



N° d'ordre 026

UNIVERSITE D'ABOMEY- CALAVI

Faculté des Sciences et Techniques (FAST)
Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire (LBBM)

THESE DE DOCTORAT UNIQUE

Présentée par

Mme AYI-FANOU Lucie

Ecole Doctorale "Sciences de la vie"

Pour l'obtention du

Grade de Docteur de l'Université d'Abomey-Calavi

Spécialité : Biochimie et Biologie Moléculaire

LA POLLUTION ATMOSPHERIQUE A COTONOU : IMPACTS SUR DES POPULATIONS CIBLES

Soutenu le 18 Novembre 2010 devant le jury composé de :

- Président :** Professeur Edmond E. CREPPY; Université de Bordeaux 2 (France)
- Rapporteurs :** Professeur Alfred TRAORE ; Université de Ouagadougou (Burkina Faso)
Professeur Georges ACCROMBESSI ; Université d'Abomey-Calavi (Bénin)
Professeur Pirouz SHIRALI ; Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO-France)
- Membre :** Professeur Fabrice CAZIER ; Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO-France)
- Directeur de Thèse :** Professeur Ambaliou SANNI ; Université d'Abomey-Calavi (Bénin)

Année 2009-2010

Dédicaces

*A la Trinité Sainte et à Maman Marie,
Merci pour votre amour et votre fidélité.*

*A mon Cher époux Théophile AYI,
A mes enfants et amis Maxime et Lynda, merci pour tout.
Aux familles AYI et FANOU, soyez bénies*

Remerciements

Je tiens à remercier très chaleureusement Monsieur le Professeur Ambaliou SANNI, Directeur du Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire (LBBM-Bénin) et Président de l'Ecole Doctorale Science de la Vie, pour avoir accepté de diriger cette thèse, pour sa collaboration et son dévouement à trouver les moyens pour résoudre les différents problèmes rencontrés au cours de cette thèse.

Je présente mes sincères remerciements au Professeur Benjamin FAYOMI, Directeur de l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA-Bénin) et Directeur de l'Unité de Recherche en Santé au Travail et Environnement (UREST-Bénin) pour avoir accepté ma participation à l'étude de la pollution atmosphérique, et favorisé notre collaboration avec les conducteurs de taxi-moto et les habitants de Sohon.

Mes remerciements vont également au Professeur Herman AUTRUP Chef du Département de l'Environnement et de la Médecine du travail à Aarhus (Danemark), pour sa franche collaboration, sa disponibilité, sa participation active à cette étude et pour tous ses conseils et soutien matériel.

J'exprime ma profonde gratitude au Professeur Peter MOLLER, responsable de l'Institut de Santé publique à l'Université de Copenhague (Danemark), pour sa disponibilité à la participation de cette étude, et ses conseils.

Je remercie tout particulièrement l'Ambassade du Danemark pour son soutien financier à travers le projet PARPES.

J'adresse mes sincères remerciements au Professeur Edmond CREPPY, Directeur du Laboratoire de Toxicologie et d'Hygiène Appliquée de l'Université de Bordeaux 2 (France), pour ses conseils, son appui technique et sa disponibilité à juger ce travail.

Je présente ma vive gratitude au Docteur Gérard KEITH, Chercheur à Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire à Strasbourg (France), pour m'avoir acceptée dans son laboratoire et pour son soutien financier et technique.

Mes sincères remerciements vont au Professeur Codjo HOUNTONDI, Directeur du Laboratoire de photobiologie Moléculaire à l'Université Pierre et Marie Curie de Paris VI (France), pour m'avoir acceptée dans son laboratoire et permis la finalisation du travail sur les adduits.

Tous mes remerciements pour le Professeur Emérite Jacques-Henry WEIL (France), pour votre constante disponibilité, vos conseils, et votre soutien technique pour moi personnellement ainsi que pour toute notre équipe de LBBM et de la formation Biochimie Biologie Moléculaire et Applications.

J'exprime ma sincère gratitude au Professeur Faustin AÏSSI, Vice Président chargé de la Coopération de l'Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO) Dunkerque (France), pour tout votre dévouement, disponibilité et souci permanent à contribuer au développement scientifique des pays Africains surtout du Bénin.

Mes remerciements vont également au Docteur Fabrice CAZIER, Directeur du centre Commun des mesures de l'Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO) Dunkerque (France), pour votre disponibilité, votre appui technique et votre amour du travail bien fait.

Je remercie tout particulièrement le Professeur Pirouz SHIRALI, Directeur de l'Unité de Chimie Environnementale et Interaction sur le Vivant de l'Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO, Dunkerque (France), d'avoir accepté de juger ce travail malgré vos multiples occupations.

Au Professeur Alfred TRAORE, Directeur du Réseau Ouest-Africain des Biotechnologies, Université de Ouagadougou (Burkina Faso), recevez ma profonde gratitude pour toute votre sollicitude et votre disponibilité à juger ce travail.

Au Professeur Georges ACCROMBESSI, Directeur du Laboratoire de Chimie Organique, Physique et de Synthèse, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi (Bénin), j'adresse mes sincères remerciements pour votre disponibilité à juger ce travail.

Au Service de Coopération et d'Action Culturelle de l'Ambassade de France pour m'avoir soutenue pour mon séjour à Paris et en particulier au Professeur Mohamadou MERAWA pour sa constante sollicitude.

Je remercie très sincèrement les conducteurs de taxi-moto surtout leurs responsables syndicaux messieurs Bonaventure AHICHEME et Robert YEHOUENOU pour leur franche collaboration.

J'adresse également mes remerciements à messieurs les Professeurs Mohamed Chérif RAHIMY, ADDE, ZANNOU et Madame LAWSON et le personnel de la Banque de sang pour leur collaboration.

J'adresse un grand merci à tous mes collègues et personnel de LBBM, du Département de Biochimie et Biologie Cellulaire ainsi que de l'ISBA pour leur encouragement, conseils, disponibilité et franche collaboration.

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail par leurs conseils, corrections, suggestions et encouragements, j'exprime tous mes remerciements.

A tous mes frères et sœurs en Christ, profonde gratitude, pour votre soutien fraternel et spirituel.

SOMMAIRE

	Pages
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	viii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
RESUME.....	xi
I. INTRODUCTION.....	1
II. REVUE DE LITTERATURE.....	7
II.1. Composition de l'air, principaux polluants de l'air et leur origine.....	8
II.1.1. Composition de l'air.....	8
II.1.2. Les principaux polluants de l'air et leur origine.....	8
II.1.2.1. Dioxyde de soufre (SO ₂).....	8
II.1.2.2. Oxydes d'azote (NO, NO ₂) (NO _x).....	8
II.1.2.3. Monoxyde de carbone (CO).....	8
II.1.2.4. Composés organiques volatils (COVs).....	9
II.1.2.5. Particules en suspension (PM).....	9
II.1.2.6. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs).....	10
II.2. Effets néfastes de quelques polluants de l'air sur la santé.....	10
II.2.1. Dioxyde de soufre (SO ₂).....	10
II.2.2. Oxyde d'azote (NO, NO ₂) (NO _x).....	10
II.2.3. Monoxyde de carbone (CO).....	11
II.2.4. Composés organiques volatils (COVs).....	11
II.2.5. Particules en suspension (PM).....	11
II.3. Impact biologique de quelques polluants majeurs de l'air.....	12
II.3.1. De l'exposition aux polluants à l'apparition de la maladie.....	12
II.3.2. Le benzène.....	13
II.3.2.1. Effets modulateurs des polymorphismes génétiques sur la toxicité du benzène.....	15
II.3.2.2. Evaluation des titres des anticorps anti-métabolites du benzène (AAMB).....	17

II.3.3. Les Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs).....	17
II.3.4. Les particules en suspension : Toxicité et effets sur la santé.....	20
II.4. Biomarqueurs d'exposition.....	22
II.4.1. Le benzène urinaire.....	22
II.4.2. L'acide S-phénylmercapturique (APM) et acide muconique (AM).....	22
II.4.3. Les anticorps anti-métabolites du benzène anti-hydroquinone et anti-benzoquinone (anti-HQ et anti-BQ).....	22
II.4.4. Le 1-hydroxypyrene (1-HOP).....	22
II.5. Biomarqueurs d'exposition et d'effets biologiques.....	23
II.5.1. Les adduits d'ADN.....	23
II.5.1.1. Importance des adduits d'ADN dans les études épidémiologiques.....	23
II.5.1.2. Méthodes de quantification des adduits d'ADN.....	25
II.5.1.2.1. Les méthodes radio-immunologiques (RIA) et l'ELISA.....	25
II.5.1.2.2. La technique de radiomarquage au ³² P.....	25
II.5.2. Développement et modifications du test des comètes dans l'analyse des dommages dans l'ADN.....	26
II.6. Les biomarqueurs de susceptibilité.....	28
II.6.1. Principales enzymes de la phase I.....	30
II.6.2. Principales enzymes de la phase II.....	30
II.6.2.1. Le cytochrome P450 (CYP 450).....	30
II.6.2.2. Quelques polymorphismes identifiés dans la glutathion-S-transférase.....	31
II.6.2.2.1. La GSTM1.....	31
II.6.2.2.2. La GSTT1.....	33
II.6.2.3. La NQO1.....	33
II.7. Facteurs nutritionnels modulant le niveau des dommages dans l'ADN.....	34
III. MATERIEL ET METHODES.....	35
III.1. Cadre d'étude.....	36
III.2. Recrutement des populations cibles.....	37

III.2.1. Conditions de recrutement.....	37
III.2.2. Critères d'exclusion.....	37
III.3. Matériel.....	38
III.3.1. Matériel biologique.....	38
III.3.1.1. Le sang.....	38
III.3.1.2. L'urine.....	38
III.3.1.3. Les enzymes.....	38
III.3.2. Matériel chimique.....	38
III.3.3. Matériel de chromatographie et d'électrophorèse.....	39
III.4. Méthodes utilisées.....	39
III.4.1. Méthode d'analyse de l'essence.....	39
III.4.2. Mesure des polluants de l'air.....	40
III.4.2.1. Mesure et analyse du benzène et ses dérivés dans l'air ambiant.....	40
III.4.2.1.1. Prélèvement des COVs.....	40
III.4.2.1.2. Principe de la GC/MS.....	40
III.4.2.2. Mesure des HAPs et des particules de l'air.....	40
III.5. Etude de l'impact de la pollution sur la population cible.....	41
III.5.1. Détermination du niveau des métabolites du benzène.....	41
III.5.1.1. Détermination du niveau de benzène urinaire.....	41
III.5.1.2. Détermination du niveau d'excrétion de l'acide S-APM urinaire.....	41
III.5.1.2.1. Préparation des standards et échantillons d'urine.....	41
III.5.1.2.2. Analyse et quantification de S-APM par CG-MS.....	43
III.5.1.2.3. Détermination de la créatinine urinaire.....	43
III.5.1.3. Détermination des titres des anticorps anti-métabolites du benzène HQ + BQ.....	44
III.5.1.3.1. Fixation de l'antigène ou coating.....	44
III.5.1.3.2. Fixation d'anticorps spécifiques sur l'antigène et de l'anticorps marqué.....	44
III.5.1.3.3. Révélation.....	44
III.5.2. Analyse du niveau du 1-hydroxypyrene (1-HOP), métabolite des HAPs.....	44
III.5.3. Analyse des niveaux de modifications de l'ADN.....	45

