillons dans le tube de quartz. Bien que ceci ait pu être atténué par l'utilisation d'un étalon interne, l'utilisation d'un passeur automatique d'échantillons permettant de déposer les échantillons rigoureusement de la même manière, permettrait d'améliorer la répétabilité des mesures. Il faut également noter que le système de pyrolyse à filament utilisé sur notre spectromètre de masse MAB-ToF n'est pas le mieux adapté à la pyrolyse quantitative. En effet, des systèmes de pyrolyse à point de Curie permettent d'atteindre de bien meilleures valeurs de répétabilité de mesure en Py-MS quantitative (déviations standard relative de 1,3% [27]). Cependant, il a été noté que le champ oscillateur régulant la température du filament à point de Curie pourrait induire des perturbations de la trajectoire des ions dans la source d'ionisation [15].

Enfin, la dernière limitation de la méthode Py-MAB-ToF décrite dans ce travail, est son incapacité à confirmer l'identité des espèces observées. En effet, l'analyseur qui équipe

27. Ghassempour A., Nabid M.R., Talebi M., Entezami A.A., *Talanta*, **59** (2003) 435-441.

notre spectromètre de masse est un temps de vol de dimensions réduites qui ne possède pas une résolution suffisante pour réaliser des mesures de masses exactes et qui ne permet pas de réaliser des expériences MS/MS. Ainsi, le développement d'un spectromètre de masse associant une source d'ionisation MAB et un analyseur en masse de haute résolution et/ou permettant la réalisation d'expériences MS/MS serait d'un intérêt particulier pour le type d'application que nous avons développé. Un tel système est actuellement en cours de développement à l'Université Pierre & Marie Curie et devrait associer une source d'ionisation MAB à un analyseur FT-ICR. Ce système utilisera une source d'ionisation MAB de nouvelle génération qui devrait être en outre plus sensible que celle utilisée au cours de cette étude. Ainsi, ce système permettrait à la fois, d'améliorer la sensibilité de la méthode Py-MAB-ToF et de confirmer l'identité des espèces observées par la mesure de masses exactes et la réalisation d'expériences MS/MS. Cet apport pourrait être précieux dans le cadre de projets pour lesquels une caractérisation rapide et précise des AAH sera nécessaire, bien qu'il semble difficile d'envisager l'utilisation d'une telle instrumentation dans son état actuel de développement pour des analyses de routine à haut débit.

V Article 1

**Assessment of metastable atom bombardment (MAB) ionization
mass spectrometry for the fast determination of heterocyclic
aromatic amines in cooked meat.**

Emilien Jamin, Sylvie Chevolleau, Catherine Touzet, Jacques Tulliez
Laurent Debrauwer

Analytical and Bioanalytical Chemistry, **387** (2007) 2931-2941

Anal Bioanal Chem (2007) 387:2931–2941
DOI 10.1007/s00216-007-1170-x

ORIGINAL PAPER

Assessment of metastable atom bombardment (MAB) ionization mass spectrometry for the fast determination of heterocyclic aromatic amines in cooked meat

E. Jamin · S. Chevolleau · C. Touzet · J. Tulliez ·
L. Debrauwer

Received: 25 October 2006 / Revised: 26 January 2007 / Accepted: 31 January 2007 / Published online: 28 February 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract An investigation of metastable atom bombardment (MAB) ionization mass spectrometry for the fast characterization of mutagenic/carcinogenic heterocyclic aromatic amines (HAAs) formed during heating processes of meats is presented. The aim of our study was to use the selective ionization of MAB to develop a detection method for HAAs in non-purified meat extracts, thus avoiding purification and concentration steps and reducing analysis time. Sample introduction into the MAB ion source was achieved by pyrolysis, allowing the direct and fast insertion of complex food extracts into the mass spectrometer. Analysis conditions were optimized on standard HAAs by using different ionization gases for the MAB process. Metastable nitrogen was selected as the best MAB gas for the analysis of HAAs. Ionization selectivity is shown by the detection of heterocyclic amines in non-purified chicken meat extracts spiked with HAAs. A quantitative approach is also presented by using pyrograms as chromatograms for quantification purposes. HAAs determination using Py-MAB-ToF was finally performed on cooked chicken breast extracts and compared to an LC-APCI-MS/MS method. Although Py-MAB-ToF sensitivity remains to be improved in the present state of development of our prototype device, only 2 h from the cooking were required to obtain quantitative results in good agreement with HAAs concentrations measured by LC-MS/MS in 36 h.

Keywords Heterocyclic aromatic amines · Chicken · Metastable atom bombardment · Pyrolysis · Mass spectrometry

Abbreviations

MAB	metastable atom bombardment
HAA(s)	heterocyclic aromatic amine(s)
IARC	International Agency for Research on Cancer
A α C	2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indole
MeA α C	2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indole
Trp-P-1	3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole
Trp-P-2	3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indole
Glu-P-1	2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole
IQ	2-amino-3-methyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoline
MeIQ	2-amino-3,4-dimethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoline
IQx	2-amino-3-methyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoxaline
MeIQx	2-amino-3,8-dimethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoxaline
DiMeIQx	2-amino-3,4,8-trimethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoxaline
TriMeIQx	2-amino-3,4,7,8-tetramethyl-3H-imidazo[4,5-f]quinoxaline
PhIP	2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine
HPLC	high-performance liquid chromatography
SPE	solid-phase extraction
Py-MAB-ToF	pyrolysis–metastable atom bombardment–time-of-flight
EI	electron ionization
SD	standard deviation

E. Jamin · S. Chevolleau · C. Touzet · J. Tulliez ·
L. Debrauwer (✉)
Laboratoire des Xenobiotiques,
INRA UMR 1089, BP 3,
31931 Toulouse Cedex, France
e-mail: laurent.debrauwer@toulouse.inra.fr

RSD	relative standard deviation
LOD	limits of detection
SPME	solid-phase microextraction
CE	capillary electrophoresis
GC	gas chromatography
ISTD	internal standard

Introduction

Since the discovery of heterocyclic aromatic amines (HAAs) in cooking fumes of meats or fish at the end of the 1970s [1], HAAs have become an important challenge for food scientists. Indeed, humans are exposed to HAAs formed during cooking processes of meats on a daily basis. Moreover, some HAAs are known to form covalent adducts with DNA [2, 3] after metabolic activation [4]. HAAs have therefore been reported as pro-mutagenic [5] on the basis of the Ames/Salmonella test and ten of them have been shown to be pro-carcinogenic for rodents [6–10], and one for monkey [11]. The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified nine HAAs as possibly carcinogenic to humans (Group 2B) and 2-amino-3-methyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ) as probably carcinogenic to humans (Group 2A) [12–14].

HAAs are formed from amino acids, creatin(in)e and carbohydrates by partially elucidated mechanisms during heating processes of meats. Schematically, HAAs are divided into two groups according to their formation pathway [15]. The first group includes carbolines, e.g. 2-amino-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole(A α C), 2-amino-3-methyl-9*H*-pyrido[2,3-*b*]indole (MeA α C), 3-amino-1,4-dimethyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-1), 3-amino-1-methyl-5*H*-pyrido[4,3-*b*]indole (Trp-P-2) and 2-amino-6-methyldipyrido[1,2-*a*:3',2'-*d*]imidazole (Glu-P-1), formed from amino acids and proteins by radical mechanisms at temperatures up to 300 °C. The second group includes quinolines, quinoxalines and pyridines, e.g. 2-amino-3-methyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ), 2-amino-3,4-dimethyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinoline (MeIQ), 2-amino-3-methyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinoxaline (IQx), 2-amino-3,8-dimethyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinoxaline (MeIQx), 2-amino-3,4,8-trimethyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinoxaline (DiMeIQx) and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP), formed by the Maillard reaction at temperatures of 150–250 °C from creatin(in)e, carbohydrates and amino acids [16, 17] (studied HAAs structures are presented in Fig. 1). To date, more than 20 HAAs have been characterized in most cooked meats at the nanogram per gram level for the majority of HAAs and ca. tenfold higher levels for PhIP [18]. In the case of cooked poultry, the main HAAs formed are PhIP, MeIQx and 4,8-DiMeIQx at concentration levels of ca. 40, 3 and 2 ng g⁻¹, respectively,

while other HAAs concentrations are below 1 ng g⁻¹ [19]. However, HAAs determination in foods is still a challenge and all analysis steps, from the extraction to the detection, have to be optimized. Sample preparation methods used for the determination of HAAs in food extracts have been reviewed by Toribio [20], and purification using solid-phase extraction (SPE) cartridges represents the most widely used and the most effective sample preparation technique. Several separation and detection methods have also been described for the determination of HAAs [21]. High-performance liquid chromatography (HPLC) appears as the most widespread separation method for the analysis of HAAs, although analytical methodologies based on capillary electrophoresis (CE) or gas chromatography (GC) have also been successfully developed. Following their separation, the detection of HAAs can be achieved by ultraviolet-diode array detection (UV-DAD) but this technique suffers from its lack of selectivity. Other used detection methods are fluorescence or electrochemical methods which provide high selectivity and sensitivity, and mass spectrometry which allows selective and specific determination of HAAs. All these analytical methodologies allow the determination of HAAs at the trace level in food, as has recently been recognized during an inter-laboratory exercise [22].

However, the sample preparation steps in these experimental procedures are time consuming, which is detrimental to the study of correlation between HAAs intake and some cancer development in humans [23]. In this context, the development of fast quantification methods of HAAs would be very useful. To reduce analysis time, various SPE cartridges have been investigated [24–28], as well as solid-phase microextraction (SPME) [29], Blue Cotton, Blue Rayon and Blue Chitin [30] and automation of the sample preparation method prior to HPLC [31]. However, despite their high performance levels, these analytical protocols require long analysis time. In this work, we have investigated the potentiality of metastable atom bombardment (MAB) ionization mass spectrometry coupled to direct in-beam pyrolysis for the fast determination of HAAs in non-purified samples of cooked meat. MAB ionization, which is based on the Penning ionization theory [32], forms radical ions by electron transfer from a molecule to a species (noble gas or nitrogen) excited in a metastable state [33]. By selecting metastable gas for ionization, it is possible to precisely control the available ionization energy in the gas phase. This allows one to control fragmentation extent of the studied species and to selectively ionize some molecules in a mixture depending on their ionization potentials. The MAB ionization source could be coupled to a pyrolyser (Py-MAB-MS), which allows analysis by direct introduction of the sample into the mass spectrometer, therefore constituting a fast analytical technique. The selectivity of Py-MAB-MS has already been used for the

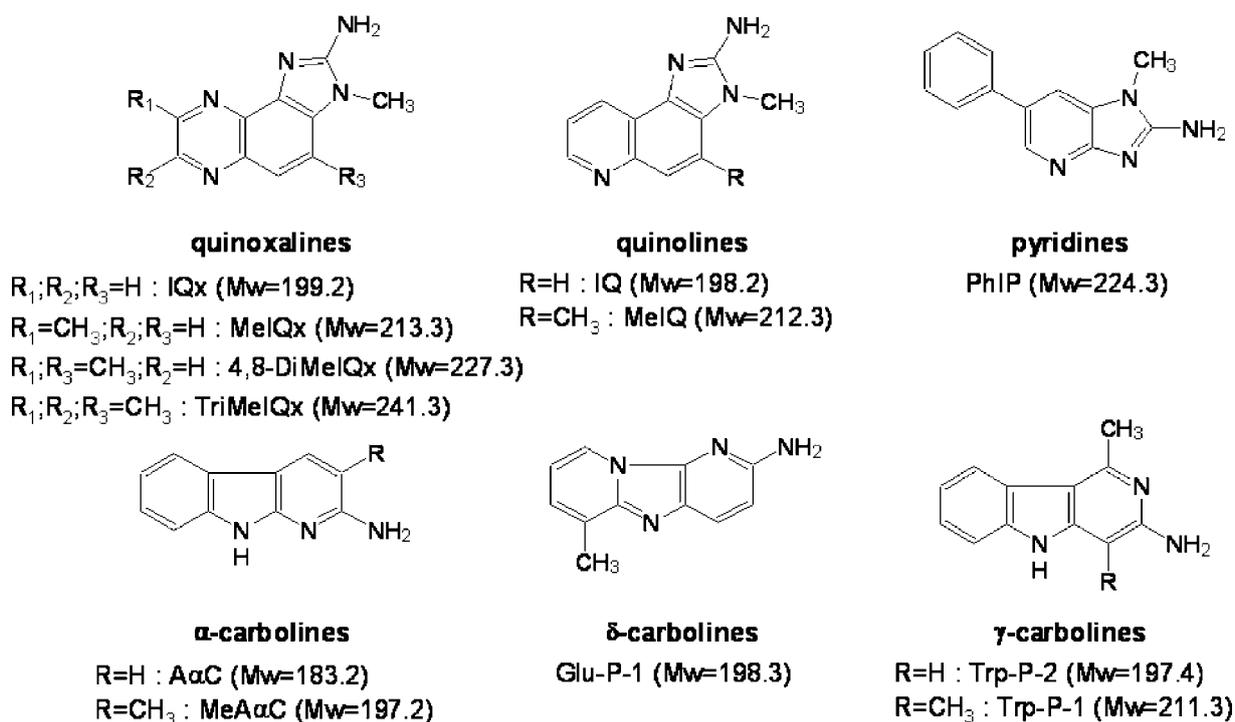


Fig. 1 Structure, abbreviated name and molecular mass of the studied HAAs

identification and characterization of fungi [34], microorganisms [35–38] and toxins [39] in complex matrices.

In order to achieve the determination of HAAs in cooked chicken breast by Py-MAB-MS, analytical conditions were first optimized by analyzing HAAs standards. The ionization selectivity of the MAB ionization process was applied to the detection of heterocyclic amines in non-purified chicken meat extracts spiked with HAAs. A quantitative approach was then developed by using pyrograms as chromatograms for quantification purposes. HAAs determination using Py-MAB-ToF was finally performed on cooked chicken breast extracts and compared to an LC-APCI-MS/MS method.

Materials and methods

Reagents and instrumentation

HAAs standards (TriMeIQx, DiMeIQx, MeIQx, IQx, MeIQ, IQ, PhIP, Trp-P-1, Trp-P-2, MeA α C, A α C and Glu-P-1) and radiolabelled HAAs (PhIP-2- 14 C and MeIQx-2- 14 C) were purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). Standard stock solutions were prepared at 1 mg mL $^{-1}$ in MeOH/CH $_2$ Cl $_2$ (v/v, 1:1) and used for further dilutions. HPLC-grade organic solvents (methanol,

acetonitrile, dichloromethane) were from Scharlau (Barcelona, Spain). All analytical grade chemicals used for sample treatment or mobile phase preparation were purchased from Aldrich (Steinheim, Germany) and water was from a Milli-Q system (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France). Empty Extrelut-NT20 extraction cartridges and diatomaceous earth refill material came from Merck (Darmstadt, Germany), and Oasis MCX (60 mg, 3 cm 3) were from Waters (Milford, MA, USA). Chicken breasts were obtained from a local supermarket.

Mass spectra were acquired using a MAB-ToF (v. 1.01) instrument from Dephy Technologies (Montreal, Canada), consisting of an orthogonal-acceleration time-of-flight mass analyser with an electrostatic reflector providing a flight length of 0.6 m. MAB ion source was operated with N $_2$, Xe, Kr, Ar and He as metastable gases at pressures between 1 and 10 kPa depending on the metastable gas to be used. The MAB gun produces a self-maintained plasma of metastable species with a discharge current of 12 mA. Source temperature was set at 190 °C. Full scan mass spectra were sampled and combined over a mass range of m/z 57–250. The mass spectrometer was fitted with a Pyroprobe 2000 pyrolyser (CDS Analytical, Oxford, PA), allowing direct introduction of samples into the ionization volume via a platinum heating coil pyrolysis probe. The pyrolyser probe temperature was programmed by linear ramping from 20 to 1,100 °C at 20 °C ms $^{-1}$ and then kept

constant at 1,100 °C for 200 s. A volume of 0.3 µL of solution sample was introduced into a quartz tube (25-mm L, 1.9-mm i.d.) placed inside the platinum heating coil of the pyrolysis probe. This probe was home-modified in order to push gas-phase species generated by the fast heating process directly into the MAB source using a vector gas (He) at a flow rate of 1 mL min⁻¹. EI (70 eV) mass spectra were obtained on a Nermag R10-10 single quadrupole by means of a direct insertion probe. Radioactivity measurements were achieved on a liquid scintillation counter TRI-CARB 1500 (PerkinElmer Life Sciences, Villebon sur Yvette, France) using the Ultima Gold (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA) liquid scintillation cocktail.

For HAAs determinations by LC-MS/MS, chromatographic separation was performed using a Thermo Electron Surveyor liquid chromatography system equipped with a quaternary pump system (Les Ulis, France). HAAs were separated using a ChromSep Pursuit C8 column (3 µm, 150.0×2.0-mm i.d.) fitted with a ChromSep Pursuit guard column (Varian, Les Ulis, France). Optimal separation was achieved with a binary mobile phase at a flow rate of 0.2 mL min⁻¹ comprising solvent A (30 mM acetic acid in water adjusted to pH 5 with a solution of ammonia) and solvent B (acetonitrile/methanol (v/v, 2:1)). The gradient elution program was: 0–1 min, 10–15% B; 1–6 min, 15–30% B; 6–12 min, 30% B; 12–15 min, 30–55% B; 15–18 min, 55% B; 18–21 min, 55–70% B; 21–30 min, 70% B. The sample volume injected was 20 µL.

The HPLC system was coupled to a TSQ Quantum triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Electron, Les Ulis, France) equipped with an atmospheric pressure chemical ionization (APCI) source. MS instrument was operated in the positive mode and data were acquired in the multiple reaction monitoring mode (MRM) using Xcalibur 2.0 software. Optimal source conditions for monitoring HAAs were as follow: spray current, 4 µA; capillary voltage, 35 V; heated capillary temperature, 300 °C; vaporizer temperature, 300 °C; sheath gas (N₂) pressure, 25 au; auxiliary gas (N₂) pressure, 5 au.

Cooking

Before the cooking, small cuboids of uniform thickness (2 cm²×1 cm) were cut from chicken breasts to ensure homogeneous cooking of the meat. Cuboids of meat were then cooked by three different ways and regularly turned during heating. Sample A was pan-fried for 14 min using a frying pan with a nonstick surface, at 80 °C internal temperature. Sample B was baked for 14 min in a domestic oven, which was heated at 250 °C. Sample C was pan-fried as sample A but only for 7 min, at 80 °C internal temperature.

Sample preparation for Py-MAB-ToF analyses

A 1-g sample of cooked chicken breast was ground in 6 mL of MeOH/CH₂Cl₂ (v/v, 1:1) and then sonicated for 10 min. The supernatant was recovered by centrifugation (5,000 rpm, 5 min). The remaining solid phase was washed twice with 2 mL of MeOH/CH₂Cl₂ (v/v, 1:1). Liquid phases were pooled and dried under a nitrogen stream. The final dry extract was then redissolved in 100 µL of MeOH/CH₂Cl₂ (v/v, 1:1) including 10 µg of internal standard (TriMeIQx) for analysis.

Sample preparation for LC-MS/MS analyses

A modified protocol was designed based on that originally developed by Messner and Murkovic [24]. Briefly, 1 g of cooked sample was lyophilised, and dissolved in 12 mL 1 M NaOH and homogenized by magnetic stirring for 1.5 h. The alkaline solution was then mixed with diatomaceous earth (13 g) and poured into an empty Extrelut 20 column which was eluted with 75 mL dichloromethane. Samples were then purified using an Oasis MCX (60 mg) cartridge, washed with 0.1 M HCl (2 mL) and MeOH (2 mL), and eluted with 5 mL MeOH/NH₄OH 10%. Finally, samples were evaporated to dryness under a stream of nitrogen and the residues were redissolved in 200 µL of the initial LC mobile phase.

Results and discussion

The aim of this study was to assess pyrolysis coupled to MAB ionization as a fast and reliable HAAs determination method in cooked meat samples. Indeed, MAB ionization is known to afford both ionization selectivity and control of the extent of fragmentation for compounds brought into the gas phase, and has already been successfully applied to the determination of mycotoxins in cereal matrices [39].

Choice of metastable gas for ionization

The various metastable states of the ionization gases used for MAB are presented in Table 1, together with their corresponding excitation energies available for ionization. As expected, MAB mass spectra of each HAA studied in this work (see Fig. 1) show different patterns according to the gas used for ionization. Only M⁺ molecular ions are observed with nitrogen or xenon which display the lowest metastable state energies, whereas fragmentation extent increases when using krypton, argon and helium, in that order (Table 2). Indeed, the electron transfer from the neutral molecule to the metastable species occurs only if the ionization energy of the molecule is lower than the

Table 1 Metastable states and excitation energies of rare gases used in this work

MAB gas	Metastable state	Energy (eV)	Approximate population (%)
Helium (He)	1S_0	20.61	10
	3S_1	19.82	90
Argon (Ar)	3P_0	11.72	14
	3P_2	11.55	86
Krypton (Kr)	3P_0	10.56	<10
	3P_2	9.92	>90
Nitrogen (N ₂)	$E^3\Sigma_g^+$	11.88	<15
	$a^1\Sigma_u^-$	8.52	>85
Xenon (Xe)	3P_0	9.45	<7
	3P_2	8.32	>93

excitation level of the metastable species [33]. In this process, the internal energy transferred to ions depends on the difference between the excitation level of the metastable species (i.e. the gas used for MAB ionization) and the ionization energy of the molecule, provided that the electron is expelled from the metastable gas in a continuum state. This feature implies that the fragmentation extent of the ionized molecules depends upon the nature of the MAB gas. Thus, the greatest fragmentation extent is observed with helium, whereas no fragmentation occurs with xenon, as reported in Table 2. All HAAs studied in this work were ionized using xenon, suggesting that they all present ionization potentials below 8.3 eV, which was expected according to their structures including a primary amine function. Possible origins for the various observed fragment ions in MAB and EI mass spectra of HAAs are proposed in Table 2. The same fragment ions are observed in EI and MAB He, Ar or Kr mass spectra. However they display different relative abundances due to the different excess of internal energy of the M^+ molecular ions formed. This shows how MAB can offer the control of the fragmentation extent by selecting the appropriate ionization gas, even more precisely than EI achieves by reducing the electrons' energy [40]. Fragmentation pathways are comparable for all HAAs and mainly consist of both competitive and consecutive losses of $\cdot H$, $\cdot CH_3$, HCN, CH_3CN radicals or neutral species. Ions formed by a loss of 28 au are also observed which could correspond either to a loss of C_2H_4 or to the consecutive losses of $\cdot H$ and HCN. Similarly $M-42$ ions may represent either $[M-CN_2H_2]^+$ or $[M-H-CH_3CN]^+$ species. The loss of the imidazole moiety (69 au) also occurs for quinolines, quinoxalines and PhIP. On the other hand, mass spectra of DiMeIQx, MeIQx and IQx display fragment ions corresponding to the loss of the pyrazine moiety. The $[M-18]^+$ fragment ion is observed in the MAB mass spectra of some carbolines such as MeA α C, Trp-P-1, Trp-P-2 and Glu-P-1. Taking into account the chemical

structure of these compounds, the loss of 18 au could reasonably be attributed to the consecutive losses of $\cdot H$ and NH_3 .

In the course of our method development for the HAAs detection in non-purified cooked meats, the most suited MAB gas should ionize all HAAs without significant fragmentation while ionizing the least potentially interfering compounds. Among MAB ionization gases, Xe and N₂ provided mass spectra displaying only molecular ions of HAAs without any fragmentation. However, metastable nitrogen also provided greater ion current than xenon. Thus, nitrogen was chosen as the MAB ionization gas for the detection of HAAs in cooked meats.

Analysis of HAAs mixtures using MAB N₂

Analyses of HAAs mixtures were performed in order to compare their relative responses, i.e. their relative behaviours towards the MAB ionization process. The areas of each HAA pyrolysis peak were measured in the same way as chromatographic peaks. Due to the limited resolution power of the ToF-MS analyser used in this work, the differentiation of isobaric HAAs, such as IQ and Glu-P-1 or MeA α C and Trp-P-2, was impossible. Thus, separate experiments have been designed in order to analyse HAAs mixtures containing non-isobaric compounds. Possible run-to-run response variations were also taken into account by calculating relative pyrolysis peak areas considering an internal reference. TriMeIQx was chosen as the internal reference, since it is commonly reported in other MS-based HAAs determinations [24, 41]. Relative areas measured for each HAA were obtained by analysing a mixture of HAAs at the same concentration (100 ng μL^{-1}) and are reported in Table 3. As a general trend, greater responses are observed with carbolines and quinolines compared to signals obtained from quinoxalines or PhIP. The greatest relative areas are observed for α - and γ -carbolines, indicating a more efficient charge-transfer process for those compounds than the other structural families of HAAs.

Run-to-run precision of pyrolysis peak area measurement was also checked from those experiments. Calculated relative standard deviations reported in Table 3 are quite large with values up to 20%. Analyses performed on different days and weeks were also compared. Obtained results display neither day-to-day nor week-to-week variation of the pyrolysis peak area measurements. These quite large relative standard deviations may be explained by the difficulties in achieving manually repeatable sample deposits of 0.3- μL volume in the pyrolysis probe, which led to non-homogeneous analyte distribution in the quartz tube and therefore to a variability in the behaviour of the deposited sample towards the platinum coil heating process. Although the technique is really different, similar difficul-

Table 2 Ions observed in MAB and EI mass spectra of HAAs

HAA	m/z^a	Ions	Relative abundance (%)					EI
			MAB					
			Xe	N ₂	Kr	Ar	He	
DiMeIQx	227	[M] ⁺	100	100	100	100	100	100
	226	-H			35	59	98	87
	212	-CH ₃			2	10	31	18
	199	-28 u				13	55	22
	185	-42 u				4	39	7
	159	-C ₃ H ₄ N ₂					52	8
	158	-Imidazole					62	7
	144	-CH ₃ CN-42 u					37	1
	131	-HCN-imidazole					26	6
MeIQx	213	[M] ⁺	100	100	100	100	97	100
	212	-H			8	49	81	68
	198	-CH ₃				5	23	4
	185	-28 u				6	62	9
	171	-42 u				3	49	5
	158	-HCN-28 u					36	1
	145	-C ₃ H ₄ N ₂					78	4
	144	-Imidazole					100	5
	130	-HCN-28 u					41	2
	117	-HCN-imidazole					42	4
IQx	199	[M] ⁺	100	100	100	100	100	100
	198	-H			6	49	91	62
	184	-CH ₃				5	25	9
	171	-28 u				6	79	24
	157	-42 u				3	52	7
	145	-C ₂ H ₂ N ₂					36	12
	144	-HCN-28 u					61	9
	130	-Imidazole					39	11
	117	-C ₂ H ₂ N ₂ -28 u					26	14
MeIQ	212	[M] ⁺	100	100	100	100	93	100
	211	-H			3	18	61	39
	197	-CH ₃			4	19	100	36
	184	-28 u				6	54	10
	170	-42 u					73	7
	169	-CH ₃ -28 u					32	3
	155	-H-28 u-28 u					31	4
	143	-Imidazole					72	6
	142	-28 u-42 u					37	10
	116	-HCN-imidazole					25	5
IQ	198	[M] ⁺	100	100	100	100	93	100
	197	-H			4	46	44	35
	183	-CH ₃			3	19	43	22
	170	-28 u			2	14	38	12
	156	-42 u				4	100	14
	129	-Imidazole					35	11
PhIP	224	[M] ⁺	100	100	100	- ^b	100	100
	223	-H			5		72	53
	196	-28 u					32	13
	155	-Imidazole					29	5
	154	-28 u-42 u					49	5
	140	-42 u-42 u					36	14
	127	-Imidazole-28 u					25	9

Table 2 (continued)

HAA	m/z^a	Ions	Relative abundance (%)					EI
			MAB					
			Xe	N ₂	Kr	Ar	He	
MeAαC	197	[M] ⁺	100	100	100	100	100	100
	196	-H			4	86	81	63
	180	-NH ₃			1	14	17	5
	179	-H-NH ₃				4	50	12
	169	-28 u				3	43	13
	152	-NH ₃ -28 u					22	4
AαC	183	[M] ⁺	100	100	100	100	100	100
	182	-H			2	4	22	8
	156	-HCN			2	29	48	21
	155	-28 u				5	85	23
	129	-2HCN				5	30	12
	128	-HCN-28 u					24	11
Trp-P-1	211	[M] ⁺	100	100	100	100	100	100
	210	-H			1	8	40	21
	194	-NH ₃				5	28	5
	193	-H-NH ₃				5	59	14
	183	-28 u				2	32	5
	179	-NH ₃ -CH ₃					22	2
	169	-42 u					27	3
	166	-NH ₃ -28 u					26	3
Trp-P-2	142	-HCN-42 u					50	4
	197	[M] ⁺	100	100	100	100	100	100
	196	-H			1	2	39	7
	180	-NH ₃			2	16	60	16
	179	-H-NH ₃				2	60	14
	170	-HCN				5	39	6
	169	-28 u				6	63	12
	157	-C ₃ H ₄					47	14
	155	-42 u					80	11
	142	-HCN-28 u					39	3
Glu-P-1	128	-HCN-42 u					36	6
	198	[M] ⁺	100	100	100	100	61	100
	197	-H			1	8	24	17
	170	-H-NH ₃				1	20	7
	93	[Methylpyridine] ⁺				1	86	17
	92	[C ₅ H ₄ N ₂] ⁺					100	20

^a Only ions which have a relative abundance >20% in MAB He mass spectra are represented

^b Not analysed

ties related to the lack of homogeneity of the deposit were reported for quantitative MALDI-MS analyses. In this case, a non-homogeneous crystallization of the spot was also compensated by using an internal standard [42]. In the same way, internal references were also used in pyrolysis-mass spectrometry using other pyrolysis systems, allowing one to achieve quantitative analyses with relative standard deviations close to 17% [43] or less [44].

Linearity of the response and limits of detection

Performance of our prototype device was assessed on two representative HAAs, namely PhIP and IQ. Solutions of

PhIP and IQ were analysed at concentrations ranging respectively from 10 to 200 ng μL⁻¹ and 25 to 200 ng μL⁻¹ with TriMeIQx (ISTD) concentration kept constant at 100 ng μL⁻¹. Results (Fig. 2) revealed that relative areas of PhIP and IQ varied linearly within the concentration range studied. Coefficients of determination were 0.9996 and 0.9999 for PhIP and IQ, respectively. By analogy, relative areas of the other HAAs studied were considered to vary linearly from their limits of quantification to 200 ng μL⁻¹.

The limits of detection were determined by analysing diluted solutions of HAAs until reaching a S/N ratio of 3. Results obtained for the various HAAs studied in this work

Table 3 Relative areas (RAs) and corresponding RSDs obtained from the Py-MAB-ToF analysis of HAAs

HAA	Run-to-run		Day-to-day		Week-to-week	
	(n=12)		(n=16)		(n=16)	
	RA	RSD (%)	RA	RSD (%)	RA	RSD (%)
DiMeIQx	1.5	12.2	1.5	11.0	1.5	14.1
MeIQx	4.0	17.1	4.0	15.4	3.8	15.7
IQx	2.4	20.7	2.4	20.4	2.1	19.9
MeIQ	5.2	23.1	5.1	23.0	4.2	24.2
IQ ^a	8.9	22.6	8.7	20.1	8.3	21.6
PhIP	1.2	11.8	1.3	10.4	1.4	12.0
MeAαC ^a	21.2	10.5	21.4	14.1	21.1	9.0
AαC	13.7	15.0	13.6	13.2	14.6	14.4
Trp-P-1	8.1	21.6	8.1	18.7	7.2	20.7
Trp-P-2 ^a	6.3	17.7	6.1	16.1	5.7	16.5
Glu-P-1 ^a	12.6	18.1	13.2	15.1	13.7	16

^a Half the number of analyses

are listed in Table 4. In the present state of development of our mass spectrometer, these detection limits are between 0.15 and 1.5 ng depending upon the HAA considered. The lowest detectable amount of PhIP, known as the most abundant HAA in cooked meats, is 0.9 ng deposited into the pyrolysis quartz tube.

Application: qualitative aspects

The potential of Py-MAB-ToF for the rapid characterization of HAAs in cooked meats was assessed using a very fast and simple extraction protocol (i.e. without any purification, concentration or separation step), followed by a direct analysis of extracts using Py-MAB-ToF.

Microwave heating has been reported to generate undetectable amounts of HAAs [45], and thus this cooking mode was chosen to produce blank samples of cooked chicken breast. These blank samples were used to check the absence of any interfering compound over the mass range of HAAs molecular ions (m/z 183–241), which could

hinder their characterization. The absence of artefactual HAAs formed during the sample pyrolysis step was also checked from the blank samples. Indeed, conditions required for HAAs formation may be fulfilled during the pyrolysis of a non-purified extract considering that HAAs precursors may be extracted. The pyrolysis process occurred at 1,100 °C, which is by far higher than the formation temperature of HAAs [46]. Py-MAB-ToF mass spectra obtained from extracts of chicken breast cooked by microwave revealed that no HAA was formed at detectable level by both microwave heating and pyrolysis. As a consequence, those extracts could be considered as good blank samples for the continuation of our work. The fact that pyrolysis does not form HAA in detectable amounts could be explained by several reasons. Firstly, the solvent system used for the extraction process (MeOH/CH₂Cl₂) may not extract the very polar HAAs precursors such as creatin(in)e, carbohydrates or amino acids from the solid chicken breast starting material. Besides, the kinetics of HAAs formation may not be fast enough to allow their formation before the

Fig. 2 Calibration curves obtained for IQ and PhIP (internal standard TriMeIQx). Each point represents the mean value \pm SD of six replicate analyses

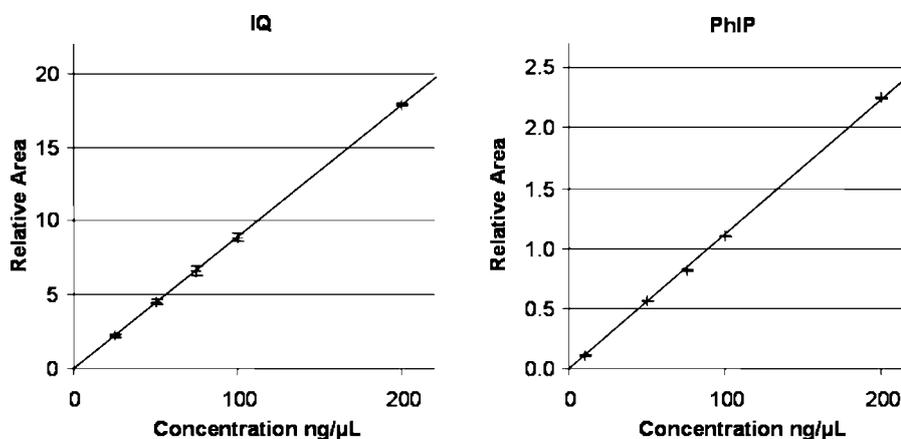


Table 4 HAAs recoveries (values \pm SD, $n=8$) and LODs measured on our Py-MAB-ToF prototype device

HAA	Recoveries (% \pm SD)	LOD (ng inj)
DiMeIQx	85.6 \pm 2.9	1.5
MeIQx	85.6 \pm 2.3	0.15
IQx	81.3 \pm 2.5	0.9
MeIQ	96.3 \pm 3.3	0.3
PhIP	100.3 \pm 2.8	0.9
A α C	88.5 \pm 1.8	0.6
Trp-P-1	94.8 \pm 3.7	0.3
Trp-P-2	78.3 \pm 2.6	1.2
Glu-P-1	82.5 \pm 7.5	0.5

vaporization of their precursors if present in our final extract. Indeed, our pyrolysis probe was not designed to achieve a real pyrolysis process involving important thermal degradation of molecules, but was rather used to rapidly transfer molecules into the gas phase. Though the platinum coil was heated at 1,100 °C during the pyrolysis process, the thermal transfer from the platinum coil to the sample must be reduced by the quartz tube thickness and by the helium stream moving through the quartz tube. Therefore, the real temperature of the sample in the first seconds of pyrolysis heating process can be estimated as greatly below 1,100 °C and our pyrolysis conditions probably did not allow the formation of significant amounts of HAAs before of the precursors vaporization (if any are in the extract).

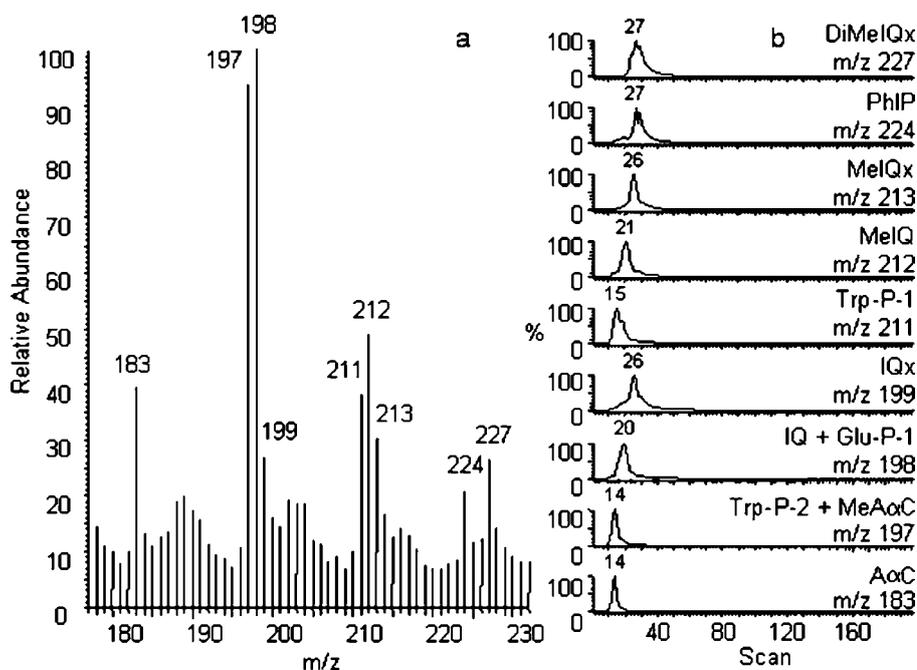
Figure 3a shows the mass spectrum obtained by Py-MAB-ToF (N_2) analysis of an extract prepared from 1 g of

blank chicken breast spiked with 4.5 μ g of each HAA. This mass spectrum illustrates the selectivity of MAB ionization, since only peaks corresponding to M^+ ions of HAAs appear at significant levels. Corresponding extracted pyrograms of each HAA studied in this work are reported in Fig. 3b. They display characteristic patterns which confirm the presence of HAAs. From these pyrograms, HAAs can be split into three groups: the first one including α - and γ -carbolines is detected at 14 s, the second one consisting of quinolines and Glu-P-1 is vaporized at ca. 20 s, while the last one, represented by quinoxalines and PhIP, is detected at 27 s. These different behaviours of HAAs during the pyrolysis process may be related to their respective physico-chemical properties but could not be rationalized due to the lack of thermochemical data such as the vaporization temperature of HAAs.

Application: quantitative considerations

Quantitative features of our methodology were first assessed for the determination of HAAs recoveries by comparison with recoveries obtained using radiolabelled HAAs. On the basis of radiolabelled PhIP and MeIQx, recoveries were determined by measuring the radioactivity using scintillation counting before and after the extraction process. Results obtained by this way were 84 and 94% for MeIQx and PhIP, respectively. Measurements were then carried out by Py-MAB-ToF, and recoveries were calculated for each HAA by comparison of blank chicken breast samples spiked with each HAA before and after the extraction step.

Fig. 3 a MAB N_2 mass spectrum of a chicken extract spiked with HAAs and b extracted ion pyrograms for the investigated HAAs



After Py-MAB-ToF analysis and integration of the various HAA pyrograms, obtained results were 86 and 100% for MeIQx and PhIP, respectively, which was in very good agreement with values determined using radioactivity. Recovery results obtained by the Py-MAB-ToF method for all HAAs studied in this work are reported in Table 4, and they ranged from 78 to 100%, which confirm that our solvent extraction system was well suited and very efficient for the subsequent analysis of HAAs from chicken breast samples.

The performance of our Py-MAB-ToF device for HAAs quantification was then assessed by analysing chicken breasts extracts by both Py-MAB-ToF and LC-MS/MS methods. LC-MS/MS is known to provide a high degree of selectivity and sensitivity and can be considered as the reference method for the HAAs determination in food extracts, in particular when associating an APCI ionization source [21] and a triple quadrupole mass analyser [47]. Therefore, a characterization procedure of HAAs in lyophilized meats extracts by LC-APCI-QqQ was developed [48]. Recoveries obtained after optimization of the clean-up procedure ranged from 46 to 81% depending on the HAA considered. However, the sample preparation step used for the LC-MS/MS determination was very long compared to the protocol used for Py-MAB-ToF determinations. The LC separation and the operating MS parameters (in particular collision energies and transitions to monitor) were also optimized to reach RSDs ranging from 1.5 to 9.6% for 10 pg μL^{-1} samples. The calibration was linear from 1 to 1,000 pg μL^{-1} . Limits of detection and limits of quantification ranged from 0.02 to 0.1 ng g^{-1} and from 0.04 to 0.2 ng g^{-1} , respectively.

Both LC-MS-MS and Py-MAB-ToF methods were applied to three chicken breast samples cooked by different ways. Results obtained by the LC-MS/MS method for samples A and B are reported in Table 5 and represent the mean values of three analyses of each sample. Compared with published data [19], very high amounts of HAAs were found, very likely due to our meat preparation protocol. Indeed, our samples were produced by cooking small cuboids (2 cm² × 1 cm) of chicken breasts, which is known

to provide an homogeneous cooking of the meat. However, this cooking method also increases the external surface of the meat, inducing an increase of HAAs concentration [49] compared with cooking the whole breast.

The quantification method using Py-MAB-ToF was also applied to these samples and obtained results are summarized in Table 5. Only PhIP could be quantified in sample A, since concentrations of other HAAs were below the LODs of Py-MAB-ToF. However, results obtained by both Py-MAB-ToF and LC-MS/MS methods were in very good agreement. MeIQx was only observed at trace level but could not be quantified, highlighting the limits of our system in terms of detection sensitivity. Similarly, the only detected HAA in sample B was PhIP. Although the amount of PhIP was close to the limit of quantification (S/N > 10), PhIP concentration in sample B could be measured with an acceptable precision (RSD = 15%). In this case again, results obtained using both determination methods were in good agreement. Finally, the Py-MAB-ToF method was not able to detect any HAA in sample C in the present state of development of our experimental device, since HAAs concentrations obtained by the LC-MS/MS method ranged from undetectable levels to 181 ng g^{-1} (data not shown), which are below the limits of detection of our prototype Py-MAB-ToF device.