III.5.3.1. Etude de la fragmentation de l'ADN.....	45
III.5.3.1.1. Extraction de l'ADN à partir des lymphocytes circulants.....	45
III.5.3.1.2. Electrophorèse de l'ADN.....	45
III.5.3.2. Analyse des cassures de brins et modification de bases par le test des comètes	45
III.5.3.2.1. Isolement des lymphocytes pour le test des comètes.....	45
III.5.3.2.2. Détermination du niveau de coupures de brins et de bases modifiées.....	46
III.5.3.3. Détermination des adduits par la méthode de post marquage au ³² P	48
III.5.3.4. Analyse du niveau de la 8-oxodG.....	49
III.6. Analyse statistique.....	49
IV. RESULTATS.....	50
IV.1. Résultats d'analyse de l'essence.....	51
IV.2. Niveaux des différents polluants dans l'air analysé.....	53
IV.2.1. Les composés organiques volatils (VOCs) à Cotonou et à Sohon.....	53
IV.2.2. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) à Cotonou et à Sohon....	56
IV.2.3. Niveaux des particules ultrafines (PUFs) à six carrefours : Cotonou (4), Godomey (1) et Sohon(1).....	58
IV.3. Profils hématologiques des populations cibles.....	59
IV.4. Niveaux des biomarqueurs d'évaluation de la dose interne dite d'exposition.	61
IV.4.1. Niveau de benzène urinaire non métabolisé.....	61
IV.4.2. Niveaux d'excrétion de S-APM.....	62
IV.4.3. Niveaux de la 1-HOP dans la population cible.....	63
IV.4.4. Evaluation du niveau des anticorps AAMB.....	63
IV.5. Biomarqueurs d'évaluation de la dose biologiquement active: impact sur le génomme des populations exposées.....	65
IV.5.1. Niveaux de coupures de brins d'ADN.....	65
IV.5.2. Niveaux de sites sensibles à la FPG.....	66
IV.5.3. Analyse des niveaux d'adduits d'ADN par marquage au ³² P.....	67
IV.5.4. Niveaux de la 8-oxodG chez les taxi-moto et habitants de Sohon.....	68
IV.5.5. Fragmentation de l'ADN.....	69

IV.6. Polymorphismes génétiques des enzymes de détoxification.....	70
IV.7. Influence du polymorphisme de la GSTT1 sur le niveau d'excrétion de S-APM.....	72
V. DISCUSSION.....	73
V.1. La qualité de l'essence vendue au Bénin.....	74
V.2. Niveaux des COVs à Cotonou comparés au village.....	74
V.3. Niveaux des HAPs à Cotonou comparés au village.....	76
V.4. Niveaux des PUFs à Cotonou comparés au village.....	77
V.5. Données hématologiques.....	77
V.6. Les biomarqueurs d'exposition et effets modulateurs de certains polymorphismes génétiques.....	79
V.7. Les biomarqueurs d'effets biologiques.....	80
VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	84
VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	87
VIII. ANNEXES.....	102
ABSTRACT	

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

ADN:	Acide Désoxyribonucléique
AAMB :	Anticorps anti métabolites du benzène
ABE :	Agence Béninoise pour l'Environnement
ABM :	Acide benzyl mercapturique
ADH :	Alcool déshydrogénase
ALDH :	Aldéhyde déshydrogénase
AM :	Acide trans-muconique
Amb :	Vendeur ambulant
APM :	Acide S-Phényl Mercaturique
B(a)P:	Benzo(a)pyrène
BET :	Bromure d'éthidium
BQ :	Benzoquinone
BSA :	Bovin Serum Albumin
CB :	Cassures de brins
CCMH :	Concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine
CDB :	Cassures double brin
CG :	Chromatographie en phase gazeuse
COVs :	Composés Organiques Volatils
CSB :	Cassures simple brin
CYP :	Cytochrome P450
D.O :	Densité Optique
dG :	Désoxyguanosine
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
ECS :	Echange de chromatides sœurs
ELISA :	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ENDOIII :	Endonucléase III
ETBE:	Ethyl tertio butyl éther
FPG :	Formamidopyrimidine glycosylase
GST :	Glutathion-S-Transférase
HAPs :	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HOP :	Hydroxypyrene
HQ :	Hydroquinone
IgG :	Immunoglobuline G
ISBA :	Institut des Sciences Biomédicales Appliquées
LBBM :	Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire
MS :	Masse spectrométrie
n:	Nombre d'échantillons
NAD(P)H :	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NAT :	N-acétyltransférases
NQO1 :	NADPH Quinone Oxydoréductase 1
OMS ou WHO :	Organisation Mondiale de la Santé ou World Health of Organization
OPD :	Ortho Phénylènediamine
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PIB :	Produit Intérieur Brut
PM :	Particules en suspension
ppm :	Partie par million

PUFs :	Pparticules ultrafines
RPMI:	Roosevelt-Parc Medium Institute
SULT :	Sulfotransférase
TCMH :	Teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine
UAC :	Université d'Abomey-Calavi
ULCO :	Université du Littoral Côte d'Opale
UREST :	Unité de Recherche et d'Enseignement en Santé au Travail
VGM :	Volume globulaire moyen

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Succession des événements allant de l'exposition aux polluants à l'apparition de la maladie.....	12
Figure 2 : Pyramide des effets aigus associés à la pollution atmosphérique.....	13
Figure 3 : Métabolisme du benzène.....	16
Figure 4 : Métabolisme simplifié du benzo(a)pyrène montrant la formation d'adduits	18
Figure 5 : Diagramme hypothétique du mode d'action des particules et le lien avec les cancers et les maladies cardiopulmonaires.....	21
Figure 6 : Structure de quelques adduits majeurs formés par les polluants dans l'ADN.....	24
Figure 7 : Métabolisme des xénobiotiques.....	29
Figure 8 : Illustration du rôle des polymorphismes dans la limitation de la formation des adduits par la GSTM1.....	32
Figure 9 : Zones d'étude des prélèvements.....	36
Figure 10 : Diagramme de préparation des échantillons d'urine pour la détermination de l'APM.....	42
Figure 11 : Les différentes classes de comètes.....	47
Figure 12 : Comparaison des concentrations en ETBE.....	52
Figure 13 : Comparaison des concentrations en aromatiques.....	52
Figure 14 : Comparaison des concentrations en benzène.....	53
Figure 15 : Concentrations moyennes de six COVs mesurés dans l'air ambiant à Cotonou comparées au village de Sohon.....	54
Figure 16 : Evaluation du nombre de particules ultrafines au niveau de cinq carrefours de Cotonou, Godomey et Sohon.....	59
Figure 17 : Niveau d'excrétion de S-APM chez les populations cibles.....	62
Figure 18 : Variations du taux d'excrétion de la 1-HOP.....	63
Figure 19 : Niveaux d'anticorps anti-métabolites du benzène chez les conducteurs de taxi-moto comparés aux sujets témoin de la banque de sang.....	64
Figure 20 : Niveaux de coupures de brins d'ADN dans la population cible.....	65
Figure 21 : Niveaux de sites sensibles à la FPG dans l'ADN de la population cible...	66
Figure 22 : Niveaux des adduits d'ADN dans les populations cibles.....	67

Figure 23 : Profil radiographique des adduits analysés par marquage au ^{32}P dans des populations cibles.....	68
Figure 24 : Niveaux de la 8-oxodG chez les conducteurs de taxi-moto et les villageois.....	69
Figure 25 : Photographie d'un gel d'agarose montrant l'état de fragmentation de l'ADN.....	70
Figure 26 : Influence de la GSTT1 sur le taux d'excrétion de S-APM.....	72

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Propriétés physico-chimiques de quelques HAPs souvent recherchés.....	19
Tableau 2 : Principales réactions de la phase d'activation et de conjugaison.....	30
Tableau 3 : Valeurs moyennes des expositions individuelles aux COVs dans la population Cible.....	55
Tableau 4 : Moyennes des mesures de dix différents HAPs dans l'air à différents endroits pendant une semaine.....	57
Tableau 5 : Profil hématologique général des populations cibles.....	60
Tableau 6 : Niveau de benzène urinaire chez les populations cibles.....	61
Tableau 7 : Répartition des polymorphismes de GSTM1, GSTP1, GSTT1, GPX et NQO1	71

RESUME

Depuis plus d'une décennie, la pollution atmosphérique est devenue préoccupante à Cotonou, la plus importante ville du Bénin. Nous avons initié cette étude pour examiner l'impact de la pollution de l'air sur la santé des populations exposées de Cotonou comparées aux habitants du village Sohon (population témoin). Pour atteindre cet objectif, nous avons :

1. analysé l'essence vendue au Bénin par CG/SM ;
2. évalué les niveaux de certains polluants majeurs de l'air ainsi que leurs biomarqueurs [benzène - acide S-Phényl Mercaturique (APM)-anticorps anti-métabolites du benzène (AAMB), les particules ultrafines (PUFs) et les hydrocarbures aromatiques et polycycliques (HAPs)-1-Hydroxy pyrène (1-HOP)] par CG/SM, HPLC et par ELISA;
3. étudié le profil hématologique chez les populations cibles ;
4. quantifié les dommages dans l'ADN par la mesure des niveaux de cassures de brins (CB), de modifications de bases, ainsi que d'adduits d'ADN par le test des comètes et la méthode de post marquage au ^{32}P ;
5. et enfin évalué la capacité des populations étudiées à détoxifier ces polluants en étudiant le polymorphisme de certains gènes [la glutathion-S-transférase (GST) et la Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NADPH) quinone oxydoréductase 1 (NQO1)] par PCR.