Conclusion

An experimental design using MAB ionization associated with pyrolysis and time-of-flight mass spectrometry was developed as a new way to rapidly detect and quantify HAAs in cooked meats. The method development involved the selection of the best MAB gas for HAAs ionization and the optimization of analytical parameters to achieve detection and quantification of HAAs. Linearity range was checked and area measurement precision was improved by using an internal reference. Indeed, the manual introduction of the sample into the pyrolysis probe greatly affected the run-to-run precision. The use of an internal reference allowed one to correct discrepancies between deposits and therefore differences between pyrolysis peak areas. However, for further improving the repeatability of the Py-MAB-ToF method, the use of an autosampler should constitute the best solution and has to be subsequently developed. The usefulness of MAB ionization selectivity was illustrated by the characterization of HAAs in non-purified meat samples spiked with HAAs. Our simple solvent extraction protocol provided satisfactory recovery rates for all studied HAAs, as determined by Py-MAB-ToF and radioactivity measurements, which gave data in good agreement. The Py-MAB-ToF method was also applied to the detection and quantification of HAAs in unspiked chicken breast extracts. Due to the relatively low sensitivity of our Py-MAB-ToF device in its present state of development, only

Table 5 Quantification of HAAs (ng g^{-1} cooked meat) in cooked chicken breast extracts using LC-MS-MS and Py-MAB-ToF methods

HAAs	Sample A		Sample B	
	LC-MS/MS	Py-MAB-ToF	LC-MS/MS	Py-MAB/ToF
DiMeIQx	16.6	nd	2.9	nd
PhIP	1,079.8	1,024.7	427.5	424.2
MeIQx	26.4	trace	22.3	nd
IQx	13.2	nd	3.5	nd
A α C	63.6	nd	0.4	nd

nd not detected

PhIP could be quantified in meat extracts. Nevertheless, measured concentrations of PhIP were in good agreement with data obtained using an LC-MS/MS-based method. Py-MAB-ToF constituted a very fast and simple analytical technique to detect and quantify HAAs in cooked meats without any purification or separation step. Time required for the LC-MS/MS method from the cooking to the result was at least 36 h due to the use of lyophilized samples, several SPE cartridges and a chromatographic separation. By comparison, only 2 h were needed using Py-MAB-ToF with a deposit of sample every 10 min allowing higher-throughput analyses.

Further developments of the Py-MAB-MS system are now planned to improve our HAAs determination method and reach sensitivity allowing measurement in the low nanogram per gram range classically observed in cooked meats. The investigation of a new generation MAB ion source leading to a better ionization yield will enhance the Py-MAB-MS sensitivity. Besides, the use of tandem mass spectrometry is also considered in order to compensate the non-separation of isobaric ions by pyrolysis. Such a development that opens up the possibility to analyze rapidly numerous samples of cooked meat generated by different heating processes of protein-rich foods is of major importance to realistically assess the risk factor associated with HAAs.

Acknowledgments This work was supported by a grant from INP (Institut National Polytechnique de Toulouse, France). We thank Eric Leroy and Catherine Claparols (University Paul Sabatier, Toulouse) for the analyses in EI mass spectrometry. We thank Claude Beaugrand (Abionix, France) and Dr. Maurice Rabache (Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris, France) for helpful discussions.

References

1. Sugimura T, Nagao M, Kawachi T, Honda M, Yahagi T, Seino Y, Sato S, Matsukara N, Shirai A, Sawamura M, Matsumoto H (1977) In: Hiatt HH, Watson JD, Winsten JA (eds) *Origins of human cancer* (Book C). Cold Spring Harbour Laboratory, New York, pp 1561–1577
2. Schut HAJ, Snyderwine EG (1999) *Carcinogenesis* 20:353–368
3. Turesky RJ, Vouros P (2004) *J Chromatogr B* 802:155–166
4. Turesky RJ (2005) *Mol Nutr Food Res* 49:101–117
5. Sugimura T (1997) *Mut Res* 376:211–219
6. Esumi H, Ohgaki H, Kohzen E, Takayama S, Suginura T (1989) *Jpn J Cancer Res* 80:1176–1178
7. Ito N, Hasegawa R, Sano M, Tamano S, Esumi H, Takayama S, Sugimura T (1991) *Carcinogenesis* 12:1503–1506
8. Ohgaki H, Takayama S, Sugimura T (1991) *Mut Res* 259:399–410
9. Takahashi M, Toyoda K, Aze Y, Furuta K, Mitsumori K, Hayashi Y (1993) *Jpn J Cancer Res* 84:852–858
10. Tamano S, Hasegawa R, Hagiwara A, Nagao M, Sugimura T, Ito N (1994) *Carcinogenesis* 15:2009–2015
11. Adamsson RH, Thorgeirsson VP, Snyderwine SG, Thorgeirsson SS, Reeves J, Dalgard JW, Takayama S, Sugimura T (1990) *Jpn J Cancer Res* 81:10–14
12. IARC (1993) *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, p 56
13. IARC (1986) *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, p 40
14. IARC (1983) *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, p 31
15. Jägerstad MI, Skog K, Grivas S, Olsson K (1991) *Mut Res* 259:219–233
16. Zöchling S, Murkovic M (2002) *Food Chem* 79:125–134
17. Murkovic M (2004) *J Chromatogr B* 802:3–10
18. Skog KI, Johansson MAE, Jägerstad MI (1998) *Food Chem Toxicol* 36:879–896
19. Skog KI, Solyakov A (2002) *Food Chem Toxicol* 40:1213–1221
20. Toribio F, Galcerán MT, Puignou L (2000) *J Chromatogr B* 747:171–202
21. Pais P, Knize MG (2000) *J Chromatogr B* 747:139–169
22. Santos FJ, Barceló-Barrachina E, Toribio F, Puignou L, Galcerán MT, Persson E, Skog K, Messner C, Murkovic M, Nabinger U, Ristic A (2004) *J Chromatogr B* 802:69–78
23. Sinha R (2002) *Mut Res* 506–507:197–204
24. Messner C, Murkovic M (2004) *J Chromatogr B* 802:19–26
25. Knize MG, Salmon CP, Hopmans EC, Felton JS (1997) *J Chromatogr A* 763:179–185
26. Toribio F, Puignou L, Galcerán MT (1999) *J Chromatogr A* 836:223–233
27. Toribio F, Moyano E, Puignou L, Galcerán MT (2000) *J Chromatogr A* 880:101–112
28. Holland RD, Taylor J, Schoenbachler L, Jones RC, Freeman JP, Miller DW, Lake BG, Gooderham J, Turesky RJ (2004) *Chem Res Toxicol* 17:1121–1136
29. Cárdenes L, Ayala JH, Afonso AM, Gonzalez V (2004) *J Chromatogr A* 1030:87–93
30. Skog KI (2004) *J Chromatogr B* 802:39–44
31. Fay LB, Ali D, Gross GA (1997) *Mut Res* 376:29–35
32. Penning FM (1927) *Naturwissenschaften* 15:818
33. Faubert D, Paul GJC, Giroux J, Bertrand MJ (1993) *Int J Mass Spectrom Ion Process* 124:69–77
34. Miketova P, Martin P, Khailova L, Beaudet S, Jelinek D, Schram KH, Moore IM, Graham ML (2004) *Proc 52nd ASMS*, Nashville, TN
35. Wilkes JG, Heinze TM, Freeman JP, Rafii F, Cyr M, Moussemal M, Bertrand MJ, Voorhees KJ (1997) *Proceed 45th ASMS*, Palm Springs, CA
36. Wilkes JG, Holcomb M, Rafii F, Letarte S, Bertrand MJ, Colby S (1998) *Proc 46th ASMS*, Orlando, FL
37. Letarte S, Morency D, Wilkes J, Bertrand MJ (2004) *J Anal Appl Pyrolysis* 71:13–25
38. Wilkes JG, Rushing L, Nayak R, Buzatu DA, Sutherland JB (2005) *J Microbiol Methods* 61:321–334
39. Beaugrand C, Martin P, Forest A, Faubert D, Sanchez G, Bertrand MJ (2000) *Proc 48th ASMS*, Long Beach, CA
40. Boutin M, Lesage J, Ostiguy C, Bertrand MJ (2003) *J Anal Appl Pyrolysis* 70:505–517
41. Toribio F, Moyano E, Puignou L, Galcerán MT (2002) *J Chromatogr A* 948:267–281
42. Sleno L, Volmer DA (2006) *Rapid Commun Mass Spectrom* 20:1517–1524
43. Tienpont B, David F, Vanwalleghem F, Sandra P (2001) *J Chromatogr A* 911:235–247
44. Ghassempour A, Nabid MR, Talebi M, Entezami AA (2003) *Talanta* 59:435–441
45. Felton JS, Fultz E, Dolbeare FA, Knize MG (1994) *Food Chem Toxicol* 32:897–903
46. Knize MG, Dolbeare FA, Carroll KL, Moore DH, Felton JS (1994) *Food Chem Toxicol* 32:595–603
47. Barceló-Barrachina E, Moyano E, Puignou L, Galcerán MT (2004) *J Chromatogr A* 1023:67–78
48. Chevolleau S, Touzet C, Jamin E, Tulliez J, Debrauwer L (2007) *Sci Aliments* (in press)
49. Tran NL, Salmon CP, Knize MG, Colvin ME (2002) *Food Chem Toxicol* 40:673–684

VI Article 2

**Dosage par LC-APCI-MS/MS des amines aromatiques
hétérocycliques formées lors de la cuisson des viandes.**

Sylvie Chevolleau, Catherine Touzet, Emilien Jamin, Jacques Tulliez
Laurent Debrauwer

Sciences des Aliments

à soumettre

Résumé

Les Amines Aromatiques Hétérocycliques (AAH) sont des substances mutagènes et cancérigènes chez l'animal, et suspectées de l'être chez l'homme. Connues depuis les années 1970, plus d'une vingtaine d'AAH ont été caractérisées à des concentrations de l'ordre du ng/g dans la plupart des viandes cuites dans des conditions normales de temps et de température de cuisson. Leur toxicité pour l'homme a suscité de nombreuses études pour estimer le niveau d'exposition du consommateur aux AAH.

Dans ce travail, nous rapportons le développement d'une méthode de quantification de dix AAH par LC-MS/MS et son application à l'analyse de filets de poulets cuits. Après optimisation des différents paramètres d'extraction et de purification, les taux de récupération obtenus sont compris entre 50 et 80 % selon l'AAH considérée. La méthode de dosage par LC-MS/MS utilise une colonne de type C8 (150 × 2 mm) pour la séparation des AAH, l'ionisation par APCI en mode positif et un spectromètre de masse triple quadripolaire pour la quantification, en se basant sur deux transitions spécifiques pour chacune des AAH. L'AAH TriMeIQx est utilisée comme standard interne. Les performances de la méthode en termes de répétabilité, linéarité et sensibilité sont présentées ainsi que les résultats obtenus sur des échantillons ayant subi différents paramètres de cuisson. Les niveaux d'AAH observés varient entre 0.2 et 650 ng/g selon le mode de cuisson utilisé, PhIP représentant dans tous les cas l'AAH majoritaire.

Abstract

Heterocyclic Aromatic Amines (HAAs) are mutagenic and carcinogenic substances in animals, and several of them are classified as possible or probable carcinogens for Humans. Known since the '70s, more than twenty HAAs have been characterized with concentrations in the ng/g range in most meats cooked under normal conditions of time and temperature. Their toxicity for Human raised up many studies to estimate the level of exposure of consumers towards HAAs.

In this work, we report the development of a quantification method of ten HAAs by LC-MS/MS and its application to the analysis of HAAs in cooked chicken breasts. After optimization of the various extraction and purification parameters, the obtained recovery rates are in the range of 50 to 80 % depending on the considered HAA. The LC-MS/MS determination method involves the use of a C8 type column (150 × 2 mm). Positive APCI is used as the ionization technique and the quantification is carried out on a triple quadruple mass spectrometer, based on two specific transitions for each HAA. TriMeIQx is used as the internal standard. The performances of the method are presented in terms of repeatability, linearity and sensitivity, as well as results obtained on samples which underwent various

cooking modes. The observed HAA levels were comprised between 0.2 and 650 ng/g depending on the cooking mode, and PhIP was found as the major HAA in all samples.

Introduction

Les Amines Aromatiques Hétérocycliques (AAH) sont des substances connues pour leurs propriétés pro-mutagènes et pro-cancérogènes chez des animaux tels que le rat, la souris et le singe, émettant ainsi un sérieux doute sur les effets néfastes de ces molécules chez l'homme (SUGIMURA *et al.* 2004). Les études chez l'animal ont montré que quel que soit le mode d'administration, les AAH sont presque totalement bio-disponibles et sujettes à une métabolisation importante avant excrétion. Environ 90 % de la dose administrée est excrétée dans les urines (TURTELTaub *et al.* 1993), mais seul un faible pourcentage est excrété sous forme inchangée, ce qui confirme le fait que les AAH sont très largement absorbées et bio-disponibles (GOODERHAM *et al.* 1996). Au cours du métabolisme chez les rongeurs, l'action des enzymes à cytochrome P450 mène à la formation de *N*-hydroxylamines puis d'ions arylnitrenium, composés génotoxiques susceptibles de se lier à l'ADN et de provoquer ainsi des mutations, voire des cancers (TURESKY 2005). Des études épidémiologiques mettent également en cause certaines AAH dans la cancérogenèse chez l'Homme (KNIZE et FELTON 2005). En particulier, IQ (2-amino-3-méthylimidazo[4,5-*f*]quinoline) est fortement soupçonnée d'être impliquée dans l'initiation de cancers du côlon, et a été classée carcinogène probable pour l'Homme (classe 2A) par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC, 1993). De même, MeIQ, MeIQx, PhIP, Glu-P-1, Glu-P-2, Trp-P-1 et Trp-P-2 ont été classées comme carcinogènes possibles (classe 2B) par la même agence.

Les AAH sont générées lors de la cuisson des viandes et poissons, soit par des mécanismes radicalaires intervenant dans les processus de pyrolyse à des températures supérieures à 300°C, soit selon la réaction chimique complexe de Maillard à partir d'acides aminés, les sucres, la créatine et la créatinine et intervenant à des températures de 150-200°C (MURKOVIC 2004a). Les structures des AAH étudiées dans ce travail sont présentées en Figure 1. Le type et les quantités d'AAH formées dépendent de paramètres physiques comme la température, la durée, ou encore la technique de cuisson mais aussi de paramètres chimiques comme la présence de précurseurs, d'activateurs (lipides) ou d'inhibiteurs (antioxydants, micronutriments) de leur formation pour une viande ou poisson donné (SKOG *et al.* 1998, AHN et GRÜN 2005, DASHWOOD 2002).

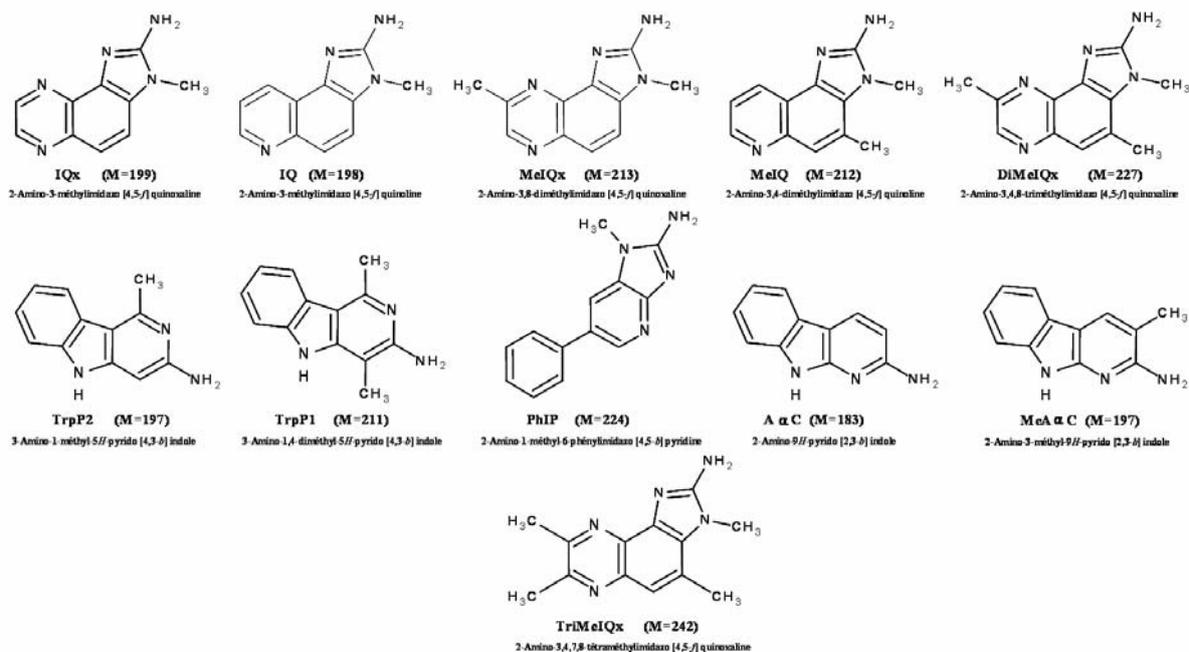


Figure 1. : Structure chimique des 10 AAH étudiées et du standard interne utilisé (TriMeIQx).
 Chemical structure of the 10 HAAs investigated and internal standard (TriMeIQx) used in this work.

Depuis les premiers travaux concernant les AAH dans les années 70, plusieurs familles d'AAH ont été répertoriées, qui présentent à la fois des structures chimiques, des propriétés physicochimiques ainsi que des mécanismes de formation différents (MURKOVIC 2004a). Plus d'une vingtaine d'AAH ont été caractérisées à des concentrations de l'ordre du ng/g (ppb) dans la plupart des viandes cuites (poulet, bœuf, porc et poisson) dans des conditions normales de temps et de température de cuisson (MURKOVIC 2004b, SKOG *et al.* 1998, SKOG et SOLYAKOV 2002, PAIS et KNIZE 2000). Les plus abondantes rencontrées dans les viandes cuisinées sont PhIP, A α C, MeIQx, DiMeIQx et IQ. De fortes teneurs en PhIP et A α C sont trouvées dans le poisson (25 à 30 ng/g), de même que l'on trouve des quantités abondantes de PhIP dans les blancs de poulet frits (jusqu'à 330 ng/g) (MURKOVIC 2004b) ou dans les blancs de poulet grillés au barbecue (jusqu'à 480 ng/g) (SINHA *et al.* 1995). On estime entre 0.1 à 15 μ g l'exposition quotidienne du consommateur aux AAH par le biais de son alimentation (GOODERHAM *et al.* 1996, SKOG *et al.* 1998).

De nombreuses méthodes de dosages des AAH dans les aliments cuits sont décrites dans la littérature, utilisant comme technique séparative la chromatographie gazeuse (GC) ou liquide (LC), ou encore d'électrophorèse capillaire (EC), et comme méthode de détection associée l'absorbance UV, la fluorescence, l'électrochimie ou la spectrométrie de masse (MS) (PAIS et KNIZE 2000). Cependant, depuis ces dernières années, pour des raisons de sélectivité et de sensibilité, la détermination des teneurs en AAH dans les matrices alimentaires cuites est principalement effectuée en utilisant le couplage LC-MS (BARCELO-BARRACHINA *et al.* 2004, GUY *et al.* 2000). Devant la complexité des matrices alimentaires

à analyser et les faibles quantités d'AAH présentes, plusieurs méthodes d'extraction et de purification ont été proposées, toutes basées sur une méthode initiale développée par Gross (GROSS et GRUTER 1992, FAY *et al.* 1997, TORIBIO *et al.* 2000b, SANTOS *et al.* 2004, MESSNER et MURKOVIC 2004).

Dans ce travail, nous rapportons le développement d'une méthode de quantification de dix AAH par LC-APCI-MS/MS avec étalonnage interne, dans la viande de poulet. En premier lieu, les protocoles d'extraction et de purification ont été optimisés de façon à obtenir un taux de récupération maximum pour chacune des AAH considérées. La méthode de dosage par LC-MS/MS repose sur l'utilisation de l'ionisation par APCI (mode positif) et d'un spectromètre de masse triple quadripolaire en se basant sur deux transitions spécifiques pour chacune des AAH. La séparation par HPLC est réalisée sur une colonne de type C8 de 2 mm de diamètre interne. L'AAH TriMeIQx (voir Figure 1) est choisie comme standard interne. Ce composé représente le standard interne le plus utilisé pour le dosage des AAH par SM en l'absence de standard deutéré (SANTOS *et al.* 2004, GUY *et al.* 2000). Les performances de la méthode sont présentées en termes de répétabilité, linéarité et sensibilité. L'effet matrice sur la réponse obtenue en SM a également été étudié. Les quelques résultats obtenus sur des échantillons de blancs de poulet ayant subi différents temps, températures et modes de cuisson, sont également présentés et montrent clairement l'influence de ces différents paramètres sur les quantités d'AAH formées.

Matériels et méthodes

Réactifs

Les composés standards (IQx, IQ, MeIQx, MeIQ, A α C, MeA α C, DiMeIQx, TrpP1, TrpP2, PhIP, et l'étalon interne TriMeIQx) utilisés dans cette étude proviennent de Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, Canada) et sont préparés à la concentration de 0,1 mg/ml dans un mélange méthanol/dichlorométhane (9/1, v/v). Le méthanol et l'acétonitrile sont fournis par Scharlau (Barcelona, Spain), le dichlorométhane par Accros (Geel, Belgium), l'acide acétique, l'hydroxyde de sodium et l'hydroxyde d'ammonium par Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). L'eau ultrapure est produite par un système Milli-Q (Millipore, St Quentin en Yvelines, France).

Traitements des échantillons

Les échantillons de viande utilisés sont des filets de poulet achetés en grande surface et conservés à -20°C jusqu'à leur cuisson et leur analyse.

Mode et durée de cuisson

Les blancs de poulet sont coupés de façon régulière (2 cm²/1 cm d'épaisseur) dans le but d'obtenir une cuisson homogène. Les modes et durées de cuissons utilisés sont rassemblés dans le Tableau 1. Les blancs de poulet cuits sont ensuite broyés (Mixeur), lyophilisés et enfin réduits en poudre au mortier. Des blancs de poulet crus témoins ont également été broyés et lyophilisés. Pour chacune des conditions de traitement, deux essais ont été réalisés.

Tableau 1. : Modes et durées de cuisson étudiées pour les filets de poulet. Cooking modes and duration investigated for the chicken breasts.

Modes de cuisson	Micro-ondes	Micro-ondes	Bain d'huile	Auto-cuiseur	Poêle	Poêle	Poêle	Four	Four	Four	Four
Températures ou puissances	750 W	750 W	140°C	100°C	80°C	80°C	70°C	250°C	250°C	180°C	180°C
Temps (min)	1	10	14	14	14	7	4	14	7	14	7

Protocole d'extraction

La méthode d'extraction utilisée est basée sur la méthode développée par Gross (GROSS et GRUTER 1992). 1 g de blanc de poulet lyophilisé est mis en suspension dans NaOH 1 M (12 mL) pendant 1h30 sous agitation. Une extraction liquide/liquide du mélange est ensuite réalisée sur cartouche d'Extrelut NT20 (13 g) (Merck) par 75 ml de dichlorométhane. Les extraits sont purifiés sur la base de la méthode de Messner (MESSNER et MURKOVIC 2004) que nous avons modifiée dans le but d'obtenir de meilleurs rendements de récupération de chacune des AAH. Après évaporation partielle de la phase organique (~ 70 ml) la purification est réalisée sur une cartouche Oasis[®] MCX (60 mg, 3 ml) (Waters), préalablement conditionnée par 2 ml de dichlorométhane. Les AAH retenues sont lavées par 2 ml de HCl 0.1 M, 2 ml de méthanol et éluées en milieu basique par 5 ml de mélange MeOH/NH₄OH (9/1, v/v). Après évaporation à sec du solvant, l'extrait est repris par 200 µl de phase mobile A utilisée pour l'analyse LC-MS/MS (acétate d'ammonium 30 mM, pH 5). Le standard interne (TriMeIQx) est ajouté à ce stade, à la concentration de 50 pg/µl.

Dans le but d'évaluer les rendements d'extraction, des surcharges de quantités connues de chacune des AAH (0.5 µg/ml) ont été effectuées sur des blancs de poulet cuits 1 min au four à micro-ondes (mode de cuisson ne générant pas d'AAH en quantités détectables (FELTON *et al.* 1994)).

Dosage par LC-APCI-MS/MS

Matériel et conditions

Le dosage des AAH est réalisé à l'aide d'une pompe HPLC Surveyor (Thermo Fisher, Les Ulis, France), couplée à un spectromètre de masse triple quadripolaire TSQ Quantum Discovery Max (Thermo Fisher) équipé d'une source d'ionisation APCI opérant en mode positif. La séparation des AAH est réalisée sur colonne Chromsep Pursuit C8 (150 × 2 mm, 3 µm) munie d'une pré-colonne de même type (Varian). La composition des phases mobiles est la suivante, A : acétate d'ammonium 30 mM, pH 5, et B : méthanol/acétonitrile (2/1, v/v). Le gradient d'élution utilisé pour la séparation des 10 AAH et du standard interne est le suivant : à 0 min : 90 % de A, à 1 min : 85 % de A, entre 6 et 12 min : 70 % de A, entre 15 et 18 min : 45 % de A, entre 21 et 30 min : 30 % de A, puis retour aux conditions initiales à 33 min. Le débit est de 0.2 ml/min et le volume injecté de 20 µL. Les conditions expérimentales fixées au niveau du spectromètre de masse sont les suivantes : courant de décharge de l'aiguille APCI (3.66 µA), température du nébuliseur (300°C), température du capillaire de transfert (300°C), voltage du capillaire de transfert (35 V), offset du tube lens (104 V), débit du gaz coaxial (25 ua) et débit du gaz auxiliaire (5 ua). L'optimisation des conditions d'analyse ainsi que la détermination des énergies de collision optimales pour chacune des AAH par l'intermédiaire d'expériences de spectrométrie de masse résolue en énergie (ERMS) est réalisée par infusion d'une solution à 1 ng/µl de chacune des AAH à un débit de 5 µl/min ajoutée au flux de phase mobile A/B (50/50) à 0.2 ml/min.

Gamme étalon

Les points de la gamme étalon ont été obtenus grâce à l'analyse de mélanges des 10 AAH aux concentrations suivantes : 1 pg/µl, 10 pg/µl, 50 pg/µl, 100 pg/µl, 250 pg/µl, 500 pg/µl et 1000 pg/µl pour chacune des AAH étudiées, dans un mélange de phase mobile A/B (90/10). Le standard interne (TriMeIQx) est ajouté à la concentration constante de 50 pg/µl.

Résultats et discussion

Séparation chromatographique et détection des standards

Les conditions chromatographiques optimisées (solvants, pH, gradient d'élution) permettent d'obtenir une bonne séparation des 10 AAH standards et du standard interne en moins de 25 min. De même, l'optimisation des conditions d'ionisation pour la détection de chacun des standards a été effectuée en comparant l'efficacité des deux modes d'ionisation ESI et APCI à la fois en mode positif et négatif. L'APCI en mode positif a été retenue car elle

fournit la meilleure réponse pour l'ensemble des AAH étudiées. Ce résultat est en accord avec certaines données déjà publiées (PAIS et KNIZE 2000, GUY *et al.* 2000). La méthode de détection des AAH par suivi de transitions multiples (MRM) a ensuite été mise au point sur un spectromètre de masse de configuration triple quadripolaire. Dans un premier temps, les spectres MS/MS de chacune des 10 AAH ont été enregistrés à partir des différents ions précurseurs $[M+H]^+$ formés par APCI. Ces spectres MS/MS ont été générés à plusieurs énergies de collision afin de construire pour chaque AAH des courbes ERMS (données non reportées). A partir de ces courbes, l'énergie de collision optimale a pu être déterminée pour chaque transition sélectionnée. Pour chacune des AAH, deux fragmentations ont été sélectionnées pour pouvoir d'une part confirmer sa structure de manière spécifique et d'autre part, quantifier le composé avec la meilleure sensibilité. Le Tableau 2 rassemble les ions fragments choisis pour la confirmation (en italique) et pour la quantification (en gras) de chacune des AAH, ainsi que la valeur d'énergie de collision donnant une intensité maximale pour la transition considérée. La plupart des transitions suivies concernent la perte d'un radical méthyle $\cdot\text{CH}_3$ ou l'élimination de NH_3 à partir de la fonction amine primaire des AAH (voir Figure 1). L'élimination de HCN est également fréquemment observée. Ces différentes transitions peuvent être considérées comme caractéristiques des AAH (TORIBIO *et al.* 2002, GUY *et al.* 2000). Le chromatogramme reconstruit présenté en Figure 2 montre une bonne séparation et une excellente réponse des 10 AAH et du standard interne.

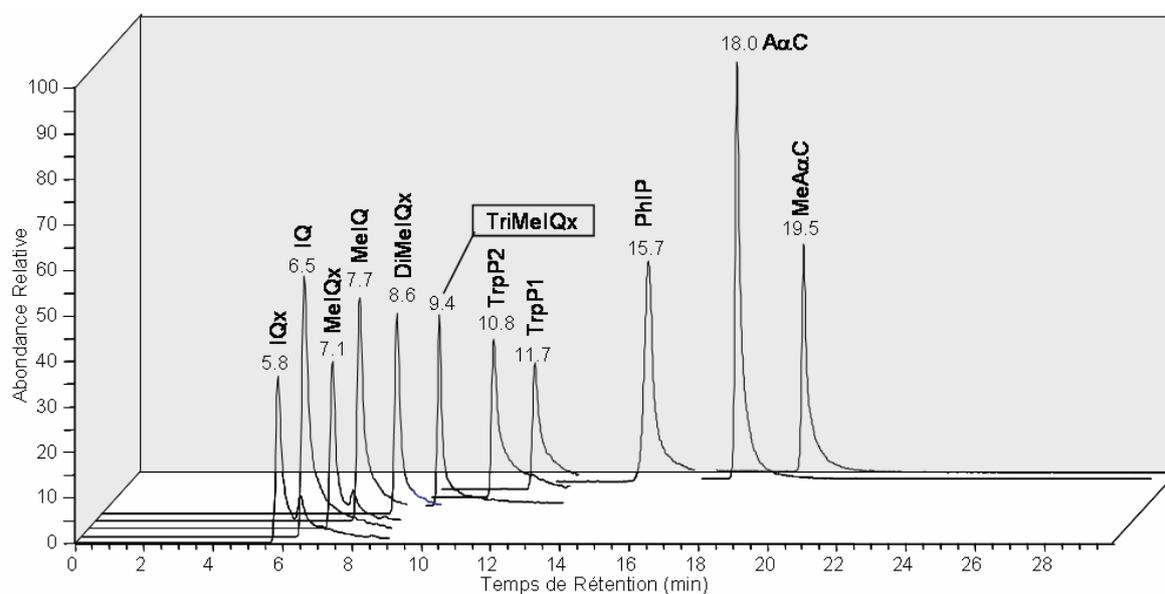


Figure 2. : Chromatogrammes d'ions reconstruits (MRM) pour les 10 AAH standards et le standard interne à la concentration de 50 pg/μl. Reconstructed ion chromatograms of the 10 standard HAAs and the internal standard for a concentration of 50 pg/μl.

Tableau 2. : Temps de rétention et ions fragments diagnostiques retenus pour la caractérisation (en italique) et la quantification (en gras) des AAH. Retention times and diagnostic fragment ions used for the characterization (italic) and the quantification (bold) of HAAs.

AAH	Temps de rétention (min)	[M+H] ⁺	Energie de collision (eV)	<i>m/z</i>	Attribution
IQx	5.8	200	32	185	[M+H - [•] CH ₃] ⁺
				<i>131</i>	[M+H - [•] CH ₃ - 2HCN] ⁺
IQ	6.5	199	32	184	[M+H - [•] CH ₃] ⁺
				<i>157</i>	[M+H - [•] CH ₃ - HCN] ⁺
MeIQx	7.1	214	30	199	[M+H - [•] CH ₃] ⁺
				<i>146</i>	[M+H - C ₃ H ₄ N ₂] ⁺
MeIQ	7.7	213	28	198	[M+H - [•] CH ₃] ⁺
				<i>197</i>	[M+H - [•] CH ₃ - [•] H] ⁺
DiMeIQx	8.6	228	34	<i>213</i>	[M+H - [•] CH ₃] ⁺
				212	[M+H - [•] CH ₃ - [•] H] ⁺
TriMeIQx	9.4	242	30	227	[M+H - [•] CH ₃] ⁺
				<i>226</i>	[M+H - [•] CH ₃ - [•] H] ⁺
TrpP2	10.8	198	30	<i>181</i>	[M+H - NH ₃] ⁺
				154	[M+H - NH ₃ - HCN] ⁺
TrpP1	11.7	212	26	195	[M+H - NH ₃] ⁺
				<i>167</i>	[M+H - NH ₃ - HCN - [•] H] ⁺
PhIP	15.7	225	32	210	[M+H - [•] CH ₃] ⁺
				<i>183</i>	[M+H - [•] CH ₃ - HCN] ⁺
AαC	18.0	184	32	<i>167</i>	[M+H - NH ₃] ⁺
				140	[M+H - NH ₃ - HCN] ⁺
MeAαC	19.5	198	26	181	[M+H - NH ₃] ⁺
				<i>154</i>	[M+H - NH ₃ - HCN] ⁺

Performances de la méthode LC-MS/MS pour la quantification

Linéarité

La linéarité de la réponse a été vérifiée pour chacune des AAH dans un domaine de concentrations en AAH standards compris entre 1 et 1000 pg/μl (concentration en standard interne fixée à 50 pg/μl). Cinq injections ont été réalisées pour chacune des 7 concentrations de la gamme étalon. Les coefficients de corrélation obtenus pour les droites de calibration de chacune des AAH sont tous supérieurs à 0.992, montrant une excellente linéarité de la méthode dans ce domaine de concentrations.

Répétabilité

La répétabilité de la méthode développée a été évaluée pour les concentrations de solutions standards de chacune des AAH à 10 et 500 pg/μl, et sur la base de 5 répétitions. Les coefficients de variation (CV) ont été calculés à la fois sur les temps de rétention et sur les rapports des aires AAH/étalon interne pour chacune des AAH étudiées et sont reportés dans le Tableau 3 pour les deux concentrations étudiées. Ces résultats indiquent une très bonne répétabilité de la méthode aussi bien sur les temps de rétention (CV_{moyen} ~ 0.3 %) que sur le rapport des aires mesurées (CV_{moyen} ~ 2.8 %) avec des CV inférieurs à 3 % à la

concentration de 500 pg/μl et inférieurs à 10 % à la concentration de 10 pg/μl, pour l'ensemble des 10 AAH étudiées.

Tableau 3. : Coefficients de variation des temps de rétention et des rapports des aires et limites de détection et de quantification calculées pour les 10 AAH. Relative standard deviations of retention times and surfaces ratios, and limits of detection and quantification calculated for 10 HAAs.

AAH	CV temps rétention (%)		CV rapport aires (%)		LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
	10 pg/μl	500 pg/μl	10 pg/μl	500 pg/μl		
IQx	0.9	0.3	1.7	2.6	0.10	0.20
IQ	0.8	0.2	2.0	1.2	0.04	0.10
MelQx	0.6	0.3	3.1	1.2	0.06	0.20
MelQ	0.6	0.2	2.6	1.2	0.02	0.06
DiMelQx	0.5	0.3	4.9	3.0	0.04	0.10
TrpP2	0.2	0.2	5.0	0.9	0.06	0.20
TrpP1	0.5	0.3	2.8	0.8	0.10	0.20
PhIP	0.4	0.2	1.5	0.5	0.06	0.20
AαC	0.2	0.1	9.6	2.5	0.02	0.04
MeAαC	0.1	0.1	7.3	2.0	0.02	0.04

Sensibilité

Les limites de détection (LOD : rapport signal/bruit de fond = 3) et de quantification (LOQ : rapport signal/bruit de fond = 10) ont été déterminées pour chacune des 10 AAH et sont reportées dans le Tableau 3.

Les valeurs des LOD exprimées en quantités d'AAH détectées par gramme de viande cuite se situent entre 0.02 et 0.1 ng/g et les LOQ entre 0.04 et 0.2 ng/g. Ces limites sont en accord avec les résultats publiés dans la littérature, notamment pour des travaux développés à partir d'un triple quadripôle en mode MRM (TORIBIO *et al.* 2000b, GUY *et al.* 2000, BARCELO-BARRACHINA *et al.* 2004).

Effet matrice

L'effet matrice a également été testé à partir d'une matrice poulet cuit au four micro-ondes pendant 1 minute pour laquelle l'absence d'AAH a préalablement été vérifiée (FELTON *et al.* 1994). L'effet matrice a été contrôlé en réalisant une addition post-colonne d'un mélange des 10 AAH standards à 200 pg/μl de façon constante tout au long de la durée de l'analyse chromatographique. Aucune perturbation du signal des AAH n'a été observée dans les zones de temps de rétention d'intérêt, démontrant l'absence d'effet matrice dans les conditions expérimentales utilisées.

Rendements d'extraction

La plupart des données de la littérature font état de l'utilisation de la méthode d'extraction et de purification de Gross et Grüter (GROSS et GRUTER 1992), éventuellement modifiée. Bien que performante, cette méthode présente l'inconvénient de

fournir deux extraits, l'un contenant les AAH les plus polaires et l'autre contenant les AAH les moins polaires. Nous avons pour notre part choisi de nous baser sur la méthode initialement proposée par Messner (MESSNER et MURKOVIC 2004, SANTOS *et al.* 2004), également utilisée par l'équipe de Galceran sur une matrice urinaire (SENTELLAS *et al.* 2004) et qui permet d'obtenir une seule fraction finale contenant la totalité des AAH en n'utilisant qu'une seule cartouche SPE. Nous avons cependant modifié la méthode initiale dans le but d'améliorer les rendements de récupération de chacune des AAH. En particulier l'acétate d'éthyle a été remplacé par le dichlorométhane comme solvant d'extraction, celui-ci permettant d'obtenir globalement des rendements d'extraction supérieurs. Un volume de 75 ml de dichlorométhane a été choisi pour une extraction optimale des AAH sur une cartouche Extrelut à partir de 1 g d'échantillon lyophilisé, suivi d'une évaporation partielle du solvant avant de déposer l'extrait sur une cartouche OASIS[®] MCX. Enfin la récupération optimale des AAH lors de la purification par SPE a été obtenue par élution d'un solvant polaire en milieu basique (MeOH/NH₄OH (9/1, v/v)).

Les rendements d'extraction ont été calculés pour trois extractions successives réalisées à partir d'échantillons de blancs de poulet cuits au four à micro-ondes et surchargés par chacune des AAH standards et par le standard interne. L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans l'histogramme de la Figure 3.

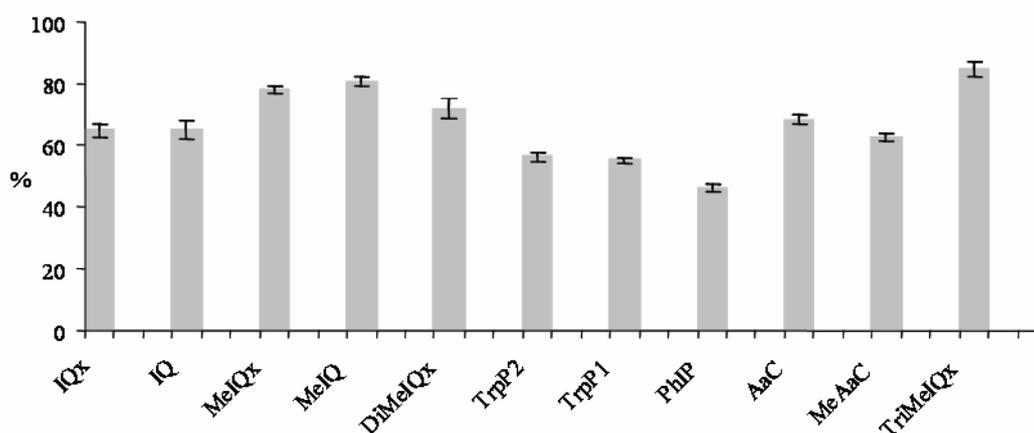


Figure 3. : Moyenne des rendements d'extraction (n=3) pour les 10 AAH étudiées et le standard interne. Average extraction yields (n=3) determined for the 10 studied HAAs and the internal standard.

Les rendements d'extraction obtenus avec ce protocole optimisé se situent entre 50 % (PhIP) et 80 % (MeIQx, MeIQ, TriMeIQx) avec un coefficient de variation moyen de 5.3 %. Ces rendements sont globalement équivalents, voire supérieurs à ceux habituellement obtenus dans des travaux similaires (MESSNER et MURKOVIC 2004, TORIBIO *et al.* 2000a et 2000b, AHN et GRÜND, 2005).

Application au dosage des AAH dans des filets de poulet

La méthode développée a été appliquée au dosage des 10 AAH dans des filets de poulet ayant subi différents modes de cuisson. Selon le type de cuisson utilisé (poêle, four traditionnel, four à micro-ondes), le mode de transfert de chaleur (conduction, convection, rayonnement) peut influencer sur les quantités d'AAH générées. Pour un même type de cuisson, la température et la durée sont les deux paramètres principaux ayant une influence sur les quantités d'AAH formées. Pour cette raison, nous avons choisi d'étudier 5 modes de cuisson différents, et pour 3 d'entre eux (four traditionnel, poêle, four à micro-ondes), 2 températures et 2 temps de cuisson ont été étudiés.

Les teneurs en AAH des différents échantillons analysés, exprimées en ng par g de viande lyophilisée, et corrigées par leurs rendements d'extraction respectifs sont regroupées dans le Tableau 4. Il est également possible d'exprimer ces teneurs en ng par g de viande cuite, en estimant le taux d'humidité contenu dans les échantillons de blancs de poulet avant l'étape de lyophilisation, taux qui est compris entre 50 et 60 % selon les modes et les temps de cuisson. Comme nous l'avons vu précédemment (Tableau 3), les taux de récupération se révèlent assez différents d'une AAH à l'autre. Pour cette raison, nous avons jugé plus pertinent d'ajouter le standard interne uniquement dans l'extrait final au niveau de la méthode LC-APCI-MS/MS, et de corriger les quantités mesurées de chacune des AAH par leur rendement d'extraction respectif déterminé précédemment.

Tableau 4. : Teneurs en AAH (ng/g) dans les extraits de blancs de poulet crus et cuits suivant différents modes. HAAs contents (ng/g) of breasts chicken extracts raw and cooked according to various modes.