Nos résultats montrent que :

- a) L'essence vendue au Bénin contient trois à six fois plus de benzène que l'essence vendue en France, et ne possède pas de l'éthyl tertio butyl éther (ETBE) qui permet une bonne combustion des hydrocarbures.
- b) L'air de Cotonou contient de fortes concentrations de polluants [benzène-76 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ contre 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ recommandée par l'OMS; PUFs - 166816 particules/ cm^3 et de HAPs - 103 ng/m^3] contre de faibles concentrations au village témoin [benzène - 3,4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$; PUFs - 5276 particules/ cm^3 ; HAPs - 1,55 ng/m^3].
- c) Qu'il existe une réduction du nombre de cellules de la lignée blanche (leucocytes, lymphocytes) entre populations exposés et témoins.

d) Les niveaux de tous les biomarqueurs ainsi que les modifications de bases, d'adduits d'ADN sont en général plus élevés chez les sujets de la ville de Cotonou par rapport aux habitants du village témoin.

e) La délétion du gène GSTT1 entraîne une moindre excrétion d'APM par rapport à l'allèle sauvage. Une corrélation positive existe entre les niveaux d'APM et de CB pour l'allèle muté de NQO1 d'une part, et entre les niveaux d'APM et de sites sensibles à la formamidopyrimidine glycosylase pour l'allèle délété du gène GSTP1 d'autre part.

En conclusion, l'air ambiant à Cotonou est fortement pollué par le benzène, les HAPs et les PUFs provenant essentiellement de la combustion incomplète du carburant dépourvu de l'ETBE. Ces polluants ont un impact négatif sur la santé des populations exposées : diminution du nombre de cellules de la lignée blanche, fragmentation, cassures de brins, modification de bases et formation des adduits d'ADN. Les données issues de cette étude révèlent que ces dommages dans l'ADN sont plus importants chez les habitants de la ville de Cotonou par rapport aux villageois. Il est donc impératif de réduire les émissions de polluants dans l'air au Bénin afin d'améliorer la santé des populations, surtout celles vivant en zones urbaines.

Mots clés : Pollution atmosphérique, ETBE, Biomarqueurs, Adduits d'ADN, Fragmentation d'ADN.

I. INTRODUCTION

Depuis des siècles, la présence de fumées, de cendres, de gaz sulfureux et de composés indésirables dans l'atmosphère est considérée comme une nuisance pour la biosphère.

Selon la Loi sur " l'air et l'utilisation rationnelle de l'énergie " de 1996, la pollution atmosphérique est définie comme étant:

« l'introduction par l'homme, directement ou indirectement, dans l'atmosphère et les espaces clos, de substances ayant des conséquences préjudiciables de nature à mettre en danger la santé humaine, à nuire aux ressources biologiques et aux écosystèmes, à influencer sur les changements climatiques, à détériorer les biens matériels, à provoquer des nuisances olfactives » (ADEME, 1996).

L'air pollué peut contenir de nombreux composés, tels que les dioxydes de carbone (CO_2), de soufre (SO_2) et d'azote (NO_2), les composés organiques volatils (COVs) ainsi que les poussières et particules associées aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs).

La pollution atmosphérique est un phénomène complexe due principalement à la densité du trafic routier et aérien, à l'incinération des ordures ménagères, aux installations industrielles, de chauffage, de centrales thermiques, etc.

La pollution atmosphérique exerce une influence négative sur la santé de nombreux êtres vivants animaux ou végétaux. Chez l'homme, elle entraîne une augmentation des maladies respiratoires (asthme, angines ou insuffisance respiratoire ou bronchique) et cardiovasculaires et est source de surmortalité. En effet, il a été rapporté qu'une augmentation de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de la concentration des particules de diamètre $2,5 \mu\text{m}$ est associée respectivement à une augmentation de 4%, 6% et 8% des maladies cardio-pulmonaires, de la mortalité et du cancer de poumon (Pope et al., 2002). D'autres études ont rapporté que la réduction de la concentration des particules fines peut contribuer à l'amélioration de l'espérance de vie globale, jusqu'à hauteur de 15%. Il y a donc un lien direct entre l'exposition aux polluants de l'air et les maladies respiratoires, cardiovasculaires, et celles liées à la reproduction humaine (Kristin et al., 2007 ; Robin et al., 2008).

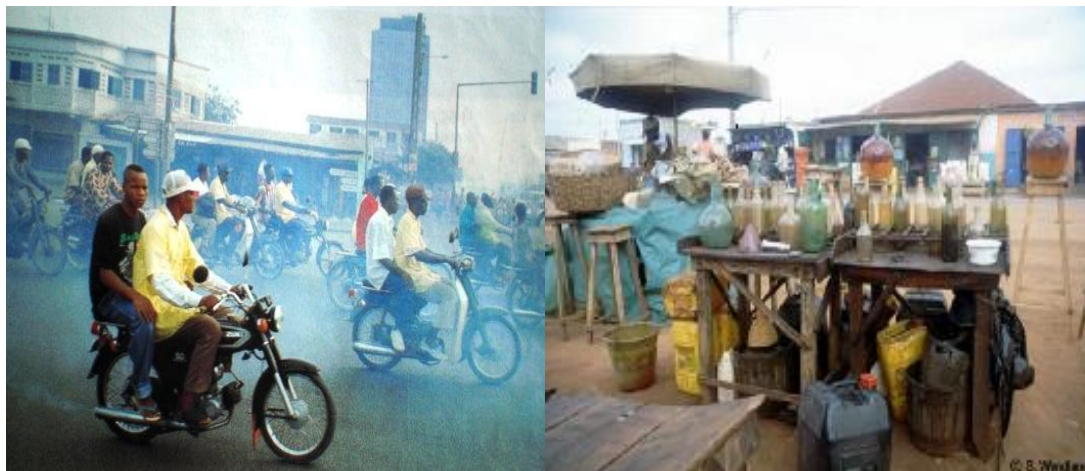
L'exposition aux polluants de l'air est évaluée à l'aide de biomarqueurs spécifiques. Plusieurs biomarqueurs sont décrits dans la littérature. Certains fournissent une indication sur la dose interne : par exemple la mesure du benzène urinaire, les anticorps anti-métabolites du benzène (AAMB) (Ducos et al., 1990, Jongeneelen et al., 1987, Dimitrova et al., 2005). sont

D'autres biomarqueurs sont indicateurs de la dose biologiquement active : les adduits d'ADN utilisés comme marqueurs prédictifs du risque de certains types de cancer (Vineis et Perera, 2000 ; Rundle et al., 2000 ; Peluso et al., 2005), les cassures de brins d'ADN, les modifications de bases et les enzymes de réparation de l'ADN (Autrup et al., 1999; Møller et al., 2000).

Bien que la pollution atmosphérique soit considérée comme un problème majeur de santé publique aussi bien dans les pays industrialisés que dans les pays émergents, les données de la littérature montrent irréfutablement que le niveau des polluants de l'air ainsi que leurs effets sur la santé des populations exposées sont en nette progression dans les pays les moins industrialisés que dans les pays industrialisés (Baumbach et al., 1995; Kyrtopoulos et al., 2001; Ruchirawat et al., 2007).

Cotonou, la capitale économique du Bénin est sujette depuis plus d'une décennie à une pollution sans cesse croissante due à la croissance démographique (plus de 1,2 millions d'habitants à Cotonou, 2002), à l'inexistence de transport en commun, à l'utilisation des véhicules (vieux de plus de dix ans de moyenne d'âge), de motos à deux temps (très polluants) comme moyens de transport et d'essence vendue aux abords des voies. Malgré les mesures (réglementation de l'importation des véhicules d'occasion, exonération des taxes de douanes sur l'achat de bus neufs, opération pollueur payeur, etc.) adoptées par le gouvernement du Bénin pour y remédier, la pollution atmosphérique demeure préoccupante à Cotonou.

Cotonou étant le siège d'une activité portuaire, industrielle et aéroportuaire intenses, il est fréquent d'observer les fumées noires des camions diesels, des cheminées d'usines ou les traînées blanches qui surplombent la ville au passage des avions et qui contribuent pour une bonne part à la formation des polluants de l'air ambiant. La photo ci-après illustre bien ce phénomène.



L'analyse des données de la littérature montre que la plupart des études examinant l'impact de la pollution de l'air sur la santé de l'homme sont effectuées dans les pays développés. Face à l'ampleur de la pollution de l'air à Cotonou, nous avons entrepris une étude pilote en 2003 pour examiner la qualité de l'air ambiant à Cotonou. Nos résultats ont montré que l'air à Cotonou est très pollué et contient entre autres polluants, des composés organiques volatils (COVs) comme le benzène et ses dérivés, des particules ultrafines (PUFs) associées aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) en très fortes concentrations : le benzène atteint une concentration moyenne de $76 \mu\text{g}/\text{m}^3$, valeur largement au dessus du seuil de $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ recommandé par l'OMS ; les HAPs et les PUFs atteignent respectivement $103\text{ng}/\text{m}^3$ et $166816 \text{ particules}/\text{m}^3$ à Cotonou contre $1.55\text{ng}/\text{m}^3$ et $5276,5 \text{ particules}/\text{m}^3$ dans un site témoin situé à 80kms de Cotonou (village Sohon) (Avogbe et al., 2005 et Ayi-Fanou et al., 2006).

Nous avons poursuivi nos investigations pour connaître l'origine des polluants comme le benzène, les PUFs et les HAPs que nous avons retrouvés dans l'air à Cotonou.

La littérature rapporte que jusqu'en 1950, le benzène est utilisé comme additif antidétonant à l'essence qui n'en contenait jusqu'alors que 5%. Mais il a été vite remplacé à cause de ses effets néfastes par le tétraéthyl de plomb, qui est aussi un additif antidétonant. Compte tenu des effets néfastes du tétraéthyl plomb sur la santé humaine et suite aux réglementations concernant la teneur en plomb de l'essence dans de nombreux pays (Etats-Unis, Europe etc.), le benzène réapparaît dans l'essence à un taux avoisinant 1% (Kolmetz et

Gentry, 2007). A l'heure actuelle où le Bénin a adopté l'essence sans plomb, nous avons cherché à savoir si l'essence vendue au Bénin respectait cette norme internationale ou si le taux de benzène était plus élevé dans l'essence mise en vente au Bénin par rapport à celle vendue dans un pays développé comme la France.