	Cuisson	IQx	IQ	MeIQx	MeIQ	DiMeIQx	TrpP2	TrpP1	PhIP	A α C	MeA α C
Four	180°C/7min	nd	0.3	traces	0.3	traces	nd	nd	traces	traces	traces
Four	180°C/14min	nd	0.3	0.3	0.3	traces	nd	nd	0.4	traces	traces
Four	250°C/7min	traces	0.4	0.9	0.3	0.4	nd	nd	7.2	traces	traces
Four	250°C/14min	3.5	7.4	22.2	1.9	2.9	0.4	nd	427.7	0.4	0.6
Poêle	70°C/4min	1.3	1.4	4.5	0.8	1.8	nd	nd	52.7	0.8	traces
Poêle	80°C/7min	3.0	3.8	8.5	2.2	4.5	0.4	nd	181.3	5.4	0.6
Poêle	80°C/14min	13.2	2.1	26.4	traces	16.6	nd	nd	1080.4	63.6	7.2
Micro-onde	750 W/1min	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.5	nd	nd
Micro-onde	750 W/10min	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.6	nd	nd
Autocuiseur	100°C/14min	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.7	nd	nd
Bain d'huile	140°C/14min	nd	0.4	nd	nd	nd	nd	nd	0.5	nd	nd
Sans cuisson		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

* : valeurs corrigées par le taux de récupération obtenu après extraction

nd : valeurs inférieures à la limite de détection

traces : valeurs inférieures à la limite de quantification

Les modes de cuisson par four micro-ondes, autocuiseur ou en papillote au bain d'huile conduisent à des quantités d'AAH formées très faibles, voire non détectables. Il est à

noter qu'une cuisson de 10 min au four à micro-ondes (750 W) conduit à la formation de PhIP à une quantité de 2.6 ng/g, alors qu'une quantité proche de la LOQ est générée en 1 min dans les mêmes conditions. Aucune autre AAH n'est formée en quantité détectable avec ce mode de cuisson, ce qui confirme certains résultats rapportés (FELTON *et al.* 1994). Ce résultat montre que la cuisson au four à micro-ondes peut être utilisée pour produire des échantillons de matrice « blanche » dans le cadre des essais de surcharge en AAH pour la détermination des rendements d'extraction ou l'étude de l'effet matrice en LC-MS/MS. Une mesure a également été réalisée sur des filets de poulet crus, afin de confirmer l'absence d'AAH dans la viande crue (Tableau 4).

L'AAH la plus abondante retrouvée dans les filets de poulet cuits correspond à PhIP, mais d'autres AAH sont également détectées en quantités non négligeables comme MeIQx, A α C, DiMeIQx et IQx comme l'indique le Tableau 4. Sur le plan qualitatif, ces résultats sont globalement en accord avec les données de la littérature ((MESSNER et MURKOVIC 2004, SKOG *et al.* 1998). Les teneurs en AAH obtenues au cours de ce dosage sont comprises entre 0.3 et 63.4 ng/g de viande lyophilisée (si on exclut PhIP), ce qui correspond à 0.2 à 38.0 ng/g de viande, si l'on tient compte d'un taux d'humidité de 50 à 60 % dans la viande. Ces valeurs sont également comparables à celles obtenues aux cours d'études effectuées sur des viandes cuites non lyophilisées, pour le même type de matrice et des modes et temps de cuisson similaires (MESSNER et MURKOVIC 2004, PAIS et KNIZE 2000, SKOG *et al.* 1998). Par contre, les taux observés de PhIP sont globalement très supérieurs à ceux reportés dans la littérature. Cependant, il est important de noter que la formation d'AAH est d'une part fonction du mode de préparation des morceaux de viande qui va conditionner à la fois la surface d'échange et l'efficacité du transfert de chaleur pendant la cuisson. Dans notre cas des morceaux de 2 cm² sur 1 cm d'épaisseur ont été utilisés, produisant une surface de contact plus importante que celle offerte par des filets de poulet entiers utilisés dans des études similaires (SKOG *et al.* 1998). D'autre part, si l'on corrige notre résultat par le taux d'humidité de la viande, les teneurs maximales en PhIP obtenues sont alors de l'ordre de 650 ng/g de viande, ce qui est du même ordre de grandeur que certaines valeurs relevées dans la littérature, par exemple sur de la viande de poulet grillée au barbecue pour laquelle des teneurs en PhIP de 480 ng/g ont été mesurées (SINHA *et al.* 1995, PAIS et KNIZE 2000). Globalement, pour un même mode de cuisson, les quantités d'AAH semblent augmenter très rapidement et de manière non linéaire, lorsque l'on augmente la durée et la température de cuisson. Cependant un nombre de points de mesure plus important sera nécessaire pour une bonne modélisation de l'influence de ces paramètres. Outre le temps et la température de cuisson, le mode de cuisson peut également influencer sur la formation des AAH comme l'illustrent les valeurs du Tableau 4. Par exemple, lorsque les morceaux de poulet sont cuits à la poêle (80°C) durant 14 minutes la teneur en PhIP est de 1080.4 ng/g,

alors qu'elle est de 427.7 ng/g lorsque les morceaux de poulet sont cuits au four à 250°C et seulement de 0.4 ng/g pour une cuisson au four à 180°C pendant 14 minutes.

Conclusions

Une méthode d'extraction et de dosage par LC-MS/MS a été développée pour la quantification par étalonnage interne de 10 amines aromatiques hétérocycliques, substances mutagènes et cancérigènes, formées lors de la cuisson des viandes. La viande de poulet, en particulier sous forme de filets, a été choisie comme matrice pour l'application de notre méthode et l'étude de l'influence de différents paramètres de cuisson sur la formation des AAH. Le protocole mis au point pour l'extraction et la purification des AAH à partir des viandes cuites et lyophilisées est simple, fiable et reproductible, et la méthode de dosage par LC-MS/MS permet d'atteindre des limites de détection comprises entre 0.02 et 0.1 ng/g de viande, selon l'AAH considérée. Comme attendu, nous avons observé que les teneurs en AAH sont d'autant plus élevées que la température et le temps de cuisson sont élevés. Le mode de cuisson et la surface de contact de la viande avec la source de chaleur sont également des facteurs à prendre en compte et il serait intéressant de standardiser certains de ces paramètres de façon à pouvoir comparer efficacement les résultats obtenus à partir d'études menées dans différents laboratoires. PhIP représente l'AAH formée majoritairement dans le blanc de poulet, avec notamment des teneurs pouvant avoisiner le ppm dans les échantillons cuits à la poêle (80°C, 14 min). Après avoir validé notre méthode sur un nombre restreint d'échantillons (JAMIN *et al.* 2007), l'objectif est maintenant de l'utiliser pour déterminer les niveaux d'AAH formées dans les viandes cuites en fonction de l'espèce animale considérée (porc, bœuf, poisson...) mais aussi de différents paramètres de cuisson (temps, température, teneur en eau, activité de l'eau...). Ces résultats devraient permettre de pouvoir modéliser la formation des AAH en fonction de ces différents paramètres de façon à envisager des recommandations susceptibles de se traduire par une diminution de l'exposition du consommateur aux AAH.

Références bibliographiques

- AHN J., GRÜND I.U., 2005. Heterocyclic amines: 1. Kinetics of formation of polar and nonpolar heterocyclic amines as a function of time and temperature. *J. Food Sci.*, **70**, 173-179.
- BARCELÒ-BARRACHINA E., MOYANO E., PUIGNOU L., GALCERAN M.T., 2004. Evaluation of different liquid chromatography-electrospray mass spectrometry systems for the analysis of heterocyclic amines. *J. Chromatogr., A*, **1023**, 67-78.

DASHWOOD R.H., 2002. Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an 'A-to-Z' guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. *Mutat. Res.*, **511**, 89-112.

FAY L.B., ALI S., GROSS G. A., 1997. Determination of heterocyclic aromatic amines in food products: automation of sample preparation method prior to HPLC and HPLC-MS quantification. *Mutat. Res.*, **376**, 29-35.

FELTON J.S., FULTZ E., DOLBEARE F.A., G. KNIZE M.G. 1994. Effect of microwave pretreatment on heterocyclic aromatic amine mutagens/carcinogens in fried beef patties. *Food Chem. Toxicol.*, **32**, 897-903.

GOODERHAM N.J., MURRAY S., LYNCH A.M., EDWARDS R.J., YADOLLAHI-FARSANI M., BRATT C., RICH K.J., ZHAO K., MURRAY B.P., BHADRESA S., CROSBIE S.J., BOOBIS A.R., DAVIES D.S., 1996. Heterocyclic amines: evaluation of their role in diet associated human cancer. *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **42**, 91-98.

GROSS G.A., GRUTER A., 1992. Quantitation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic aromatic amines in food products. *J. Chromatogr.*, **592**, 271-278.

GUY P.A., GREMAUD E., RICHOZ J., TURESKY R.J., 2000. Quantitative analysis of mutagenic heterocyclic aromatic amines in cooked meat using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., A*, **883**, 89-102.

IARC (Internationally Agency for Research on Cancer). 1993. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Some naturally occurring aromatic amines and mycotoxins. Lyon: IARC. p 242.

JAMIN E., CHEVOLEAU S., TOUZET C., TULLIEZ J., DEBRAUWER L., 2007. Assessment of metastable atom bombardment (MAB) ionization mass spectrometry for the fast determination of heterocyclic aromatic amines in cooked meat. *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**, 2931-2941.

KNIZE M.G., FELTON J.S., 2005. Formation and human risk of carcinogenic heterocyclic amines formed from natural precursors in meat. *Nutr. Rev.*, **63**, 158-165.

MESSNER C., MURKOVIC M., 2004. Evaluation of a new model system for studying the formation of heterocyclic amines. *J. Chromatogr., B*, **802**, 19-26.

MURKOVIC M., 2004a. Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems. *J. Chromatogr., B*, **802**, 3-10.

MURKOVIC M., 2004b. Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic aromatic amines in fried products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **106**, 777-785.

PAIS P., KNIZE M.G., 2000. Chromatographic and related techniques for the determination of aromatic heterocyclic amines in foods. *J. Chromatogr., B*, **747**, 139-169.

SANTOS F.J., BARCELÒ-BARRACHINA E., TORIBIO F., PUIGNOU L., GALCERAN M.T., PERSSON E., SKOG K., MESSNER C., MURKOVIC M., NABINGER U., RISTIC A., 2004. Analysis of heterocyclic amines in food products: interlaboratory studies. *J. Chromatogr., B*, **802**, 69-78.

SENTELLAS S., MOYANO E., PUIGNOU L., GALCERAN M.T., 2004. Optimization of a clean-up procedure for the determination of heterocyclic aromatic amines in urine by field-amplified sample injection-capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr., A*, **1032**, 193-201.

SINHA R., ROTHMAN N., BROWN E.D., SALMON C.P., KNIZE M.G., SWANSON C.A., ROSSI S.C., MARK S.D., LEVANDER O.A., FELTON J.S., 1995. High Concentrations of the Carcinogen 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine (PhIP) Occur in Chicken but Are Dependent on the Cooking Method. *Cancer Res.*, **55**, 4516-4519.

SKOG K.I., JOHANSSON M.A.E., JÄGERSTAD M.I., 1998. Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: A review on formation, occurrence and intake. *Food Chem. Toxicol.*, **36**, 879-896.

SKOG K., SOLYAKOV A., 2002. Heterocyclic amines in poultry products: a literature review. *Food Chem. Toxicol.*, **40**, 1213-1221.

SUGIMURA T., WAKABAYASHI K., NAKAGAMA H., NAGAO M., 2004. Heterocyclic amines: Mutagens/carcinogens produced during cooking of meat and fish. *Cancer Sci.*, **95**, 290-299.

TORIBIO F., MOYANO E., PUIGNOU L., GALCERAN M.T., 2000a. Determination of heterocyclic aromatic amines in meat extracts by liquid chromatography-ion-trap atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr., A*, **869**, 307-317.

TORIBIO F., MOYANO E., PUIGNOU L., GALCERAN M.T., 2000b. Comparison of different commercial solid-phase extraction cartridges used to extract heterocyclic amines from a lyophilised meat extract. *J. Chromatogr., A*, **880**, 101-112.

TORIBIO F., MOYANO E., PUIGNOU L., GALCERAN M.T., 2002. Multistep mass spectrometry of heterocyclic amines in a quadrupole ion trap mass analyser. *J. Mass Spectrom.*, **37**, 812-828.

TURESKY R.J., 2005. Interspecies metabolism of heterocyclic aromatic amines and the uncertainties in extrapolation of animal toxicity data for human risk assessment. *Mol. Nutri. Food Res.*, **49**, 101-117.

TURTELTAUB K.W., VOGEL J.S., FRANTZ C., BUONARATI M.H., FELTON J.S., 1993. Low-level biological dosimetry of heterocyclic amine carcinogens isolated from cooked food. *Environ. Health Perspect.*, **99**, 183-186.

- Chapitre 3 -

**Etude de la formation des adduits covalents entre les
désoxynucléosides et les amines aromatiques hétérocycliques.**

I Présentation de l'étude

Après avoir développé des méthodologies de caractérisation des AAH dans les viandes cuites, ces travaux de thèse se sont intéressés aux effets génotoxiques des AAH, et plus précisément à l'étude de la formation d'adduits covalents entre les bases de l'ADN et deux AAH sélectionnées. Dans un premier temps, nous avons choisi de nous intéresser à la formation des adduits avec les désoxynucléosides, qui sont des systèmes de taille relativement faible permettant de limiter le nombre de facteurs pouvant influencer la formation d'adduits. De plus, à notre connaissance, aucune étude n'a concerné la recherche d'éventuels nouveaux adduits formés entre les AAH et les désoxynucléosides depuis 1992 [1] alors que les outils analytiques se sont considérablement améliorés depuis cette date notamment en terme de sensibilité. Les résultats obtenus sur la synthèse et l'analyse des adduits formés entre les désoxynucléosides et les AAH, permettront de disposer d'informations précieuses qui pourront être réutilisées au cours d'études ultérieures menées au laboratoire concernant la formation d'adduits entre les AAH et les oligonucléotides ou l'ADN.

L'Article 3 présenté dans ce chapitre s'intéresse à l'étude de la formation d'adduits entre les quatre désoxynucléosides et deux AAH sélectionnées. Plusieurs critères ont été retenus pour le choix de ces deux AAH, et en particulier :

- le caractère cancérigène sur des modèles animaux
- l'existence de réactifs de synthèse commerciaux
- le niveau d'exposition de l'Homme
- la réactivité connue de ces AAH vis-à-vis des bases de l'ADN.

PhIP et IQ sont deux AAH qui répondent à ces critères et dont la structure est rappelée dans la Figure 1. En effet, PhIP est l'AAH à laquelle nous sommes le plus exposés par le biais de notre alimentation comme cela a été signalé dans le Chapitre 1. En outre, cette substance a été décrite comme étant cancérigène chez les rongeurs suite à la formation d'un adduit avec l'atome de carbone en position 8 de la guanine [2]. Enfin, un réactif de synthèse commercial (NO₂-PhIP) est disponible pour la synthèse de l'espèce électrophile nécessaire à la formation d'adduits avec les désoxynucléosides. IQ est quant à elle une AAH présente dans les viandes cuites à des concentrations nettement plus faibles que celles de PhIP, mais néanmoins non négligeables. De plus, IQ est la seule AAH à avoir

-
1. Turesky R.J., Rossi S.C., Welti D.H., Lay J.O., Kadlubar F.F., *Chem. Res. Toxicol.*, **5** (1992) 479-490.
 2. Turesky R.J., Vouros P., *J. Chromatogr., B*, **802** (2004) 155-166.

été à ce jour décrite comme cancérigène chez un primate en plus des rongeurs. Tout comme MeIQx, cette AAH présente l'originalité de former un adduit minoritaire dG-N²-IQ en plus de l'adduit majoritaire dG-C8-IQ, ce qui laisse envisager une réactivité différente de celle de PhIP. Enfin, IQ possède également un réactif commercial (NHOH-IQ) intéressant pour la synthèse d'adduits.

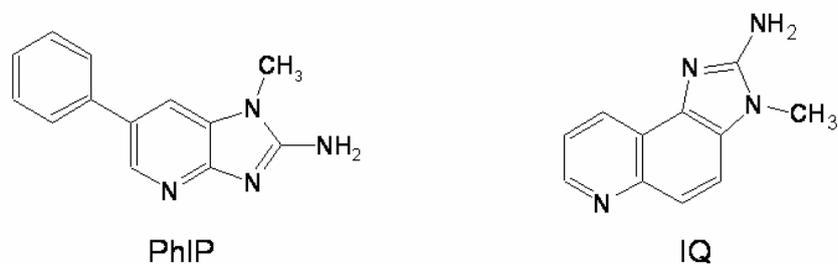
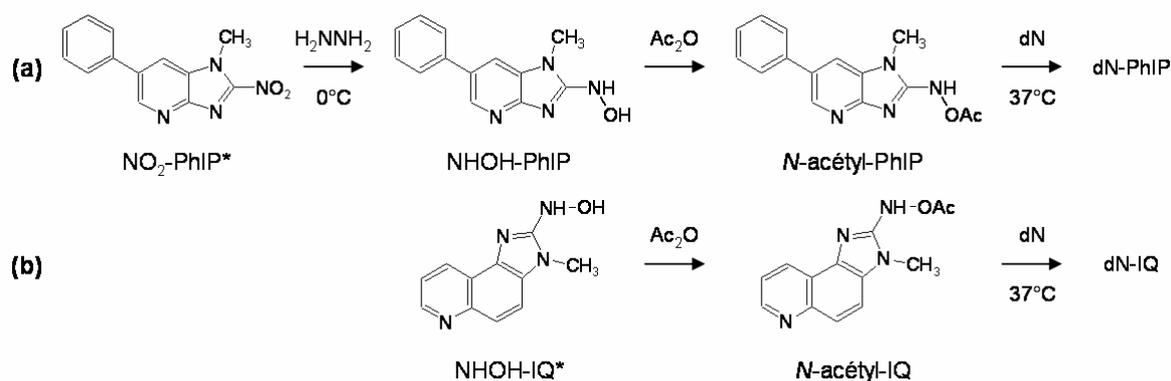


Figure 1. Structures de PhIP et IQ.

II Démarche scientifique et instrumentale

II. 1 Synthèses chimiques des adduits désoxynucléosides - AAH

La méthodologie suivie dans cette étude a consisté à développer des protocoles de synthèse mimant les conditions biologiques afin de ne pas générer d'adduits « biologiquement irréalistes ». Ainsi, les différentes étapes de synthèse ont été basées sur les processus de bioactivation des AAH qui consistent en une *N*-acétylation du dérivé *N*-hydroxylé de l'AAH, suivie par la réaction entre le désoxynucléoside et la *N*-acétyl-AAH, comme indiqué dans le Chapitre 1. Le dérivé *N*-hydroxylé de PhIP n'étant pas commercial, nous avons dû le préparer par réduction ménagée de NO₂-PhIP (Figure 2b). Enfin, la réaction entre le désoxynucléoside et la *N*-acétyl-AAH, a été mise en œuvre dans des conditions proches des conditions biologiques, c'est à dire en phase aqueuse tamponnée à pH 7, sous atmosphère inerte, dans des solvants dégazés et à 37°C (Figure 2). Ces protocoles ont été développés à partir de méthodologies décrites dans la littérature comme ceci est indiqué dans l'article présenté ci-après. Cependant, quelques difficultés techniques ont dû être surmontées lors de la mise au point des protocoles de synthèse et méritent à ce titre d'être précisées. Dans un premier temps, les protocoles décrits dans la littérature sont basés sur des quantités initiales de réactifs importantes et incompatibles avec les conditionnements commerciaux actuels de ces réactifs. C'est pourquoi, plusieurs expériences préliminaires ont été réalisées afin d'ajuster les proportions des différents réactifs pour les conditions expérimentales de cette étude. De plus, les protocoles décrits font état de la nécessité de réaliser des synthèses sous atmosphère inerte mais sans souligner la condition essentielle de l'utilisation de solvants dégazés pour en éliminer l'oxygène dissout. Enfin, comme nous avons fixé nos propres conditions de concentration et de pH, les temps de réaction ont également nécessité une optimisation. Il faut souligner que le dérivé *N*-hydroxylé de PhIP est une substance particulièrement instable expliquant sa non-commercialisation. Ainsi, sa synthèse à partir de NO₂-PhIP a nécessité le maintien de conditions très « douces » avec l'utilisation de solvants froids (4°C) et purgés à l'argon ainsi qu'une réaction à 0°C sous atmosphère inerte et dans le noir. De même, la purification de NHOH-PhIP sur cartouche d'extraction en phase solide a dû être réalisée de manière rapide en utilisant également des solvants froids et purgés à l'argon, ainsi qu'une cartouche SPE préalablement refroidie au réfrigérateur.



* Réactif commercial

Figure 2. Schémas de synthèse des adduits entre les désoxynucléosides et PhIP (a) ou IQ (b).

Après avoir mis au point ces protocoles de synthèse, nous nous sommes attachés dans un premier temps à vérifier l'obtention des adduits déjà décrits avec la désoxyguanosine, et dans un deuxième temps à rechercher d'éventuels adduits inconnus. C'est pourquoi, les mêmes protocoles ont été appliqués de façon systématique au quatre désoxynucléosides (dA, dC, dG et dT). Enfin, des synthèses ont été réalisées en présence d'un mélange équimolaire des quatre bases afin de vérifier que les désoxynucléosides n'auraient aucune influence réciproque sur la formation des adduits.

II. 2 Analyses par LC-MSⁿ des adduits désoxynucléosides - AAH

Les analyses des différents mélanges réactionnels ainsi préparés ont été réalisées par couplage entre la chromatographie en phase liquide et la spectrométrie de masse. La chromatographie nous a permis d'analyser directement les mélanges réactionnels sans étape préalable de purification évitant ainsi les pertes et/ou dégradations potentielles d'adduits. Les conditions chromatographiques ont été optimisées afin d'obtenir la meilleure séparation possible des adduits. Ainsi, plusieurs colonnes chromatographiques ont été testées et le gradient de phase mobile optimisé. Les systèmes chromatographiques finalement adoptés sont décrits dans la partie expérimentale de l'article présenté à la fin de ce chapitre. Le couplage à la spectrométrie de masse a permis l'identification des espèces générées par leur caractérisation structurale réalisée sur des analyseurs de type piège à ions. L'ionisation par Electrospray a été choisie car elle constitue une source d'ionisation aisément associable à la chromatographie en phase liquide et est bien adaptée à l'ionisation de composés polaires comme les adduits recherchés. Les adduits ont été analysés en mode positif en raison de la présence sur leurs structures de fonctions chimiques à caractère basique. L'unique fragment observé sur les spectres MS/MS des adduits obtenus sur la trappe d'ions utilisée, correspondait à une perte du désoxyribose (- 116 u) ce qui est intéressant pour la détection des adduits (fragment diagnostique) mais qui représente un

handicap pour leur caractérisation structurale. C'est pourquoi la caractérisation structurale des adduits a été réalisée à partir des spectres MS³ des espèces ayant perdu leur désoxyribose. Pour cela, des expériences LC-MS³ ont été menées d'une part sur un piège à ions 3D, et d'autre part sur un appareil hybride permettant à la fois de réaliser des expériences de type MS³ dans piège à ions 2D et une analyse des ions fragments en haute résolution dans une Orbitrap[®]. Les schémas des spectromètres de masse utilisés sont représentés sur la Figure 3 pour l'analyseur de type piège tridimensionnel (LCQ[®]) et sur la Figure 4 pour spectromètre de masse hybride LTQ-Orbitrap[®] associant un piège linéaire au piège Orbitrap[®]. Les adduits ont donc été détectés en repérant les espèces subissant une perte de désoxyribose lors d'expériences MS/MS. Puis, ces adduits ont été identifiés en étudiant les fragmentations observées lors d'expériences MS³. Ces expériences MS³ ont consisté à sélectionner l'ion précurseur [dNAAH+H]⁺ (représentant l'adduit protoné entre le désoxynucléoside et l'AAH) pour former l'ion fragment [NAAH+H]⁺ (représentant le même adduit ayant perdu son désoxyribose) lors d'une expérience MS/MS, suivie de l'isolement et de la fragmentation de l'ion précurseur [NAAH+H]⁺ dans une étape MS³. Lorsque les quantités d'adduits synthétisés étaient trop faibles, en particulier pour certaines synthèses de l'adduit dG-N7-IQ, les expériences MS³ ont été remplacées par des expériences de CID en source afin de réaliser l'élimination du désoxyribose de l'adduit avant son injection dans le piège, puis de fragmenter les ions précurseurs [GIQ+H]⁺ lors d'expériences MS/MS. Ceci a permis d'améliorer la sensibilité de l'analyse en évitant les pertes d'ions lors du processus de piégeage au sein de la trappe d'ions.

En parallèle de ces recherches d'adduits covalents, d'éventuels autres adduits dont la formation aurait engendré la perte du désoxyribose en solution (équivalent au processus de dépurination sur l'ADN) ont également été recherchés. Cette recherche se justifiait d'autant plus que la formation d'un adduit dG-N7 avait été observée. En effet, la formation d'adduits en position N7 de dG est connue pour pouvoir induire des processus de dépurination, conduisant à la formation de sites abasiques sur l'ADN [3]. Cependant, aucun adduit sans désoxyribose n'a été observé au cours de ce travail, quel que soit le système AAH-désoxynucléoside étudié. A la vue de ces résultats, il semble que PhIP et IQ ne conduisent pas à la formation de sites abasiques en quantités détectables dans nos conditions expérimentales.

3. Gates K.S., Nooner T., Dutta S., *Chem. Res. Toxicol.*, **17** (2004) 839-856.

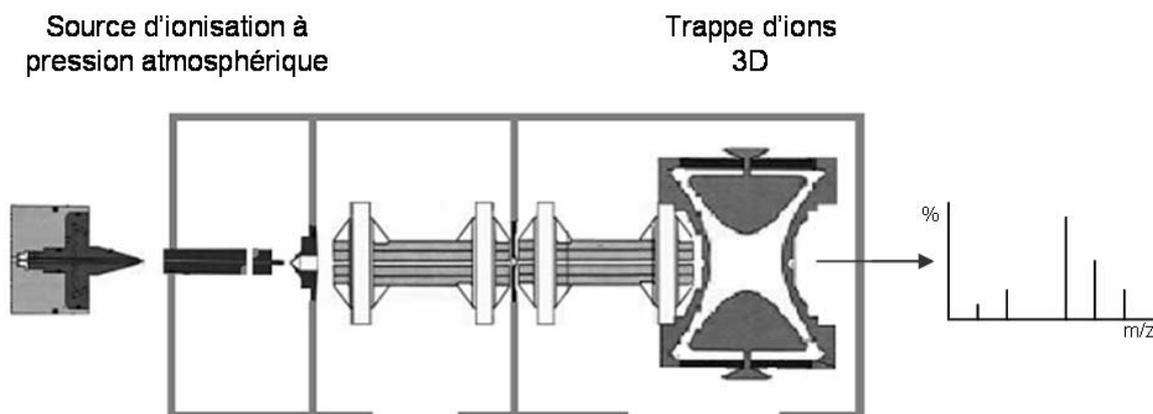


Figure 3. Schéma du spectromètre de masse LCQ® (documentation : Thermo Fisher).

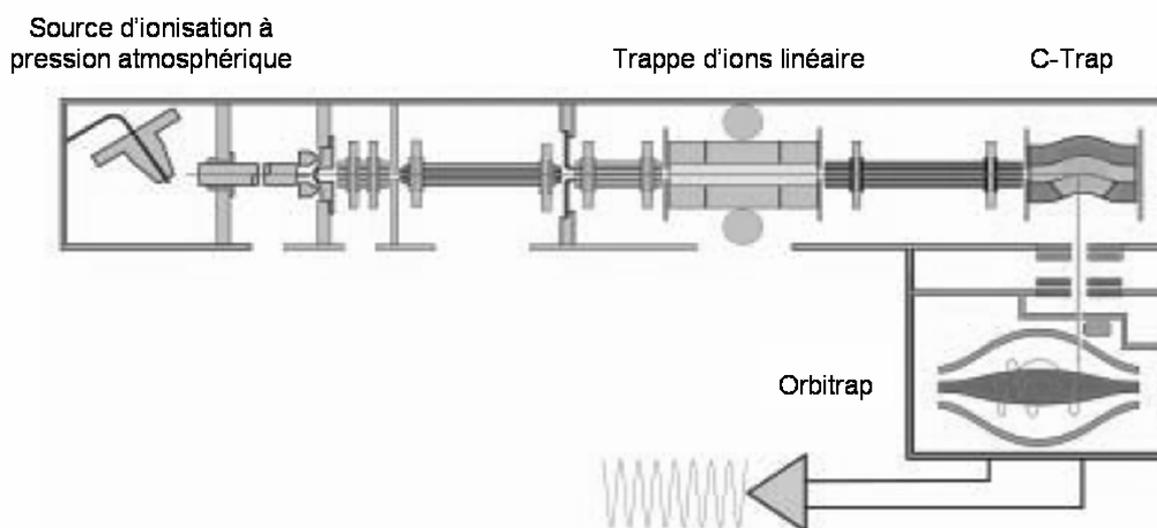


Figure 4. Schéma du spectromètre de masse hybride LTQ-Orbitrap® (documentation : Thermo Fisher).

II. 3 Caractérisation structurale des adduits désoxynucléosides - AAH

Afin de confirmer la structure des adduits synthétisés et détectés par LC-MS/MS, ces derniers ont été purifiés (lorsque les quantités formées le permettaient) par chromatographie en phase liquide en vue de les analyser par spectrométrie RMN. La chromatographie à des fins préparatives a été réalisée avec une colonne chromatographique possédant la même phase stationnaire que la colonne analytique mais avec un diamètre intérieur plus grand (c'est-à-dire 4 mm au lieu de 2 mm pour la colonne utilisée en couplage LC-MS) de façon à permettre l'injection de quantités de bruts réactionnels plus importantes sans saturation de la colonne. Les fractions collectées ont ensuite été évaporées à sec avant leur analyse par RMN réalisée dans les conditions expérimentales décrites dans l'article à la fin de ce

chapitre. Cependant, la technique de spectrométrie RMN n'a pas été suffisamment sensible pour confirmer la structure des adduits minoritaires malgré l'utilisation d'une sonde cryogénique. Des synthèses ont donc été réalisées avec une plus grande quantité initiale de réactifs afin d'obtenir une quantité plus importante d'adduits. La quantité maximale de réactifs utilisés ($\text{NO}_2\text{-PhIP}$ et NHOH-IQ) ayant été limitée pour des raisons de coût de ces substances, les quantités d'adduits formées sont restées insuffisantes pour une caractérisation structurale par RMN. Par conséquent, l'unique méthode de caractérisation structurale des adduits minoritaires a été la spectrométrie de masse. Pour ces raisons, une étude approfondie des fragmentations des différents adduits a été effectuée afin de proposer des mécanismes de formation pour les principaux fragments considérés comme caractéristiques des structures des adduits formés, en particulier au niveau des atomes de l'AAH et du désoxynucléoside impliqués dans la liaison covalente de l'adduit formé. Ces différents mécanismes sont également décrits dans l'Article 3 à la fin de ce chapitre. De plus, l'identité des fragments a pu être confirmée par la mesure de leur masse exacte grâce à l'utilisation d'un spectromètre de masse hybride haute résolution associant une trappe d'ions linéaire (LTQ[®]) et une Orbitrap[®] dont le schéma est présenté dans la Figure 4. L'ensemble des résultats obtenus sur l'étude systématique des adduits formés entre PhIP et IQ d'une part, et les quatre désoxynucléosides d'autre part sont décrits dans l'article présenté en fin de ce chapitre.

III Conclusions et perspectives

Suite à la mise au point des protocoles de formation *in vitro* des adduits AAH-désoxynucléosides par l'obtention d'adduits déjà décrits (dG-C8-PhIP, dG-C8-IQ et dG-N²-IQ), les paramètres analytiques ont été optimisés du point de vue de la séparation chromatographique des adduits et de leur analyse par spectrométrie de masse. De plus, deux adduits inconnus ont été détectés et identifiés (dG-N7-IQ et dA-N⁶-IQ) comme ceci est présenté dans le Tableau 1. Pour la première fois, un adduit entre une AAH et une base différente de la guanine a été caractérisé. La formation de cet adduit (dA-N⁶-IQ) pourrait permettre d'apporter des éléments d'explication concernant les mutations impliquant les nucléobases A ou T observées *in vivo* [4] qui ne peuvent pas à priori être expliquées par la formation des adduits dG-C8-IQ et dG-N²-IQ. De même, un adduit dG-N7-IQ a été identifié pour la première fois dans ce travail. La caractérisation de cet adduit permet d'éclaircir le mécanisme de formation de l'adduit majoritaire dG-C8-IQ. En effet, l'atome d'azote en position 7 constitue le site le plus nucléophile de la guanine et par conséquent représente potentiellement le site le plus réactif vis-à-vis du dérivé électrophile de IQ. Considérant que la formation d'adduits du type dG-N7 a déjà été décrite avec d'autres substances génotoxiques comme pouvant être à l'origine de l'adduit dG-C8 par réarrangement [5], cette étude permet également d'envisager que dans le cas de IQ, la formation de l'adduit dG-N7-IQ pourrait également être à l'origine de la formation de l'adduit dG-C8-IQ. Néanmoins, aucun adduit en position N7 de dG n'a pu être détecté pour PhIP dans notre travail. Ceci suppose que la réaction équilibrée entre l'adduit dG-N7 et l'adduit dG-C8 est plus déplacée vers la formation de l'adduit dG-C8 pour PhIP que pour IQ et/ou que le réarrangement de dG-N7-PhIP (s'il se forme) en dG-C8-PhIP est plus rapide que pour IQ. Cependant, il est à noter que des travaux très récents ont fait état de la formation d'une espèce pouvant correspondre à un adduit dG-N7-PhIP *in vivo* même si ce résultat mérite d'être confirmé par une identification structurale précise [6].

Tableau 1. Liste des adduits observés entre les désoxynucléosides et PhIP ou IQ.

adduit	C8	N ²	N ⁶	N7
dG	PhIP IQ	IQ	-	IQ
dA	-	-	IQ	-
dC ou dT	-	-	-	-

4. Kakiuchi H., Watanabe M., Ushijima T., Toyota M., Imai K., Weisburger J.H., Sugimura T., Nagao M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92** (1995) 910-914.
5. Humphreys W.G., Kadlubar F.F., Guengerich F.P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89** (1992) 8278-8282.
6. Goodenough A.K., Schut H.A.J., Turesky R.J., *Chem. Res. Toxicol.*, **20** (2007) 263-276.

Pour l'ensemble des adduits détectés, la structure a pu être établie de façon non ambiguë par l'utilisation de séquences MS³ ainsi qu'à l'aide de mesures de masse exacte effectuées sur les différents fragments, permettant leur confirmation au moyen de leur composition élémentaire. Une étude détaillée des fragmentations a été effectuée et des mécanismes de formation sont proposés pour la plupart des ions fragments observés. Pour certains adduits, la structure a également pu être confirmée par RMN.

Nos résultats présentés ci-après dans l'Article 3, vont dans le même sens que l'ensemble des données de la littérature et semblent indiquer que la formation d'adduits avec PhIP et IQ n'induit pas de dépurination et par conséquent que ces AAH ne forment pas de site abasique avec l'ADN ce qui pose la question des effets biologiques de la formation d'adduits avec les AAH. En effet, sur la base de travaux effectués sur les catéchols œstrogènes et les hydrocarbures aromatiques polycycliques, il a été postulé par Cavalieri que seuls les adduits dépurinants seraient cancérigènes alors que les adduits stables n'induisaient pas de tumeurs chez les rongeurs [7]. De même, l'aflatoxine B1, qui est une substance cancérigène pour l'Homme, forme majoritairement des adduits en position N7 de la guanine induisant des dépurinations [8]. Cependant, les arylamines, et en particulier le 2-acétylamino-fluorène, qui sont également des composés cancérigènes, forment uniquement des adduits stables en position N² et C8 de la guanine [9, 10]. Ainsi, la question des effets biologiques induits par le type d'adduit formé est très complexe et semble dépendre du type de substance étudiée. Bien qu'il soit reconnu que ces cancers soient induits dans tous ces cas par la formation d'adduits, les relations entre développement de cancers et formation d'adduits ne sont pas encore clairement établies [11].

L'un des objectifs de cette étude était également de générer des adduits modèles permettant ultérieurement le développement de méthodologies de détection de ces mêmes adduits générés *in vivo*. En effet, deux nouveaux adduits ont été caractérisés au cours de cette étude démontrant que leur formation était chimiquement possible. Néanmoins, il reste nécessaire de démontrer qu'ils peuvent également se former *in vivo*, bien que nos conditions expérimentales étaient proches des conditions biologiques. Les adduits dG-C8-PhIP, dG-C8-IQ et dG-N²-IQ ont déjà été caractérisés *in vivo* comme ceci a été mentionné dans le

7. Cavalieri E.L., Stack D.E., Devanesan P.D., Tudorovic R., Dwivedy I., Higginbotham S., Johansson S.L., Patil K.D., Gross M.L., Gooden J.K., Ramanathan R., Cerny R.L., Rogan E.G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94** (1997) 10937-10942.
8. Bedard L.L., Massey T.E., *Cancer Lett.*, **241** (2006) 174-183.
9. Shibutani S., Gentles R., Johnson F., Grollman A.P., *Carcinogenesis*, **12** (1991) 813-818.
10. Verna L., Whysner J., Williams G.M., *Pharmacol. Ther.*, **71** (1996) 83-105.
11. Sander M., Cadet J., Casciano A., Galloway S.M., Marnett L.J., Novak R.F., Pettit S.D., Preston R.J., Skare J.A., Williams G.M., Van Houten B., Gollapudi B.B., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **208** (2005) 1-20.

Chapitre 1. Ainsi, une des perspectives de ce travail sera d'appliquer cette méthode de détection des adduits par LC-MS/MS à leur caractérisation à partir de modèles biologiques. Les adduits à l'ADN ainsi générés seront dans un premier temps isolés par digestion enzymatique sous forme de désoxynucléosides modifiés, puis analysés dans un deuxième temps par LC-MS/MS ou nanoLC-MS/MS afin d'augmenter la sensibilité de détection. Une telle méthode permettrait également d'utiliser les adduits détectés comme biomarqueurs de risque de développement de tumeurs induites par les AAH comme ceci a été proposé par Turesky et Vouros [2]. Néanmoins, ceci nécessiterait soit un prélèvement d'échantillons invasif par biopsie, soit un prélèvement buccal comme ceci a été réalisé chez les fumeurs [12]. De plus, la corrélation entre les quantités d'adduits formés et le risque de développer un cancer n'est pas forcément possible avec des substances absorbées à faibles doses [11]. En réalité, ce genre de méthodologie impliquant la corrélation quantitative entre le nombre d'adduits et le développement de tumeurs est plus adapté aux études de génotoxicité et/ou de cancérogenèse réalisées sur des modèles biologiques.

Notons enfin que les relativement faibles rendements de formation des adduits minoritaires observés *in vitro* au cours de ce travail ne signifient pas forcément que la formation de ces adduits est sans conséquence *in vivo*. En effet, les effets biologiques d'une substance ne représentent pas nécessairement une fonction quantitative des adduits formés [13]. Ces adduits peuvent être plus ou moins bien réparés et peuvent engendrer plus ou moins de mutations comme ceci a été décrit dans le Chapitre 1. De plus, les rendements de formation d'adduits à l'ADN ne sont pas équivalents aux rendements de formation des adduits avec les désoxynucléosides. L'ADN est une macromolécule dans laquelle les bases sont appariées par des liaisons hydrogènes compliquant ainsi l'approche des substances génotoxiques par des effets d'encombrement stérique entre autres. De même, l'environnement local des bases ciblées, comprenant les bases adjacentes sur la séquence nucléotidique et les bases complémentaires, entraîne potentiellement une orientation préférentielle de la formation des adduits par une stabilisation des espèces intermédiaires impliquées dans les mécanismes de formation des adduits. Ainsi, la formation, la réparation et les erreurs de réplication, induisant des mutations sont plus ou moins influencées par l'environnement de la base ciblée par des substances formant des adduits à l'ADN. C'est pourquoi, les procédures de synthèse mises au point avec les adduits formés entre les AAH et les désoxynucléosides ont été étendues à l'étude de la formation d'adduits avec des oligonucléotides modèles afin d'étudier l'influence de l'environnement local de la modification sur la formation des adduits qui est présentée dans le chapitre suivant.

12. Stone J.G., Jones N.J., McGregor A.D., Waters R., *Cancer Res.*, **55** (1995) 1267-1270.

13. Nagao M., *Mutat. Res.*, **431** (1999) 3-12.

IV Article 3

New insights in the formation of deoxynucleoside adducts with 2-amino-6-phenyl-1-methylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) and 2-amino-3-methyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ).

Emilien L. Jamin¹, Delphine Arquier¹, Cécile Canlet¹, Estelle Rathahao²,
Jacques Tulliez¹, Laurent Debrauwer¹

Journal of the American Society for Mass Spectrometry

accepté le 12/06/07

¹ UMR 1089 Xenobiotiques INRA-ENVT, 180 Chemin de Tournefeuille, 31931 TOULOUSE Cedex 9, France

² INRA/INA P-G, Laboratoire de Chimie Analytique UMR 0214 – IAQA, AgroParisTech, 16 rue Claude Bernard, 75231 Paris Cedex 05, France

Abstract

The formation of adducts by reaction of two heterocyclic aromatic amines (PhIP and IQ) at nucleophilic sites of deoxynucleosides has been studied by LC-MSⁿ analyses of the obtained reaction mixtures. Sequential MS³ experiments were carried out on an ion trap mass spectrometer in order to get extensive structural information of each adduct detected in the first MS step. High resolution mass measurements were also achieved allowing the confirmation of fragment ions by means of their elemental composition. Five different adducts have been characterized in this study, among which two are new compounds, namely dG-N7-IQ and dA-N⁶-IQ. No depurinating adduct was found in the reactions investigated therein. As expected, the C8 and N² atoms of dG were found as the most reactive sites of deoxynucleosides, resulting in the formation of two different adducts with IQ and one adduct with PhIP. An unusual non-depurinating dG-N7-IQ adduct has been characterized and a mechanism is proposed for its formation on the basis of the reactivity of arylamines. A dA-N⁶-IQ adduct has been identified for the first time in this work, showing that HAAs can generate DNA adducts with other bases than dG. For all the five adducts, new information is provided by a detailed study of their fragmentation. Fragmentation mechanisms are proposed for each ion of structural interest, supported by high resolution mass measurements.

Introduction

Among all possible DNA modifications inducing mutations and cancer initiations, the formation of covalent adducts with DNA bases represents one of the most significant [1, 2]. For some genotoxic substances, such as heterocyclic aromatic amines (HAAs), the formation of DNA adducts is at present the only way to explain their mutagenic and carcinogenic properties observed in laboratory animals [3, 4]. HAAs are produced during the cooking of meats from proteins, amino acids, creatin(in)e and carbohydrates either by radical mechanisms or via the Maillard reaction [5, 6]. Indeed, HAAs have been characterized in all kinds of meats cooked by most of heating processes and human consumers are therefore daily exposed to these genotoxic compounds via their diet at estimated amounts around 15 µg per person and per day [7]. The most abundant HAA, 2-amino-6-phenyl-1-methylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP), is produced at concentrations of dozens nanograms per gram of cooked meats while other HAAs are formed at concentrations of few ng.g⁻¹ or less [8]. Following their food intake absorption, HAAs are metabolized in liver by phase I cytochromes P450 enzymes (CYP1A1, CYP1A2, etc.) into *N*-hydroxy-HAAs. If these metabolites are not deactivated, phase II metabolic enzymes, such as *N*-acetyltransferase, can generate esters of *N*-hydroxy-HAAs derivatives. Finally, the heterolytic cleavage of the N-O bond of these latter produces arylnitrenium ions which are highly electrophilic species

able to react with nucleophilic sites of cellular macromolecules (proteins, DNA) and form covalent adducts [9, 10].

Numerous analytical techniques have been used to characterize DNA adducts like ^{32}P -postlabeling, immunochemical methods, fluorescence or mass spectrometry [11]. Although mass spectrometry is relatively less sensitive than ^{32}P -postlabeling for DNA adducts detection, this analytical method is more selective, quantitative [12] and above all, allows the structural determination of adducts. Most of the techniques cited above have been used to characterize adducts formed between DNA and HAAs. Major HAA-DNA adducts thus characterized involved the C8 carbon atom of guanine linked to the primary amine function of various HAAs, forming dG-C8-HAA adducts [13]. Besides these major adducts, minor ones have also been described between IQ or MeIQx and the primary amine function of guanine, thus constituting dG-N²-HAA adducts [13].

Powerful analytical methods mainly based on capillary HPLC or capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry have been developed for the characterization of these structurally known adducts formed *in vivo*. However, although analytical systems have been dramatically improved, no work has revisited the adduct formation between HAAs and deoxynucleosides in the past decade [14]. Therefore, we present in this work a systematic investigation on HAA-deoxynucleoside adduct formation by assessing the reactivity of the four deoxynucleosides (dG, dA, dC and dT) with PhIP and IQ which structures are reported in Figure 1. Adducts syntheses have been performed between PhIP, or IQ, and each of the four deoxynucleosides. Syntheses protocols were achieved as much as possible under conditions similar to biological environment to produce realistic adducts. Crude reaction solutions were analyzed by mass spectrometry coupled to high performance liquid chromatography to detect HAA adducts and characterize their structures using ion trap MSⁿ sequences as well as high resolution mass measurements of fragment ions. When synthesized amounts of adducts were sufficient, Nuclear Magnetic Resonance (NMR) was used to confirm the structures established by mass spectrometry.

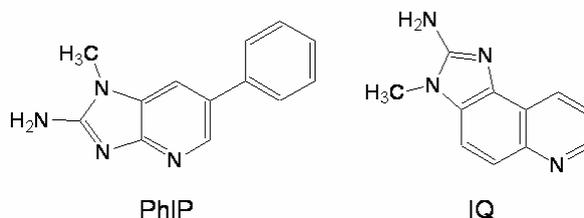


Figure 1. Structures of 2-amino-6-phenyl-1-methylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) and 2-amino-3-methyl-3*H*-imidazo[4,5-*f*]quinoline (IQ).

Experimental

Reagents

NO₂-PhIP and NHOH-IQ were purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). Deoxynucleosides (dG, dA, dC, et dT), EDTA, Pd/C and hydrazine came from Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Acetic anhydride was from Prolabo (Paris, France), NaH₂PO₄ and DMSO from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France) and THF from Accros (Gee, Belgium). HPLC-grade organic solvents were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain). Water was obtained by a Milli-Q system (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France). Bond Elut C18 cartridges were from Varian (Les Ulis, France).

Adducts Syntheses

Synthesis of PhIP-deoxynucleoside adducts was based on published data [15, 16, 17]. Briefly, 0.5 mg of NO₂-PhIP was dissolved in 2 mL of anhydrous THF in the presence of Pd/C 10% (2 mg). The reaction mixture was placed at 0°C under magnetic stirring and argon. 10 µL of hydrazine hydrate were added slowly in order to keep the temperature below 5°C. After 40 min, 10 mL of cold and purged EDTA (10 mM, pH 4.6) was added to the reaction mixture. NHOH-PhIP thus obtained was then purified on a Bond Elut C18 cartridge (200 mg, 3 mL) prewashed with one bed volume of MeOH followed by one bed volume of EDTA buffer (10 mM, pH 4.6). Retained substances were washed with 2 bed volumes of EDTA buffer, and eluted with 1 volume of purged DMSO/MeOH 4/1 v/v. This solution was directly reacted with acetic anhydride (11.3 µL) and allowed to proceed for 10 min at 0°C under argon to produce the AcO-PhIP derivative. Deoxynucleoside (2.10⁻⁶ mol) dissolved in 10 mL of purged NaH₂PO₄/EDTA buffer (100 mM/100 µM, pH 7) was finally added and reaction proceeded for 1 h at 37°C under argon atmosphere. Crude reaction mixtures containing PhIP adducts were stored at -80°C under argon until analysis.

Deoxynucleosides adducts of IQ were prepared according to a previously described protocol [14]. *N*-hydroxy-IQ (100 µg) was directly reacted with 2-fold molar excess of deoxynucleosides dissolved in 2.5 mL of NaH₂PO₄/EDTA (100 mM/100 µM, pH 7) in the presence of acetic anhydride (1.3 µL). The reaction mixture was warmed at 37°C during 3 h 30 under magnetic stirring and argon. Crude reaction solutions containing IQ adducts were then stored at -80°C under argon until analysis.

High Performance Liquid Chromatography

LC separation of deoxynucleosides adducts was performed on a Thermo Separation P1500 pump (Thermo Fisher, Les Ulis, France). The LC column used was an Ultrabase C18 (250 × 2.1 mm, 5 µm) from SFCC (Eragny, France) and 100 µL of crude reaction solutions

were injected. Optimal separation was achieved at a flow rate of 0.2 mL.min⁻¹ using the following mobile phase composition : A H₂O/MeOH/AcOH 90/10/0.2 v/v/v and B H₂O/MeOH/AcOH 10/90/0.2 v/v/v. The following gradient elution was used for PhIP adducts : 0-3 min from 0 to 75 % B, 3-16 min 75 % B, 16-17 min from 75 to 100 % B, 17-20 min 100 % B. Optimal separation conditions of IQ adducts were : 0-1 min from 0 to 14 % B, 1-14 min 40 % B, 14-15 min from 40 to 100 % B, 15-24 min 100 % B. The same LC system was used for adduct purification for NMR analyses by collecting the fractions of interest.

Structural Analyses

The HPLC system was coupled to an LCQ ion trap mass spectrometer (Thermo Fisher, Les Ulis, France) equipped with an ESI source operating in the positive mode and using the following conditions : needle voltage 3.4 kV; heated capillary temperature 220°C; capillary voltage 33 V. Multiple MS experiments (MSⁿ) were achieved using helium as collision gas, an isolation width of precursor ions of 1.5 Da and an activation time of 30 ms. All experiments were carried out under automatic gain conditions.

Exact mass measurements of fragment ions obtained by MS³ sequential experiments were achieved on a LTQ-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher, Les Ulis, France) fitted with an ESI ion source. The following conditions were used : needle voltage 5 kV; heated capillary temperature 250°C; capillary voltage 50 V. Multiple MS experiments (MSⁿ) were achieved using helium as collision gas, an isolation width of precursor ions of 2 Da and an activation time of 30 ms.

NMR experiments were performed on a Bruker Avance DRX-600 spectrometer (Wissembourg, France) operating with a proton resonance frequency of 600.13 MHz and fitted with a triple cryogenic probe ¹H-¹³C-¹⁵N. Adduct samples were dissolved in MeOD or CDCl₃.

Results and Discussion

PhIP-deoxynucleosides adducts

The first synthesis involving the *N*-hydroxy-PhIP derivative was performed with guanine in order to validate our synthesis protocol by producing the already known dG-C8-PhIP adduct [13]. The solution obtained after reaction of NHOH-PhIP with dG was analyzed by LC-MS. The resulting chromatogram displayed in Figure 2a, showed the occurrence of a compound with an *m/z* ratio of 490 corresponding to that of the expected adduct. Moreover, an MS/MS experiment performed on this precursor ion showed the formation of a major fragment ion at *m/z* 374 (Figure 2b) resulting from a neutral loss of deoxyribose which is a common feature for deoxynucleosides adducts and is usually employed for adducts detection

[12, 18]. This loss of 116 u demonstrates that the m/z 490 precursor contains a deoxynucleoside moiety and therefore, that this ion represents an adduct involving PhIP and dG, probably dG-C8-PhIP. The production yield of this adduct was 30 %, estimated from peak integration after MS detection.

The structure of this adduct, was further investigated by sequential MS³ experiments built-up by selecting the precursor ion [GPhIP+H]⁺ at m/z 374. According to the fragment ions observed on the MS³ spectrum presented in Figure 2c as well as to previously published data on dG-C8 adducts fragmentation [18, 19, 20, 21, 22], the following attribution could be made, further supported by elemental composition of fragment ions obtained by exact mass measurements performed on an LTQ-Orbitrap hybrid instrument and reported in Table 1. The first fragment observed shows a loss of 17 u in agreement with the elimination of NH₃ likely occurring at the primary amine function of G or from the intracyclic nitrogen atom at position 1 of guanine [19]. Losses of CH₂N₂ and CHNO are consistent with the formation of the m/z 332 and m/z 331 fragment ions, and signals observed at m/z 329, m/z 304, m/z 302 can be attributed to the consecutive losses of respectively NH₃ + CO, CH₂N₂ + CO, and NH₃ + CO + HCN. The m/z 289 ion corresponds to a structure involving PhIP and the imidazole moiety of guanine. All these fragment ions only demonstrate that PhIP is bonded to the imidazole moiety of dG and their structures have been described in a very recent work published by Goodenough *et al.* [23]. However, they do not allow the precise identification of atoms involved in the covalent bond between dG and PhIP. On the other hand, additional fragment ions provide information about the linking of the deoxynucleoside with the HAA. For these fragment ions, some mechanisms of formation are proposed in Scheme 1. The m/z 262 fragment ion may result of consecutive rearrangements from the m/z 304 ion, leading to a loss of CH₂N₂ from the imidazole moiety of dG as indicated in Scheme 1a. After an heterolytic cleavage, a 6 centers rearrangement can explain the formation of the m/z 250 ion (Scheme 1b). The minor m/z 235 and m/z 140 complementary ions could originate in an ion dipole complex which can be formed by the mechanism suggested in Scheme 1c, and proves that PhIP is bonded to the C8 atom of dG. Finally, the m/z 223 ion can be attributed to the PhIP moiety which can be released after fragmentation of the dG imidazole ring into neutral fragments (Scheme 1d).

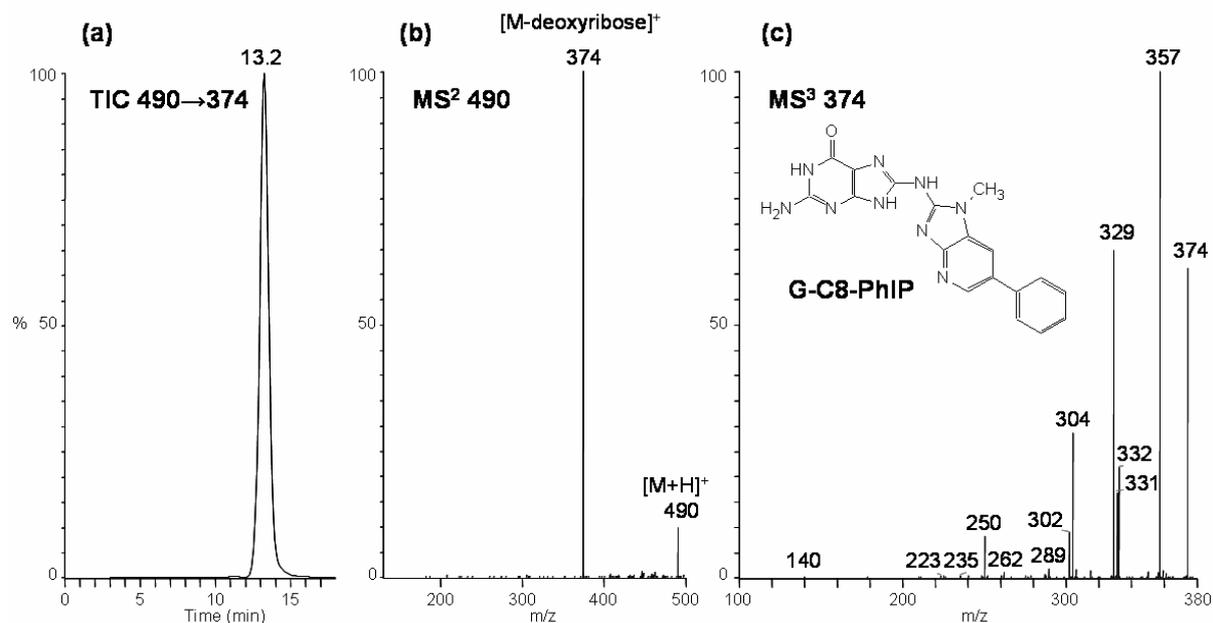
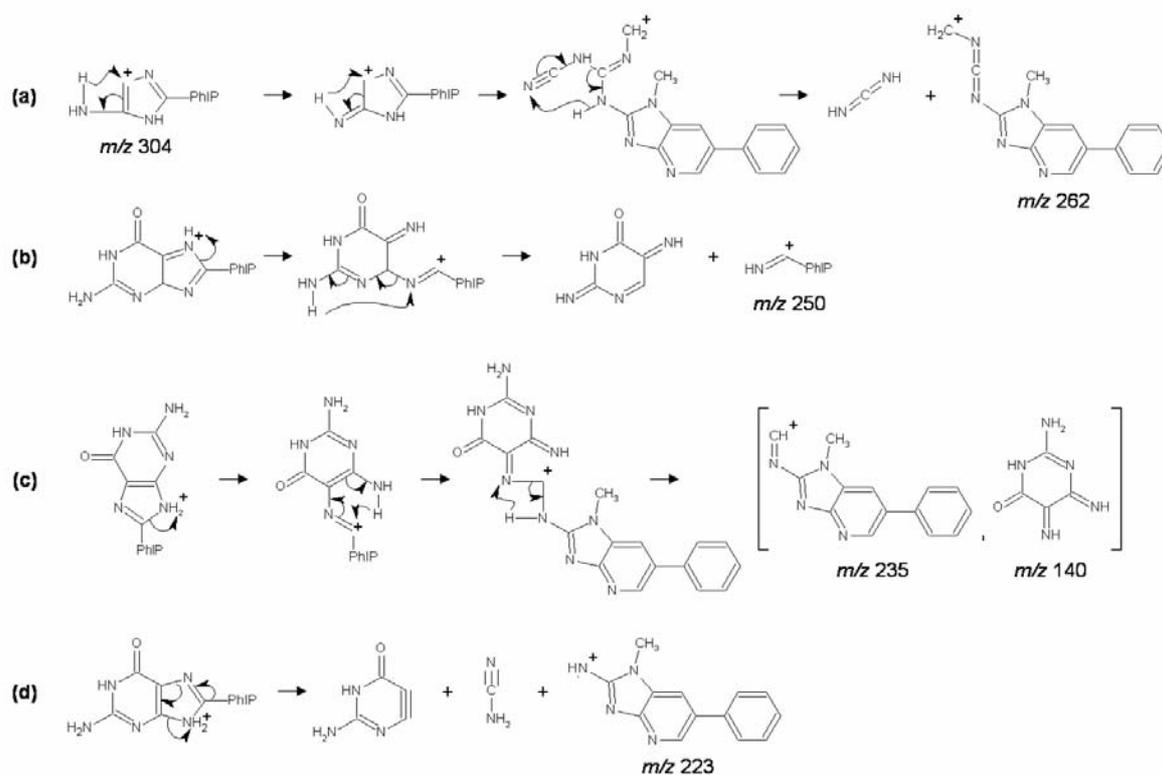


Figure 2. LC-MS/MS of sample obtained by reaction between PhIP and dG : (a) total ion current chromatogram of m/z 490 losing a deoxyribose, (b) MS^2 and (c) MS^3 spectra of dG-C8-PhIP.



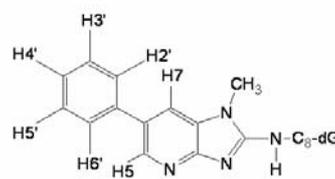
Scheme 1. Formation mechanisms proposed for fragment ions observed in the MS^3 spectrum of the dG-C8-PhIP adduct.

Table 1. Exact mass measurements of MS³ fragment ions of dG-C8-PhIP.

Ion	Elemental Composition	Measured mass	Theoretical mass	Delta (ppm)
374	C ₁₈ H ₁₆ O ₇ N ₉	374.14806	374.14778	0.75
357	C ₁₈ H ₁₃ O ₇ N ₈	357.12131	357.12123	0.22
332	C ₁₇ H ₁₄ O ₇ N ₇	332.12620	332.12598	0.66
331	C ₁₇ H ₁₅ N ₈	331.14223	331.14197	0.79
329	C ₁₇ H ₁₃ N ₈	329.12656	329.12632	0.73
304	C ₁₆ H ₁₄ N ₇	304.13128	304.13107	0.69
302	C ₁₆ H ₁₂ N ₇	302.11566	302.11542	0.79
289	C ₁₆ H ₁₃ N ₆	289.12017	289.12036	0.66
262	C ₁₅ H ₁₂ N ₅	262.10938	262.10927	0.42
250	C ₁₄ H ₁₂ N ₅	250.10924	250.10927	0.12
235	C ₁₄ H ₁₁ N ₄	235.09838	235.09837	0.04

Although some diagnostic ions were obtained for characterizing the involvement of the C8 atom of guanine in the adduct linking, no information was available on the MS³ spectrum concerning the atom of PhIP bonded to the guanine. Therefore, this adduct was analyzed by NMR after purification by chromatography, and chemical shifts displayed in Figure 3 confirmed the structure of dG-C8-PhIP with a covalent bond between G and the primary amine function of PhIP [15]. This could be expected since this latter function was chemically activated in the synthesis protocol. Recently, an additional minor dG-PhIP adduct was detected *in vivo* from liver and colon of rats exposed to PhIP, and accounted for a few percent of the total amount of dG-PhIP adducts [23]. Although no exact structure could be determined for this adduct, plausible dG-N7-PhIP and isomeric dG-C8-PhIP structures were hypothesized. The occurrence of such an adduct could not be evidenced in this work with PhIP but a similar minor adduct was evidenced in the reaction of dG with IQ and is discussed later in this paper.

Proton	δ H (ppm)
N-CH3	3.64
H4'	7.34
H5'/H3'	7.46
H6'/H2'	7.74
H7	8.19
H5	8.38



The chemical structure shows a guanine base (left) linked at the C8 position to a phenyl ring (right). The phenyl ring has a methyl group (CH₃) at the para position and a hydrogen atom (H) at the ortho position. Protons are labeled as follows: H3' and H4' on the phenyl ring; H5' and H6' on the guanine base; H2' and H7 on the guanine base; and H5 on the guanine base. The methyl group is labeled N-CH₃.

Figure 3. Chemical shifts of dG-C8-PhIP obtained by proton NMR spectrometry.

No detectable amount of adduct could be evidenced in the LC-MS/MS analysis of reaction mixtures produced from *N*-hydroxy-PhIP and dA, dC or dT. Finally, a reaction involving *N*-hydroxy-PhIP and an equimolar mixture of the 4 deoxynucleosides was achieved to investigate potential effects of other deoxynucleosides. dG-C8-PhIP amounts obtained by

this way were in good agreement with those obtained with dG alone, demonstrating that the formation of dG-C8-PhIP was not affected by other deoxynucleosides in solution.

IQ-deoxynucleosides adducts

In a similar way as with PhIP, reactions were carried out with *N*-hydroxy-IQ and deoxynucleosides. Thus, the solution obtained after the reaction of NHOH-IQ with dG was analyzed by LC-MSⁿ. The chromatogram presented in Figure 4a shows the occurrence of three different compounds at *m/z* 464, in agreement with the expected mass of dG-IQ adducts. Furthermore, the CAD spectra of these precursor ions all displayed a unique fragment ion corresponding to a loss of deoxyribose demonstrating that the three compounds were dG-IQ adducts. Two of them, *i.e.* dG-IQ adducts eluting at 12.0 and 20.2 min, could be identified as the already described dG-N²-IQ and dG-C8-IQ adducts, respectively. Estimated reaction yields were 30 % for the major dG-C8-IQ adduct and 4 % for the most polar dG-N²-IQ adduct. The third dG-IQ adduct eluted at 15.9 min and corresponded to a new compound formed with a yield below 1%.

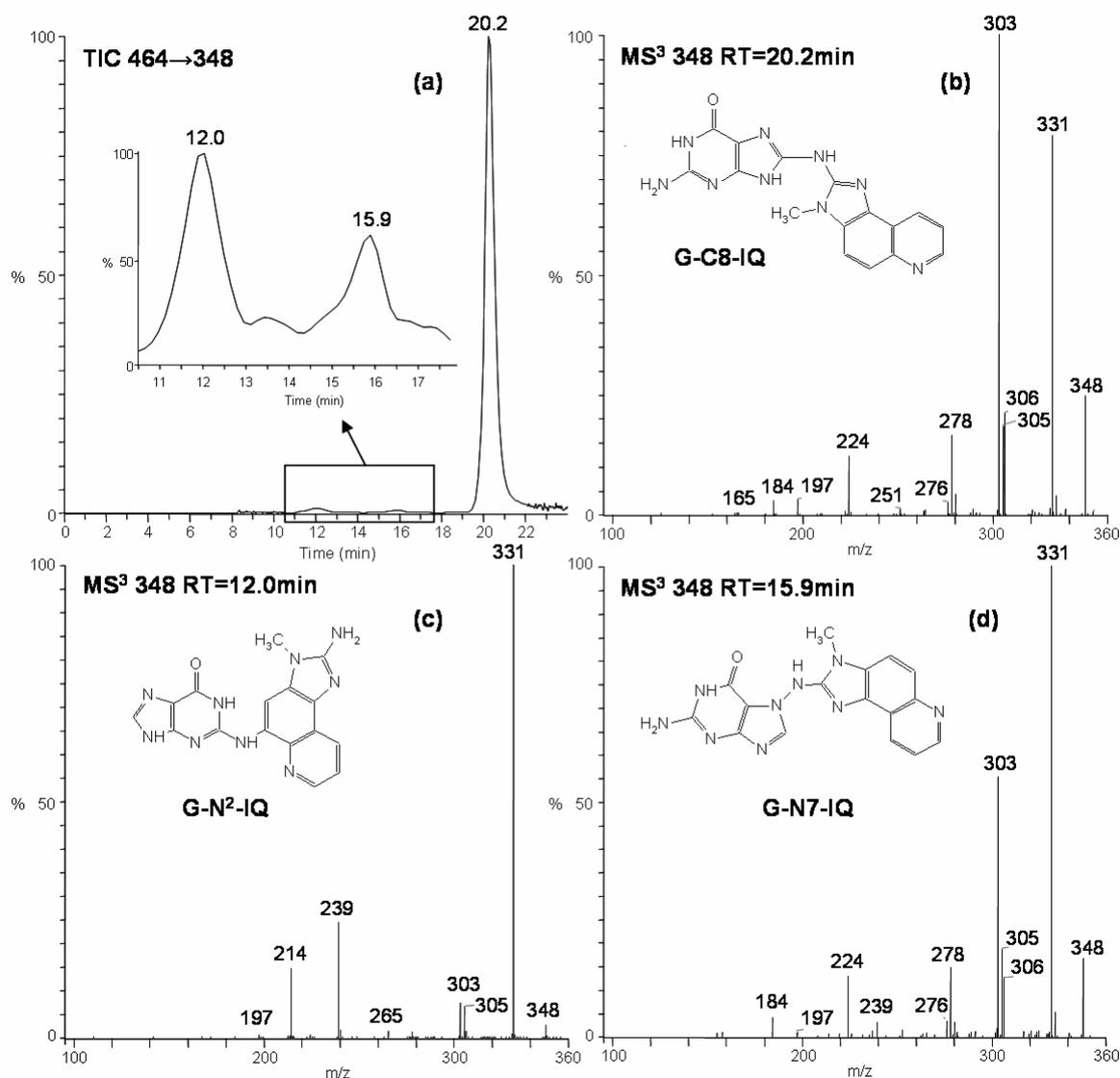
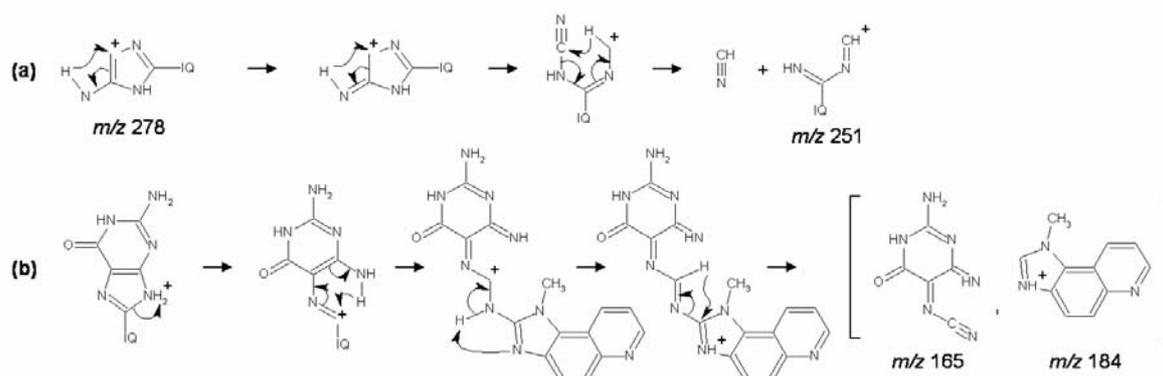


Figure 4. LC-MS/MS of sample obtained by reaction between IQ and dG : (a) total ion current chromatogram of m/z 464 losing a deoxyribose, and MS³ spectra of (b) dG-C8-IQ, (c) dG-N²-IQ and (d) dG-N7-IQ.

The chromatographic peak observed at RT = 20.2 min in Figure 4a represents the major and the less polar adduct, which could fit dG-C8-IQ properties [20, 21]. Furthermore, the MS³ spectrum of the [GIQ+H]⁺ precursor ion at m/z 348 selected from this peak and presented in Figure 4b displays the same fragmentation pathways as dG-C8-PhIP already discussed in the first part of this paper. Indeed, m/z 331, 306 and 305 ions are produced by elimination of NH₃, CH₂N₂ and CHNO, respectively. In the same way as dG-C8-PhIP, consecutive losses of NH₃ and CO lead to the m/z 303 ion, whereas CH₂N₂ and CO consecutive eliminations lead to the m/z 278 fragment ion. The formation of the m/z 276 ion can be explained by successive eliminations of NH₃, CO and HCN from the m/z 348 precursor ion. Although the m/z 278 ion possesses the same kind of structure as the m/z 304 ion formed in the case of PhIP (see Scheme 1a), it displays a different behavior since no

CH_2N_2 loss is observed from the m/z 278 ion in the case of IQ (*i.e.* no fragment ion at m/z 236 on Figure 4b). Alternatively, the occurrence of a fragment ion at m/z 251 (Figure 4b) may be explained considering the elimination of HCN from the m/z 278 ion, according to a mechanism proposed in Scheme 2a. The m/z 224 fragment ion can be generated by a heterolytic cleavage followed by a 6 centers rearrangement occurring in a way as the m/z 250 ion for dG-C8-PhIP (see Scheme 1b). The m/z 197 ion corresponds to the IQ moiety just like the m/z 223 ion for dG-C8-PhIP described in Scheme 1d. Starting from the m/z 348 precursor ion, the formation of the two complementary fragment ions at m/z 165 and m/z 184 may result from the dissociation of an ion-dipole complex which can be formed according to successive rearrangements as proposed in Scheme 2b. The m/z 184 ion is of particular interest since it can be considered as diagnostic of the linkage of IQ to dG via its exocyclic primary amine function. As for dG-C8-PhIP, all these fragment ions were further confirmed by exact mass measurements performed on the Orbitrap mass spectrometer which are reported in Table 2.



Scheme 2. Formation mechanisms proposed for different fragment ions than dG-C8-PhIP observed in the MS^3 spectrum of the dG-C8-IQ.

Table 2. Exact mass measurements of MS^3 fragment ions of dG-C8-IQ.

Ion	Elemental Composition	Measured mass	Theoretical mass	Delta (ppm)
348	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_7\text{N}_9$	348.13222	348.13213	0.26
331	$\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{O}_7\text{N}_8$	331.10564	331.10558	0.18
306	$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_4\text{N}_7$	306.11031	306.11033	0.07
305	$\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_8$	305.12631	305.12632	0.03
303	$\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_8$	303.11076	303.11067	0.30
278	$\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{N}_7$	278.11541	278.11542	0.04
276	$\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_7$	276.09991	276.09977	0.51
251	$\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_6$	251.10453	251.10452	0.04
224	$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{N}_5$	224.09348	224.09362	0.62
197	$\text{C}_{11}\text{H}_9\text{N}_4$	197.08256	197.08272	0.81
184	$\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_3$	184.08723	184.08747	1.30

Taking into account its formation yield, this IQ adduct could also be analyzed by NMR to confirm the atom of IQ involved in the covalent bond with the C8 carbon atom of dG. The chemical shifts observed for IQ protons are reported in Figure 5. These data are in good agreement with published results [14], and confirm that the primary amine function of IQ is bonded to the guanine moiety.

Proton	δ H (ppm)
N-CH3	4.34
H4	8.16
H5	8.11
H7	9.03
H8	7.75
H9	8.94

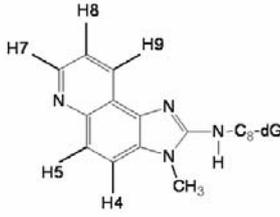
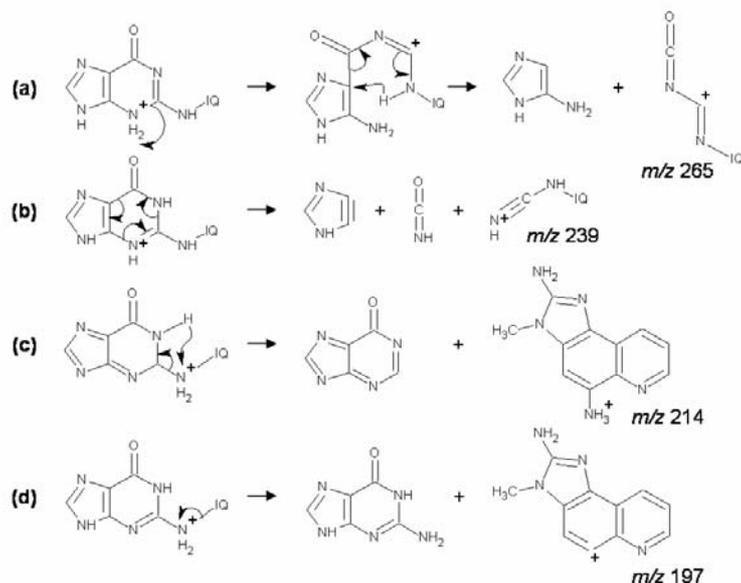


Figure 5. Chemical shifts of dG-C8-IQ obtained by proton NMR spectrometry.

The mass spectrum resulting from the MS³ analysis of the adduct eluting at RT = 12.0 min is reported in Figure 4c, and the elemental composition of the various fragment ions determined by HRMS is reported in Table 3. From these data, it appears that the *m/z* 331 ion is the result of a loss of NH₃ which can occur either from the primary amine function of IQ or from an intracyclic nitrogen atom of dG [19]. Contrarily to dG-C8-IQ, no abundant loss of 42 u leading to the *m/z* 306 fragment ion is observed in Figure 3c indicating that the elimination of CH₂N₂ from the pyrimidinone moiety of dG is unfavorable. Conversely, the presence of the *m/z* 305 ion can be attributed to a loss of CHNO from the selected *m/z* 348 parent ion, suggesting that the dG-IQ bond does not involve the N1 nitrogen atom or the O⁶ oxygen atom of dG. On the MS³ spectrum presented in Figure 4c, four fragment ions provide information on the dG-HAA linking site, namely the *m/z* 265, 239, 214 and 197 ions. For these ions, formation mechanisms are proposed in Scheme 3. The two fragment ions observed at *m/z* 265 and *m/z* 239 can originate in two different 6 centers rearrangements presented in Scheme 3a and 3b respectively, and confirm that IQ is not linked to the imidazole moiety of dG. On the other hand, a four centers rearrangement can explain the formation of the *m/z* 214 ion as proposed in Scheme 3c. This latter ion corresponds to the IQ moiety bearing an additional primary amine function coming from the exocyclic nitrogen atom of dG. This fragment ion may be considered as diagnostic of the linking of IQ to the exocyclic N² nitrogen atom of dG. Finally, as in the case of dG-C8-IQ, the *m/z* 197 ion representing the IQ moiety, is also observed (Scheme 3d). Although diagnostic ions allowed to evidence the involvement of the N² nitrogen atom of dG in the bonding with IQ, no information was available for identifying the atom of IQ involved into the covalent bond with of the adduct. However, the formation of dG-N²-IQ adduct has already been reported with the structure

indicated in Figure 4c. The formation of such an adduct was explained considering a covalent bond formation between the N² nitrogen atom of dG and the C5 carbon atom of IQ after charge delocalization of the initial arylnitrenium ion [14].



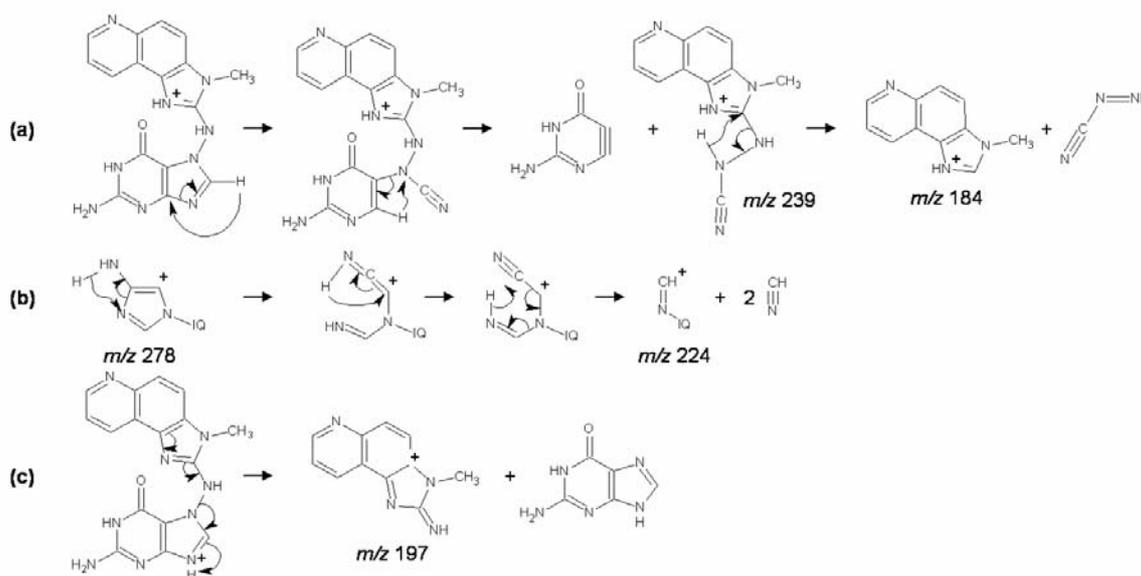
Scheme 3. Formation mechanisms proposed for fragment ions observed in the MS³ spectrum of the dG-N²-IQ adduct.

Table 3. Exact mass measurements of MS³ fragment ions of dG-N²-IQ.

Ion	Elemental Composition	Measured mass	Theoretical mass	Delta (ppm)
348	C ₁₆ H ₁₄ O ₁ N ₉	348.13215	348.13213	0.06
331	C ₁₆ H ₁₁ O ₁ N ₈	331.10553	331.10558	0.15
305	C ₁₅ H ₁₃ N ₈	305.12642	305.12632	0.33
265	C ₁₃ H ₉ O ₁ N ₆	265.08372	265.08378	0.23
239	C ₁₂ H ₁₁ N ₆	239.10435	239.10452	0.71
214	C ₁₁ H ₁₂ N ₅	214.10907	214.10927	0.93

A third dG-IQ adduct was also detected at RT = 15.9 min (Figure 4a) and was also submitted to MS³ experiments, yielding the spectrum presented in Figure 4d. The *m/z* 331 and 303 fragment ions can find their origin in a loss of NH₃ and in consecutive losses of NH₃ and CO, respectively. Peaks observed at *m/z* 306, 305, 278 and 276 come respectively from CH₂N₂, CHNO, CH₂N₂ + CO and NH₃ + CO + HCN losses, demonstrating that IQ is linked to the imidazole moiety of dG. Indeed, the CID mass spectrum of this adduct (Figure 4d) is very similar to that of dG-C8-IQ (Figure 4b) which also represents an adduct with a linkage of IQ to the imidazole moiety of dG. Taking a look to the structure of dG, the only possibilities for this nucleoside to covalently bind to an electrophilic species via its imidazole moiety are the C8 carbon atom and the N7 nitrogen atom. Thus, this new dG-IQ adduct must be dG-N7-IQ.

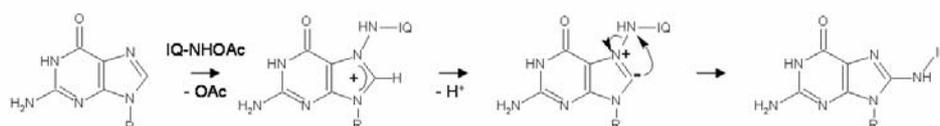
Considering such a structure, mechanisms can be proposed for the formation of the main diagnostic fragment ions occurring on Figure 4d, and which do not originate in simple neutral eliminations. These mechanisms are shown in Scheme 4. The formation of the m/z 239 fragment ion may be explained considering a 4 centers proton transfer from the C8 to the C4 position of dG with imidazole ring opening. A second proton transfer process can lead to the expulsion of the six membered ring of dG and to the formation of the m/z 239 ion as indicated in Scheme 4a. Then, an additional 4 centers rearrangement process can be responsible for the formation of the m/z 184 fragment ion from the m/z 239 species (Scheme 4a). The structure of the m/z 184 ion corresponds to a protonated IQ for which the exocyclic primary amine function has been lost, and provides evidence for the involvement of this latter function in the covalent bonding with dG. The formation of the m/z 224 fragment ion according to the mechanism proposed in Scheme 4b is also in agreement with the occurrence of a dG-N7-IQ adduct, meaning that a N-N bond is concerned in this adduct. Finally, the m/z 197 ion can be interpreted as corresponding to the IQ moiety which can be formed according to the fragmentation mechanism presented in Scheme 4c.



Scheme 4. Formation mechanisms proposed for fragment ions observed in the MS³ spectrum of the dG-N7-IQ adduct.

The structure of this dG-N7-IQ adduct deduced from 3D ion trap MS³ experiments could not be confirmed by NMR spectrometry and exact mass measurements due to the very low amounts available. Although MS³ experiments could also be obtained using the LTQ linear ion trap which is a part of the LTQ-Orbitrap, the transfer process of the various MS³ fragment ions towards the Orbitrap via the so called “C-trap” device was not effective enough to allow high resolution mass measurements of the ions using the Orbitrap whatever the experimental operating parameters investigated for this purpose. The N7 position of guanine

is known to be the target of genotoxic compounds. Indeed, the N7 atom is described as the most nucleophilic site of dG and therefore should be a favored position for electrophilic derivative attacks [24]. Generally, dG-N7 adducts are not stable and rapidly undergo decomposition reactions, mainly depurination [25, 26], which have not been observed during our work. On the other hand, dG-N7 adducts have already been synthesized with arylamines and were stable enough to be characterized by NMR [27] and a linkage of PhIP with the N7 atom of dG has also been proposed for a minor adduct detected *in vivo* in rat [23]. Besides, dG-C8 adducts can also find their origin (at least partially) in a rearrangement process occurring on initial dG-N7 adducts, in particular when a nitrenium ion represents the electrophilic species leading to adduct formation [28, 29, 30]. The characterization of a dG-N7-IQ adduct in this work provides new information to clarify the formation mechanism of the dG-C8-IQ adduct, considering the generation of a dG-N7 in a first step, followed by a possible rearrangement leading to the dG-C8 adduct. Therefore, the rearrangement mechanism reported in Scheme 5 can be reasonably proposed for the formation of both dG-N7-IQ and dG-C8-IQ, based on the mechanism initially suggested by Humphreys *et al.* for the C8 alkylation of guanine by activated arylamines [27]. In addition, this mechanism represents the only way to explain the formation of a dG-N7 adduct without considering the destabilization of the glycosidic bond leading to a depurination process. It should be noted however that the dG-C8-IQ adduct may also find its origin in the reactivity of the guanine C8 atom itself.



Scheme 5. Rearrangement mechanism proposed for the formation of the dG-C8-IQ adduct from an initial dG-N7-IQ adduct.

The reaction of IQ with dA also led to the formation of one adduct which had never been described before this work, as demonstrated by the LC-MSⁿ analysis of the corresponding reaction mixture. The resulting chromatogram showed the occurrence of a weak peak with an *m/z* ratio of 448 in agreement with a dA-IQ adduct (data not shown). As for dG adducts, the *m/z* 448 precursor ion also underwent a loss of deoxyribose when submitted to resonant excitation into the 3D ion trap device. Figure 6 shows the MS³ spectrum of the *m/z* 332 ion resulting from the decomposition of the *m/z* 448 ion in the MS² step, whereas the corresponding HRMS data of fragment ions obtained on the LTQ-Orbitrap are reported in Table 4. The loss of [•]CH₃ from the IQ moiety of the selected *m/z* 332 parent ion must explain the occurrence of the *m/z* 317 fragment ion. The elimination of NH₃ and

HCN neutrals gives rise to the m/z 315 and 305 ions (Figure 6) respectively, as confirmed by the high resolution mass measurements (Table 4). Similarly, the origin of the m/z 303 and 288 ions can be attributed to the loss of CH_3N and CH_2N_2 respectively, from the m/z 332 selected ion. The peak observed at m/z 239 is more informative since it allows to precise the dA-IQ adduct structure. This fragment ion can be formed considering losses of both HCN and the imidazole moiety of adenine, according to the mechanism proposed in Scheme 6a. The elemental composition of the m/z 239 fragment ion was also in agreement with this proposal (Table 4). As for dG-IQ adducts described above, the m/z 224 ion can be generated from a heterolytic cleavage followed by a 6 centers rearrangement occurring on the pyrimidine ring of dA (Scheme 6b). The occurrence of the m/z 213 fragment ion was more questionable since it could only be explained considering a radical ion involving IQ and an additional primary amine function according to its elemental composition (Table 4), while a protonated form at m/z 214 would have seemed more plausible. A dA-N⁶-IQ structure is the most likely to explain the formation of the m/z 213 fragment ion which can originate in the homolytic cleavage of the C6-N⁶ bond of dA as presented in Scheme 6c. As a matter of fact, HAAs derivatives are known to be able to fragment by radical mechanisms [31] and this feature has already been observed for this particular adduct with the occurrence of the m/z 317 ion produced by a loss of $\cdot\text{CH}_3$. Therefore, the proposal of a radical structure for this fragment ion seems reasonable all the more that other structure in agreement with the HRMS data cannot be proposed without considering very complex processes involving numerous hydrogen transfers, which seems unlikely. Finally, the m/z 197 fragment ion corresponds to the IQ moiety which was observed for all IQ adducts identified in this work and which can be formed according to the mechanism reported in Scheme 6d.