Le but de ce travail est d'examiner l'impact des polluants génotoxiques comme le benzène, les PUFs et les HAPs de l'air sur la santé des populations cibles que sont :

- les conducteurs de taxi-moto de Cotonou ;
- les sujets résidant près des grands carrefours comme Marina, St Michel ;
- les habitants de la banlieue de Cotonou ;
- les vendeurs de carburants et vendeurs aux abords des rues ;
- les habitants du village de Sohon (situé à 80Km environ de Cotonou).

Pour atteindre cet objectif, notre travail a consisté à :

1. analyser l'essence utilisée au Bénin pour la comparer à l'essence vendue en France ;
2. évaluer les niveaux d'exposition au benzène et ses dérivés, les PUFs et les HAPs associés dans les grands carrefours, la banlieue de Cotonou ainsi qu'au village Sohon ;
3. étudier le profil hématologique chez les populations cibles ;
4. mesurer le niveau des biomarqueurs d'exposition des populations cibles tels que l'acide S-Phényl Mercaturique (l'APM), les anticorps anti métabolites du benzène (AAMB) ainsi que le 1-Hydroxy pyrène (1-HOP) métabolite du pyrène des HAPs;
5. quantifier les dommages engendrés par ces polluants de l'air sur l'ADN par la mesure des niveaux de cassures simples brins et doubles brins, les modifications de bases (sites sensibles à la formamidopyrimidine glycosylase (FPG)) ainsi que les adduits d'ADN;
6. évaluer la capacité des populations étudiées à détoxifier ces polluants en étudiant un certain nombre de polymorphismes de gènes de la famille du glutathion S-transférase (GST) et de la Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (NAD(P) H) quinone oxydoréductase 1 (NQO1).

Notre thèse est constituée de trois chapitres. Le premier chapitre de ce document fait le point d'une revue bibliographique sur la composition de l'air et de ses polluants, et leurs

effets biologiques. Cette partie se poursuit par une analyse des enzymes de métabolisation des xénobiotiques et se termine par quelques mécanismes impliqués dans la cancérogenèse, en focalisant notre approche sur les adduits d'ADN, leur formation et leurs méthodes de détection.

Le deuxième chapitre présente les moyens et méthodes mis en jeu pour répondre aux objectifs de notre travail.

Dans un troisième chapitre, sont présentés les résultats obtenus ainsi que la conclusion générale de ce travail et les perspectives sur le développement.

II. REVUE DE LITTÉRATURE

II.1. Composition de l'air, principaux polluants de l'air et leur origine

II.1.1. Composition de l'air

L'air constitue le premier des éléments nécessaires à la vie. Chaque jour, nous respirons environ 14 kg d'air, soit 11 000 litres contre 1,5 kg de nourriture et 2 l d'eau (Declercq, 2009). La composition chimique normale de l'air est: 78% d'azote, 21% d'oxygène, 0,9% d'argon et 0,1% d'autres gaz.

Les substances polluantes peuvent être d'origine naturelle (activité volcanique) ou essentiellement anthropique. Elles sont émises par des sources fixes et mobiles: activités industrielles, domestiques et agricoles, transport routier des personnes et des marchandises.

II.1.2. Les principaux polluants de l'air et leur origine

L'air que nous respirons peut contenir des centaines de polluants sous forme gazeuse, liquide ou solide. Les polluants considérés comme des indicateurs de la pollution sont : le dioxyde de soufre, les oxydes d'azote, le monoxyde de carbone, les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les particules ultrafines en suspension, les composés organiques volatils, etc.

II.1.2.1. Dioxyde de soufre (SO₂)

Ce gaz provient essentiellement de la combinaison du soufre, contenu dans les combustibles fossiles (charbon, fuel, gazole, etc.) avec l'oxygène de l'air. Les industries et les installations de chauffage sont les principaux émetteurs. Il contribue à la formation des pluies acides qui nuisent à l'écosystème.

II.1.2.2. Oxydes d'azote (NO, NO₂) (NO_x)

Toutes les combustions à haute température et à haute pression des moteurs des automobiles (surtout les moteurs diesel) et des avions produisent les NO_x. Ils résultent de la réaction de l'azote et de l'oxygène de l'air qui a lieu à haute température dans les moteurs et les installations de combustion et de l'activité de certaines bactéries nitrifiantes. Ces gaz participent également à la formation des pluies acides.

II.1.2.3. Monoxyde de carbone (CO)

Il résulte de la combustion incomplète des combustibles et carburants. Dans l'air ambiant, on le rencontre essentiellement à proximité des voies de circulation routière. Il est

essentiellement issu des véhicules à essence et vieux véhicules non catalysés qui ont échappé au contrôle technique.

II.1.2.4. Composés organiques volatils (COVs)

Ils sont multiples, il s'agit principalement d'hydrocarbures dont l'origine est soit naturelle, soit liée à l'activité humaine : le transport routier, l'utilisation industrielle ou domestique de solvants, l'évaporation des stockages pétroliers et des réservoirs automobiles. Le benzène est le plus étudié parmi les COVs. C'est un solvant incolore très utilisé dans l'industrie chimique, pharmaceutique, du plastique, des colorants etc. L'exposition au benzène est possible à travers les émissions issues du trafic routier, de l'air ambiant intérieur, des fumées de tabac, des solvants et produits d'entretien ménagers, des parfums (Wallace, 1996). Le benzène est classé comme cancérigène humain par le Centre International de Recherche sur le Cancer (IARC, 1974). C'est pour cette raison qu'il a été remplacé dans les usines par d'autres solvants moins toxiques. Toutefois, dans de nombreux pays, certains procédés industriels font encore un usage contrôlé du benzène : par exemple dans l'essence sans plomb, il est utilisé comme additif et solvant adhésif dans la colle et dans la fabrication des chaussures.

II.1.2.5. Particules en suspension (PM)

Les particules en suspension dans l'air (notées PM en anglais pour Particulate Matter) ou aérosols désignent un mélange de polluants solides et ou liquides, en suspension dans un milieu gazeux. Ils se caractérisent par leur morphologie, leurs propriétés physico-chimiques et thermodynamiques. Elles sont classées en plusieurs groupes : grosses (diamètre aérodynamique $> 10 \mu\text{m}$ PM_{10}), fines (diamètre compris entre $10 \mu\text{m}$ et $2,5 \mu\text{m}$ voire $1 \mu\text{m}$ $\text{PM}_{2,5}$, PM_1), ultrafines ou nanoparticules (diamètre $< 0,1 \mu\text{m}$). Mais d'autres critères tiennent compte de leur mécanisme de formation, leur origine et leur composition chimique (Gilli et al., 2007). Elles peuvent adsorber sur leurs surfaces de nombreux autres polluants comme les pollens, les microorganismes (bactéries, virus), les sulfates, nitrates, ammonium, métaux lourds (Pb, As, Ni, Hg, Cd) et les (HAPs). Il a été démontré que les HAPs sont parmi les composés les plus importants des PM (Binkova et al., 2007). La composition et la concentration des PM dépendent de nombreux facteurs comme les sources de combustion, l'intensité du trafic, la nature du climat et de la pollution (urbaine ou industrielle) (Valavanidis et al., 2008 ; Kok et al., 2006). Les principaux émetteurs de PM sont les

véhicules diesels qui émettent plus de 80% des particules dans l'air, les incinérateurs, les cimenteries et certaines industries.

II.1.2.6. Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

Ce sont des molécules constituées d'atomes de carbone et d'hydrogène dont la structure comprend au moins deux cycles aromatiques condensés. Ils sont très toxiques.

Les principales sources d'exposition aux HAPs sont : les raffineries (pétroles, fioul, matières organiques...), les travaux d'asphaltage, les gaz d'échappement issus de la combustion du carburant automobile, la combustion domestique (charbon, bois), la production industrielle (aciéries), la production d'énergie (centrales électriques fonctionnant au pétrole ou au charbon, etc.), la fumée de tabac, le goudron, la houille de même que l'alimentation.

II.2. Effets néfastes de quelques polluants de l'air sur la santé

Bien que personne ne soit à l'abri des effets de la pollution atmosphérique sur la santé certains sous-groupes sont plus à risque. Ces sous-groupes comprennent : les enfants, les personnes âgées, les asthmatiques, les insuffisants respiratoires, les cardiaques, les sujets souffrant de bronchite chronique, les fumeurs, les femmes enceintes et les professionnels en contact avec les produits chimiques (garagistes, métiers du bâtiment, agents de l'industrie etc.). Les conséquences sur la santé sont différentes suivant la dose et la nature des polluants, bien que les différents constituants nocifs agissent souvent en synergie.

II.2.1. Dioxyde de soufre (SO₂)

C'est un gaz irritant. Il provoque une altération de la fonction pulmonaire chez les enfants et une exacerbation des symptômes respiratoires aigus chez l'adulte (toux, gêne respiratoire, etc.). Les personnes asthmatiques y sont particulièrement sensibles.

II.2.2. Oxyde d'azote (NO, NO₂) (NO_x)

Les NO_x sont des gaz irritants qui pénètrent dans les plus fines ramifications des voies respiratoires, entraînant une inflammation et une obstruction des voies aériennes. Ces oxydes provoquent une hyperréactivité bronchique chez les patients asthmatiques et un accroissement de la sensibilité des bronches aux infections chez l'enfant. Ils sont responsables des affections cardiovasculaires chez les sujets âgés (MSS, 2000).

II.2.3. Monoxyde de carbone (CO)

C'est un gaz mortel surtout en milieu clos. Il se fixe à la place de l'oxygène sur l'hémoglobine du sang conduisant à un manque d'oxygénation des organes comme le système nerveux, le cœur et les vaisseaux sanguins. Le système nerveux central et les organes sensoriels sont les premiers affectés, provoquant des céphalées, vertiges, asthénies ou troubles sensoriels et neuropsychiques irréversibles.

II.2.4. Composés organiques volatils (COVs)

Ces molécules ont des effets très divers selon leur famille. De la simple gêne olfactive (odeurs), certains provoquent une irritation (aldéhydes), voire une diminution de la capacité respiratoire. L'inhalation d'un taux inférieur à 2% de benzène peut occasionner la somnolence, des vertiges, une accélération du rythme cardiaque, des maux de tête, des tremblements, la confusion ou la perte de connaissance. La dose létale par ingestion est de 50 mg/kg. L'exposition chronique au benzène occasionne principalement une altération de la moelle osseuse qui se traduit par une diminution du taux de globules rouges dans le sang et une anémie aplasique ou une leucémie (Qu et al., 2002). Enfin le benzène est reconnu comme mutagène et cancérigène tout comme le bromure d'éthidium, ou BET en raison de son caractère comme agent intercalant (il s'insère entre les bases nucléotidiques des acides nucléiques, dont l'ADN, et provoque des erreurs de lecture et/ou de réplication).

II.2.5. Particules en suspension (PM)

Les plus grosses particules sont retenues par les voies respiratoires supérieures. Elles sont donc moins nocives pour la santé que les particules plus fines $PM_{2,5}$, PM_{10} et les $PM_{0,1}$ ou (PUFs) qui pénètrent plus profondément dans l'organisme. Elles irritent alors les voies respiratoires inférieures et altèrent la fonction respiratoire et même, à terme cardiovasculaire. Certaines, selon leur nature, ont également des propriétés mutagènes et cancérigènes.

II.3. Impact biologique de quelques polluants majeurs de l'air

II.3.1. De l'exposition aux polluants à l'apparition de la maladie

Les figures 1 (page 12), 2 (page 13) présentent la succession d'évènements allant de l'exposition aux polluants jusqu'à la survenue éventuelle de maladies franches. La figure 3 (page 16) permet de définir les divers types de biomarqueurs qui sont utilisés pour évaluer l'exposition, les effets biologiques et les susceptibilités particulières.

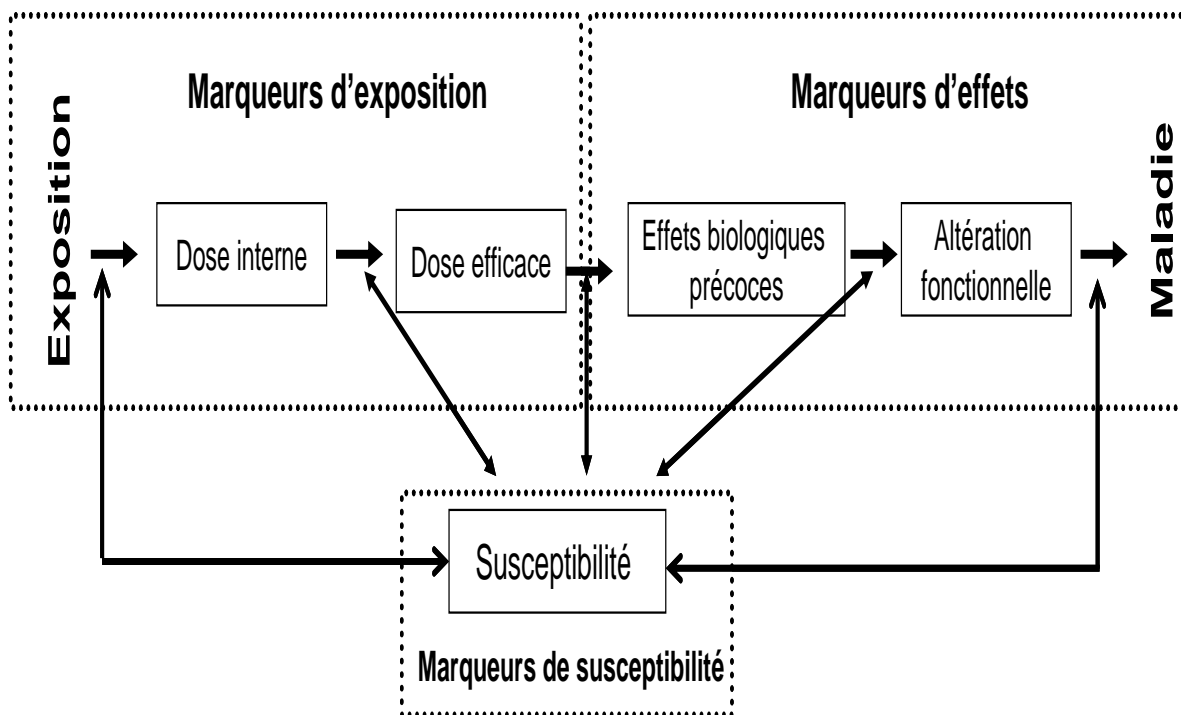


Figure 1: Succession des évènements allant de l'exposition aux polluants à l'apparition de la maladie

Les effets de la pollution de l'air sont multiples et dépendent de la quantité des polluants avec lesquels l'organisme est en contact ; on parle de "dose". Cette dose varie en fonction de 3 facteurs:

- la concentration des polluants dans l'atmosphère,
- la durée de l'exposition,
- l'intensité de l'activité physique.

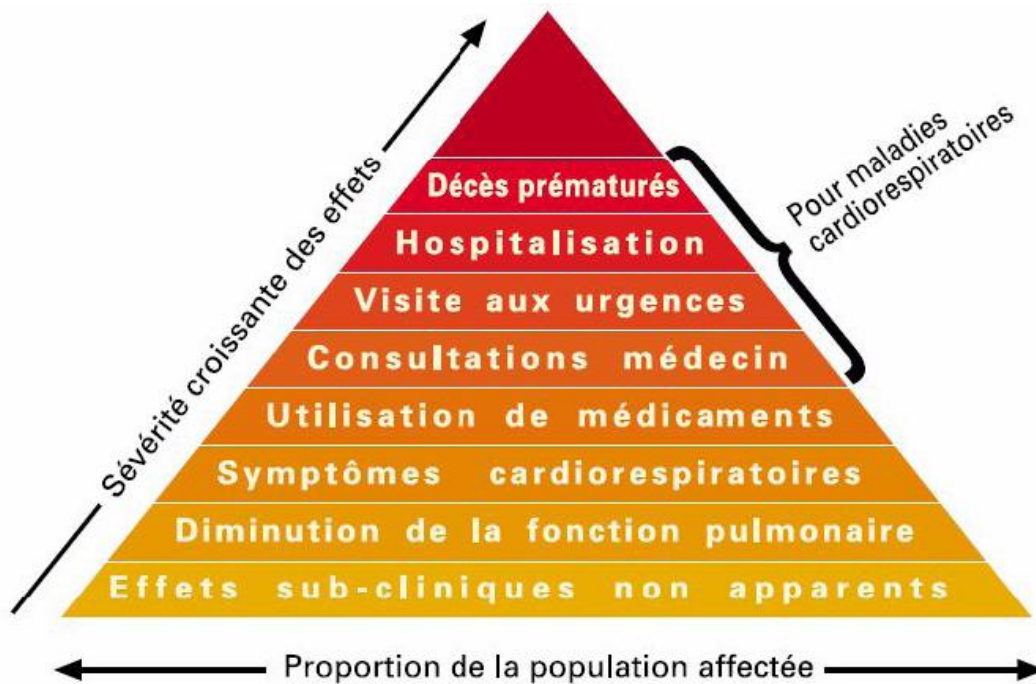


Figure 2: Pyramide des effets aigus associés à la pollution atmosphérique

(Source : Direction de la santé publique de Montréal. 2003)

La pyramide ci-dessus montre l'effet aigu de la pollution atmosphérique sur la santé des populations exposées (Declercq., 2009). A la base, on observe une partie de cette population qui, bien qu'étant exposée ne présente pas de signes cliniques observables donc elle est apparemment saine. Mais au fur et à mesure que la concentration des polluants augmente, les effets cliniques deviennent de plus en plus sévères allant de la diminution de la fonction pulmonaire aux maladies cardiorespiratoires voire à la mortalité. Ces manifestations cliniques, fonctionnelles ou biologiques se déroulent dans un intervalle de temps bref (quelques heures, jours à quelques semaines).

Les effets chroniques résultant d'exposition à long terme, (plusieurs mois ou années) souvent à de faibles doses peuvent aussi conduire à des désordres cliniques, fonctionnels ou biologique, à la diminution de l'espérance de vie ou à la mort.

II.3.2. Le benzène

Le benzène pénètre dans l'organisme essentiellement par inhalation. Certains auteurs comme Sawada et al.,1985, ont étudié le devenir de ce benzène dans l'organisme : il est

éliminé de l'organisme en partie dans les urines (moins de 1%) et dans l'air expiré (10 à 50% selon l'activité physique et l'importance du tissu adipeux). Le reste subit une biotransformation en benzène époxyde responsable de son effet myélotoxique. Il est bien connu qu'une exposition à une forte dose de benzène provoque une toxicité aigüe du système hématopoïétique (hématotoxicité) aussi bien chez l'homme que chez les animaux (Hayes et al., 2001 ; Yin et al., 1996 ; Savitz et Andrews, 1997). Le risque de développer une leucémie a été estimé à environ six cas par million chez les personnes ayant une exposition de $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ au benzène ambiant (WHO, 1996). Par ailleurs, il a été rapporté que, des niveaux d'exposition de l'ordre de 1-10 ppm soit $3,25\text{-}32,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ sont associés à une augmentation d'aberrations chromosomiques, principalement des échanges de chromatides sœurs dans les lymphocytes de transporteurs du pétrole et des travailleurs d'une usine de production de plantes aromatiques (Yardley-Jones et al., 1990 ; Carere et al., 1995). Dans de nombreuses villes européennes les concentrations moyennes annuelles du benzène dans l'air ambiant varient de 1 à $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (15 ppb) (Skov et al., 2001).

Snyder et Hedli, (1996) ont montré que le métabolisme joue un rôle important dans la toxicité du benzène. Le benzène est principalement métabolisé dans le foie et génère une variété de composés cycliques ainsi que des métabolites très réactifs (figure 3). Ces métabolites sont transportés jusqu'à la moelle osseuse, où un métabolisme secondaire plus poussé accroît la toxicité du benzène (Subrahmanyam et al., 1991) ou provoque la production d'anticorps spécifiques pour les éliminer. Le dosage de ces anticorps rend compte de l'exposition au benzène voire du taux de ces métabolites (Dimitrova et al., 2005)

L'exposition au benzène est évaluée à l'aide de différents biomarqueurs : le benzène urinaire non métabolisé, ou les métabolites urinaires du benzène (l'acide trans-muconique (AM), l'acide S-phénylmercapturique (APM) et le phénol) et les anticorps anti hydroquinone (HQ) et anti benzoquinone (BQ). Ces biomarqueurs servent à caractériser l'exposition interne au benzène, mais des marqueurs d'effets cancérogènes potentiels, incluant le stress oxydant et les effets cytogénétiques sont également très importants et ont fait l'objet de certaines études (Zhang et al., 1996, 1998 ; Smith et al., 1998 ; Kim et al., 2004). Plusieurs des métabolites du benzène, plus particulièrement les dérivés des quinones (p-benzoquinone (BQ) et hydroquinone (HQ) sont de petites molécules, qui peuvent se lier aux macromolécules cellulaires comme les protéines et l'ADN et engendrer un stress oxydatif qui est à l'origine des effets génotoxiques (Subrahmanyam et al., 1991) ou former des adduits de protéines. Ce

sont ces adduits de protéines qui sont immunogènes et sont responsables de la formation des anticorps spécifiques anti-métabolites HQ et BQ (Dimitrova et al., 2005).