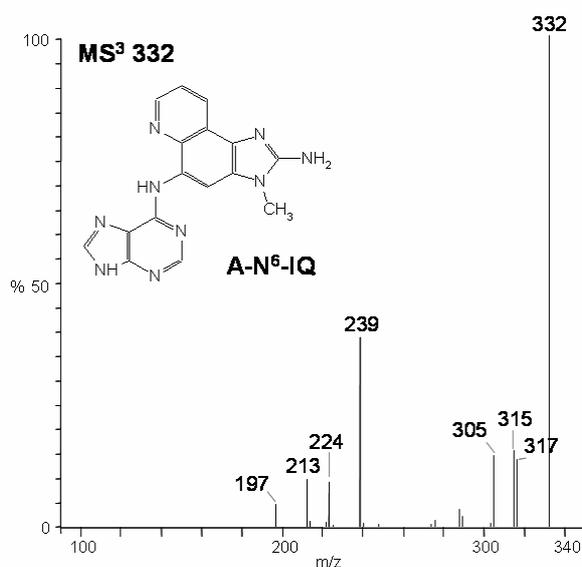
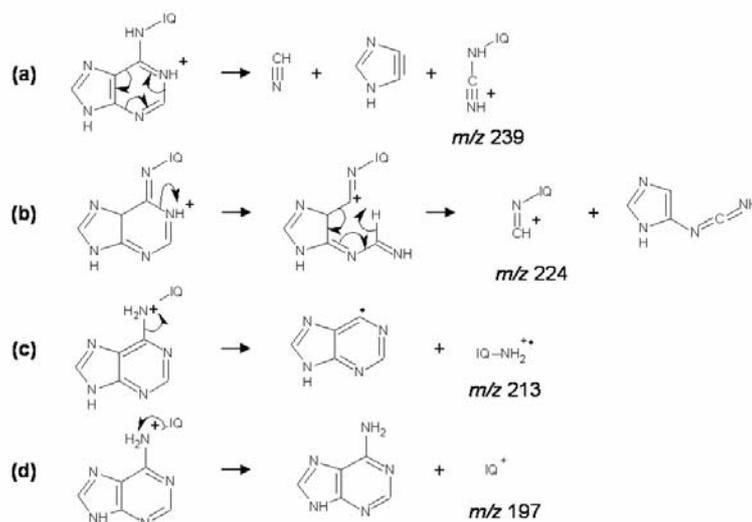


Figure 6. MS³ spectrum of dA-N⁶-IQ.



Scheme 6. Formation mechanisms proposed for fragment ions observed in the MS³ spectrum of the dA-N⁶-IQ adduct.

Table 4. Exact mass measurements of MS³ fragment ions of dA-N⁶-IQ.

Ion	Elemental Composition	Measured mass	Theoretical mass	Delta (ppm)
332	C ₁₆ H ₁₄ N ₉	332.13725	332.13722	0.10
317	C ₁₅ H ₁₁ N ₉	317.11376	317.11374	0.06
315	C ₁₆ H ₁₁ N ₈	315.11081	315.11067	0.44
305	C ₁₅ H ₁₃ N ₈	305.12640	305.12632	0.26
239	C ₁₂ H ₁₁ N ₆	239.10455	239.10452	0.13
224	C ₁₂ H ₁₀ N ₅	224.09351	224.09362	0.49
213	C ₁₁ H ₁₁ N ₅	213.10131	213.10144	0.61

The N⁶ nitrogen atom of adenine has already been described as a target for genotoxic agents [32], such as estrogens [26] polycyclic aromatic hydrocarbons [33, 34] or aristolochic acid [35]. However, no diagnostic information allowing the determination of the IQ atom involved in the bonding with adenine could be obtained by multi-step MS³ experiments. The loss of NH₃ leading to the formation of the *m/z* 315 fragment ion which may come from a primary amine function, only indicates that the primary amine function of IQ is not involved in the linking of dA and IQ. Thus, by analogy with dG-N²-IQ adduct which also involves a primary amine function of the deoxynucleoside, we propose that the bond between dA-N⁶ and IQ is also formed with the C5 aromatic carbon atom of IQ by a charge delocalization of the arylnitrenium ion [14].

No detectable adducts were found from reactions involving *N*-hydroxy-IQ and dC or dT. Finally, a reaction involving *N*-hydroxy-IQ and an equimolar mixture of the four deoxynucleosides was achieved to check potential competitive effects of deoxynucleosides between each other. All the four dG-C8, N² and N7-IQ and dA-N⁶-IQ adducts were obtained and their relative proportions were in agreement with the syntheses conducted using single

deoxynucleosides, suggesting that the formation of IQ adducts was not affected by competitive or synergistic effects.

Conclusions

A systematic study has been conducted on the reactivity of two HAAs towards deoxynucleosides, on the basis of chemical reactions involving the four DNA bases and chemically activated HAAs, namely NHOH-IQ and NHOH-PhIP. The structure of already known adducts is discussed and our proposals are supported by high resolution mass measurements achieved on fragment ions after sequential MS³ experiments into a linear ion trap. Mechanisms of formation are proposed for most of fragment ions present on the MS³ spectra of the detected adducts.

Besides the already known dG-C8-PhIP, dG-C8-IQ and dG-N²-IQ adducts, two new adducts were identified. The first one (dG-N7-IQ) is quite unusual since its formation implies an initial hydrazo linkage between the HAA and the N7 atom of guanine. A mechanism is proposed for this particular adduct which may rearrange into the dG-C8-IQ adduct. Although a similar dG-N7 adduct has recently been hypothesized for PhIP [23], no such compound was evidenced in our work conducted *in vitro* with PhIP. A second new adduct has been detected in the reaction between IQ and dA, namely dA-N⁶-IQ. This constitutes the first report on the formation of an adduct between an HAA and a deoxynucleoside other than dG. This new information may contribute to a better understanding of mutations involving A or T nucleobases observed *in vivo* [36] which cannot be explained by adduct formation with dG.

Extensive information are provided on the various HAA-nucleobase adducts in terms of fragmentation, which will be useful for the MS detection on such adducts based on diagnostic fragment ions in forthcoming further studies on the detection of HAA-DNA adducts conducted *in vitro* or *in vivo*.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from INP (Institut National Polytechnique de Toulouse, France). We thank A. Carrere for her valuable contribution to this study, P. Vouros and J. Glick (Northeastern University, Boston, MA, USA) for kindly providing standard dG-C8-PhIP used for adjusting our synthesis protocol of PhIP adduct. We thank S. Alves, D. Lesage and J.-C. Tabet (University Pierre & Marie Curie, Paris, France) for helpful discussions around the LTQ-Orbitrap mass spectrometer.

References

1. Garner, R. C. The Role of DNA Adducts in Chemical Carcinogenesis. *Mutat. Res.* **1998**, 402, 67-75.
2. Wogan, G. N.; Hecht, S. S.; Felton, J. S.; Conney, A. H.; Loeb, L. A. Environmental and Chemical Carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology* **2004**, 14, 473-486.
3. Schut, H. A. J.; Snyderwine, E. G. DNA Adducts of Heterocyclic Amine Food Mutagen: Implication for Mutagenesis and Carcinogenesis. *Carcinogenesis* **1999**, 20, 353-368.
4. Snyderwine, E. G.; Venugopal, M.; Yu, M. Mammary Gland Carcinogenesis by Food-derived Heterocyclic Amines and Studies on the Mechanisms of Carcinogenesis of 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP). *Mutat. Res.* **2002**, 506-507, 145-152.
5. Zöchling, S.; Murkovic, M. Formation of the Heterocyclic Aromatic Amine PhIP: Identification of Precursors and Intermediates. *Food Chem.* **2002**, 79, 125-134.
6. Murkovic, M. Formation of Heterocyclic Aromatic Amines in Model Systems. *J. Chromatogr., B* **2004**, 802, 3-10.
7. Skog, K. Problems Associated with the Determination of Heterocyclic Amines in Cooked Foods and Human Exposure. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, 40, 1197-1203.
8. Skog, K. I.; Johansson, M. A. E.; Jägerstad, M. I. Carcinogenic Heterocyclic Amines in Model Systems and Cooked Foods: A Review on Formation, Occurrence and Intake. *Food Chem. Toxicol.* **1998**, 36, 879-896.
9. Turesky, R. J. Interspecies Metabolism of Heterocyclic Aromatic Amines and the Uncertainties in Extrapolation of Animal Toxicity Data for Human Risk Assessment. *Mol. Nutr. Food Res.* **2005**, 49, 101-117.
10. Novak, M.; Rajagopal, S.; Xu, L.; Kazerani, S.; Toth, K.; Brooks, M.; Nguyen, T.-M. Chemistry of Carcinogenic and Mutagenic Metabolites of Heterocyclic Aromatic Amines. *J. Phys. Org. Chem.* **2004**, 17, 615-624.
11. de Kok, T. M. C. M.; Moonen, H. J. J.; van Delft, J.; van Schooten, F. J. Methodologies for Bulky DNA Adduct Analysis and Biomonitoring of Environmental and Occupational Exposures. *J. Chromatogr., B* **2002**, 778, 345-355.
12. Koc, H.; Swenberg, J. A. Applications of Mass Spectrometry for Quantification of DNA Adducts. *J. Chromatogr., B* **2002**, 778, 323-343.
13. Turesky, R. J.; Vouros, P. Formation and Analysis of Heterocyclic Aromatic Amines-DNA Adducts in Vitro and in Vivo. *J. Chromatogr., B* **2004**, 802, 155-166.
14. Turesky, R. J.; Rossi, S. C.; Welti, D. H.; Lay, J. O.; Kadlubar, F. F. Characterisation of DNA Adducts Formed in Vitro by Reaction of *N*-Hydroxy-2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline and *N*-Hydroxy-2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline at the C-8 and N² Atoms of Guanine. *Chem. Res. Toxicol.* **1992**, 5, 479-490.
15. Brown, K.; Guenther, E. A.; Dingley, K. H.; Cosman, M.; Harvey, C. A.; Shields, S. J.; Turteltaub, K. W. Synthesis and Spectroscopic Characterisation of Site-specific 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine Oligodeoxyribonucleotide Adducts. *Nucleic Acids Research* **2001**, 29, 1951-1959.
16. Crosbie, S. J.; Murray, S.; Boobis, A. R.; Gooderham, N. J. Mass Spectrometric Detection and Measurement of N²-(2'-deoxyguanosin-8-yl)PhIP Adducts in DNA. *J. Chromatogr., B* **2000**, 744, 55-64.

17. Tanga, M. J.; Bupp, J. E.; Bradford, W. W. Synthesis of Deuterated 2-Amino-1-methyl-6-phenyl-1*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP) and its *N*-Hydroxy Derivative. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2001**, 44, 405-411.
18. Rindgen, D.; Turesky, R. J.; Vouros, P. Determination of in Vitro Formed DNA Adducts of 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine Using Capillary Liquid Chromatography/Electrospray ionization/Tandem Mass Spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **1995**, 8, 1005-1013.
19. Paehler, A.; Richoz, J.; Soglia, J.; Vouros, P.; Turesky, R. J. Analysis and Quantification of DNA Adducts of 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-*f*]quinoxaline in Liver of Rats by Liquid Chromatography/Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **2002**, 15, 551-561.
20. Gangl, E.T.; Turesky, R.J.; Vouros, P. Determination of in Vitro and in Vivo Formed DNA Adducts of 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline by Capillary Liquid Chromatography/Microelectrospray Mass Spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, 12, 1019-1027.
21. Soglia, J. R.; Turesky, R. J.; Paehler, A.; Vouros, P. Quantification of the Heterocyclic Aromatic Amine-DNA Adduct *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline in Livers of Rats Using Capillary Liquid Chromatography/Microelectrospray Mass Spectrometry: A Dose-Response Study. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 2819-2827.
22. Li, L.; Chiarelli, M. P.; Branco, P. S.; Antunes, A. M.; Marques, M. M.; Gonçalves, L. L.; Beland, F. A. Differentiation of Isomeric C8-Substituted Alkylaniline Adducts of Guanine by Electrospray Ionization and Tandem Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, 14, 1488-1492.
23. Goodenough, A. K.; Schut, H. A. J.; Turesky, R. J. Novel LC/MS/MSⁿ Method for the Characterization and Quantification of 2'-Deoxyguanosine Adducts of the Dietary Carcinogen 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine by 2-D Linear Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.* **2007**, 20, 263-276.
24. Pullman, A.; Pullman, B. Electrostatic Potential of the Nucleic-Acids. *Quarterly Reviews of Biophysics* **1981**, 14, 289-380.
25. Gates, K. S.; Nooner, T.; Dutta, S. Biologically Relevant Chemical Reactions of *N7*-Alkylguanine Residues in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, 17, 839-856.
26. Jouanin, I.; Debrauwer, L.; Fauglas, G.; Paris, A.; Rathahao, E. Adduction of catechol estrogens to nucleosides. *Steroids* **2002**, 67, 1091-1099.
27. Humphreys, W. G.; Kadlubar, F. F.; Guengerich, F. P. Mechanism of C8 Alkylation of Guanine Residues by Activated Arylamines: Evidence for Initial Adduct Formation at the *N7* Position. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1992**, 89, 8278-8282.
28. Kennedy, S. A.; Novak, M.; Kolb, B. A. Reactions of Ester Derivatives of Carcinogenic *N*-(4-Biphenyl)hydroxylamine and the Corresponding Hydroxamic Acid with Purine Nucleosides. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 7654-7664.
29. Guengerich, F. P.; Mundkowski, R. G.; Voehler, M.; Kadlubar, F. F. Formation and Reaction of *N7*-Aminoguanosine and Derivatives. *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, 12, 906-916.
30. Kaiya, T.; Fujiwara, T.; Kohda, K. Syntheses and Properties of 1-Methyl-3-phenylaminobenzimidazolium Salts, Models of DNA adducts of *N7*-Arylaminodeoxyguanosinium Salt. *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, 13, 993-1001.

31. Guy, P. A.; Gremaud, E.; Richoz, J.; Turesky, R. J. Quantitative Analysis of Mutagenic Heterocyclic Aromatic Amines in Cooked Meat using Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2000**, 883, 89-102.
32. Dipple, A. DNA Adducts of Chemical Carcinogens. *Carcinogenesis* **1995**, 16, 437-441.
33. Roberts, K. P.; Lin, C.-H.; Jankowiak, R.; Small, G. J. On-line Identification of Diastereomeric dibenzo[*a,l*]pyrene Diol Epoxide-Derived Deoxyadenosine Adducts by Capillary Electrophoresis-Fluorescence Line-narrowing and Non-line Narrowing Spectroscopy. *J. Chromatogr., A* **1999**, 853, 159-170.
34. Khalili, H.; Zhang, F.-J.; Harvey, R. G.; Dipple, A. Mutagenicity of Benzo[*a*]pyrene-deoxyadenosine Adducts in a Sequence Context Derived from the *p53* Gene. *Mutat. Res.* **2000**, 465, 39-44.
35. Zhou, S.; Koh, H.-L.; Gao, Y.; Gong, Z.-Y.; Lee, E. J. D. Herbal Bioactivation: The Good, the Bad and the Ugly. *Life Sci.* **2004**, 74, 935-968.
36. Kakiuchi, H.; Watanabe, M.; Ushijima, T.; Toyota, M.; Imai, K.; Weisburger, J. H.; Sugimura, T.; Nagao M. Specific 5'-GGGA-3' -> 5'-GGA-3' mutation of the *Apc* gene in rat colon tumors induced by 2-amino-3-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, 92, 910-914.

- Chapitre 4 -

**Etude de la formation des adduits covalents entre des
oligonucléotides modèles et les amines aromatiques
hétérocycliques.**

I Présentation de l'étude

Suite à l'étude de la formation des adduits covalents entre les désoxynucléosides et les amines aromatiques hétérocycliques, certains paramètres pouvant influencer cette formation ont été approfondis. De nombreuses données bibliographiques indiquent que les mutations de l'ADN, qui peuvent être une des conséquences de la formation d'adduits entre les AAH et l'ADN, ciblent spécifiquement certaines portions de séquences. L'existence de ces éléments de séquence préférentiellement mutés, appelées « Hot Spots » peut être expliquée par des effets de contexte de séquence qui peuvent concerner toutes les étapes conduisant à l'apparition de mutations, allant de la formation d'un adduit à la réplication en passant par les processus de réparation de l'ADN, comme décrit dans le Chapitre 1. Cependant, de nombreuses questions restent posées concernant la part relative de toutes ces étapes dans la sélectivité observée des mutations, et plus précisément, l'influence directe de la séquence de l'ADN sur la formation d'adduits.

Dans ce contexte, le travail faisant l'objet de ce chapitre a consisté à étudier l'influence de l'environnement local de la base modifiée sur la formation d'un adduit avec PhIP ou IQ. En effet, si la formation de l'adduit est influencée par la nature de la séquence, il est alors très probable que ceci soit principalement causé par l'environnement local de la base modifiée. C'est pourquoi, le travail présenté dans cette partie concerne l'étude de l'influence de la base voisine de la modification sur la formation de l'adduit avec la guanine, dont nous avons vu dans le Chapitre 3 qu'elle constituait la cible privilégiée pour l'alkylation par les AAH. Pour cela, des réactions ont été conduites sur la base des protocoles développés dans le chapitre précédent, entre PhIP ou IQ et des oligonucléotides modèles choisis de façon à pouvoir établir des comparaisons au niveau de l'environnement immédiat du site modifié.

II Démarche scientifique et instrumentale

La démarche suivie au cours de cette étude a consisté à pouvoir synthétiser de manière répétable des adduits sur des oligonucléotides modèles dans le but de comparer leur taux de modification. Les résultats obtenus dans le Chapitre 3 ont montré que dG était le désoxynucléoside préférentiellement touché par les modifications tandis que dT n'était pas réactif vis-à-vis des AAH activées que nous avons étudiées. Aussi, les séquences des oligonucléotides choisis possèdent toutes un site réactif (G) en leur centre. Cette guanine, est entourée d'une base variable (A, C, G ou T) côté 5' et d'une thymine (T) côté 3' dans le cas de l'étude de l'effet de la base en 5' de la modification. Inversement, pour étudier l'effet de la nature de la base en 3' de la modification, le site réactif est entouré d'une thymine côté 5' et d'une base variable côté 3'. Enfin, toutes ces séquences trimères ont été placées au centre d'une chaîne de thymines suffisamment longue (12 et 13-mer) afin de constituer un environnement global de la guanine ciblée proche de l'ADN et afin d'éviter les éventuels effets des bases terminales. En effet, ces bases terminales ne possèdent pas en 3' ou 5' le groupement phosphate, ce qui peut modifier la densité électronique des atomes, stabiliser par des liaisons faibles les intermédiaires réactionnels formés au cours de la formation des adduits, ou encore encombrer stériquement certains sites réactifs des bases vis-à-vis des AAH. Enfin, dans le cas où la base voisine du site réactif (G) était également une guanine, les conditions stœchiométriques de la synthèse ont alors été modifiées en raison de la présence de deux sites réactifs sur une même séquence. Dans ce cas de figure, les taux de modification des séquences possédant deux guanines adjacentes ont été comparés au taux de modification d'une séquence possédant deux guanines distantes.



Figure 1. Séquences utilisées pour l'étude de l'effet de la base voisine de la modification sur la formation de l'adduit.

II. 1 Synthèses chimiques des adduits oligonucléotides – AAH

Les oligonucléotides modifiés par PhIP et IQ ont été préparés sur la base des protocoles de synthèses développés dans le chapitre précédent avec les désoxynucléosides. L'un des objectifs de ce travail étant la comparaison des taux de modification de différentes séquences oligonucléotidiques, une attention toute particulière a été portée à la réalisation de toutes les synthèses sur une courte période de temps et dans des conditions rigoureusement identiques en termes de manipulateur, température et temps de réaction, ou encore de numéro de lot de réactifs. Enfin, les mélanges réactionnels obtenus ont été analysés immédiatement après l'arrêt de la synthèse.

II. 2 Analyses par LC-MS/MS des adduits oligonucléotides – AAH

En ce qui concerne les conditions d'analyse en LC-MS, l'ensemble des paramètres analytiques ont logiquement été modifiés par rapport aux conditions utilisées pour l'analyse des adduits générés avec les désoxynucléosides. En effet, la séparation chromatographique des oligonucléotides a nécessité l'utilisation d'un autre type de colonne chromatographique en raison de la polarité importante des fonctions phosphates portées par les oligonucléotides. Ainsi, toutes les séparations chromatographiques des oligonucléotides ont été réalisées avec une colonne Uptisphere ODB (250 × 2 mm, 5 µm). Néanmoins, l'analyse de l'oligonucléotide ^{5'}TTTTTGGGTTTT^{3'} modifié par PhIP a nécessité l'utilisation d'une autre colonne chromatographique afin de séparer les trois adduits générés à différentes positions. Différentes phases stationnaires ont été testées et la colonne Pursuit C8 (150 × 2 mm, 3 µm) a finalement conduit à une séparation satisfaisante des trois adduits. Les phases mobiles utilisées étaient composées de mélanges acétonitrile / acétate de triéthylammonium (5 mM, pH 7) qui avaient permis l'obtention de résultats satisfaisants lors d'études précédentes développées au laboratoire [1]. L'utilisation de cette phase mobile permet de ne pas générer d'ions adduits avec les solvants ou avec des cations comme le sodium ou le potassium, en quantités importantes. Ceci permet de simplifier l'interprétation des spectres de masse obtenus avec le mode d'ionisation par Electrospray et permet également d'améliorer la sensibilité en concentrant le signal sous l'espèce ionique d'intérêt. En effet, la présence de tels adduits induirait une perte de signal des ions multi-déprotonés qui sont les espèces intéressantes à fragmenter pour l'étude des oligonucléotides par spectrométrie de masse en tandem.

1. Debrauwer L., Rathahao E., Couve C., Poulain S., Pouyet C., Jouanin I., Paris A., *J. Chromatogr., A*, **976** (2002) 123-134.

La détection des oligonucléotides modifiés ou non modifiés a donc été réalisée par spectrométrie de masse utilisant comme source d'ions l'Electrospray. Comme cela a été évoqué dans le Chapitre 1, le mode d'ionisation négatif est plus efficace en raison de l'acidité importante des fonctions phosphates présentes sur les chaînes oligonucléotidiques. L'optimisation des conditions d'ionisation par ESI a été réalisée dans un premier temps par l'analyse en infusion directe d'oligonucléotides non modifiés, puis dans un deuxième temps, en utilisant un Té pour optimiser les paramètres en conditions de débit chromatographique.

II. 3 Localisation de l'adduit sur la séquence oligonucléotidique

Des expériences de spectrométrie de masse en tandem ont été conçues sur une trappe d'ions 3D (LCQ®) en sélectionnant les ions précurseurs multi-déprotonés et les ions fragments observés ont été interprétés afin d'identifier les séquences observées et de localiser l'adduit formé par PhIP ou IQ sur la séquence étudiée. Comme ceci a précédemment été mentionné dans le Chapitre 1, la nature et l'abondance des fragments générés lors d'expériences MS/MS en CID dépend de l'état de charge de l'ion précurseur sélectionné. Cependant, il est nécessaire de sélectionner les ions précurseurs d'état de charge majoritaire afin d'obtenir un signal suffisant pour une analyse ultérieure en MS/MS. Ainsi, les ions précurseurs majoritaires (trichargés) pour les oligonucléotides modifiés par PhIP et IQ ont été sélectionnés dans le but de localiser la position de l'adduit. Par contre, les quantités disponibles d'oligonucléotides non modifiés étant plus importantes, la fragmentation des ions précurseurs tétrachargés moins intenses a pu être mise en œuvre induisant une fragmentation plus importante et conduisant à une couverture plus complète de la séquence étudiée. Conformément aux règles générales de fragmentation des oligonucléotides lors de leur analyse par ESI-ITMS, les voies de fragmentation majoritaires observées sont des pertes de bases neutres ou chargées en fonction de l'état de charge de l'ion précurseur sélectionné, et induisant la formation consécutive des ions fragments complémentaires du type w et (a-B).

II. 4 Développement d'un programme d'attribution des fragments des oligonucléotides

L'attribution des ions fragments des oligonucléotides est rendue délicate par la nature très diverse des fragments observés lors d'expériences MS/MS d'oligonucléotides comme ceci est mentionné dans le Chapitre 1. Afin de faciliter l'attribution des ions fragments observés, un programme informatique fonctionnant sous environnement Microsoft® Excel 2002 a été développé. Ce programme permet de calculer à partir d'une séquence donnée, les rapports m/z théoriques de tous les types d'ions fragments possibles d'états de charges compris entre les ions monochargés et tétrachargés (Tableau 1), et d'autre part, de les

comparer avec les rapports m/z observés sur les spectres MS/MS obtenus. Plusieurs paramètres peuvent être intégrés dans une page de saisie des données (Figure 2) afin de préciser l'attribution des fragments :

- séquence théorique attendue
- nature de la modification (PhIP, IQ ou non modifié)
- état de charge de l'ion précurseur sélectionné
- échelle de rapports m/z observés (LMCO (Low Mass Cut Off) : 2000)
- abondance absolue minimale des ions à considérer
- erreur de mesure de masse.

En fonction de ces différents paramètres, la programme fournit une liste d'attribution des pics (Figure 3) et calcule le taux d'attribution du spectre MS/MS (coin supérieur gauche de la Figure 4). Il est important de signaler que le type d'analyseur de masse utilisé au cours de cette étude était une trappe d'ions, analyseur faiblement résolutif, impliquant des erreurs de mesure de rapports m/z relativement importantes, pouvant induire des attributions multiples pour un même rapport m/z observé. Ceci implique que dans certaines situations, le programme est dans l'incapacité de donner une attribution non équivoque. Cependant, le programme est capable de signaler ces situations par des points d'interrogations (Figure 3) permettant ainsi une attribution manuelle de ces ions fragments.

Tableau 1. Nature des ions fragments issus d'oligonucléotides dont les rapports m/z sont calculés et comparés par le programme d'attribution.

Fragmentations de la chaîne	côté 5'	a	(a-B)	(a-H ₂ O)	(a-B-H ₂ O)	
		b	(b-B)	(b-H ₂ O)	(b-B-H ₂ O)	
		c	(c-B)	(c-H ₂ O)	(c-B-H ₂ O)	
		d	(d-B)	(d-H ₂ O)	(d-B-H ₂ O)	
	côté 3'	w	(w-B)	(w-H ₂ O)	(w-B-H ₂ O)	
		x	(x-B)	(x-H ₂ O)	(x-B-H ₂ O)	
		y	(y-B)	(y-H ₂ O)	(y-B-H ₂ O)	
		z	(z-B)	(z-H ₂ O)	(z-B-H ₂ O)	
Fragmentations n'induisant pas de coupure de la chaîne	pertes de base ou d'eau	[M-A]	[M-A*]	[M-A-H ₂ O]	[M-A*-H ₂ O]	[M-H ₂ O]
		[M-C]	[M-C*]	[M-C-H ₂ O]	[M-C*-H ₂ O]	
		[M-G]	[M-G*]	[M-G-H ₂ O]	[M-G*-H ₂ O]	
		[M-T]	[M-T*]	[M-T-H ₂ O]	[M-T*-H ₂ O]	
	bases chargées	A	A*			
		C	C*			
		G	G*			
		T	T*			

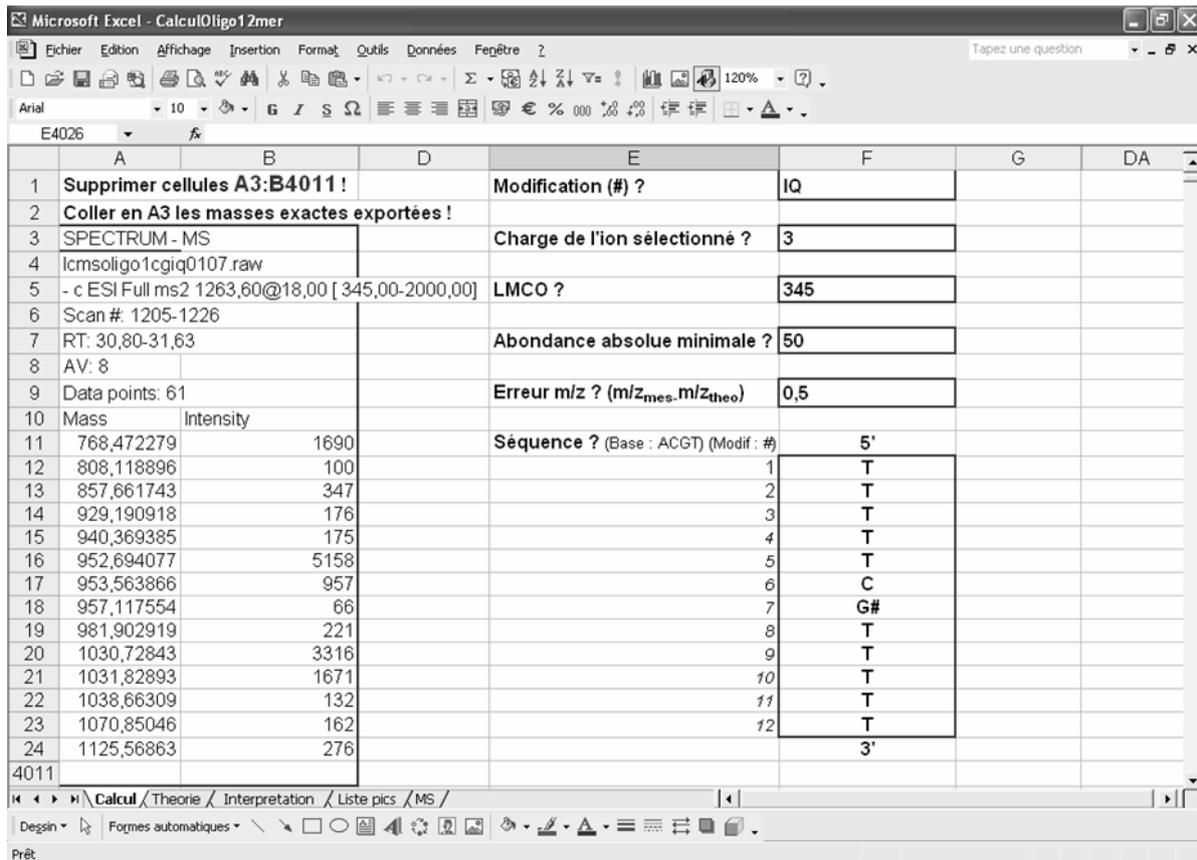


Figure 2. Page de saisie des données du programme d'attribution.

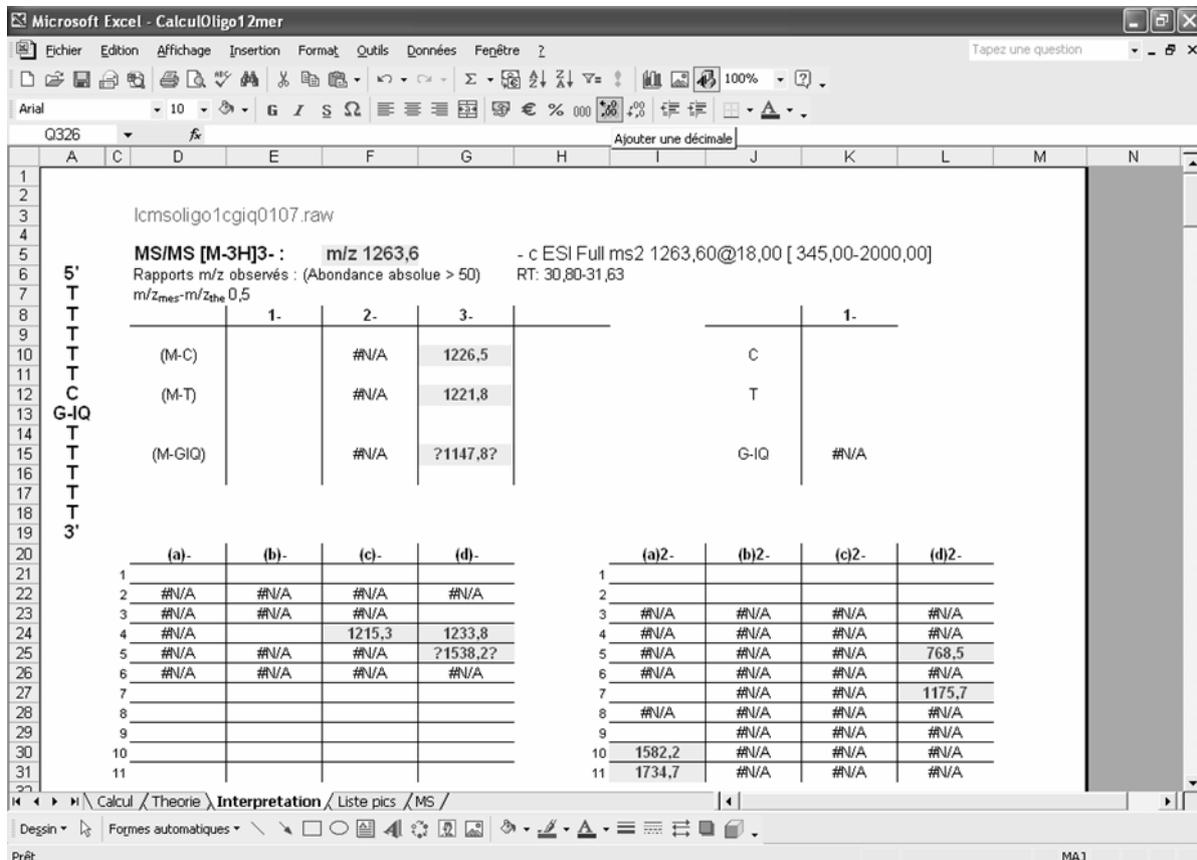


Figure 3. Page de propositions d'attribution des fragments observés.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	5'	lcmsoligo1cgicq0107.raw										
2	T	- c ESI Full ms2 1263,60@18,00 [345,00-2000,00]				RT: 30,80-31,63						60
3	T	Rapports m/z observés : (Abondance absolue > 50)									non attribués :	11
4	T	m/z	Abondance	m/z	Abondance						attribués :	82%
5	T	768,472279	1690	1255,263672	164							
6	T	808,118896	100	1256,786133	145							
7	C	857,661743	347	1263,451105	8409							
8	G-IQ	929,190918	176	1264,536423	1132							
9	T	940,369385	175	1275,880859	151							
10	T	952,694077	5158	1300,219727	69							
11	T	953,563866	957	1377,997070	71							
12	T	957,117554	66	1393,296631	101							
13	T	981,902919	221	1430,794920	233							
14	3'	1030,728431	3316	1435,879150	58							
15		1031,828933	1671	1537,522817	1798							
16		1038,663086	132	1538,919612	737							
17		1070,850462	162	1540,971924	116							
18		1125,568633	276	1582,178711	146							
19		1147,544154	2859	1617,047659	1054							
20		1148,965820	113	1618,160671	645							
21		1150,268066	97	1619,236085	528							
22		1152,614746	54	1651,109375	79							
23		1175,694824	266	1733,315186	161							
24		1181,545410	133	1734,671631	126							
25		1188,839355	243	1881,164795	195							
26		1202,754527	182	1882,734821	197							
27		1209,829102	86	1906,212665	984							
28		1212,330294	313	1907,868650	189							
29		1215,253118	515									

Figure 4. Page de liste des ions observés.

II. 5 Comparaison des taux de modification des oligonucléotides

Nous montrons en détail dans l'Article 4 présenté à la fin de ce chapitre que par l'intermédiaire d'ions fragments caractéristiques et avec l'aide d'un programme d'attribution des ions fragments, il est possible de localiser qualitativement le (ou les) site(s) modifié(s) sur un oligonucléotide. Suite à la localisation de la modification induite par PhIP ou IQ par des expériences MS/MS, une approche quantitative a été adoptée en déterminant les taux de modification des différentes séquences étudiées et en les comparant afin d'étudier l'effet de la base voisine du site modifié sur la formation des adduits G-PhIP et G-IQ. Comme il aurait été relativement complexe de réaliser un étalonnage externe ou interne pour chaque oligonucléotide modifié et non modifié, nous nous sommes basés sur l'hypothèse selon laquelle les facteurs de réponse (rendements d'ionisation, acidités, efficacités de piégeage, etc.) de ces espèces étaient très proches pour les déterminations quantitatives. Ceci nous a donc permis de comparer la surface des pics chromatographiques de différents oligonucléotides afin de déterminer leurs taux de modification. Pour s'affranchir des éventuelles différences de distribution d'états de charges, la somme des surfaces des pics chromatographiques de tous les états de charges d'une même espèce a été prise en compte dans les calculs. Enfin, les paramètres expérimentaux ont été ajustés de façon à ce que les

abondances relatives des fragments générés en source ainsi que des adduits sodiques, potassiques et aux solvants puissent être considérées comme négligeables. Les différents taux de modifications ont finalement été obtenus en réalisant le rapport entre la somme des surfaces des pics de l'espèce modifiée et la somme des surfaces des pics de toutes les espèces pouvant potentiellement être générées, à savoir :

- l'oligonucléotide non modifié
- l'oligonucléotide modifié sur le site étudié
- l'oligonucléotide modifié sur un site différent
- l'oligonucléotide simultanément modifié sur plusieurs sites.

L'ensemble des résultats portant sur l'étude de l'influence de la base voisine du site modifié est rassemblé dans l'Article 4 figurant en fin de chapitre. Cependant, d'autres expérimentations ont été conduites en marge de ces travaux et sont décrites ci-après.

II. 6 Analyse d'adduits supplémentaires générés entre les AAH et les oligonucléotides

En parallèle de l'étude des oligonucléotides mono-modifiés sur une guanine par PhIP ou IQ, d'autres espèces ont été générées lors des synthèses des adduits. En effet, des espèces doublement modifiées ont été formées en faible quantité avec les oligonucléotides possédant plusieurs guanines adjacentes ou distantes. De plus, l'adduit dA-N⁶-IQ précédemment caractérisé pour la première fois avec les désoxynucléosides (voir Chapitre 2) a également été mis en évidence pour la première fois sur les séquences oligonucléotidiques possédant une adénine. Ceci a été vérifié à partir d'une synthèse réalisée entre NHOH-IQ et l'oligonucléotide de séquence ^{5'}TTTTTATTTTTT^{3'}. Le mélange réactionnel analysé par LC-MS/MS a montré la présence d'une espèce de rapport *m/z* correspondant à la masse de l'oligonucléotide modifié par IQ. De plus, le spectre MS/MS présenté sur la Figure 5 montre la présence d'un ion fragment de type [M-3H-AIQ]³⁻ à *m/z* 1152,9 démontrant que la base modifiée est une adénine. Enfin, les fragments complémentaires w_6^{2-} *m/z* 920,6 et $(a_6\text{-AIQ})^-$ *m/z* 1617,2 indiquent que les cinq premières bases et les 6 dernières bases sont des thymines non modifiées, confirmant ainsi la séquence ^{5'}TTTTTA(IQ)TTTTT^{3'}.

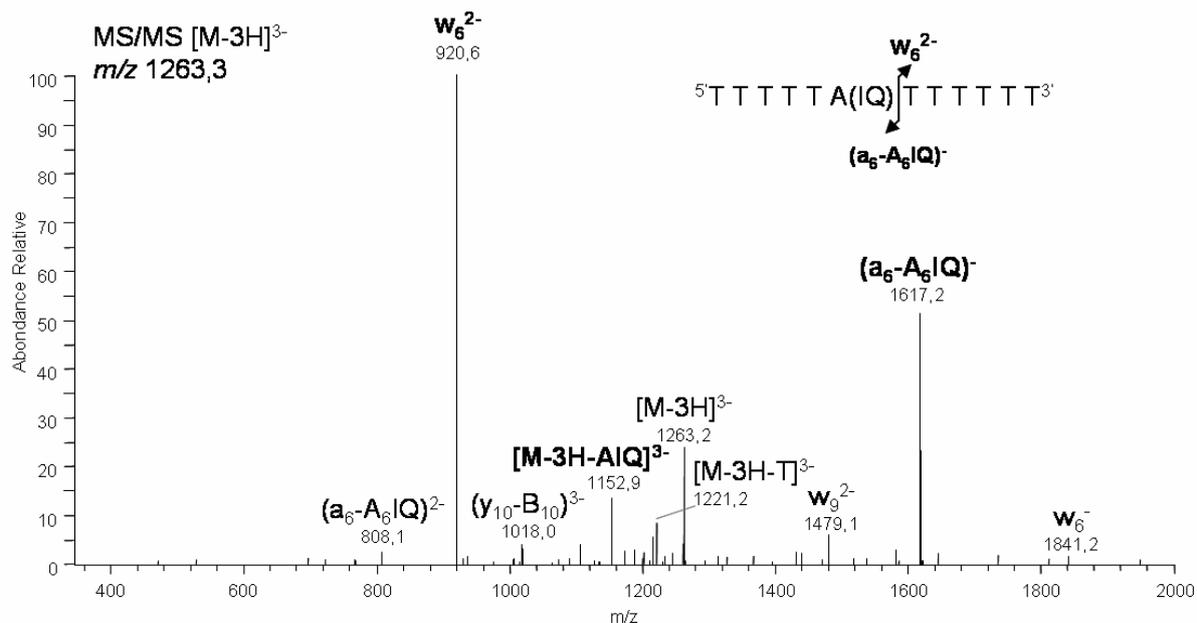


Figure 5. Spectre MS/MS de l'ion précurseur $[M-3H]^{3-}$ généré par Electrospray négatif à partir de $5'TTTTTA(IQ)TTTTT3'$.

II. 7 Identification des adduits générés avec les oligonucléotides

Bien qu'elles ne soient pas relatées dans l'article présenté à la fin de ce chapitre, certaines expériences d'identification complémentaires ont également été réalisées pour tenter d'apporter des informations structurales supplémentaires pour l'identification des adduits G-PhIP et G-IQ générés sur les oligonucléotides. Si l'on se réfère aux résultats obtenus dans le Chapitre 3, il paraît très probable que l'adduit formé entre les oligonucléotides et PhIP soit un adduit G-C8-PhIP. Néanmoins, il nous a semblé intéressant de pouvoir le confirmer par des expériences MS³. Comme ceci est détaillé dans le Chapitre 1, des pertes de bases neutres ou chargées sont observées lors de la fragmentation des oligonucléotides. Dans le cas des pertes de bases neutres, un seul type d'ions fragments est observé correspondant à $[M-nH-N]^{n-}$, alors que dans le cas des pertes de bases mono-chargées, deux ions fragments complémentaires sont observés correspondant à des espèces du type $[M-nH-(N-H)]^{(n-1)-}$ et surtout $[N-H]^-$. Ainsi, dans le cas d'une perte de guanine modifiée et mono-chargée, les ions fragments complémentaires et majoritaires attendus sont $[M-nH-(GAAH-H)]^{(n-1)-}$ et $[GAAH-H]^-$. Une analyse par LC-MS³ de l'ion $[GAAH-H]^-$ a donc été envisagée afin de savoir si celle-ci pouvait permettre d'obtenir des informations supplémentaires sur la nature de l'adduit formé, notamment en termes d'isomérisation de position.