Des études expérimentales ont montré que l'exposition au benzène induit des lésions oxydatives de type 8-oxo déoxyguanosine (8-oxodG) dans l'ADN, aussi bien dans les lymphocytes que dans la moelle osseuse dépourvue de l'enzyme superoxyde dismutase, qui est un puissant antioxydant naturel. (Tuo et al., 1996 et Tuo et al., 1999).

II.3.2.1. Effets modulateurs des polymorphismes génétiques sur la toxicité du benzène

Les polymorphismes génétiques de certains gènes codant pour des enzymes impliquées dans les processus de détoxification, jouent un rôle important dans le métabolisme du benzène (Lan et al., 2004). Par exemple, la NAD(P)H quinone oxydoréductase, enzyme de détoxification qui convertit grâce à une réduction les dérivés de quinones en composés moins toxiques, pourrait théoriquement protéger contre le stress oxydatif induit par le métabolisme du benzène (Moran et al., 1999 ; Autrup, 2000). Mais, certaines données suggèrent que le polymorphisme du gène NQO1 semble accroître la toxicité et la cancérogénicité du benzène aussi bien chez l'homme que dans les modèles animaux (Iskander et Jaiswal, 2005 ; Smith, 1999).

Plusieurs des métabolites intermédiaires du benzène peuvent être liés au glutathion (Snyder et al., 1993) formant ainsi un complexe glutathionyl d'oxyde de benzène qui est métabolisé en acide S-phényl mercapturique et excrété dans l'urine. Mais dans certains cas cette conjugaison au glutathion pourrait, bien au contraire, augmenter la toxicité. Hsieh et collaborateurs (1999) ont rapporté une hématotoxicité chez des sujets exposés professionnellement au benzène et homozygotes normaux pour GSTM1, GSTT1. Par ailleurs, il est montré que le niveau d'excrétion de l'acide trans muconique (AM) est augmenté chez les sujets porteurs d'une délétion de GSTT1 mais que le niveau d'excrétion de l'APM est effondré chez les sujets porteurs de l'allèle muté de NQO1 (Rossi et al., 1999).

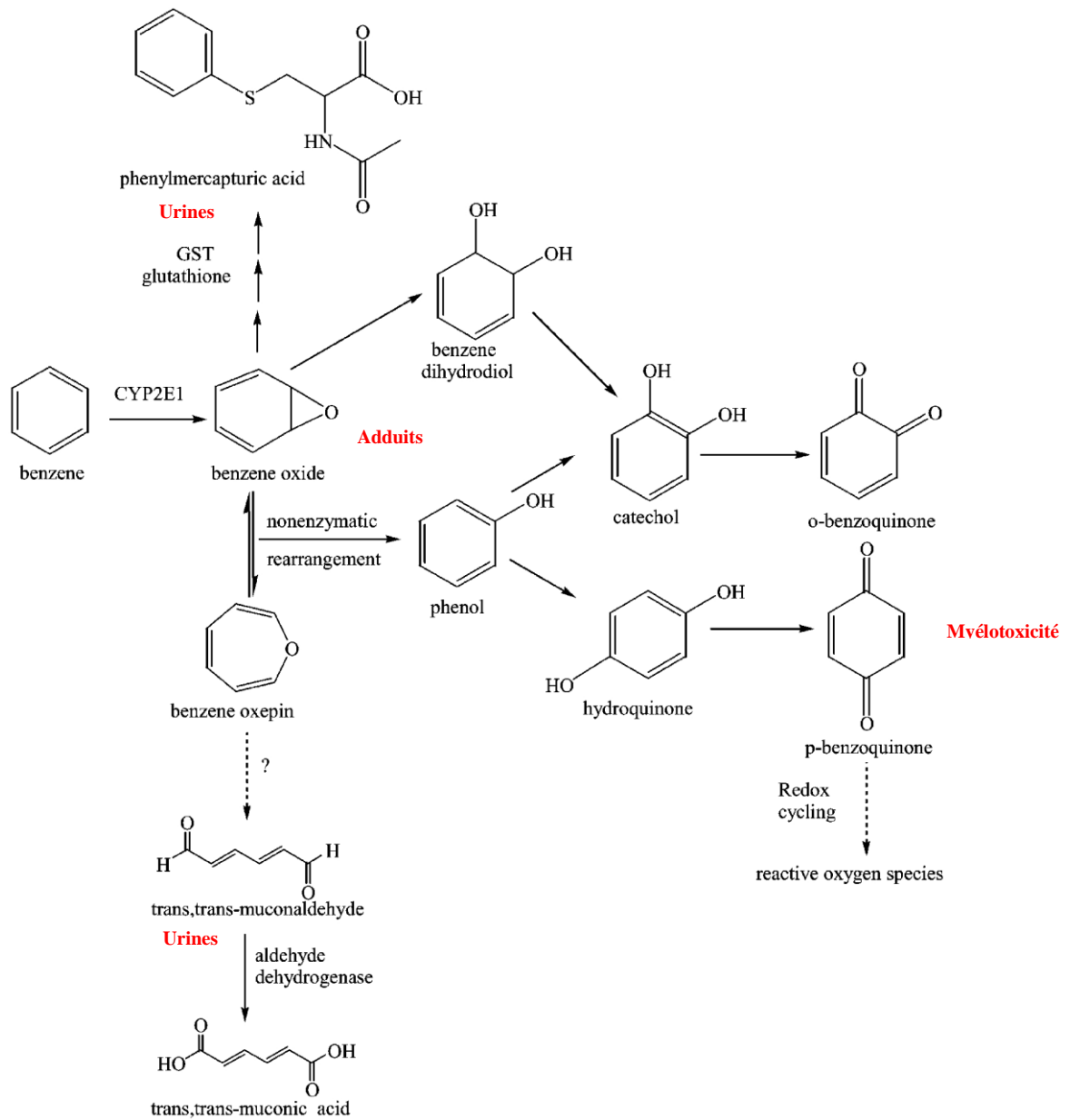


Figure 3 : Métabolisme du benzène (source Sorensen et al., 2003a; Sci. Total Environ.)

Le benzène est bio-transformé par CYP2E1 dans le foie en benzène oxyde et ensuite par des réarrangements non-enzymatiques en phénol, qui peut encore être hydroxylé en hydroquinone, catéchol et le 1,2,4-trihydroxybenzène. Les di-et tri-hydroxy métabolites peuvent être oxydés dans la moelle osseuse par la myéloperoxydase en benzoquinones, qui sont détoxiqués par la NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) en hydroxybenzenes moins toxiques.

II.3.2.2. Evaluation des titres des anticorps anti-métabolites du benzène (AAMB)

Le benzène, une fois dans l'organisme est transformé en différents métabolites dont les plus toxiques sont le 1, 2, 4 benzène triol, le parabenzoquinone et l'hydroquinone. Ces composés de petite taille se lient aux protéines cellulaires et provoquent la formation des anticorps anti-protéines-métabolites de benzène (AAMB) qui témoignent de l'exposition au benzène. La concentration de ces anticorps est d'autant plus élevée que l'exposition est plus forte (Dimitrova et al., 2005). Ces anticorps anti-métabolites du benzène sont dosés grâce à la technique d'ELISA.

II.3.3. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

L'homme est en général exposé à un mélange d'HAPs et non pas à un HAP particulier, et ceci quelle que soit la voie d'exposition (orale, pulmonaire ou cutanée). Comme le benzène, les HAPs sont cancérigènes (IARC, 2006) pour l'homme.

Actuellement, les effets toxicologiques de tous les HAPs sont mal connus puisque :

- 1- ils ont un effet compétitif avec les dioxines ;
- 2- les données expérimentales disponibles étudient en général l'effet spécifique d'un seul HAP ;
- 3- seule la toxicité d'un nombre restreint de HAPs est actuellement connue ;
- 4- certains HAPs s'avèrent cancérigènes alors que d'autres n'induisent que des effets systémiques non cancérigènes (effets hépatiques, hématologiques, immunologiques et développement d'athérosclérose) ;
- 5- L'extrapolation de l'animal à l'homme est particulièrement difficile parce que les enzymes activant les HAPs sont différentes chez l'animal et l'homme et la possibilité de développer des tumeurs en présence des HAPs varie en fonction de l'espèce étudiée.

Cependant, les données disponibles dans la littérature suggèrent que l'exposition de l'homme aux HAPs est associée à une augmentation du risque de cancer. Par exemple il a été démontré que l'exposition aux HAPs est associée à divers types de cancers, notamment les

cancers de la peau, des poumons et de la vessie (Boffetta et al., 1997 ; Zhang et al., 2009). De plus, il est bien connu que de nombreux HAPs ainsi que leurs analogues hétérocycliques sont cancérigènes chez l'homme et l'animal (Dipple et al., 1984).

Les HAPs requièrent aussi une activation métabolique qui, dans la plupart des cas, fait intervenir les enzymes de la famille CYP450. Cette activation génère des métabolites très réactifs (cancérigène ultime) capables de se lier aux macromolécules cellulaires tels que les acides nucléiques et les protéines, formant ainsi des adduits (figure 4 ci-dessous). De nombreuses études ont montré que l'exposition aux HAPs s'accompagne d'une augmentation du niveau d'adduit d'ADN (Binkova et al., 2007 ; Ruchirawat et al., 2009), avec des niveaux très élevés chez ceux ayant des faibles concentrations d'antioxydants (Kelvin et al., 2009). Il a été rapporté récemment que la co-exposition au benzène et aux HAPs est associée à une augmentation du niveau de cassures de brins d'ADN et du niveau de la 8-oxodG chez des travailleurs d'une industrie de pétrochimie (Ruchirawat et al., 2009).