Cependant, les expériences préliminaires nous ont démontré que l'abondance relative des ions $[GAAH-H]^-$ était trop faible pour pouvoir les piéger et les fragmenter efficacement au cours d'expériences MS³. Plusieurs solutions ont donc été envisagées de manière complémentaire sur le piège tridimensionnel LCQ[®] pour favoriser la perte de bases chargées et donc former les ions $[GAAH-H]^-$. La première solution a consisté à optimiser les paramètres spectrométriques afin de favoriser les ruptures simples conduisant aux pertes de bases chargées, par rapport aux réarrangements conduisant aux pertes de bases neutres. Cette solution n'ayant pas donné satisfaction, une deuxième solution consistant à sélectionner un ion précurseur d'état de charge plus important a été envisagée. Les résultats obtenus (Figure 6) montrent que l'excitation de l'ion précurseur trichargé ne conduit pas à la perte de bases chargées (Figure 6a) alors que l'ion précurseur tétrachargé conduit après excitation à la formation de l'ion recherché $[GAAH-H]^-$ avec une faible abondance relative (Figure 6b). L'abondance relative de l'ion $[M-5H]^{5-}$ formé à partir de l'oligonucléotide $5'TTTTTG(PhIP)TTTTT3'$, était trop faible pour que celui-ci puisse être exploité. En revanche, l'expérience a pu être tentée à partir de l'ion précurseur $[M-5H]^{5-}$ de l'oligonucléotide non modifié $5'TTTTGTTTTT3'$ en recherchant la perte de guanine chargée. Le spectre MS/MS obtenu (Figure 6c) ne montre pas de perte de guanine chargée. Par contre, un ion correspondant à une perte de thymine chargée est observé à m/z 870,7. L'examen du spectre MS/MS indique que cette thymine est majoritairement la thymine terminale en 5' (ion w_{11}^{4-} abondant) conformément aux règles de fragmentations des oligonucléotides en ESI-ITMS résumées dans le Chapitre 1. A partir de ces résultats, l'espèce tétrachargée a donc été sélectionnée pour produire des ions $[GAAH-H]^-$ à partir d'oligonucléotides modifiés dans une étape MS/MS afin de tenter de les piéger et les fragmenter dans une autre trappe d'ions que le LCQ[®].

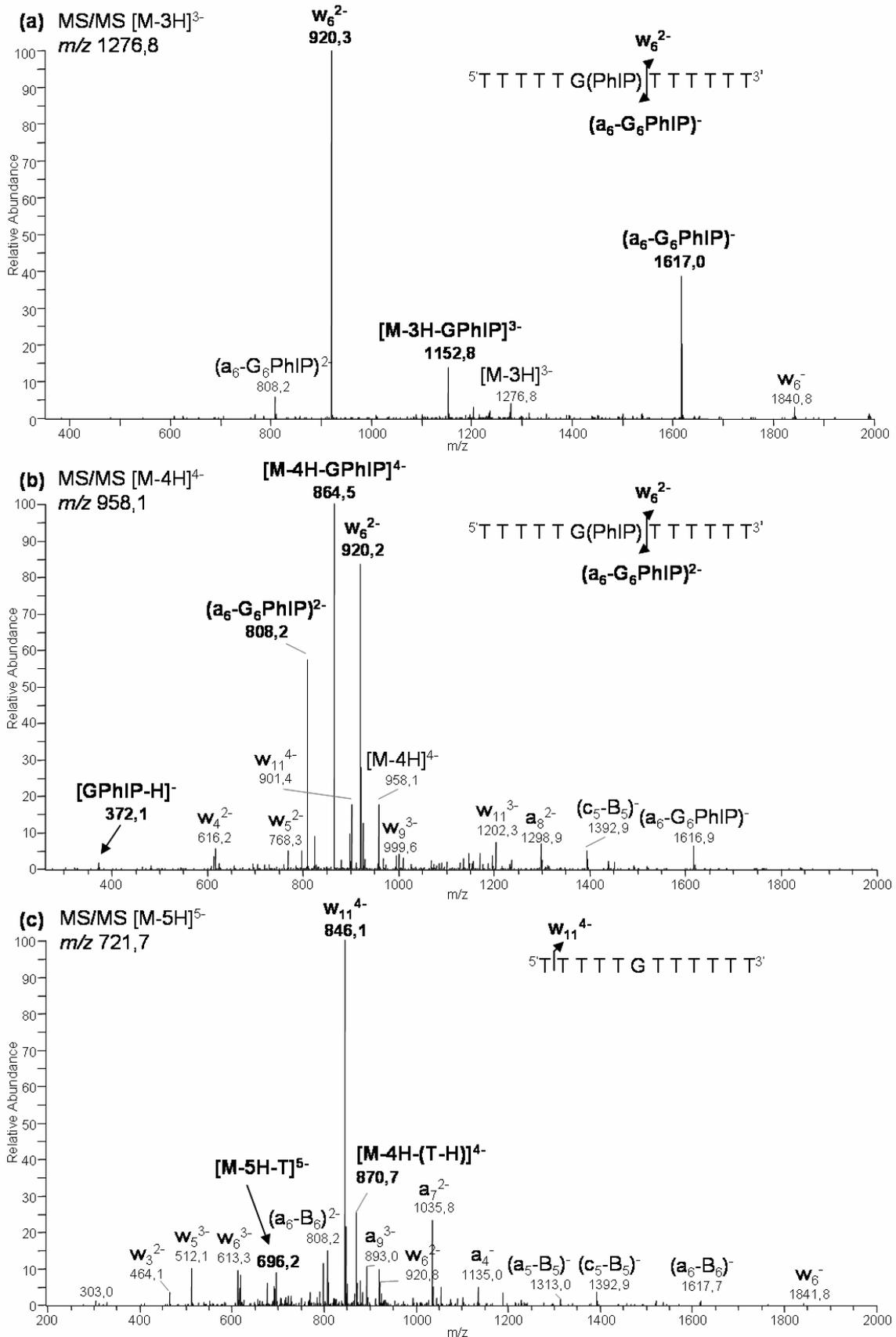


Figure 6. Spectres MS/MS des ions précurseurs [M-3H]³⁻ (a) et [M-4H]⁴⁻ (b) de l'oligonucléotide 5' TTTTGT(PhIP)TTTTT 3', ainsi que [M-5H]⁵⁻ de l'oligonucléotide 5' TTTTGTTTTTT 3' (c).

En effet, la troisième solution envisagée afin de piéger les ions $[GAAH-H]^-$ a consisté à utiliser d'une trappe d'ions linéaire (LTQ[®]) de technologie plus récente et présentant à priori une meilleure sensibilité. Ainsi, un spectre MS³ de l'ion $[GPhIP-H]^-$ issu de la fragmentation de l'oligonucléotide tétrachargé $5'TTTTTG(PhIP)TTTTT3'$ a pu être obtenu et comparé à un spectre MS³ de l'ion précurseur $[G-C8-PhIP - H]^-$ généré en mode négatif à partir de l'adduit dG-C8-PhIP étudié dans le chapitre précédent. Ces deux spectres MS³ présentés en Figure 7 présentent une très grande similarité et permettent de confirmer la structure G-C8-PhIP de l'adduit formé sur l'oligonucléotide. On notera malgré tout l'absence de deux fragments minoritaires (m/z 248 et 302) sur le spectre MS³ issu de l'oligonucléotide, en raison du très faible signal disponible sur l'ion précurseur sélectionné, mais nous avons considéré que cette absence n'altérerait pas l'identification de l'adduit.

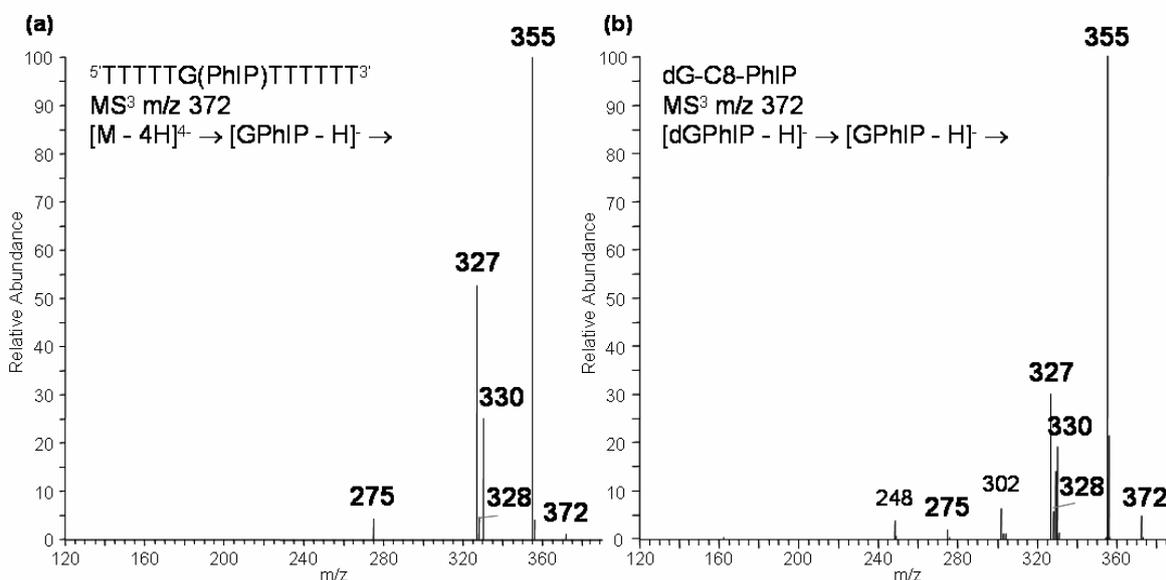


Figure 7. Comparaison des spectres MS³ des ions précurseurs tétrachargés de l'oligonucléotide $5'TTTTTG(PhIP)TTTTT3'$ (a) et de l'adduit dG-C8-PhIP (b).

Après l'analyse d'oligonucléotides modifiés par PhIP, la méthode a été appliquée à la caractérisation des adduits formés entre les oligonucléotides et IQ. En effet, nous avons vu dans le Chapitre 3 que cette AAH forme deux adduits isomères majoritaires avec la guanine (dG-C8-IQ et dG-N²-IQ). De plus, l'analyse LC-MS/MS des oligonucléotides modifiés par IQ a montré la formation de deux espèces différentes avec l'oligonucléotide $5'TTTTTCGTTTTT3'$ (Figure 8). L'analyse par LC-MS/MS de ces deux adduits a permis de montrer qu'il s'agissait bien de deux adduits différents sur la base G. Cependant, l'analyse par LC-MS³ de cette séquence modifiée n'a pas permis la détermination des structures des deux adduits observés. En effet, les rendements de synthèse obtenus lors de la préparation des adduits entre les oligonucléotides et IQ étaient nettement plus faibles que ceux obtenus avec PhIP,

et les limites de sensibilité de l'instrument utilisé ont également été atteintes. Néanmoins, il paraît très probable que les deux espèces observées avec $5'\text{TTTTTCGTTTTT}^3'$ représentent les adduits G-C8-IQ et G-N²-IQ en raison des proportions relatives de ces deux espèces. En effet, les résultats obtenus dans le Chapitre 3 indiquent que l'espèce majoritaire formée avec les désoxynucléosides est l'adduit dG-C8-IQ.

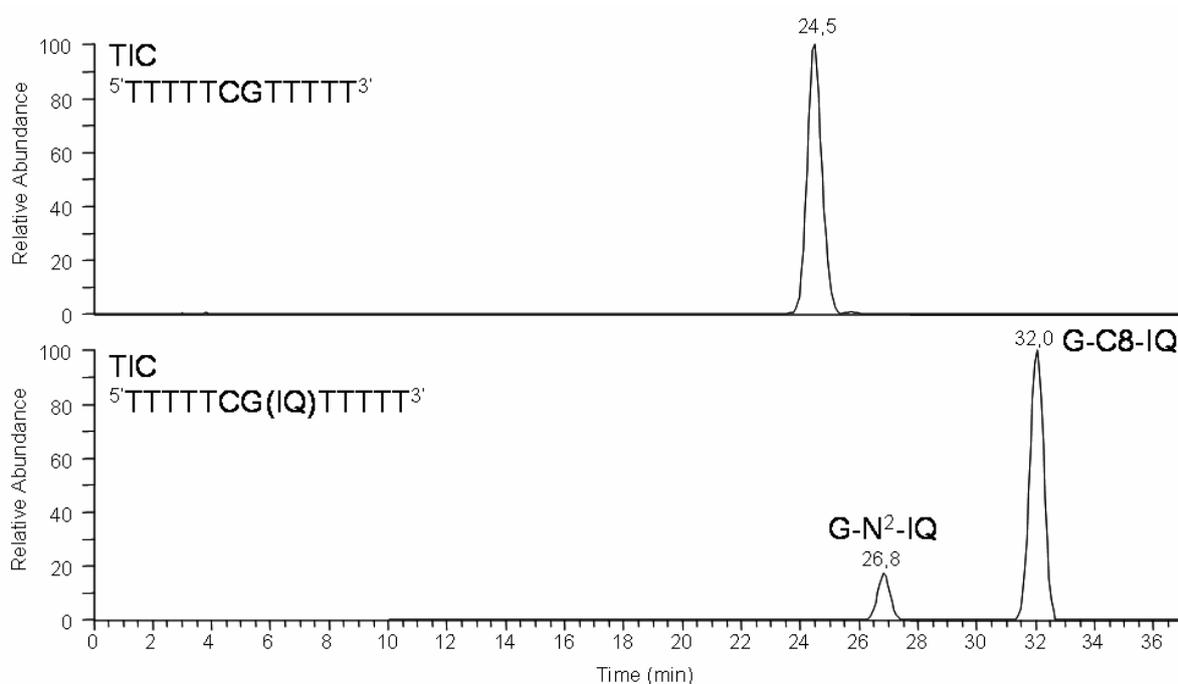


Figure 8. Chromatogrammes obtenus à partir de l'oligonucléotide $5'\text{TTTTTCGTTTTT}^3'$ modifié par IQ.

III Conclusions et perspectives

Les résultats obtenus suite à l'étude de l'effet de la base voisine de la modification sur la formation des adduits G-PhIP et G-IQ, font l'objet de l'Article 4 présenté ci-après. Ainsi, dans un premier temps, les protocoles de synthèse des adduits développés dans le chapitre précédent à partir des désoxynucléosides ont été adaptés aux oligonucléotides. Les conditions analytiques ont également été optimisées en termes de séparation chromatographique et d'analyse par spectrométrie de masse. Les modifications des oligonucléotides ont pu être localisées grâce à l'utilisation d'expériences MS/MS et d'un programme d'attribution des fragments observés en aide à l'interprétation des spectres MS/MS obtenus. Suite à la localisation des adduits formés, les taux de modification de séquences oligonucléotidiques modèles, représentés en Figure 9, ont été comparés afin d'étudier la sélectivité de formation des adduits en fonction de la séquence oligonucléotidique.

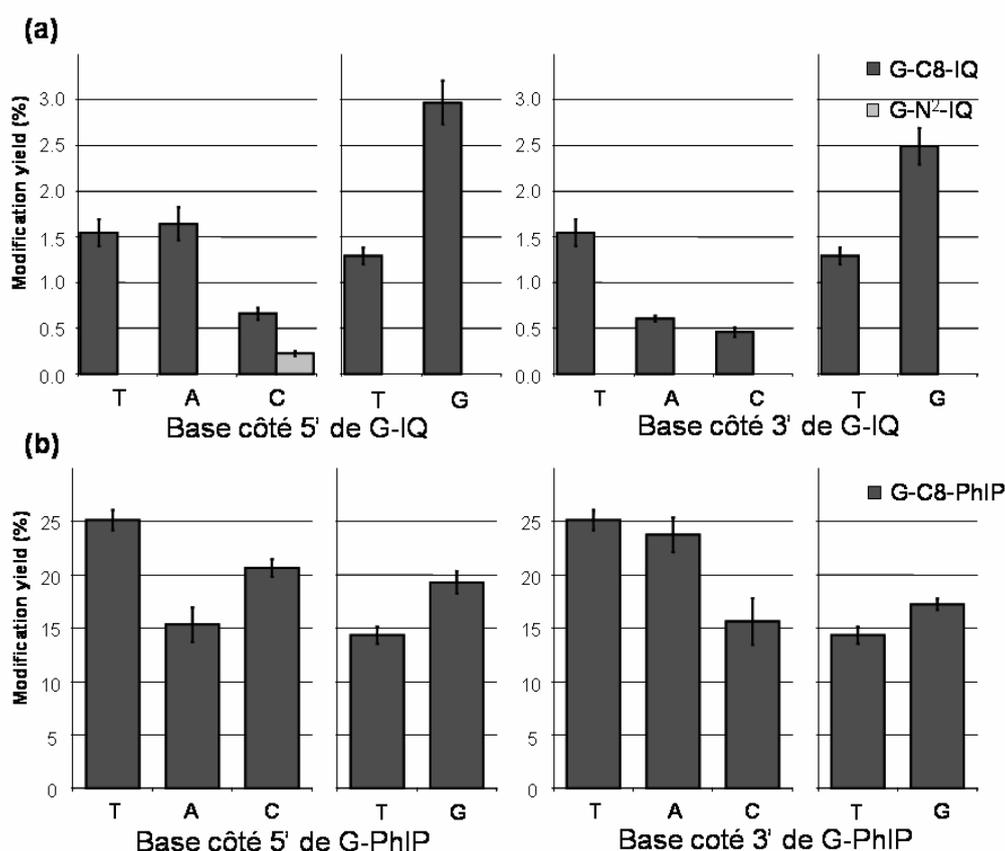


Figure 9. Taux de modification des oligonucléotides modèles modifiés par IQ (a) et PhIP (b) en fonction de la nature de la base côté 5' et 3' permettant la comparaison des effets de C et A par rapport à T, ainsi que l'effet de G par rapport à T.

Concernant les modifications induites par IQ, une influence importante de la base voisine sur la formation de l'adduit G-N²-IQ a été démontrée avec une seule séquence ayant conduit à la formation de cet adduit sur la guanine centrale de la séquence 5'CG*T³. La formation de l'adduit G-C8-IQ est également influencée par la nature de la base voisine, avec une modification favorisée pour la guanine centrale de la séquence 5'GG*G³, ce qui a pu être vérifié par l'analyse de l'oligonucléotide 5'TTTTTGGGTTTT³ modifié par IQ. Néanmoins, peu de données bibliographiques concernant les séquences dites « Hot Spots » pour IQ sont disponibles, ce qui permet de corrélérer les mutations observées *in vivo* et la sélectivité de séquence de la formation de l'adduit avec IQ.

Au niveau des modifications induites par PhIP, une faible influence de la nature de la base voisine a été observée. Cependant, il semble à la vue de nos résultats que la présence d'une guanine en 5' soit légèrement favorable tandis que la présence d'une cytosine en 3' serait légèrement défavorable à la formation de l'adduit G-C8-PhIP. Sur la base des expériences réalisées, nos résultats indiquent que la séquence préférentielle pour la modification de la guanine centrale par PhIP est 5'GG*A/G/T³. Or les portions de séquences « Hot Spots » décrites lors de nombreuses études concernant PhIP font état d'un motif du type 5'GGA³ [2]. Ces résultats sont en accord et indiquent que la sélectivité de formation de l'adduit et la sélectivité d'erreur de réplication sont concordantes. La faible sélectivité de formation de l'adduit G-C8-PhIP observée au cours de cette étude, rend cependant toute interprétation supplémentaire délicate quant aux proportions relatives des effets du contexte de la séquence sur la réplication et sur la formation de l'adduit. De plus, les raisons précises de cette sélectivité de formation d'adduits observée au cours de ce travail, sont difficilement identifiables. Il semble néanmoins probable que la nature de la base voisine puisse favoriser la formation de certains adduits par stabilisation des états intermédiaires formés au cours du mécanisme réactionnel, et/ou défavoriser la formation d'autres adduits par encombrement stérique.

En parallèle des résultats obtenus dans l'article présenté ci-après, d'autres types de modifications ont été étudiées. L'étude de la séquence 5'TTTTTGGTTTT³ doublement modifiée par PhIP a démontré que la modification d'un site n'interdisait pas celle du site adjacent. Confirmant les résultats du chapitre précédent, ce travail a également mis en évidence la formation d'un adduit A-IQ sur les séquences possédant une adénine. La formation de cet adduit renforce l'hypothèse émise dans le chapitre précédent selon laquelle l'observation de mutation de l'adénine ou de sa base complémentaire *in vivo* pourrait s'expliquer par une réactivité chimique entre l'adénine et IQ. Notons toutefois qu'aucune

2. Kakiuchi H., Watanabe M., Ushijima T., Toyota M., Imai K., Weisburger J.H., Sugimura T., Nagao M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92** (1995) 910-914.

double modification n'a été observée sur les séquences 5'TTTTTAGTTTT^{3'} et 5'TTTTTGATTTTT^{3'}. Dans un autre ordre d'idées, aucun site abasique n'a été détecté lors de l'étude des modifications des oligonucléotides par PhIP et IQ, confirmant également les résultats obtenus dans le Chapitre 3 à partir des désoxynucléosides.

En outre, pour obtenir des informations à la fois plus précises et plus pertinentes, il semble nécessaire que l'étude de l'influence de l'environnement local de la modification sur la formation des adduits G-PhIP et G-IQ soit poursuivie par l'analyse des modifications subies par des oligonucléotides double brin. En effet, si la formation des adduits avec les AAH est influencée par la nature des bases voisines de la modification, il est alors très probable qu'elle soit également influencée par la nature des bases complémentaires. L'intérêt de ce type d'approche a déjà été démontré dans un travail comparant la réactivité d'un oligonucléotide simple brin avec son homologue double brin vis-à-vis d'un HAP, montrant ainsi que la sélectivité de la formation de cet adduit était accentuée avec l'oligonucléotide double brin [3]. De plus, une évaluation plus précise de la sélectivité de formation d'adduits *in vivo* serait possible en étudiant la réactivité de systèmes double brin par rapport aux systèmes simple brin.

D'autre part, notre étude s'est concentrée sur l'influence de la nature de la base voisine en partant de l'hypothèse que l'influence de l'environnement immédiat est plus importante que l'influence du contexte à plus longue distance. Néanmoins, ces effets à longue distance ne sont pas forcément négligeables comme ceci a pu être noté dans le cas de modifications induites par des HAP [4]. C'est pourquoi, il serait également intéressant d'étudier ces effets sur la formation des adduits par PhIP ou IQ. Cependant, l'application de la méthodologie employée dans notre étude serait dans ce cas délicate à mettre en œuvre en raison du nombre important de séquences oligonucléotidiques modèles qu'il faudrait modifier et comparer. Une méthode similaire à celle développée par Vouros [5] serait plus appropriée pour ce genre d'étude. Cette méthode consiste à générer des adduits sur l'ADN, à réaliser une digestion enzymatique partielle de cet ADN modifié afin de former des oligonucléotides de faible taille, et à repérer les séquences préférentiellement modifiées. Cependant, ce type d'approche est encore limité par de nombreuses difficultés techniques comme la digestion spécifique de l'ADN en oligonucléotides de même taille, le développement d'un logiciel afin d'interpréter les résultats extrêmement complexes en raison du nombre de séquences possibles, etc.

3. Harsch A., Sayer J.M., Jerina D.M., Vouros P., *Chem. Res. Toxicol.*, **13** (2000) 1342-1348.
4. Rill R.L., Marsch G.A., *Biochemistry*, **29** (1990) 6050-6058.
5. Andrews C.L., Harsch A., Vouros P., *Int. J. Mass Spectrom.*, **231** (2004) 169-177.

Enfin, une tentative d'identification des adduits G-PhIP et G-IQ par MS³ des ions précurseurs [GAAH-H]⁺ a été réalisée. Le résultat obtenu avec un oligonucléotide modifié par PhIP, montre que la nature de l'adduit formé est du type G-C8-PhIP. Néanmoins, les quantités disponibles d'oligonucléotides modifiés par IQ n'ont pas permis la caractérisation des adduits formés. Il serait donc nécessaire de réaliser une synthèse des adduits 5'-TTTTTCG(IQ)TTTTT^{3'} à partir d'une quantité plus importante de réactifs afin de pouvoir fragmenter les ions [GIQ-H]⁺. Une autre solution envisageable pour former en plus grande quantité les ions [GAAH-H]⁺ pourrait être d'utiliser d'un autre mode d'excitation. Par exemple, des pertes abondantes de bases chargées ont été décrites lors d'une excitation par IRMPD d'oligonucléotides [6] dans une cellule ICR. De même, une excitation par CID d'anions radicalaires produits par EPD (Electron Photodetachment Dissociation) peut conduire à la formation d'espèces ayant perdu une base chargée [7] qu'il serait intéressant d'approfondir.

6. Keller K.M., Brodbelt J.S., *Anal. Biochem.*, **326** (2004) 200-210.

7. Gabelica V., Tabarin T., Antoine R., Rosu F., Compagnon I., Broyer M., De Pauw E., Dugourd P., *Anal. Chem.*, **78** (2006) 6564-6572.

IV Article 4

**Mass spectrometric investigation of the sequence selectivity for
adduction of heterocyclic aromatic amines with oligonucleotides.**

Emilien L. Jamin, Delphine Arquier, Jacques Tulliez, Laurent Debrauwer

Rapid Communications in Mass Spectrometry

à soumettre

Abstract

Heterocyclic aromatic amines (HAAs) generated during the cooking of meats are genotoxic substances able to form covalent bonds with DNA bases. In order to get better knowledge in the field of the mutation selectivity observed on particular sequence parts, this work consisted in the investigation of the influence of the local environment of guanine, which constitutes the most reactive nucleobase towards HAAs, on its modification induced by two different HAAs, namely PhIP and IQ. More precisely, the investigation of the nature of the neighbouring base was emphasized. Thus, PhIP and IQ adducts have been synthesized with various T-rich model oligonucleotides involving different flanking bases (A, G, C or T) at the 3' or the 5' side of the targeted guanine, which allowed to compare the flanking base effects on adduction. Modified oligonucleotides have been analyzed by mass spectrometry with Electrospray ionization coupled to HPLC. The location of the modifications induced by PhIP or IQ along the oligonucleotide sequence was achieved by tandem mass spectrometry, and modification yields of various model sequences were compared. Results indicate a significant sequence context effect on the G-C8-IQ adduct formation, with the sequence $5'GGG^3'$. Although higher than IQ, modification yields observed with PhIP showed a less significant effect of the neighbouring base on the G-C8-PhIP adduct formation, with a weakly preferential sequence $5'GGA/G/T^3'$.

Introduction

Heterocyclic Aromatic Amines (HAAs) are produced during the cooking of proteinous food¹ and have been discovered in cooked meat at the end of the seventies.² These substances, to which consumers are daily exposed by their diet, display mutagenic properties higher than benzo[a]pyrene or aflatoxin B1 in *S. typhimurium*.³ Furthermore, ten HAAs have been described to induce tumours in rodents⁴ and primate,⁵ and the International Agency for Research on Cancer (IARC) have classified these compounds as probable (group 2A) and possible (group 2B) carcinogens for humans.^{6,7,8} The DNA damages induced by HAAs are caused by their capacity to covalently bind to DNA bases after metabolic activation.⁹ This latter process generates highly nucleophilic arylnitrenium ions able to react with the DNA bases,¹⁰ mainly with the C8 carbon atom of G, and in a lesser extent with the N² nitrogen atom of G for two HAAs,¹¹ namely IQ and MeIQx.

Although mutation frequency is not directly correlated to cancer development,¹² some specifically mutated sequences have been described in cancerous cells. By this way, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4-5,b]pyridine (PhIP) is responsible for specific mutations of the $5'GGGA^3'$ sequence of the *Apc* gene in colon tumours,¹³ a signature also described in the *LacI* gene of rat and mouse.^{14,15,16} Similarly, mutations induced by PhIP have been

described in the 5'GGA3' sequence of H-ras gene of rat¹⁷ and Apc gene of mouse¹⁸ with 64% of mutations in the sequence 5'GA3'.¹⁹ Finally, the mutation frequency induced by PhIP has been demonstrated to depend on the neighbouring context in COS-7 cells, with predominant mutations of sequences containing a G or C at the 5' side of the modified base.²⁰ Contrary to PhIP, no obvious correlation has been found among the mutation "Hot Spots" in the case of 2-amino-3-methylimidazo[4-5,f]quinoline (IQ).^{13,19,21,22}

In this context, the assessment of possible preferentially modified sequences which could fit preferentially mutated ones, represents an important issue. The genotoxic effect will likely be all the higher as preferential sequences of adduct formation and mutation are identical, whereas genotoxic effect will be reduced if the preferential modified sequence is not a preferential target of mutation. Some carcinogens present an adduction selectivity for particular sequences, such as benzo[a]pyrene which generates more adducts at the central G of sequences 5'CGG3', 5'TGG3', 5'TGT3' and 5'CGT3'.^{23,24} Similarly, *N*-acetoxy-*N*-acetyl-2-aminofluorene (AAAF) is fixed to specific sites of *pBR322* plasmid,^{25,26} and a metabolite of benzo[c]phenanthrene has been described to bind predominantly to the hot spot of the carcinogenic metabolite of benzo[a]pyrene in the Chinese hamster *hprt* gene.²⁷ In order to obtain more precise information of the flanking bases effect on the adduct formation, Vouros and co-workers have developed a pseudo-combinatory method based on a partial digestion of modified DNA followed by a characterization of modified trimers by mass spectrometry coupled to liquid chromatography.²⁸ By this method, they have observed a preferential modification tendency with AAAF for G when C is its 3' flanking base, showing an effect of the microenvironment on the adduction.

The monitoring of the context effect of the modified nucleobase on the adduction process was achieved by mass spectrometry coupled to liquid chromatography, which appears as the most suited technique for oligonucleotides analysis.²⁹ Indeed, the use of a liquid separation method such as HPLC, nanoHPLC,³⁰ or capillary electrophoresis³¹ enables the quantification of DNA modifications, whereas mass spectrometry allows the structural characterization of DNA modifications, in terms of adduct location in the oligonucleotide sequence as well as adduct structural identification. Mass spectrometry is able to fragment small oligonucleotides (< 20-mer) in the gas phase according to well described mechanisms,³² and fragment ions assignment allows the oligonucleotide sequencing,³³ which is used to determine the modification position by using tandem mass spectrometry experiments on ions generated by Electrospray ionization^{34,35,36} or MALDI³⁷.

We present hereafter an investigation of the chemoselectivity of the adduct formation on DNA bases, and more precisely a systematic study of the neighbouring base effect on the adduction by the two heterocyclic aromatic amines PhIP and IQ, which are both carcinogens for rodents and also represent HAAs to which Humans are the most exposed by their diet.

PhIP and IQ are known to react with the C8 carbon atom of G to form a major G-C8 adduct. IQ is also known to generate minor adducts with the N² and N7 nitrogen atoms of G.³⁸ For this, T-rich model oligonucleotides chemically modified by either PhIP or IQ, have been analyzed by liquid chromatography coupled to Electrospray ionization mass spectrometry. Following the location of the adduct position in the oligonucleotide sequence by tandem mass spectrometry (MS/MS), the modification yields of the particular sequences investigated have been compared to study the influence of the neighbouring bases of the modified one on the adduction yield.

Experimental

Chemicals

Desalted 12-mer and 13-mer oligonucleotides from Sigma Genosys (Haverhill, UK), 1-methyl-2-nitro-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (NO₂-PhIP) and 2-hydroxyamino-3-methylimidazo[4,5-*f*]quinoline (NHOH-IQ) from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada) were the starting reactants for adducts syntheses. EDTA, Pd/C and hydrazine hydrate came from Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Acetic anhydride was purchased from Prolabo (Paris, France), DMSO from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France), THF was from Accros (Gee, Belgium) and triethylammoniumacetate (TEAA) from Applichem (Darmstadt, Germany). HPLC grade methanol and acetonitrile were purchased from Scharlau (Barcelona, Spain) and water was produced by a Milli-Q system (Millipore, Saint Quentin en Yvelines, France). Finally, Bond Elut C18 cartridges came from Varian (Les Ulis, France).

Adducts Syntheses

In order to enable the comparison of the modification yields of oligonucleotides, all syntheses were performed in strictly identical conditions. Furthermore, syntheses protocols were achieved as much as possible in conditions similar to biological environment to avoid the generation of unrealistic adducts. Oligonucleotides have been modified from *N*-hydroxyl HAAs derivatives according to a previously described protocol.³⁸ Briefly, NHOH-PhIP was synthesized by the dissolution of 0.5 mg of nitro-PhIP in 2 mL of anhydrous THF in the presence of 2 mg of Pd/C 10%. The mixture was placed at 0°C under a magnetic stirring and under argon. 10 µL of hydrazine hydrate were added slowly in order to keep the temperature below 5°C. After 40 min at 0°C under argon, 10 mL of cold and purged EDTA buffer (10 mM, pH 4.6) were finally added. The solution was then purified with a Bond Elut C18 cartridge (200 mg, 3 mL) conditioned with 1 bed volume of methanol and 1 bed volume of EDTA buffer (10 mM, pH 4.6). Loaded derivatives were washed with 2 bed volumes of EDTA buffer (10

mM, pH 4.6), and NHOH-PhIP was eluted with 1 volume of purged DMSO/MeOH 4/1 v/v. 15 µg of NHOH-PhIP obtained by this way were reacted with 0.2 µL of acetic anhydride during 10 min under argon. Then, 50 µg of oligonucleotide in 500 µL of TEAA 5 mM pH 7 were added and the reaction was allowed to proceed during 1 h at 37°C under magnetic stirring and argon atmosphere. Concerning the reaction with IQ, 50 µg of oligonucleotide in 500 µL of TEAA 5 mM pH 7 were directly placed with 15 µg of NHOH-IQ and 0.2 µL of acetic anhydride. The reaction was allowed to proceed during 3 h 30 under stirring at 37°C under argon. Crude reaction solutions were analyzed by LC-MS/MS immediately after syntheses.

LC-MS/MS

Liquid chromatography was achieved using a Thermo Separation P1500 pump (Thermo Fisher, Les Ulis, France). 100 µL of sample were injected into an Uptisphere ODB column (250 × 2 mm, 5 µm) from Interchim (Montluçon, France). In the particular case of the study of the oligonucleotide 5'TTTTTGGGTTTT3' modified by PhIP, a column Pursuit C8 (150 × 2 mm, 3 µm) from Varian (Les Ulis, France) had to be used in order to separate all generated adducts. The mobile phase flow rate was 0.2 mL/min of TEAA (5 mM, pH 7)/ACN 95/5 v/v for phase A and 5/95 v/v for phase B. Default gradient was 0 min, 0% B ; 15 min, 5% B ; 25 min, 8% B ; 30 min, 12% B ; 40 min, 100% B. This gradient was sometimes modified for analyses of particular adducts mixtures. This chromatographic system was coupled to a LCQ ion trap mass spectrometer (Thermo Fisher, Les Ulis, France), fitted with an Electrospray ionization source operating in the negative mode. Analytical conditions were optimized by the analysis of unmodified oligonucleotides and were as follow: spray voltage 4 kV, capillary temperature 220°C, capillary voltage -47 V, tube lens offset 15 V. For MS/MS experiments, precursor ions were selected with an isolation width of 3 Da and excited with an activation time of 30 ms. The attribution of fragment ions observed in MS/MS spectra of oligonucleotides was achieved by using an home made program working with Microsoft® Excel 2002.

Results and discussion

Oligonucleotides Sequencing

Under our experimental conditions, the mass spectra of oligonucleotides displayed a major charge state corresponding to the triply charged ion (data not shown). In the case of unmodified oligonucleotides, greater quantities available generated more intense signals, which allowed the selection of the less intense $[M-4H]^{4-}$ precursor ion to obtain a more extensive fragmentation. As an example, the MS/MS spectra acquired from the $[M-3H]^{3-}$ and $[M-4H]^{4-}$ precursor ions of the unmodified oligonucleotide 5'TTTTTGTTTTT3' are reported in

Figure 1a and 1b respectively. These spectra display the usual fragmentation pattern of T-rich oligonucleotides³⁹ with a full sequence information provided by the selection of the $[M-4H]^{4-}$ precursor ion.

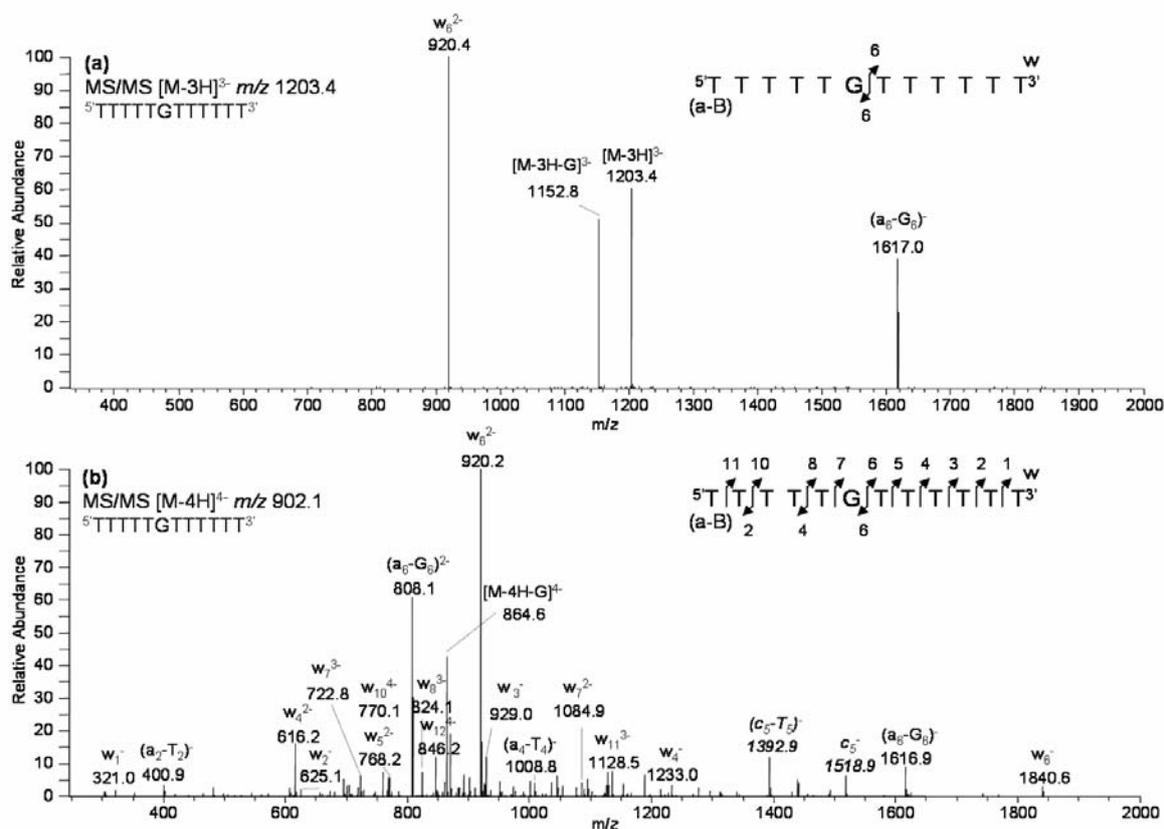


Figure 1. MS/MS spectra obtained by isolation and subsequent fragmentation of the NI-ESI generated $[M-3H]^{3-}$ (a) and $[M-4H]^{4-}$ (b) precursor ions of the unmodified oligonucleotide $5'TTTTTGTTTTT3'$.

Following the sequence confirmation of $5'TTTTTGTTTTT3'$, this oligonucleotide was modified by the *N*-acetoxy derivative of PhIP or IQ. The crude reaction mixtures were then analyzed by LC-MS and the resulting mass spectra showed the occurrence of species with *m/z* ratios corresponding to the expected mass of the oligonucleotide modified by either PhIP or IQ (data not shown). The $[M-3H]^{3-}$ precursor ions of both modified oligonucleotides were selected for MS/MS experiments and the resulting spectra are reported in Figure 2. Both MS/MS spectra display a diagnostic fragment ion at *m/z* 1153 corresponding to $[M-3H-GIQ]^{3-}$ (Figure 2a) and $[M-3H-GPhIP]^{3-}$ (Figure 2b) fragment ions, demonstrating that the modified nucleobase is G. Furthermore, w_6^{2-} and $(a_6-G_6IQ)^-$ or $(a_6-G_6PhIP)^-$ fragment ions are observed at *m/z* 920 and 1617 respectively, confirming the modification of the G in position 6.

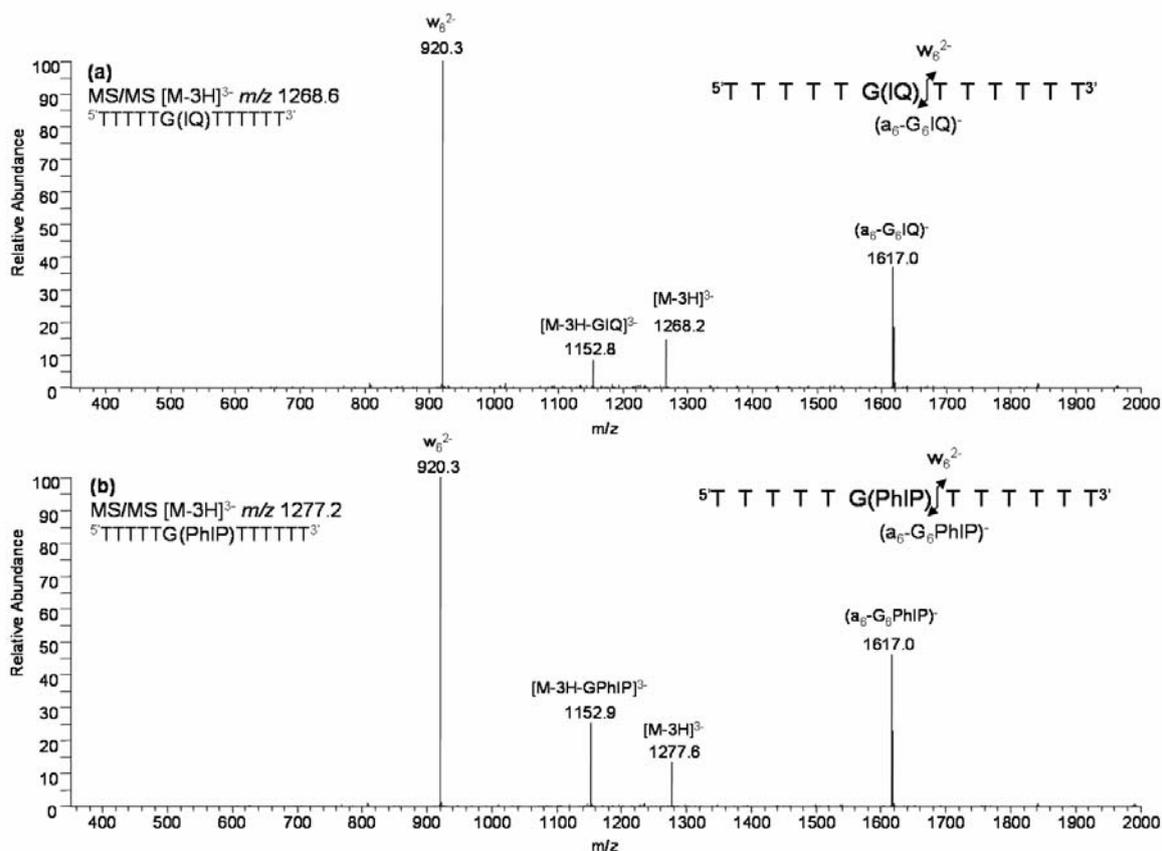


Figure 2. MS/MS spectra obtained by isolation and subsequent fragmentation of the NI-ESI generated $[M-3H]^{3-}$ precursors ions of the oligonucleotide $5' \text{TTTTTGTTTTT} 3'$ modified by IQ (a) or PhIP (b).