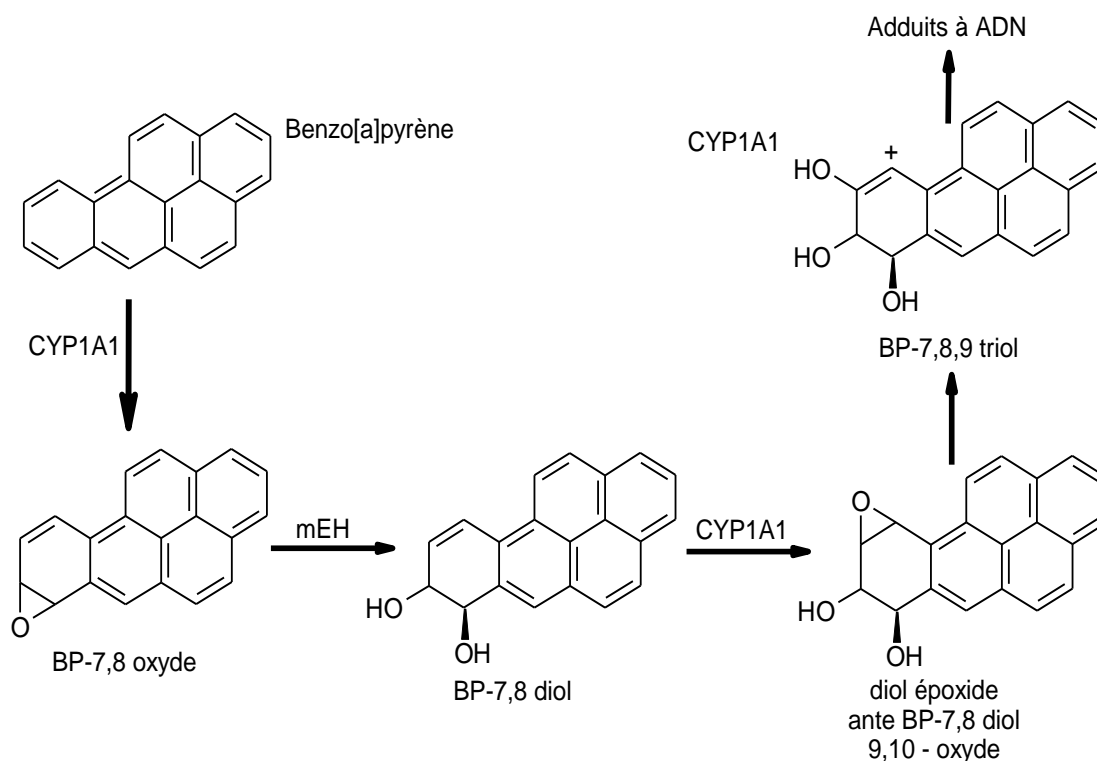








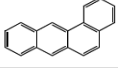
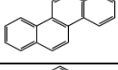
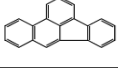
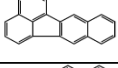
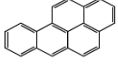
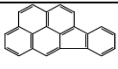

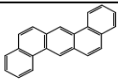


Figure 4: Métabolisme simplifié du benzo(a)pyrène montrant la formation d'adduits

mEH= époxyde hydrolase microsomale

Le tableau 1 ci-dessous montre la structure de quelques HAPs souvent examinés dans les études épidémiologiques.

Tableau 1: Propriétés physico-chimiques de quelques HAPs souvent recherchés.

Nom	Masse molaire (g/mol)	Formule brute	Formule développée	Point de Fusion (°C)	Point d'ébullition (°C)
Naphtalène	128	C ₁₀ H ₈		80	218
Acénaphthylène	152	C ₁₂ H ₈		93	270
Acénaphtène	154	C ₁₂ H ₁₀		95	279
Fluorène	166	C ₁₃ H ₁₀		117	295
Phénanthrène	178	C ₁₄ H ₁₀		100	340
Anthracène	178	C ₁₄ H ₁₀		218	342
Fluoranthène	202	C ₁₆ H ₁₀		111	393
Pyrène	202	C ₁₆ H ₁₀		156	393
Benzo(a)anthracène	228	C ₁₈ H ₁₂		161	438
Chrysène	228	C ₁₈ H ₁₂		256	441
Benzo(b)fluoranthène	252	C ₂₀ H ₁₂		168	481
Benzo(k)fluoranthène	252	C ₂₀ H ₁₂		217	481
Benzo(a)pyrène	252	C ₂₀ H ₁₂		180	496
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	276	C ₂₂ H ₁₂		163	530
Benzo(ghi)pérylène	276	C ₂₂ H ₁₂		278	500
Dibenzo(ah)anthracène	278	C ₂₂ H ₁₄		268	nc

II.3.4. Les particules en suspension : Toxicité et effets sur la santé

Une grande attention est accordée aux particules fines et ultrafines en raison de leur caractère potentiellement toxique pour la santé de l'homme, particulièrement les $PM_{2,5}$ et les PUFs ($PM_{0,1}$) qui peuvent pénétrer dans les voies respiratoires inférieures alors que les PM_{10} sont plus facilement arrêtées par les muqueuses.

Les particules fines peuvent causer de nombreuses maladies comme l'asthme, les allergies, les maladies de la peau, différentes affections pulmonaires chroniques et le cancer. En effet, de nombreuses études épidémiologiques ont établi une association entre l'exposition aux PM et l'augmentation de la mortalité et des hospitalisations dues au cancer du poumon, aux maladies pulmonaires et cardio-vasculaires (Brunekreef et Holgate, 2002, Pope et al., 2002 et Brook et al., 2004, Riedl et al., 2005, Saxon et al., 2005 ; Franklin et al., 2008 ; Delfino et al., 2009 ; Zhang et al., 2009).

Le mécanisme exact par lequel les particules exercent leurs effets toxiques au niveau cellulaire n'est pas encore complètement élucidé. Il est généralement admis que chez l'homme les PM engendrent la production de radicaux oxygénés réactifs (ROR) élevant le niveau du stress oxydatif (Sorensen et al., 2003b). Dans les conditions physiologiques normales il y a un équilibre entre les systèmes oxydant et anti-oxydant. Il a été démontré qu'une production excessive des ROR accable le système anti-oxydant et favorise une oxydation des macromolécules cellulaires (Risom et al., 2005). Par exemple l'attaque du groupement hydroxyle ($\cdot OH$) sur l'ADN génère plusieurs bases modifiées dont la 8-oxodéoxyguanosine (8-oxodG) qui est plus souvent examinée dans de nombreuses études comme biomarqueur évaluant les niveaux de lésions oxydatives dans l'ADN (Rossner et al., 2008 ; Sorensen et al., 2003a ; 2003b).

Malgré les nombreuses études épidémiologiques sur les PM pendant cette dernière décennie, il n'y a pas un consensus sur les propriétés physico-chimiques des particules responsables de leur toxicité ainsi que les mécanismes qui sous-tendent leurs effets néfastes sur la santé (Knaapen et al., 2004, Sharma et al., 2007 et Abbas et al., 2009). Il est admis que les $PM_{2,5}$ sont en grande partie responsables des effets biologiques, puisqu'elles peuvent pénétrer dans les endroits les plus profonds de l'appareil respiratoire (région alvéolaire) où a lieu les échanges gazeux respiratoires. De plus, la grande surface spécifique et irrégulière des $PM_{2,5}$ favorise l'adsorption de nombreuses molécules cancérigènes et/ou mutagènes, tels que

les HAPs, les nitro-HAPs et les métaux de transition (Claxton et al., 2004). Par ailleurs, il a été rapporté que les PM_{2,5} contiennent généralement de grandes quantités d'ions de métaux de transition (Fe, Cu, Zn, etc.), de puissants inducteurs de lésions oxydatives dans l'ADN grâce à la production de radicaux oxygénés réactifs (ROR) (Knaapen et al., 2002).

Différentes études (utilisant des cellules de mammifères et des animaux de laboratoire) ont montré que les PM sont capables d'induire une génotoxicité, une cytotoxicité cellulaire, une oxydation de l'ADN de même qu'une production de cytokines (de Kok et al., 2006 ; Gábelová et al., 2004, Billet et al., 2008).

La figure 5 ci-dessous synthétise le mode d'action des PM et leur implication dans l'apparition des cancers et maladies cardiovasculaires.

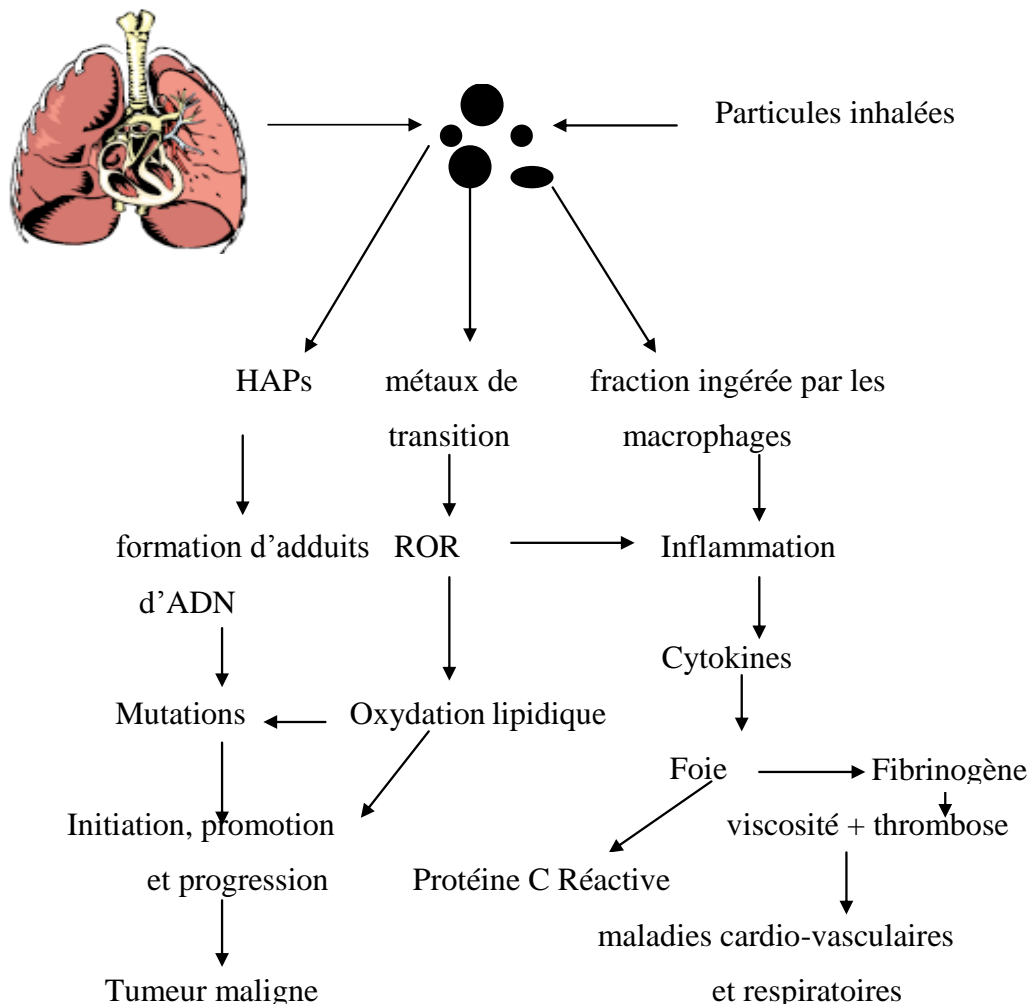


Figure 5 : Diagramme hypothétique du mode d'action des particules et le lien avec les cancers et maladies cardiopulmonaires (source Sorensen et al., 2003 c)

II.4. Biomarqueurs d'exposition

II.4.1. Le benzène urinaire

Une partie du benzène qui pénètre dans l'organisme (moins de 1%) est éliminé de l'organisme par les urines. Ce benzène non métabolisé peut être utilisé comme biomarqueur d'exposition au benzène.