All oligonucleotides bearing one G reactive site were analyzed according to the same method, and diagnostic fragment ions observed on the various MS/MS spectra are summarized in Table 1. For all oligonucleotides reacted with PhIP, only one adduct was detected, and corresponded to the alkylation of G. These adducts were likely C8 adducts since PhIP is known to form only one adduct G-C8-PhIP although an additional minor isomeric adduct has been recently detected *in vivo* in rats fed with PhIP enriched diet.⁴⁰ On the other hand, IQ is able to generate three isomeric adducts with dG, namely dG-C8-IQ, dG-N²-IQ and dG-N⁷-IQ.³⁸ However, only one adduct has been observed in our synthesis conditions likely corresponding to the G-C8-IQ adduct, unless the minor adducts could not be separated with the chromatographic system used in this work. Surprisingly, the $5' \text{TTTTTCGTTTTT} 3'$ sequence led to the formation of a second minor adduct with IQ which could be separated by LC. According to data available from reactions of IQ with deoxynucleosides,^{11,38} the major adduct may be a G-C8-IQ adduct whereas the minor adduct likely corresponds to a G-N²-IQ adduct. Finally, no depurination induced by the adduct formation was detected with any modified sequence. This observation is also in agreement with previous results obtained from reactions of PhIP and IQ with deoxynucleosides.³⁸

Table 1. Diagnostic fragment ions obtained from the MS/MS analyses of unmodified oligonucleotides and their corresponding modified sequences formed with PhIP or IQ.

Sequence	^{5'} TTTTTCG*TTTTT ^{3'}			^{5'} TTTTTG*CTTTTT ^{3'}		
Adduct	∅	G-PhIP	G-IQ	∅	G-PhIP	G-IQ
Precursor ion	[M-4H] ⁴⁺ 898.4	[M-3H] ³⁻ 1272.2	[M-3H] ³⁻ 1263.6	[M-4H] ⁴⁺ 898.4	[M-3H] ³⁻ 1272.2	[M-3H] ³⁻ 1264.0
Fragment ions	[M-4H-G] ⁴⁺ 860.7 [M-4H-C] ⁴⁺ 870.7 w ₅ ²⁻ 768.3 w ₆ ²⁻ 932.8 (a ₆ -C ₆) ²⁻ 808.2	[M-3H-GPhIP] ³⁻ 1147.9 w ₅ 1537.0 (a ₇ -G ₇ *) ²⁻ 952.8	[M-3H-GIQ] ³⁻ 1147.6 w ₅ 1536.9 (a ₇ -G ₇ *) ²⁻ 952.7	[M-4H-G] ⁴⁺ 860.7 [M-4H-C] ⁴⁺ 870.7 w ₅ ²⁻ 768.2 w ₆ ²⁻ 912.8 (a ₆ -G ₆) ²⁻ 808.3	[M-3H-GPhIP] ³⁻ 1147.6 w ₆ ²⁻ 912.7 (a ₆ -G ₆ *) ⁻ 1617.1	[M-3H-GIQ] ³⁻ 1147.6 w ₆ ²⁻ 912.5 (a ₆ -G ₆ *) ⁻ 1617.2
Sequence	^{5'} TTTTTAG*TTTTT ^{3'}			^{5'} TTTTTG*ATTTTT ^{3'}		
Adduct	∅	G-PhIP	G-IQ	∅	G-PhIP	G-IQ
Precursor ion	[M-4H] ⁴⁺ 904.4	[M-3H] ³⁻ 1280.2	[M-3H] ³⁻ 1271.6	[M-4H] ⁴⁺ 904.4	[M-3H] ³⁻ 1280.2	[M-3H] ³⁻ 1271.6
Fragment ions	[M-4H-G] ⁴⁺ 866.8 [M-4H-A] ⁴⁺ 870.8 w ₅ ²⁻ 768.3 w ₆ ²⁻ 932.8 (a ₆ -A ₆) ²⁻ 808.4	[M-3H-GPhIP] ³⁻ 1156.0 w ₅ 1537.1 (a ₇ -G ₇ *) ²⁻ 965.0	[M-3H-GIQ] ³⁻ 1155.8 w ₅ 1537.1 (a ₇ -G ₇ *) ²⁻ 964.6	[M-4H-G] ⁴⁺ 866.7 [M-4H-A] ⁴⁺ 870.7 w ₅ ²⁻ 768.3 w ₆ ²⁻ 924.7 (a ₆ -G ₆) ²⁻ 808.3	[M-3H-GPhIP] ³⁻ 1155.8 w ₆ ²⁻ 924.8 (a ₆ -G ₆ *) ⁻ 1617.1	[M-3H-GIQ] ³⁻ 1155.8 w ₆ ²⁻ 924.7 (a ₆ -G ₆ *) ⁻ 1617.1

∅ unmodified oligonucleotides; asterisk indicates the adduct position

For the study of the effect of G as the 3' or the 5' flanking base of another G, oligonucleotide sequences involving several reactive sites were investigated. Therefore, the adduct location needed to be precisely determined. As an example, the chromatogram resulting from the LC-MS analysis of ^{5'}TTTTTGTTTTT^{3'} modified by IQ is reported in Figure 3a. It displays two chromatographic peaks showing *m/z* ratios corresponding to the linkage of one molecule of IQ to the original oligonucleotide. Furthermore, a [M-3H-GIQ]³⁻ ion is observed on the MS/MS spectra generated from the [M-3H]³⁻ precursor ion of both modified oligonucleotides, suggesting that a G is modified in both sequences (Figures 3b and 3c). (a₇-G₇)²⁻ fragment ions detected at *m/z* 1070.7 in the MS/MS spectrum of the adduct eluting at RT = 27.6 min (Figure 3b) provides evidence for a modification of G in position 6. This is confirmed by the occurrence of w₆²⁻ ions at *m/z* 932.9 indicating that G in position 7 is not modified. From these observations, the sequence of the first modified oligonucleotide can be deduced as ^{5'}TTTTTG(IQ)TTTTT^{3'}. The MS/MS spectrum of the second modified oligonucleotide, eluting at RT = 28.9 min is displayed in Figure 3c. In this case, the occurrence of a (a₇-G₇/IQ)²⁻ fragment ion at *m/z* 972.7 demonstrates that G in position 6 is not modified, whereas the w₆²⁻ ion present at *m/z* 1030.7 indicates that G in position 7 is modified. These diagnostic ions ensure that the sequence of the second adduct corresponds

to $5' \text{TTTTTGG(IQ)TTTTT}^{3'}$. Similarly, the modification of the same oligonucleotide by PhIP also led to the formation of two adducts which were separated by liquid chromatography (data not shown), and for which diagnostic fragment ions are reported in Table 2. As for IQ, from a qualitative point of view, the two modified sequences correspond to the alkylation of G in positions 6 and 7, respectively. Finally, for both HAAs investigated in this work, the formation of doubly modified oligonucleotides was also investigated. In the case of IQ, no doubly modified sequence was detected. For PhIP, the doubly modified $5' \text{TTTTTG}^* \text{G}^* \text{TTTTT}^{3'}$ sequence was characterized in very weak amounts, showing that the modification of one G does not hinder the modification of the other adjacent G base. Considering the very low formation yield of this doubly modified sequence, it was not further taken into account in this work.

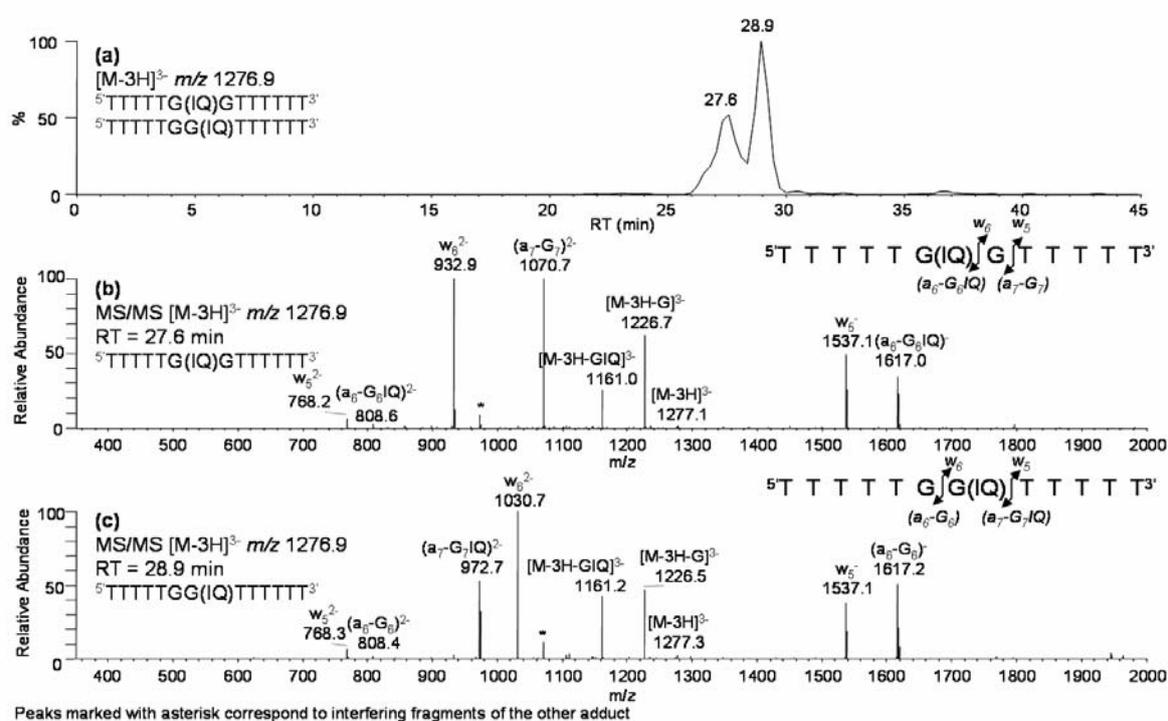


Figure 3. LC-ESI-MS/MS analysis of $5' \text{TTTTTGGTTTTT}^{3'}$ modified by IQ. **(a)** Reconstructed MS ion chromatogram of the $[M-3H]^{3-}$ ion corresponding to the modified sequence, and corresponding MS/MS spectra of peaks eluting at 27.6 min **(b)** and 28.9 min **(c)**.

Table 2. Diagnostic fragment ions obtained from the MS/MS analyses of unmodified oligonucleotides owning two and three reactive positions and their corresponding modified sequences generated with PhIP.

Sequence	$5' \text{TTTTTGGTTTT}^{3'}$	$5' \text{TTTTTG}^* \text{TTTT}^{3'}$	$5' \text{TTTTTG}^* \text{GTTTT}^{3'}$	
Precursor Ion	$[\text{M-4H}]^4$ 898.4	$[\text{M-3H}]^3$ 1286.6	$[\text{M-3H}]^3$ 1286.6	
Fragment ions	$[\text{M-4H-G}]^4$ 870.7 w_5^{2-} 768.3 w_6^{2-} 932.7 $(a_6\text{-G}_6)^{2-}$ 808.2 $(a_7\text{-G}_7)^{2-}$ 972.8	$[\text{M-3H-GPhIP}]^3$ 1161.2 w_6^{2-} 1043.8 $(a_7\text{-G}_7^*)^{2-}$ 972.8	$[\text{M-3H-GPhIP}]^3$ 1161.3 w_6^{2-} 932.8 $(a_7\text{-G}_7)^{2-}$ 1083.8	
Sequence	$5' \text{TTTTTGGGTTTT}^{3'}$	$5' \text{TTTTTG}^* \text{GGTTTT}^{3'}$	$5' \text{TTTTTGG}^* \text{GTTTT}^{3'}$	$5' \text{TTTTTGGG}^* \text{TTTT}^{3'}$
Precursor Ion	$[\text{M-4H}]^4$ 914.6	$[\text{M-3H}]^3$ 1293.9	$[\text{M-3H}]^3$ 1293.9	$[\text{M-3H}]^3$ 1293.9
Fragment ions	$[\text{M-4H-G}]^4$ 877.0 w_4 1233.1 w_5^{2-} 780.8 w_6^{2-} 945.3 $(a_6\text{-G}_6)^{2-}$ 808.3	$[\text{M-3H-GPhIP}]^3$ 1169.5 w_5^{2-} 780.8 w_6^{2-} 945.3 $(a_6\text{-G}_6^*)$ 1617.1	$[\text{M-3H-GPhIP}]^3$ 1169.4 w_5^{2-} 780.8 w_6^{2-} 1056.3 $(a_7\text{-G}_7^*)^{2-}$ 972.8	$[\text{M-3H-GPhIP}]^3$ 1169.4 w_5 1784.0 $(a_8\text{-G}_8^*)^{2-}$ 1137.3

asterisk indicates the adduct position

Finally, the chromatogram obtained by LC-MS analysis of $5' \text{TTTTTGGGTTTT}^{3'}$ modified by IQ is displayed in Figure 4a. As expected, it shows the occurrence of three peaks detected at an m/z ratio in agreement with the expected mass of an adduct resulting from the alkylation of this oligonucleotide by one molecule of IQ. Corresponding MS/MS spectra obtained from the $[\text{M-3H}]^3$ ion of the three peaks all display a $[\text{M-3H-GIQ}]^3$ fragment ion at m/z 1169.5, demonstrating that a guanine is modified in all cases. w_5^{2-} and w_6^{2-} fragment ions detected in the MS/MS spectrum of the peak eluting at RT = 28.2 min (Figure 4b) indicate that G in positions 7 and 8 are not modified whereas the modification of G in position 6 is evidenced by the occurrence of the $(a_6\text{-G}_6\text{IQ})^-$ and $(a_7\text{-G}_7)^{2-}$ fragment ions observed at m/z 1617.1 and 1070.9 respectively. Thus, the first modified oligonucleotide corresponds to $5' \text{TTTTTG}(\text{IQ})\text{GGTTTT}^{3'}$. Similarly, the w_5^{2-} fragment ion observed in the MS/MS spectrum corresponding to the peak eluting at RT = 29.2 min (Figure 4c) indicates that G in position 8 is not modified. Alternatively, the w_6^{2-} fragment ion observed at m/z 1043.4 shows that G in position 7 is modified by IQ. This is further confirmed by the $(a_7\text{-G}_7\text{IQ})^{2-}$ and $(a_6\text{-G}_6)^-$ fragment ions at m/z 972.8 and 1617.1 respectively, which indicate that G in position 6 is not modified. Therefore, the sequence of the major adduct can be deduced from these information as $5' \text{TTTTTGG}(\text{IQ})\text{GTTTT}^{3'}$. Finally, the sequence $5' \text{TTTTTGGG}(\text{IQ})\text{TTTT}^{3'}$ of the modified oligonucleotide detected at RT = 31.0 min is also

identified by the corresponding MS/MS spectrum presented in Figure 4d and displaying diagnostic w_5^- (m/z 1758.0) and $(a_6-G_8IQ)^{2-}$ (m/z 1137.2) fragment ions. A similar work has been carried out on the same oligonucleotide modified by PhIP. Results of the LC-MS/MS analyses are summarized in Table 2, and also show that the three G reactive sites were modified by this HAA.

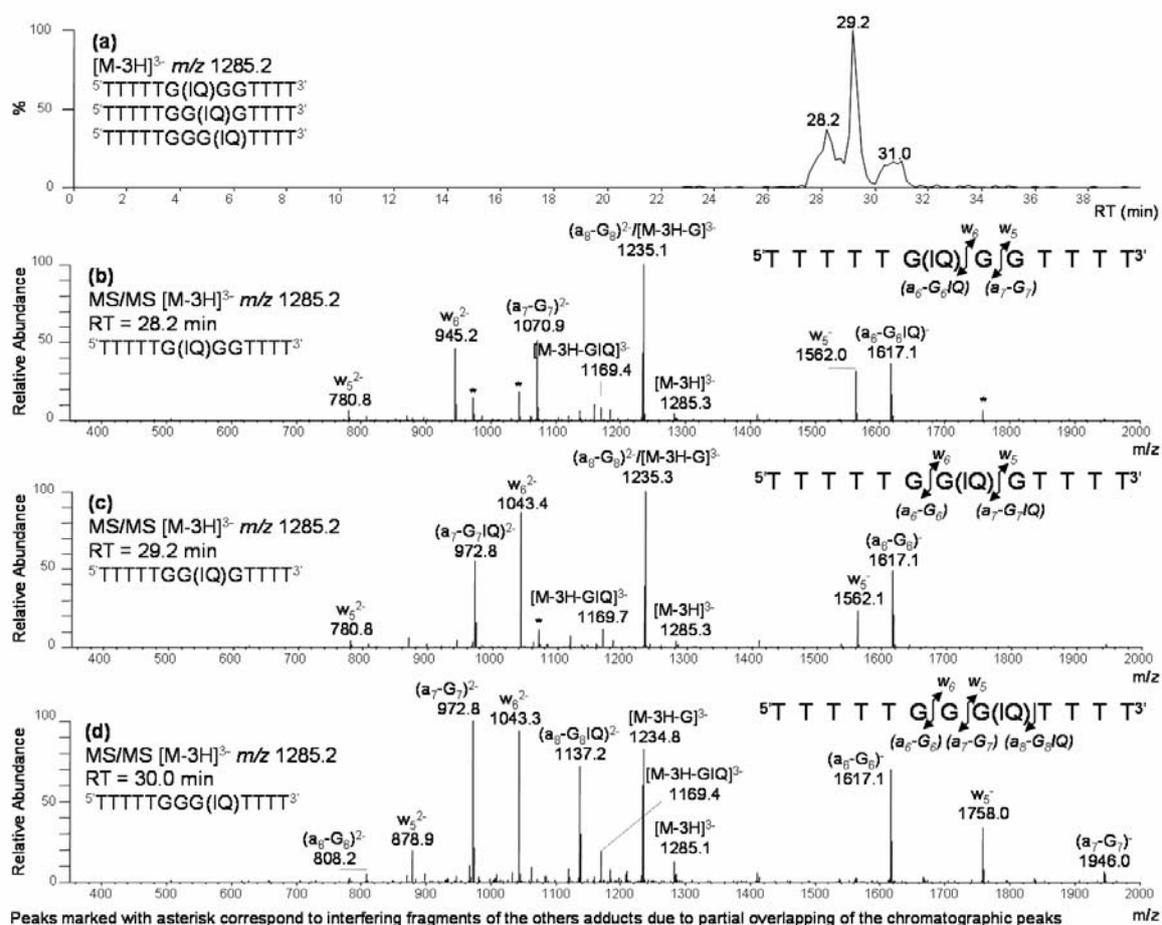


Figure 4. Negative LC-ESI-MS/MS analysis of 5'TTTTTGGGTTT3' modified by IQ. **(a)** Reconstructed ion chromatogram of the [M-3H]³⁻ ion corresponding to the modified sequence, and corresponding MS/MS spectra of peaks detected at 28.2 min **(b)**, 29.2 min **(c)** and 31.0 min **(d)**.

Sequence selectivity of adduction

One other objective of our work was to investigate the influence of the modified site neighbouring bases on the modification yield of this site, with the aim to determine possible preferential sequences for the modification by IQ or PhIP. Following the location of the adduct position along the oligonucleotide sequence, modification yields of the studied sequences were compared by calculating the ratio of the chromatographic peak areas corresponding to modified and unmodified oligonucleotides respectively, assuming that their

behaviour towards Electrospray ionization were identical. In order to compare the effect of either the 5' or the 3' flanking base, HAA-oligonucleotide reactions were carried out under rigorously identical conditions and particular sequences were selected as follows. For sequences involving one reactive site (G), the presence of a constant 3' flanking base (T) and a variable 5' flanking base (N) giving $5'\text{TTTTTNGTTTT}^3'$ sequences, allowed the comparison of the 5' flanking base effect. Similarly, sequences with one G surrounded by a constant 5' flanking base and a variable 3' flanking base ($5'\text{TTTTTGNTTTTT}^3'$) enabled the comparison of the 3' flanking base influence. However, when the variable nucleobase was another G, then the sequence involved two reactive sites. This modifies the stoichiometry of the adduct synthesis and prevents the comparison of modification yields with sequences involving only one reactive site. Therefore, modification yields of the oligonucleotide bearing two adjacent G ($5'\text{TTTTTGTTTT}^3'$) were compared with those of a sequence involving two distant G in the poly-T sequence ($5'\text{TTTTGTTT}^3'$), thus allowing the comparison of the neighbouring G effect with the neighbouring T effect. Since the T influence could be compared with A and C influence using the previous sequences, then the comparison of the neighbouring base effect on adduct formation was possible.

Concerning reactions of oligonucleotides with IQ, the formation of both a major C8 adduct and a minor N² adduct on G was expected, according to data available from reactions of the dG deoxynucleoside with this HAA.^{11,38} However, the formation of two adducts likely corresponding to a major G-C8-IQ adduct and a minor G-N²-IQ adduct was observed only from the sequence $5'\text{TTTTTCGTTTT}^3'$, while all others sequences investigated led to the generation of only one adduct, probably the C8 adduct. These results suggest that a sequence selectivity exists for the G-N²-IQ adduct formation, which seems to occur only when the neighbouring bases of G are C in 5' and T in 3'. The 5' flanking base effect on the G-C8-IQ adduct formation was investigated by comparison of the modification yields of the oligonucleotides $5'\text{TTTTTG}^*\text{TTTTT}^3'$, $5'\text{TTTTTAG}^*\text{TTTTT}^3'$, and $5'\text{TTTTTCG}^*\text{TTTTT}^3'$. Results are presented in Figure 5a and show a similar modification yield of G when T or A are the 5' flanking base, whereas a lower yield is observed when the neighbouring base is C. The comparison of the modification yields obtained for the oligonucleotides $5'\text{TTTTTG}^*\text{TTTTT}^3'$ and $5'\text{TTTTG}^*\text{TTTGT}^3'$ displayed in Figure 5b, shows a greatly favoured adduct formation when G is neighboured by another G in 5' compared to T. By pooling these information, it can be concluded that the G-C8-IQ is the most favoured when the 5' flanking base is G compared with T or A, whereas C seems to hinder the modification of G. The same approach was used on sequences $5'\text{TTTTTG}^*\text{TTTTT}^3'$, $5'\text{TTTTTG}^*\text{ATTTTT}^3'$, $5'\text{TTTTTG}^*\text{CTTTTT}^3'$ to compare the 3' flanking base effect of T, A and C (Figure 5c), as well as on $5'\text{TTTTG}^*\text{TTTGT}^3'$ and $5'\text{TTTTTG}^*\text{GTTTTT}^3'$ to compare the 3' flanking base effect of T and G (Figure 5d). Figure 5d indicates a preferential modification of G when the 3' flanking

base is G compared with T. On the other hand, sequences involving neighbouring A or C bases at the 3' position of the reactive site lead to a lower modification yield, as indicated in Figure 5c. As previously, the G-C8-IQ adduct formation appears to be favoured when the 3' flanking base is G compared to A, C or T. Therefore, the preferential sequence for the G-C8-IQ adduct formation should be $5'GG^*G^3'$, according to the combination of the observed 5' and 3' flanking base effects.

In order to support this assumption, a sequence $5'TTTTTGGGTTTT^3'$ was reacted with IQ under the same conditions. As previously described, (Figure 4), three adducts were generated, which were separated and identified by LC-MS/MS. According to the previous observations, the central G nucleobase should be primarily modified since it is surrounded by 5' and 3' flanking G bases. Measured modification yields presented in Figure 5e indicate that the major modified nucleobase is indeed the central G of the $5'TTTTTGGGTTTT^3'$. This result validates our approach for investigating the sequence selectivity for the IQ adduction of oligonucleotides, with a preferential sequence for the G-C8-IQ adduct formation corresponding to $5'GG^*G^3'$.

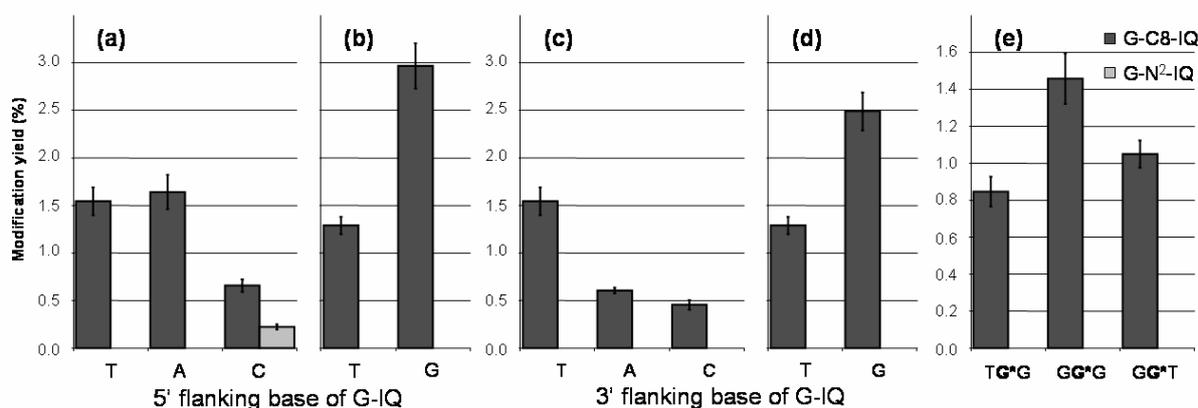


Figure 5. Effect of 3' and 5' flanking bases on the modification yields of oligonucleotides in reactions conducted with IQ. **(a)** compared effect of T, A and C as the 5' flanking base, **(b)** compared effect of T and G as the 5' flanking base, **(c)** compared effect of T, A and C as the 3' flanking base, **(d)** compared effect of T and G as the 3' flanking base and **(e)** compared modification yields for the three reactive G sites of the sequence $5'TTTTTGGGTTTT^3'$.

The same methodology was applied to investigate the influence of the neighbouring bases of the reactive site on the G-C8-PhIP adduct formation along the same oligonucleotides sequences as for IQ. The first observation concerns the global yields of adducts formation, which were much higher with PhIP than with IQ, with values ranging from 15% to 25% for PhIP whereas yields obtained with IQ were in the 0.5-3% range. Concerning the 5' flanking base, results presented in Figure 6a show a weak effect, with a favouring

effect of T compared to C, and A leading to the lower modification yield. The occurrence of G in 5' of the other G reactive sites leads to an enhancement of adduction yields compared with T, as indicated in Figure 6b. Concerning the 3' flanking base effect, Figure 6c shows a similar influence of T and A, whereas the modification yield is lowered by the occurrence of C at the 3' position. Finally, G and T display a comparable influence according to results shown in Figure 6d, although G seems to induce a slightly more favourable context. From these observations, the sequence selectivity for the PhIP adduction is clearly less contrasted than IQ, although a preferential sequence $5'GG^*A/T/G^3'$ can be tentatively deduced. In order to validate these results, the sequence $5'TTTTTGGGTTTT^3'$ was also considered for reaction with PhIP. In this situation and according to Figures 6a-d, the major adduct position expected should concern the two G nucleobases owning a 5' flanking G. Experimental modification yields obtained are reported in Figure 6e and indicate that the two G bases displaying a 5' flanking G constitute indeed the two preferentially modified nucleobases, thus corroborating the previous tendencies. Although not significant, a slightly higher modification yield was obtained for the $5'GG^*G^3'$ sequence compared to the $5'GG^*T^3'$ one, which is also in agreement with the results presented in Figure 6d.

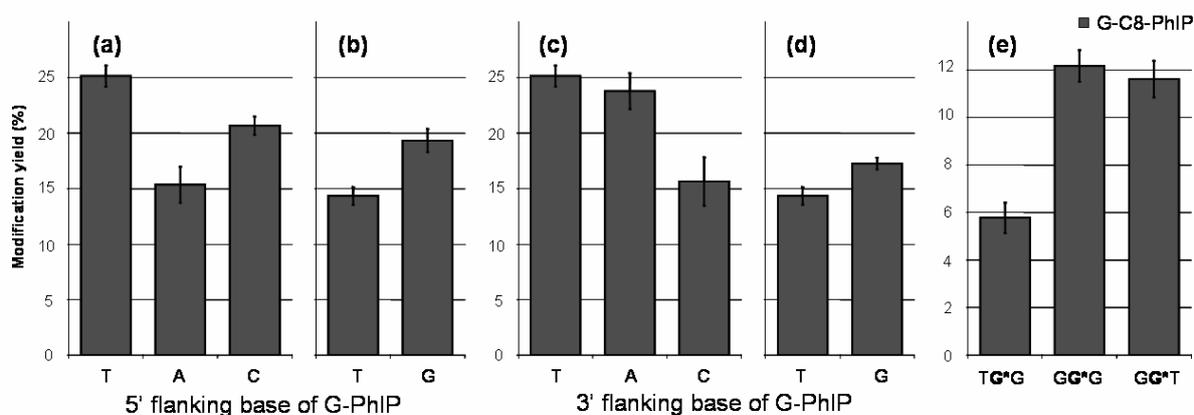


Figure 6. Effect of 3' and 5' flanking bases on the modification yields of oligonucleotides in reactions conducted with PhIP. **(a)** compared effect of T, A and C as the 5' flanking base, **(b)** compared effect of T and G as the 5' flanking base, **(c)** compared effect of T, A and C as the 3' flanking base, **(d)** compared effect of T and G as the 3' flanking base and **(e)** compared modification yields for the three reactive G sites of the sequence $5'TTTTTGGGTTTT^3'$.

Conclusions

The sequence selectivity of various oligonucleotides towards adduct formation with two HAAs (IQ and PhIP) has been assessed on the basis of model sequences bearing variable bases (A, T, G or C) as the 3' or 5' flanking base of the G reactive site. An LC-

MS/MS methodology has been developed for the liquid chromatography separation and mass spectrometric location of the modified site by means of MS/MS experiments conducted on the triply charged negative ion of modified oligonucleotides.

Modification yields were determined using a semi-quantitative approach allowing the comparison of the various sequences from each other. For both HAAs studied in this work, the presence of a guanine at a neighbouring position of another guanine (3' as well as 5' position) seems to promote the formation of an adduct with guanine, very likely at the C8 position. Although global modification yields were weak with IQ, the chemoselectivity of the adduct formation was clearly evidenced with a favouring sequence corresponding to $5'GG^*G^3$. In the case of PhIP, modification yields were much higher but the effect of the 3' and 5' flanking base of G was less obvious. Nevertheless, a preferentially modified sequence could be deduced as $3'GG^*A/G/T^3$, which fits the mutational Hot Spots sequences described in cancerous cells.

Favouring or hindering effects of the microenvironment of the modified base on the adduct formation may be attributed to the stabilization of the transition state during the adduction process by weak interactions with adjacent bases. In this context, complementary bases should also influence the adduct formation selectivity by a similar transition state stabilization and/or steric effects. Thus, forthcoming work will now be conducted by studying the complementary bases effects from double stranded oligonucleotide sequences, which means that the double strand conformation has to be preserved during the adduct synthesis process.

Acknowledgements

Financial support (E. Jamin PhD grant) was provided by INP (Institut National Polytechnique de Toulouse, France) which is greatly acknowledged. The authors would also like to especially thank Alexia Carrere for her contribution during the adducts syntheses development. Estelle Rathahao and Isabelle Jouanin (INRA, Toulouse, France) are thanked for helpful advices concerning the oligonucleotides adduct synthesis and their LC-MS/MS analysis.

References

1. Murkovic M. *J. Chromatogr., B* 2004; **802**: 3.
2. Sugimura T, Nagao M, Kawachi T, Hoda M, Yahagi T, Seino Y, Sato S, Matsukara N, Shirai A, Sawamura M, Matsumoto H. *Origins of Human Cancer (Book C)*. Hiatt HH, Watson JD, Winsten JA: New York, 1977; 1561.
3. Sugimura T. *Mutat. Res.* 1997; **376**: 211.

4. Ohgaki H, Takayama S, Sugimura T. *Mutat. Res.* 1991; **259**: 399.
5. Adamsson RH, Thorgeirsson UP, Snyderwine EG, Thorgeirsson SS, Reeves J, Dalgard DW, Takayama S, Sugimura T. *Jpn. J. Cancer Res.* 1990; **81**: 10.
6. IARC. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 1993; **56**: 165.
7. IARC. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 1987; **40**: 222.
8. IARC. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 1987; **31**: 247.
9. Turesky RJ. *Mol. Nutr. Food Res.* 2005; **49**: 101.
10. Novak M, Rajagopal S, Xu L, Kazerani S, Toth K, Brooks M, Nguyen T-M. *J. Phys. Org. Chem.* 2004; **17**: 615.
11. Turesky RJ, Vouros P. *J. Chromatogr., B* 2004; **802**: 155.
12. Nagao M. *Mutat. Res.* 1999; **431**: 3.
13. Kakiuchi H, Watanabe M, Ushijima T, Toyota M, Imai K, Weisburger JH, Sugimura T, Nagao M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1995; **92**: 910.
14. Okonogi H, Stuart GR, Okochi E, Ushijima T, Sugimura T, Glickman BW, Nagao M. *Mutat. Res.* 1997; **395**: 93.
15. Okochi E, Watanabe N, Shimada Y, Takahashi S, Wakazono K, Shirai T, Sugimura T, Nagao M, Ushijima T. *Carcinogenesis* 1999; **20**: 1933.
16. Okonogi H, Ushijima T, Zhang XB, Heddle JA, Suzuki T, Sofumi T, Felton JS, Tucker JD, Sugimura T, Nagao M. *Carcinogenesis* 1997; **18**: 745.
17. Yu M, Jones ML, Gong M, Sinha R, Schut HAJ, Snyderwine EG. *Carcinogenesis* 2002; **23**: 877.
18. Andreassen Å, Møllersen L, Vikse R, Steffensen I-L, Mikalsen A, Paulsen JE, Alexander J. *Mutat. Res.* 2002; **517**: 157.
19. Møllersen L, Vikse R, Andreassen Å, Steffensen I-L, Mikalsen A, Paulsen JE, Alexander J. *Mutat. Res.* 2004; **557**: 29.
20. Shibutani S, Fernandes A, Suzuki N, Zhou L, Johnson F, Grollman AP. *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 1998; **207**: 459.
21. Bol SAM, Horlbeck J, Markovic J, de Boer JG, Turesky RJ, Constable A. *Carcinogenesis* 2000; **21**: 1.
22. Leong-Morgenthaler PM, Op Het Velt C, Jaccard E, Turesky RJ. *Carcinogenesis* 1998; **19**: 1749.
23. Lobanenkova VV, Plumb M, Goodwin GH, Grover PL. *Carcinogenesis* 1986; **7**: 1689.
24. Rill RL, Marsch GA. *Biochemistry* 1990; **29**: 6050.
25. Combates NJ, Winkle SA. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1992; **10**: 63.
26. Mallamaci MA, Bascoy ML, Brown J, Combates NJ, Winkle SA. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1992; **10**: 83.
27. Harsch A, Sayer JM, Jerina DM, Vouros P. *Chem. Res. Toxicol.* 2000; **13**: 1342.
28. Andrews CL, Harsch A, Vouros P. *Int. J. Mass Spectrom.* 2004; **231**: 169.

29. de Kok TMCM, Moonen HJJ, van Delft J, van Schooten FJ. *J. Chromatogr., B* 2002; **778**: 345.
30. Vanhoutte K, Van Dongen W, Hoes I, Lemière F, Esmans EL, Van Onckelen H, Van den Eeckhout E, van Soest REJ, Hudson AJ. *Anal. Chem.* 1997; **69**: 3161.
31. Harsch A, Vouros P. *Anal. Chem.* 1998; **70**: 3021.
32. Wu J, McLuckey SA. *Int. J. Mass Spectrom.* 2004; **237**: 197.
33. McLuckey SA, Van Berkel GJ, Glish GL. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1992; **3**: 60.
34. McLuckey SA, Habibi-Goudarzi S. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1994; **5**: 740.
35. Marzilli LA, Wang D, Kobertz WR, Essigmann JM, Vouros P. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1998; **9**: 676.
36. Debrauwer L, Rathahao E, Couve C, Poulain S, Pouyet C, Jouanin I, Paris A. *J. Chromatogr., A* 2002; **976**: 123.
37. Brown K, Harvey CA, Turteltaub KW, Shields SJ. *J. Mass Spectrom.* 2003; **38**: 68.
38. Jamin EL, Arquier D, Canlet C, Rathahao E, Tulliez J, Debrauwer L. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* submitted.
39. Wan KX, Gross ML. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2001; **12**: 580.
40. Goodenough AK, Schut HAJ, Turesky RJ. *Chem. Res. Toxicol.* 2007; **20**: 263.

- Conclusion Générale -

Conclusion Générale

L'objectif de ce travail était d'utiliser le potentiel de la spectrométrie de masse pour une caractérisation rapide des AAH dans les viandes cuites ainsi que pour l'étude de leur réactivité vis-à-vis des bases de l'ADN. Deux axes de recherche distincts ont été développés au cours de cette thèse. Le premier axe a consisté à explorer le potentiel de l'ionisation par bombardement d'atomes métastables (MAB) pour une quantification rapide des AAH dans les viandes cuites. Dans le deuxième axe, nous avons étudié de façon systématique la réactivité de deux AAH (IQ et PhIP) vis-à-vis des désoxynucléosides et d'oligonucléotides modèles.

L'utilisation de la technologie Py-MAB-ToF a permis la mise au point d'une méthode de quantification des AAH dans les viandes cuites autorisant l'obtention du résultat en seulement deux heures. Ceci constitue une réelle avancée en comparaison avec les nombreuses heures jusqu'à présent nécessaires à la quantification de ces mêmes AAH par LC-MS/MS, technique actuellement considérée comme la méthode de référence pour cette application. Concernant la méthodologie basée sur l'utilisation de la technologie Py-MAB-ToF, les performances analytiques offertes par ce système, en termes de sélectivité d'ionisation et de rapidité d'analyse, ont été clairement établies par les résultats présentés dans ce manuscrit. Cependant, l'application de cette technologie dans son état actuel de développement semble encore difficile à envisager dans le cadre industriel ou d'analyses de routine. En effet, les niveaux de sensibilité et de répétabilité obtenus restent relativement éloignés des valeurs requises pour une étude quantitative de résidus présents à l'état de traces. C'est la raison pour laquelle la méthodologie de quantification des AAH par LC-MS/MS développée au cours de cette thèse, actuellement plus sensible et plus robuste, sera celle utilisée par le laboratoire dans le cadre d'un projet intégré européen auquel il participe. Les progrès réalisés par les sources MAB de nouvelle génération permettent d'envisager une amélioration considérable de la sensibilité. Ainsi, des expérimentations sont d'ores et déjà envisagées sur un spectromètre de masse FT-ICR équipé d'une telle source. Outre le gain de sensibilité offert par cette source, ce système permettra également la réalisation d'expériences MS/MS à haute résolution pour l'identification des substances détectées. Nous avons néanmoins démontré dans ce travail la faisabilité de notre approche qui présente un réel intérêt en termes de temps et de coût d'analyse. L'utilisation de la pyrolyse avec une approche quantitative telle que celle développée dans ce travail constitue une méthode originale pour la détermination rapide des AAH dans les viandes cuites. A la vue des résultats obtenus sur les AAH, il serait intéressant d'évaluer cette technologie sur

d'autres classes de molécules qui pourraient bénéficier des avantages offerts par l'ionisation MAB, comme des pesticides ou des mycotoxines. Ainsi, des analyses de pesticides organophosphorés sont en cours de réalisation au sein du laboratoire sur la base de la méthodologie développée au cours de cette thèse. Enfin, notre méthode de quantification n'a été appliquée qu'à un seul type de matrice, en l'occurrence la viande de poulet. Il serait donc intéressant de tester notre approche sur d'autres matrices, telles que la viande de bœuf (plus grasse que le poulet) et le poisson pour les AAH, ou les sols pour les pesticides par exemple.

Le deuxième axe développé dans ce travail visait à apporter des éléments nouveaux dans la compréhension des mécanismes de génotoxicité des AAH. Dans ce contexte, l'étude de la formation des adduits covalents formés par les AAH était fondamentale. Ce travail a conduit à la caractérisation de nouveaux adduits et à la démonstration d'une certaine sélectivité de séquence pour la formation des adduits avec les AAH. Ainsi, la caractérisation d'un adduit dG-N7 sans induction de processus dépurinant permet d'envisager un mécanisme de formation des adduits dG-C8 majoritaires via un réarrangement, apportant ainsi de nouveaux éléments dans la compréhension des mécanismes de formation des adduits par les AAH en particulier, et par les composés génotoxiques bioactivés sous forme d'ions nitrénium en général. Ces résultats vont dans le même sens que d'autres données publiées très récemment, confortant ainsi notre raisonnement. De même, la mise en évidence d'un adduit formé avec une base différente de la guanine, en l'occurrence l'adénine, offre une possible explication aux mutations observées *in vivo* de cette base ou de sa base complémentaire. En outre, les développements méthodologiques réalisés dans le cadre de cette étude permettent aujourd'hui leur application à la recherche d'adduits formés *in vitro* ou *in vivo* avec de l'ADN cellulaire après digestion enzymatique. En effet, les adduits formés avec les désoxynucléosides identifiés dans ce travail constituent des biomarqueurs de génotoxicité pertinents. C'est pourquoi, la méthode analytique utilisée au cours de nos travaux sert actuellement de base à la détection d'adduits sur de l'ADN extrait de lignées cellulaires métaboliquement compétentes et exposées à des AAH, dans le cadre d'une autre thèse réalisée au laboratoire. De même, des protocoles d'expérimentation sur des animaux exposés aux AAH sont en cours d'élaboration. Notre méthodologie analytique sera également appliquée à plus long terme au sein de l'unité à la caractérisation d'autres types de modifications de l'ADN, provoquées par d'autres agents alkylants ou par l'action des espèces réactives de l'oxygène par exemple, dans le cadre des programmes de recherche développés par l'UMR Xénobiotiques.

L'étude de la formation des adduits covalents entre les AAH et des oligonucléotides modèles a permis de démontrer une sélectivité de séquence, ce qui apporte de nouvelles

données pour la compréhension des paramètres induisant des mutations de séquences privilégiées (Hot Spots). La méthodologie développée permet d'étudier spécifiquement l'effet de la nature de la base voisine de la modification en s'affranchissant des éventuelles perturbations rencontrées avec les approches impliquant l'ADN. En effet, l'interprétation des résultats obtenus par ces approches est compliquée par la nature des bases plus éloignées de l'adduit et des proportions différentes des paires de bases A:T et G:C sur l'ADN. En étudiant la formation d'adduits entre les AAH et des oligonucléotides modèles, des séquences préférentiellement modifiées par PhIP et IQ ont pu être caractérisées au cours de nos travaux. Dans le cas de PhIP, la sélectivité de formation de l'adduit et la sélectivité de mutation décrite dans la littérature sont similaires. Néanmoins, une faible influence du contexte de la séquence sur la formation d'adduits par PhIP a été observée au cours de notre étude alors qu'une sélectivité de mutation importante de PhIP est décrite. Au contraire, une sélectivité significative de formation d'adduits par IQ a été caractérisée dans le cadre de cette thèse alors qu'une faible sélectivité de mutation est indiquée dans la littérature. Il semblerait donc que la sélectivité de réparation soit plus influente que celle concernant la formation d'adduits par PhIP et IQ. Cependant, l'étude de l'influence de l'environnement local du site modifié doit être poursuivie par l'étude de la formation des adduits avec des oligonucléotides modèles double brin afin de caractériser les effets des bases complémentaires des bases voisines de l'adduit. Ceci pourra être réalisé en appliquant la méthodologie développée au cours de nos travaux en prenant soin de conserver la conformation des oligonucléotides sous forme de double brin au cours de la formation des adduits. Enfin, le même type d'approche pourrait également être appliqué à d'autres classes de substances génotoxiques afin de caractériser la sélectivité de séquence sur les modifications de l'ADN en termes de d'alkylation, de formation d'adduits ou de sites abasiques.

Les résultats obtenus dans le cadre des deux axes de recherche étudiés dans ce travail de thèse sur les AAH, offrent de nouvelles solutions pour mieux répondre à deux types de problématiques distinctes.

L'estimation du niveau d'exposition aux agents génotoxiques chimiques constitue une préoccupation importante dans le domaine de la sécurité des aliments. Cependant, de nombreux facteurs compliquent cette estimation, notamment la quantification des agents génotoxiques présents à l'état de traces dans des matrices complexes, comme les viandes cuites dans le cas des AAH, ainsi que l'estimation de la consommation de la population étudiée. En outre, les approches épidémiologiques suivies aujourd'hui tendent à prendre en compte de plus en plus de paramètres, comme la présence simultanée de plusieurs classes de substances toxiques ou de micro-constituants pouvant réduire ou amplifier l'action de ces

substances, ainsi que les prédispositions biologiques éventuelles (métaboliques, génétiques) de chaque individu. Néanmoins, de telles approches nécessitent à la fois une estimation correcte de la consommation des aliments étudiés ainsi qu'un nombre important de mesures des quantités des substances étudiées afin de représenter le plus fidèlement possible la diversité des échantillons. Ainsi, la mise en place d'une méthode originale et rapide de quantification est de nature à faciliter la mesure des résidus et donc de mieux connaître les niveaux d'exposition, permettant de faire avancer l'évaluation du risque représenté par les substances étudiées.

La compréhension des mécanismes génotoxiques induits par la formation d'adduits représente une autre problématique importante. Dans ce cadre, il est important de caractériser les modifications de l'ADN, y compris les modifications minoritaires. En effet, ce qui paraît aujourd'hui à peine détectable et/ou non significatif du point de vue analytique, ne le sera peut être plus demain avec l'amélioration de la sensibilité des outils analytiques. La caractérisation d'une modification de l'adénine à des quantités proches des limites de détection des systèmes analytiques utilisés au cours cette étude, en est un exemple. Bien que minoritaire par rapport aux autres modifications induites par les AAH étudiées, l'adduit caractérisé avec l'adénine semble biologiquement significatif à la vue de résultats publiés concernant les mutations induites par IQ. D'autre part, il semble important de mieux comprendre les mécanismes conduisant à des mutations non aléatoires de l'ADN et d'estimer la part relative de l'influence de la formation et de la réparation des adduits à l'ADN dans la sélectivité de mutation observée. Le développement d'une méthodologie permettant de caractériser spécifiquement la sélectivité de formation d'adduits, apporte de nouvelles données dans la compréhension des mécanismes mis en jeu et dans la pondération de leur influence.

- Annexes -

Annexe 1 : Concentrations des AAH quantifiées dans des viandes cuites**Tableau 1.** Concentrations des AAH mesurées dans de la viande cuite de poulet.

Référence*	[109]	[140]	[266]	[267]	[49]	[100]	[268]	[269]	[82]	[270]	[9]	[69]	[116]
4,8-DiMelQx	nd	-	0,80	2	nd	nd	0,1	4,0	0,5	nd	3,10	1,90	0,08
MelQx	50	1,8	0,30	2	0,08	nd	0,3	9,0	0,6	0,5	0,63	1,90	0,12
IQx	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-
MelQ	-	-	0,10	-	0,14	nd	-	nd	0,3	-	-	nd	-
IQ	-	-	nd	-	nd	nd	-	nd	nd	nd	-	nd	-
MeAaC	-	-	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-
AaC	-	-	1,00	-	-	-	-	-	-	nd	-	nd	-
Trp-P-1	-	-	0,20	-	0,53	-	-	-	1,6	-	-	nd	-
Trp-P-2	-	-	nd	-	-	-	-	-	nd	-	-	nd	-
Glu-P-1	-	-	nd	-	-	-	-	-	nd	-	-	nd	-
PhIP	0,1	2,1	46,90	15	0,29	nd	-	27,0	10,0	6,4	270,00	37,50	1,10
7,8-DiMelQx	nd	-	0,04	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-
Glu-P-2	-	-	nd	-	-	-	-	-	nd	-	-	nd	-
Harman	-	-	7,50	-	-	-	-	-	30,0	-	-	nd	-
Norharman	-	-	15,10	-	-	-	-	-	30,0	-	-	nd	-
IFP	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	7,00	-
TMIP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,90	-
DMIP	-	-	29,70	-	-	-	-	-	-	-	-	22,80	-

Référence*	[271]	[272]	[139]	[98]	[129]	[85]	[273]	[115]	[86]	moy. (ng/g)	n	écart type
4,8-DiMelQx	0,81	2,1	0,6	-	0,5	0,2	nd	-	6,0	1,2	19	1,64
MelQx	2,33	1,8	2,3	-	1,2	0,8	0,7	nd	56,0	4,2	21	12,06
IQx	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	2	
MelQ	nd	4,9	-	-	0,2	-	-	-	-	0,6	9	1,61
IQ	nd	1,0	-	-	0,6	-	-	-	-	0,2	10	0,35
MeAaC	nd	-	-	0,1	nd	-	-	-	-	0,02	5	0,02
AaC	0,21	-	-	0,1	nd	-	-	-	-	0,2	6	0,39
Trp-P-1	0,12	-	-	0,1	nd	-	-	-	-	0,4	7	0,57
Trp-P-2	0,18	-	-	0,2	nd	-	-	-	-	0,1	6	0,10
Glu-P-1	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	nd	4	
PhIP	38,10	7,4	38,2	11,1	6,3	1,4	1,4	2,3	-	26,1	20	59,42
7,8-DiMelQx	-	-	-	-	nd	nd	-	1,0	-	0,2	6	0,40
Glu-P-2	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	nd	4	
Harman	-	-	9,6	-	1,8	-	-	-	-	9,8	5	11,97
Norharman	-	-	12,9	-	1,5	-	-	-	-	11,9	5	12,13
IFP	-	-	-	-	10,6	0,1	-	-	-	5,9	4	4,35
TMIP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,9	1	
DMIP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	26,3	2	
TOTAL										68,5	22	

*: Bibliographie du Chapitre 1

nd : non détecté

- : non recherché

Tableau 2. Concentrations des AAH mesurées dans de la viande cuite de bœuf.

Référence*	[167]	[109]	[140]	[266]	[123]	[90]	[102]	[267]	[49]	[100]	[274]	[275]	[276]
4,8-DiMeIQx	-	6,2	0,10	1,10	nd	4,8	nd	1	nd	0,1	nd	nd	1,8
MeIQx	1,9	46,0	1,01	2,90	nd	5,8	nd	3	0,17	0,3	8,2	30,0	5,3
IQx	-	5,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeIQ	-	-	0,10	nd	nd	3,5	nd	-	0,11	nd	nd	nd	1,7
IQ	-	-	0,58	nd	nd	5,3	nd	-	nd	nd	nd	nd	1,5
MeAaC	-	-	-	0,40	-	-	nd	-	-	-	-	-	-
AaC	-	-	-	0,50	-	-	2	-	-	-	-	-	-
Trp-P-1	-	-	0,10	0,60	13	-	nd	-	nd	-	-	-	-
Trp-P-2	-	-	0,10	0,10	-	-	14	-	-	-	-	-	-
Glu-P-1	-	-	-	nd	8	-	nd	-	-	-	-	-	-
PhIP	19,0	14,0	1,38	4,80	10	31,4	nd	6	0,59	0,6	30,0	0,3	1,2
7,8-DiMeIQx	-	0,2	0,50	0,04	-	-	-	-	nd	-	-	-	-
Glu-P-2	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Harman	-	-	-	5,30	135	-	110	-	-	-	-	-	-
Norharman	-	-	-	41,20	61	-	53	-	-	-	-	-	-
IFP	8,2	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-
TMIP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DMIP	-	-	-	0,20	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Référence*	[277]	[278]	[279]	[280]	[281]	[282]	[127]	[138]	[82]	[126]	[283]	[284]	[268]
4,8-DiMeIQx	2,1	4,1	-	-	-	-	4,5	-	0,4	-	0,3	0,3	0,7
MeIQx	9,0	23,3	-	-	-	-	16,0	0,4	1,1	4,0	3,5	0,7	2,2
IQx	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeIQ	-	nd	-	-	-	-	-	nd	nd	8,0	-	-	-
IQ	-	0,1	-	-	-	0,02	nd	nd	nd	7,0	-	-	-
MeAaC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AaC	-	-	8,3	0,19	1,90	-	21,0	-	-	-	-	-	-
Trp-P-1	-	-	-	-	-	-	nd	nd	0,7	-	-	-	-
Trp-P-2	-	-	-	-	-	-	nd	nd	0,6	-	-	-	-
Glu-P-1	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	-	-	-
PhIP	32,8	82,4	-	-	-	-	68,0	nd	2,1	-	4,0	nd	16,4
7,8-DiMeIQx	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	-
Glu-P-2	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-
Harman	-	-	-	-	-	-	-	-	30,0	-	-	-	-
Norharman	-	-	-	-	-	-	-	-	30,0	-	-	-	-
IFP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TMIP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DMIP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 2. suite.

Référence*	[151]	[134]	[270]	[9]	[81]	[128]	[122]	[69]	[74]	[83]	[163]	[96]	[271]	[135]
4,8-DiMeIQx	-	nd	nd	4,5	0,4	-	1,4	1,6	1,6	1,2	8,1	4,5	0,12	18,1
MeIQx	9,3	nd	0,9	16,4	1,6	-	4,1	6,6	7,3	5,1	89,0	16,4	3,10	40,5
IQx	-	-	-	-	-	-	0,4	0,2	-	-	-	-	-	-
MeIQ	10,4	nd	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	nd	nd
IQ	-	nd	nd	-	-	15,0	-	nd	0,7	1,0	70,0	nd	0,19	37,2
MeAaC	-	nd	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	nd	nd
AaC	-	2,8	nd	-	-	-	1,2	nd	nd	nd	8,9	21,0	1,20	nd
Trp-P-1	-	nd	-	-	-	5,5	-	nd	nd	nd	-	-	0,21	nd
Trp-P-2	-	nd	-	-	-	-	-	nd	nd	nd	-	nd	0,25	nd
Glu-P-1	-	10,1	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	nd
PhIP	-	nd	13,0	67,5	1,5	-	15,2	5,4	32,0	13,3	48,5	67,5	15,70	28,0
7,8-DiMeIQx	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
Glu-P-2	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	nd
Harman	-	129,5	-	-	0,7	110,3	-	nd	-	-	-	-	-	314,5
Norharman	-	74,0	-	-	3,2	64,1	-	nd	-	-	-	-	-	185,7
IFP	-	-	-	-	-	-	-	13,2	-	-	-	-	-	-
TMIP	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-
DMIP	-	-	-	-	-	-	-	13,4	-	-	-	-	-	nd

Référence*	[136]	[133]	[94]	[145]	[139]	[285]	[70]	[286]	[273]	[105]	[144]	[80]	[115]
4,8-DiMeIQx	12,4	-	13,3	1,4	29,5	-	0,1	0,1	0,4	5,0	-	1,5	-
MeIQx	41,4	2,4	45,9	0,4	18,3	2,1	2,0	0,2	2,4	44,0	5,1	2,7	nd
IQx	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-
MeIQ	17,3	-	nd	1,6	12,6	-	-	-	-	-	5,8	-	-
IQ	32,5	nd	37,5	1,2	6,8	-	-	-	-	-	-	-	-
MeAaC	nd	-	nd	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-
AaC	6,4	nd	nd	-	-	1,2	-	0,1	-	8,9	-	-	-
Trp-P-1	9,0	-	nd	-	-	-	-	0,6	-	-	-	-	-
Trp-P-2	nd	-	nd	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-
Glu-P-1	16,6	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	15,5	-	-
PhIP	28,8	0,9	31,3	-	10,2	15,7	49,0	0,4	18,4	48,0	-	8,9	8,7
7,8-DiMeIQx	nd	-	nd	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	nd
Glu-P-2	37,0	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Harman	263,0	-	360,3	-	-	-	-	nd	-	4,8	-	-	-
Norharman	177,0	-	158,6	-	-	-	-	0,5	-	19,0	-	-	-
IFP	-	-	-	-	-	-	21,0	-	-	-	-	4,0	-
TMIP	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-
DMIP	-	-	-	1,0	-	-	0,6	-	-	-	-	-	-

Tableau 2. suite.

Référence*	[120]	[287]	moy. (ng/g)	n	écart type
4,8-DiMeIQx	0,5	0,6	3,2	42	5,75
MeIQx	0,8	1,9	10,7	50	17,41
IQx	-	-	1,7	4	2,83
MeIQ	-	-	2,5	24	4,78
IQ	-	-	7,0	31	15,90
MeAaC	-	-	0,1	9	0,13
AaC	0,5	-	3,7	23	6,21
Trp-P-1	-	-	1,7	18	3,70
Trp-P-2	-	-	1,0	16	3,48
Glu-P-1	-	-	4,6	11	6,73
PhIP	3,2	2,0	18,7	46	21,54
7,8-DiMeIQx	-	-	0,1	10	0,16
Glu-P-2	-	-	6,2	6	15,11
Harman	-	-	112,6	13	126,94
Norharman	-	-	66,7	13	65,95
IFP	-	0,7	8,5	6	7,48
TMIP	-	-	0,4	2	
DMIP	-	-	3,0	5	5,81
TOTAL			72,9	55	

* : Bibliographie du Chapitre 1

nd : non détecté

- : non recherché

Tableau 3. Concentrations des AAH mesurées dans de la viande cuite de porc.

Référence*	[101]	[266]	[267]	[49]	[288]	[268]	[278]	[289]	[82]	[270]	[9]	[69]	[116]
4,8-DiMeIQx	3,44	0,50	1	0,03	nd	0,1	1,1	-	4,2	0,10	0,2	2,2	0,23
MeIQx	6,23	1,90	4	0,20	4,3	0,4	2,9	-	5,6	0,53	2,3	4,8	0,42
IQx	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-
MeIQ	1,72	nd	-	0,14	nd	-	nd	-	0,1	-	-	nd	-
IQ	0,50	0,10	-	nd	nd	-	0,1	0,04	0,1	nd	-	nd	-
MeAαC	-	0,10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-
AαC	-	0,20	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	nd	-
Trp-P-1	-	0,05	-	nd	-	-	-	-	5,3	-	-	nd	-
Trp-P-2	-	0,40	-	-	-	-	-	-	7,4	-	-	nd	-
Glu-P-1	-	0,04	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	nd	-
PhIP	1,32	2,50	6	0,86	30,3	4,2	12,4	-	32,0	3,00	3,0	6,9	3,80
7,8-DiMeIQx	-	0,40	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glu-P-2	-	nd	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	nd	-
Harman	-	1,40	-	-	-	-	-	-	30,0	-	-	nd	-
Norharman	-	2,30	-	-	-	-	-	-	30,0	-	-	nd	-
IFP	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	13,4	-
TMIP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,0	-
DMIP	-	3,90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	37,0	-

Référence*	[133]	[145]	[139]	[98]	[70]	[115]	[273]	moy. (ng/g)	n	écart type
4,8-DiMeIQx	-	2,10	29,50	-	nd	-	nd	2,8	16	7,24
MeIQx	0,23	5,90	18,30	-	0,40	nd	nd	3,2	18	4,38
IQx	-	-	-	-	-	-	-	nd	1	
MeIQ	-	7,40	12,60	-	-	-	-	2,4	9	4,51
IQ	0,53	3,70	6,80	-	-	-	-	1,0	12	2,11
MeAαC	-	-	-	nd	-	-	-	0,03	3	0,06
AαC	nd	-	-	nd	-	-	-	0,04	5	0,09
Trp-P-1	-	-	-	1,20	-	-	-	1,3	5	2,29
Trp-P-2	-	-	-	3,10	-	-	-	2,7	4	3,41
Glu-P-1	-	-	-	-	-	-	-	0,01	3	0,02
PhIP	1,90	-	12,00	1,50	2,40	2,20	7,40	7,4	18	9,27
7,8-DiMeIQx	-	-	-	-	-	nd	-	0,1	3	0,23
Glu-P-2	-	-	-	-	-	-	-	nd	3	
Harman	-	-	-	-	-	-	-	10,5	3	16,93
Norharman	-	-	-	-	-	-	-	10,8	3	16,70
IFP	-	-	-	-	0,40	-	-	5,9	3	6,71
TMIP	-	-	-	-	nd	-	-	2,0	2	
DMIP	-	-	-	-	nd	-	-	13,6	3	20,33
TOTAL								42,7	20	

* : Bibliographie du Chapitre 1

nd : non détecté

- : non recherché

Tableau 4. Concentrations des AAH mesurées dans de la viande cuite de poisson.

Référence*	[49]	[100]	[106]	[276]	[290]	[291]	[292]	[82]	[69]	[163]	[116]	[271]	[133]
4,8-DiMeIQx	0,7	nd	-	0,6	-	-	-	0,07	0,04	nd	nd	0,10	-
MeIQx	0,6	nd	5,0	2,5	-	-	-	0,90	0,20	4,7	0,03	6,44	5,5
IQx	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-
MeIQ	0,4	nd	-	1,3	-	-	-	nd	0,70	-	-	0,03	-
IQ	0,1	nd	-	0,7	87,5	0,5	20,0	nd	1,70	,d	-	0,16	nd
MeAaC	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	nd	-
AaC	-	-	109,0	-	-	-	-	-	nd	73,0	-	nd	2,3
Trp-P-1	0,3	-	-	-	-	-	-	0,50	nd	-	-	nd	-
Trp-P-2	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	nd	-
Glu-P-1	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	-	-	-	-
PhIP	7,0	nd	73,0	3,0	11,8	-	-	2,20	18,10	69,0	5,50	69,20	1,0
7,8-DiMeIQx	4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glu-P-2	-	-	-	-	-	-	-	nd	nd	-	-	-	-
Harman	-	-	-	-	-	-	-	30,00	nd	-	-	-	-
Norharman	-	-	-	-	-	-	-	30,00	nd	-	-	-	-
IFP	-	-	-	-	-	-	-	-	2,10	-	-	-	-
TMIP	-	-	-	-	-	-	-	-	nd	-	-	-	-
DMIP	-	-	-	-	-	-	-	-	12,80	-	-	-	-

Référence*	[98]	[85]	[293]	[146]	moy. (ng/g)	n	écart type
4,8-DiMeIQx	-	0,03	0,10	-	0,2	10	0,26
MeIQx	-	0,10	6,44	16,60	3,8	13	4,64
IQx	-	-	-	-	nd	1	
MeIQ	-	-	0,03	3,10	0,7	8	1,07
IQ	-	-	0,16	1,80	8,7	13	24,30
MeAaC	0,10	-	-	-	0,03	3	0,06
AaC	0,10	-	-	-	30,7	6	48,06
Trp-P-1	nd	-	-	-	0,2	5	0,23
Trp-P-2	0,10	-	-	-	0,03	3	0,06
Glu-P-1	-	-	-	-	nd	2	
PhIP	1,70	1,37	69,20	-	23,7	14	30,83
7,8-DiMeIQx	-	nd	-	-	2,2	2	
Glu-P-2	-	-	-	-	nd	2	
Harman	-	-	-	-	15,0	2	
Norharman	-	-	-	-	15,0	2	
IFP	-	0,07	-	-	1,1	2	
TMIP	-	-	-	-	nd	1	
DMIP	-	-	-	-	12,8	1	
TOTAL					84,1	17	

* : Bibliographie du Chapitre 1

nd : non détecté

- : non recherché

Tableau 5. Concentrations des AAH mesurées dans de la viande cuite de dinde.

Référence*	[125]	[69]	[133]	[139]	[98]	moy. (ng/g)	n	écart type
4,8-DiMeIQx	0,4	1,0	-	3,2	-	1,5	3	1,47
MeIQx	1,4	1,0	4,2	9,5	-	4,0	4	3,92
IQx	-	nd	-	-	-	nd	1	
MeIQ	0,9	nd	-	2,3	-	1,1	3	1,16
IQ	1,1	nd	0,5	1,0	-	0,7	4	0,51
MeAaC	-	nd	-	-	0,1	nd	2	
AaC	-	nd	nd	-	nd	nd	3	
Trp-P-1	-	nd	-	-	0,1	0,1	2	
Trp-P-2	-	nd	-	-	0,2	0,1	2	
Glu-P-1	-	nd	-	-	-	nd	1	
PhIP	3,8	6,8	4,4	4,7	0,8	4,1	5	2,16
7,8-DiMeIQx	-	-	-	-	-		0	
Glu-P-2	-	nd	-	-	-	nd	1	
Harman	-	nd	-	-	-	nd	1	
Norharman	-	nd	-	-	-	nd	1	
IFP	-	9,6	-	-	-	9,6	1	
TMIP	-	nd	-	-	-	nd	1	
DMIP	-	6,0	-	-	-	6,0	1	
TOTAL						27,2	5	

* : Bibliographie du Chapitre 1

nd : non détecté

- : non recherché

Tableau 6. Concentrations des AAH mesurées dans de la viande cuite d'agneau.

Référence*	[266]	[267]	[82]	[9]	[271]	[286]	moy. (ng/g)	n	écart type
4,8-DiMeIQx	1,8	0,1	0,6	nd	0,67	0,2	0,6	6	0,66
MeIQx	1,3	1,à	0,6	1,6	1,01	0,2	1,0	6	0,49
IQx	-	-	-	-	-	0,4	0,4	1	
MeIQ	nd	-	nd	-	nd	-	nd	3	
IQ	nd	-	nd	-	nd	-	nd	3	
MeAaC	0,2	-	-	-	0,19	0,2	0,2	3	0,02
AaC	0,5	-	-	-	2,50	0,5	1,2	3	1,15
Trp-P-1	0,1	-	1,0	-	nd	nd	0,3	4	0,49
Trp-P-2	0,1	-	nd	-	0,15	0,7	0,2	4	0,31
Glu-P-1	nd	-	nd	-	-	-	nd	2	0,00
PhIP	5,8	2,0	2,3	11,0	42,50	0,3	10,6	6	16,07
7,8-DiMeIQx	nd	-	-	-	-	0,2	0,1	2	
Glu-P-2	nd	-	nd	-	-	-	nd	2	
Harman	7,2	-	30,0	-	-	0,8	12,7	3	15,37
Norharman	9,1	-	30,0	-	-	0,7	13,3	3	15,08
IFP	-	0,1	-	-	-	-	0,1	1	
TMIP	-	-	-	-	-	-		0	
DMIP	nd	-	-	-	-	-	nd	1	
TOTAL							14,6	6	

* : Bibliographie du Chapitre 1

nd : non détecté

- : non recherché

Tableau 7. Concentrations des AAH mesurées dans du bacon.

Référence*	[117]	[141]	[276]	[268]	[278]	[127]	[9]	[120]	moy. (ng/g)	n	écart type
4,8-DiMeIQx	1,1	4,51	3,4	0,3	1,4	12	9,3	1,0	4,1	8	4,32
MeIQx	nd	8,14	5,9	1,2	23,7	45	27,0	18,0	16,1	8	15,42
IQx	nd	-	-	-	-	-	-	-	nd	1	
MeIQ	-	-	1,7	-	nd	-	-	-	0,9	2	1,20
IQ	1,6	0,53	10,5	-	nd	nd	-	-	2,5	5	4,51
MeAaC	nd	-	-	-	-	-	-	-	nd	1	
AaC	nd	-	-	-	-	nd	-	1,0	0,3	3	0,58
Trp-P-1	0,6	-	-	-	-	nd	-	-	0,3	2	
Trp-P-2	nd	-	-	-	-	nd	-	-	nd	2	
Glu-P-1	-	-	-	-	-	-	-	-		0	
PhIP	36,4	28,4	1,0	2,7	4,5	106	36,0	52,0	33,4	8	34,82
7,8-DiMeIQx	2,8	0,41	-	-	-	-	-	-	1,6	2	
Glu-P-2	-	-	-	-	-	-	-	-		0	
Harman	-	-	-	-	-	-	-	-		0	
Norharman	6,7	-	-	-	-	-	-	-	6,7	1	
IFP	-	-	-	-	-	-	-	-		0	
TMIP	-	-	-	-	-	-	-	-		0	
DMIP	-	-	-	-	-	-	-	-		0	
TOTAL									59,2	8	

* : Bibliographie du Chapitre 1

nd : non détecté

- : non recherché

Tableau 8. Concentrations des AAH mesurées dans des saucisses et merguez cuites.

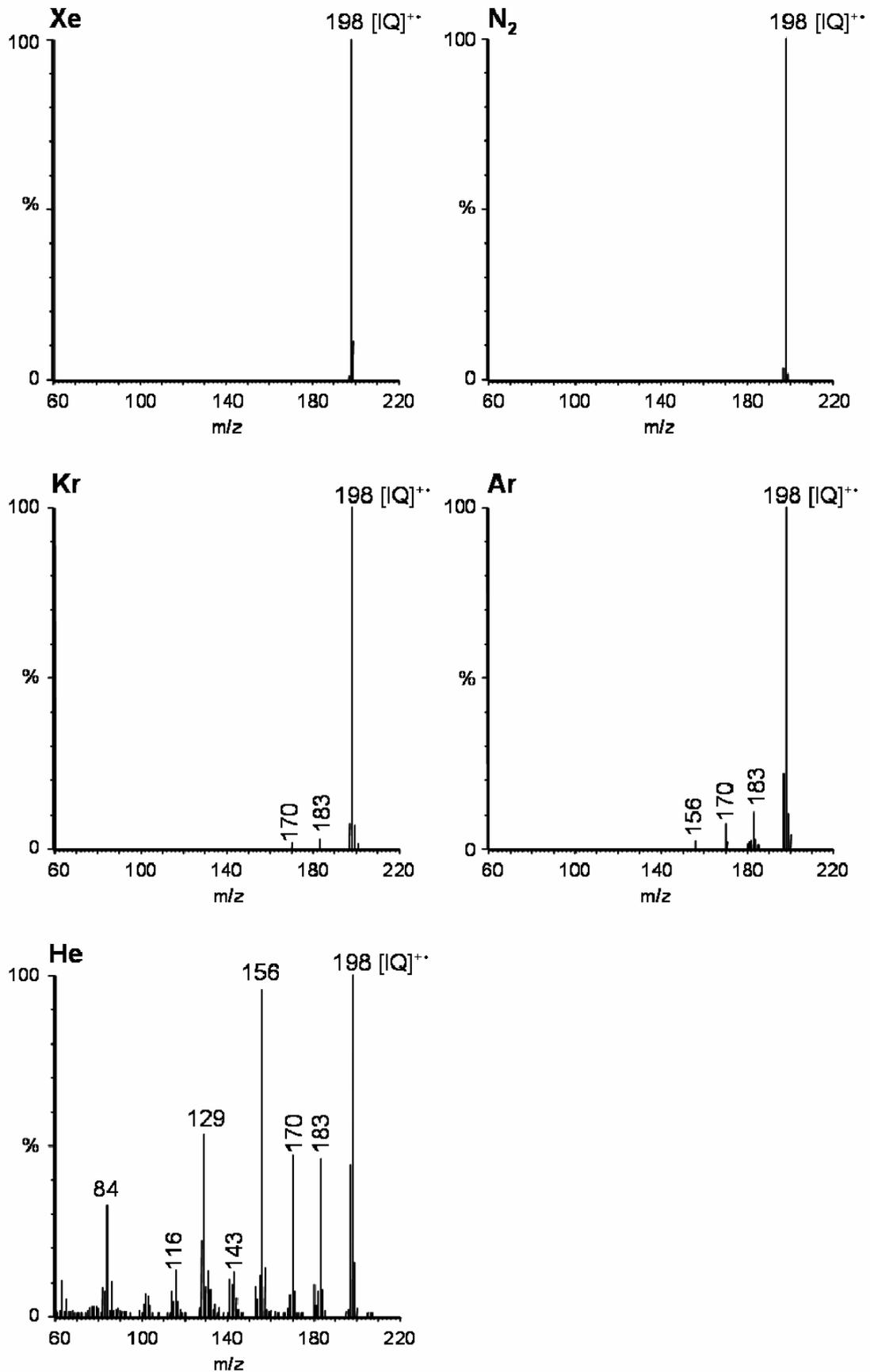
Référence*	[109]	[266]	[100]	[275]	[276]	[278]	[82]	[145]	[98]	moy. (ng/g)	n	écart type
4,8-DiMeIQx	nd	nd	nd	-	2,8	0,1	nd	1,4	-	0,6	7	1,09
MeIQx	5,0	nd	0,3	26	7,3	0,2	0,1	0,3	-	4,9	8	8,96
IQx	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6	1	
MeIQ	-	0,4	nd	-	2,3	nd	nd	1,4	-	0,7	6	0,96
IQ	-	nd	nd	-	1,6	0,2	nd	5,1	-	1,2	6	2,03
MeAaC	-	nd	-	-	-	-	-	-	nd	nd	2	
AaC	-	nd	-	-	-	-	-	-	nd	nd	2	
Trp-P-1	-	nd	-	-	-	-	0,5	-	1,2	0,6	3	0,60
Trp-P-2	-	nd	-	-	-	-	-	-	1,2	0,6	2	
Glu-P-1	-	nd	-	-	-	-	nd	-	-	nd	2	
PhIP	0,1	0,2	nd	0,4	4,5	0,4	0,1	-	0,8	0,8	8	1,51
7,8-DiMeIQx	nd	nd	-	-	-	-	-	-	-	nd	2	
Glu-P-2	-	nd	-	-	-	-	nd	-	-	nd	2	
Harman	-	0,3	-	-	-	-	30,0	-	-	15,2	2	
Norharman	-	0,3	-	-	-	-	30,0	-	-	15,2	2	
IFP	-	-	-	-	-	-	-	-	-		0	
TMIP	-	-	-	-	-	-	-	-	-		0	
DMIP	-	0,5	-	-	-	-	-	1,5	-	1,0	2	
TOTAL										10,9	9	

* : Bibliographie du Chapitre 1

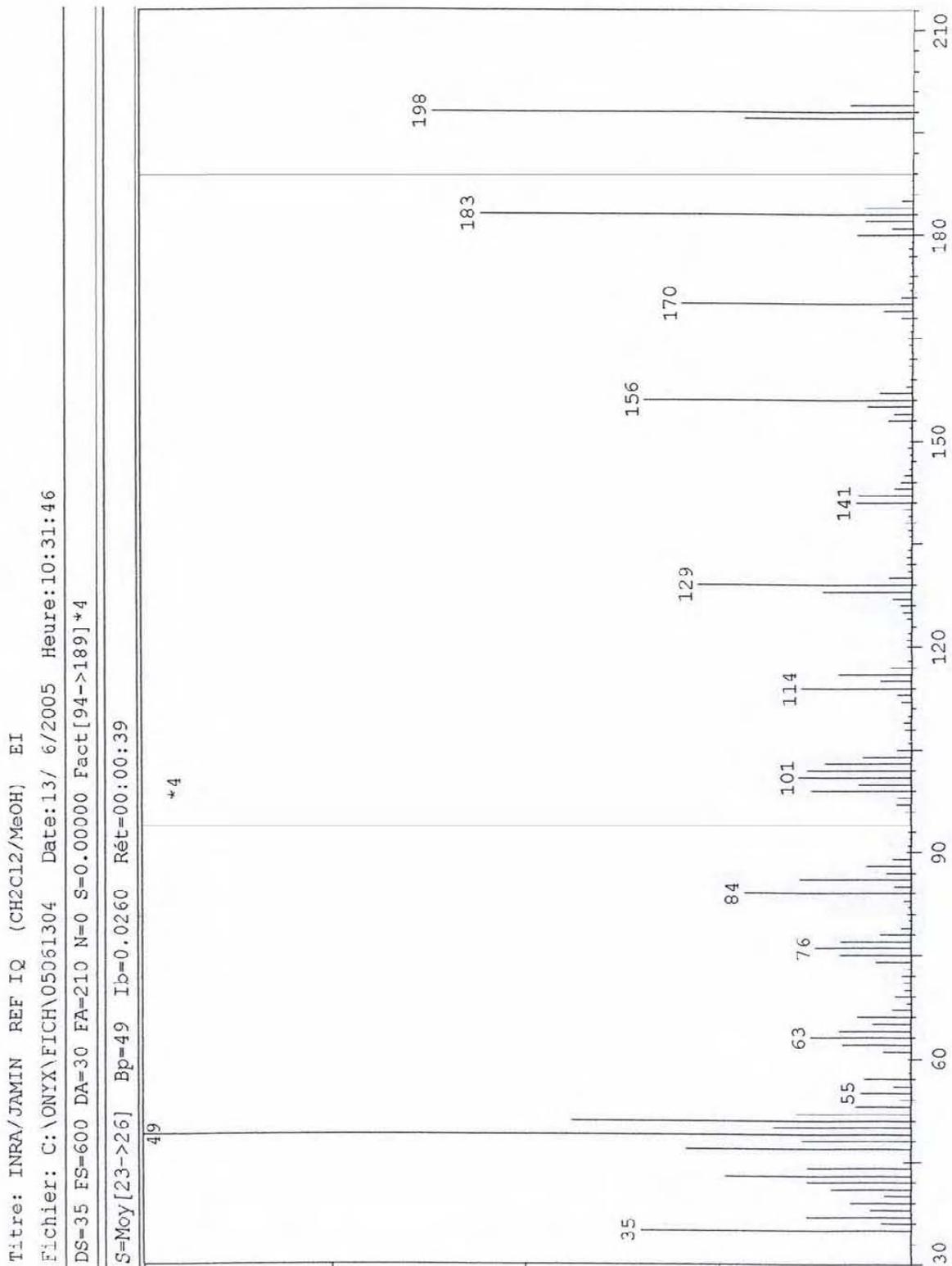
nd : non détecté

- : non recherché

Annexe 2 : Spectres de masse Py-MAB-ToF de IQ



Annexe 3 : Spectre de masse EI (70eV) de IQ



Annexe 4 : Abréviations

3,5-bis-TFMBB	bromure de 3,5-bis-trifluorométhylbenzyle
A	Adénine
AAH	Amine(s) Aromatique(s) Hétérocyclique(s)
Ac ₂ O	anhydride acétique
AcOEt	acétate d'éthyle
AcONH ₄	acétate d'ammonium
ADN	Acide DéoxyriboNucléique
AIA(s)	Amino-Imidazo-Azaarene(s)
AMS	Accelerator Mass Spectrometry
AP	site Apurique ou Apyrimidique (= site abasique)
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
ARNt	Acide RiboNucléique de transfert
ATP	Adénosine TriPhosphate
BHA	Butylated HydroxyAnisole
BHT	Butylated HydroxyToluene
BIRD	Blackbody Infrared Radiative Dissociation
C	Cytosine
CCM	Chromatographie sur Couche Mince
CH ₂ Cl ₂	dichlorométhane
CID	Collision Induced Dissociation
CYP	cytochrome P450
CZE	Capillary Zone Electrophoresis
BER	Base Excision Repair
dA	déoxyAdénosine
DAD	Diodes Array Detector
dC	déoxyCytidine
dG	déoxyGuanosine
d _{int}	diamètre intérieur
DMSO	diméthylsulfoxyde
dN	déoxyNucléoside
d _p	diamètre des particules
dT	déoxyThymidine
ECD	Electron Capture Dissociation
ED	Electrochemical Detection
EDD	Electron Detachment Dissociation

EI	Electron Impact
ELISA	Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay
EPD	Electron Photodetachment Dissociation
ERMS	Energy Resolved Mass Spectrometry
ESI	Electrospray Ionization
FAB	Fast Atom Bombardment
FAPy	FormAmidoPyrimidine
FC43	tris(nonafluorobutyl)-amine
Fluo	Fluorescence
FT-ICR	Fourier Transform - Ion Cyclotron Resonance
G	Guanine
GC	Gas Chromatography
GSH	glutathion
GST	glutathion S-transférase
H ₂ NNH ₂	hydrazine
HAA(s) ou HCA(s)	Heterocyclic Aromatic Amine(s)
HAP	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
HCl	acide chlorhydrique
HPLC ou LC	High Performance Liquid Chromatography ou Liquid Chromatography
I3C	Indol-3-CarabinoI
IARC	International Agency for Research on Cancer
IRMPD	InfraRed MultiPhoton Dissociation
ITMS	Ion Trap Mass Spectrometer
K ₂ HPO ₄	phosphate de potassium
L	longueur
LMCO	Low Mass Cut Off
LUMO	Lowest unoccupied molecular orbital
M	molaire (mol/L)
<i>m/z</i>	rapport masse sur charge
MAB	Metastable Atom Bombardment
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MeOH	méthanol
MRM	Multiple Reactions Monitoring
MS	Mass Spectrometry
MS/MS	spectrométrie de masse en tandem
MS ⁿ	spectrométrie de masse à deux dimensions (n=2 ou MS/MS), trois dimensions (n=3), etc.

MTBSTFA	<i>N</i> -méthyl- <i>N</i> -(<i>tert.</i> -butyldiméthylsilyl)trifluoroacétamide
N	Nucléobase
nanoLC	nanoscale Liquid Chromatography
NaOH	hydroxyde de sodium (soude)
NAT	<i>N</i> -acétyltransférase
NER	Nucleotide Excision Repair
NH ₃	ammoniaque
NICI	Negative Chemical Ionization
oaToF	Orthogonal Acceleration Time of Flight
OR	Odd Ratio
PG	Propyl Gallate
ppb	partie par milliard
ppm	partie par million
PRS	gel de silice propylsulfonique
PSD	PostSource Decay
Py	Pyrolyse
Q	Quadripôle
QqToF	Quadripôle-Temps de Vol
QSAR	Quantitative Structure Activity Relationship
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
SIM	Single Ion Monitoring
SORI	Sustained Off-Resonance Irradiation
SPE	Solid Phase Extraction
SPME	Solid Phase Micro-Extraction
SRM	Single Reaction Monitoring
SULT	sulfotransférase
T	Thymine
TBHQ	tertiary butyl hydroquinone
TCDD	tétrachloro-2,3,7,8-dibenzo- <i>para</i> -dioxine
ToF	Time of Flight
tQ	triple Quadripôle
TSP	Thermospray
UGT	UDP-glucuronosyltransférase
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultra-Violet

Résumé

Développement de méthodes de spectrométrie de masse pour la caractérisation des Amines Aromatiques Hétérocycliques (AAH) générées lors de la cuisson des aliments et l'étude de leur réactivité vis-à-vis des bases de l'ADN

Les AAH sont des substances génotoxiques formées dans la plupart des viandes cuites et pouvant se fixer aux bases de l'ADN. Le premier axe de recherche de cette thèse a concerné le développement d'un protocole simple et rapide de quantification des AAH par l'utilisation d'un spectromètre de masse prototype Py-MAB-ToF, qui a permis la détection directe des AAH dans des extraits de poulet cuit, diminuant ainsi le temps d'analyse. Ces résultats ont été validés à l'aide d'un protocole de dosage par LC-APCI-MS/MS d'extraits purifiés utilisé comme méthode de référence. Le deuxième volet de ces travaux a concerné l'étude de la formation des adduits covalents AAH-ADN par spectrométrie de masse. Dans un premier temps, l'étude des adduits AAH-nucléosides a permis de caractériser deux nouveaux adduits. Dans un deuxième temps, la formation des adduits avec des oligonucléotides modèles a été étudiée afin de caractériser l'influence des bases voisines de la modification sur la formation des adduits.

Mots clefs : sécurité alimentaire, amines aromatiques hétérocycliques, spectrométrie de masse, adduits, quantification, oligonucléotides, désoxynucléosides, LC-MS.

Summary

Development of mass spectrometric methods for the characterization of Heterocyclic Aromatic Amines (HAAs) formed during the cooking of meats and the investigation of their reactivity towards DNA bases

HAAs are genotoxic compounds formed during the cooking of meats under normal conditions of time and temperature, and able to covalently bind to DNA bases. On one hand, this work has allowed the development of a fast and simple quantification method of HAAs based on the use of a prototype Py-MAB-ToF mass spectrometer, which allowed the direct characterization of HAAs in cooked chicken meat extracts, reducing by this way the analysis time. Obtained results were validated by a LC-APCI-MS/MS quantification method used as a reference method on purified extracts. On the other hand, this work also concerned the investigation of HAA-DNA adducts formation by mass spectrometry. Firstly, a systematic study of HAA-nucleosides adducts formation allowed the characterization of two new adducts formed with HAAs. Secondly, the adduct formation on model oligonucleotides was studied to highlight the influence of the bases neighbouring the modified one on the adduct formation.

Keywords: food safety, heterocyclic aromatic amines, mass spectrometry, adducts, quantification, oligonucleotides, deoxynucleosides, LC-MS.