II.4.2. L'acide S-phénylmercapturique (APM) et acide muconique (AM)

L'APM et l'AM sont tous deux des biomarqueurs d'exposition au benzène. Cependant, Il est bien démontré que l'APM est beaucoup plus spécifique pour une exposition au benzène que l'AM (Carrieri et al., 2006 ; 2009).

II.4.3. Les anticorps anti-métabolites du benzène

L'hydroquinone et le benzoquinone sont des métabolites génotoxiques du benzène dont nous avons signalé la formation dans la figure (3) sur le métabolisme du benzène. Ces métabolites toxiques n'étant pas immunogènes se lient aux protéines et provoquent la formation d'anticorps spécifiques qui peuvent être dosés par des méthodes immunochimiques. Une étude récente menée par Dimitrova et ses collaborateurs, (2005), a montré l'existence d'une forte corrélation entre l'exposition à un taux élevé de benzène et une augmentation des Immunoglobulines G (IgG) spécifiques par le test de l'ELISA. La mesure de ces anticorps spécifiques pourrait constituer donc un bon indicateur pour évaluer l'exposition au benzène (Dimitrova et al., 2005).

II.4.4. Le 1-hydroxypyrene (1-HOP)

Le 1-HOP représente le biomarqueur d'exposition aux HAPs surtout du pyrène. Il est largement utilisé dans de nombreuses études pour évaluer les niveaux des HAPs (Lee et al., 2001).

II.5. Biomarqueurs d'exposition et d'effets biologiques

II.5.1. Les adduits d'ADN

II.5.1.1. Importance des adduits d'ADN dans les études épidémiologiques

Les dommages dans l'ADN sont utilisés dans de nombreuses études épidémiologiques pour évaluer les effets de la pollution de l'air sur la santé, en particulier les adduits à l'ADN, qui sont largement associés à l'exposition aux HAPs. (Castano-Vinyals et al., 2004). En effet, dans différents pays, il a été rapporté que les niveaux d'adduits à l'ADN sont plus élevés chez les populations les plus exposées aux polluants atmosphériques par rapport aux populations les moins exposées: c'est le cas des études effectuées chez les fonctionnaires de police Italiens et Thaïlandais (Peluso et al., 1998 ; Ruchirawatt et al., 2002), de résidents Polonais de zones urbaines fortement industrialisées (Perera et al., 1992) et des conducteurs de bus Danois (Nielsen et al., 1996). Dans toutes ces études, il a été rapporté des différences significatives de niveaux d'adduits entre les sujets qui sont fortement exposés par rapport à ceux qui le sont moins. En revanche, Palli et ses collaborateurs, (2001) ont rapporté récemment que les niveaux d'adduits étaient significativement plus élevés chez des sujets non fumeurs exposés à l'air pollué que chez les fumeurs actifs.

De plus, une étude utilisant la technique de radiomarquage au ^{32}P pour quantifier les niveaux d'adduits à l'ADN des lymphocytes circulants chez 194 non-fumeurs étudiants vivant dans la ville d'Athènes et dans la région de Halkida (Georgiadis et al., 2004), a rapporté que l'exposition personnelle aux HAPs était significativement plus élevée chez les sujets d'Athènes et que, les niveaux d'adduits plus élevés étaient observés dans le sous-groupe de sujets vivant à Halkida, une région à faible trafic de la Grèce. Les auteurs ont également rapporté chez ces derniers une corrélation positive entre les adduits à l'ADN et le niveau personnel d'exposition au chrysène ou Benzo(a)Pyrène.

Au Danemark, Sorensen et ses collaborateurs, (2003) ont mesuré l'exposition individuelle aux $\text{PM}_{2,5}$ et aux COVs chez 50 sujets et analysé les dommages dans l'ADN en terme de 8-oxodG. Cette étude a démontré que le niveau individuel de $\text{PM}_{2,5}$ constitue un indicateur prédictif de niveau de la 8-oxo-dG dans les lymphocytes. On observe une augmentation de 11% du niveau de la 8-oxo-dG pour un accroissement de l'exposition aux particules de 10 mg/m^3 . Une étude cas-témoins auprès de patients ex-fumeurs et non fumeurs

suivis en Europe incluant entre autres pathologies des cas de cancer de poumon (n=115), a montré une forte association entre le niveau d'adduits chez les non-fumeurs en bonne santé et le risque de développer le cancer du poumon (Peluso et al., 2005).

La figure 6 ci-dessous montre quelques adduits majeurs formés identifiés dans l'ADN.

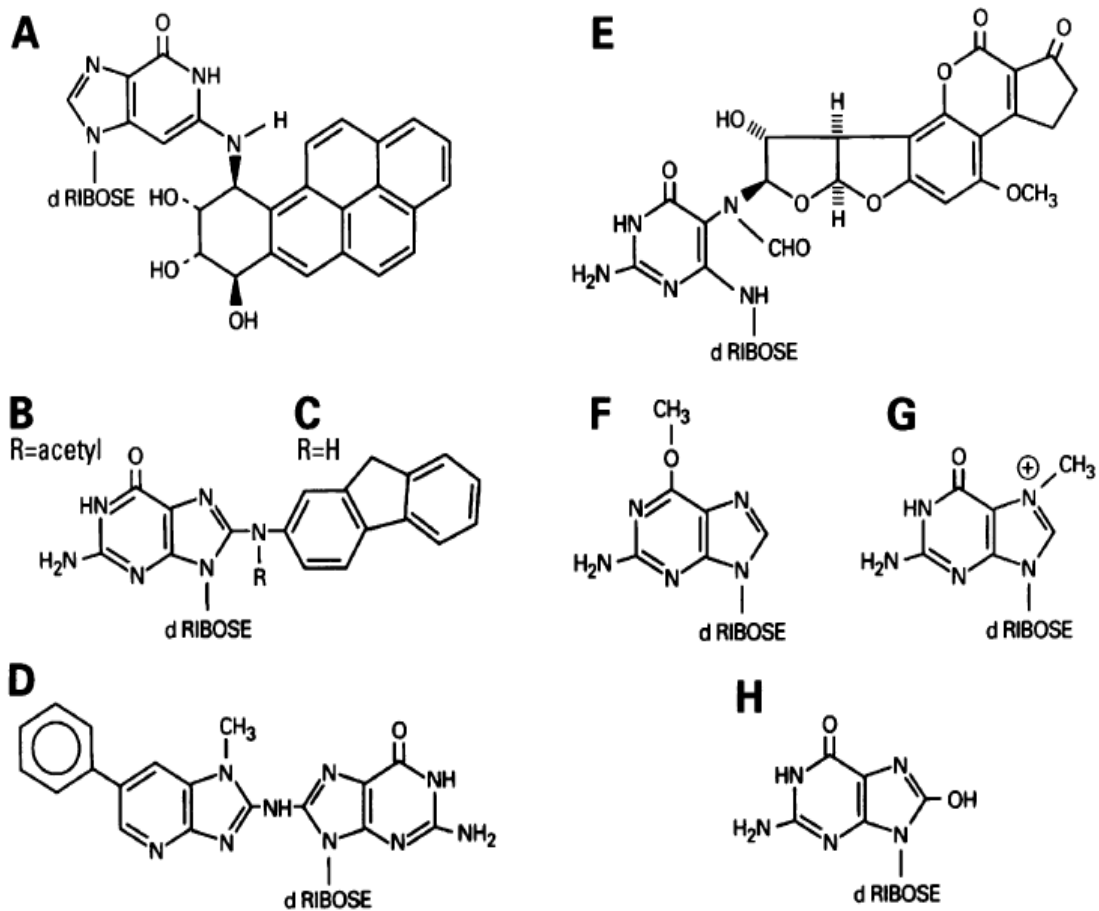


Figure 6: Structure de quelques adduits majeurs formés par les polluants dans l'ADN

(A) N^2 -[10-[r-7, t-8, t-9-trihydroxy-7,8,9,1 benzo[a]pyrène]yl]-déoxyguanosine; (B) N-déoxyguanosine-(8-yl)-2-acétylaminofluorene; (C) N-déoxyguanosine-2-aminofluorene; (D) N^2 -(2'-dG-8-yl)-2-amino-1-méthyl-6-phénylimidazo[4,5-b]pyridine; (E) aflatoxine B1-N7-déoxyguanosine; (F) O^6 -méthyldeoxyguanosine; (G) N7-méthyldeoxyguanosine; (H) 8hydroxy-2'déoxyguanosine (8-oxodG).

II.5.1.2. Méthodes de quantification des adduits d'ADN

II.5.1.2.1. Les méthodes radio-immunologiques (RIA) et l'ELISA

L'ELISA et la RIA étaient largement utilisés dès 1980 pour détecter et quantifier les adduits d'ADN avec des limites de détection de l'ordre d'un adduit pour 10^8 nucléotides non modifiés (Muller et al., 1978 ; Poirier et al., 1981, 1984). Ces techniques sont fiables, peu coûteuses, mais requièrent des quantités relativement importantes d'ADN (200 μg) et un manque de spécificité à cause de la réactivité croisée des anticorps. Des techniques immunohistochimiques sont également utilisées (Poirier et al., 1991) bien qu'elles soient moins sensibles que le test ELISA, elles présentent néanmoins l'avantage d'aider à l'identification des cellules les plus sensibles aux polluants cancérigènes dans un mélange complexe de tissus.

II.5.1.2.2. La technique de radiomarquage au ^{32}P

La technique de radio-marquage est largement utilisée actuellement pour la détection et la quantification des adduits d'ADN (Autrup et al., 1999 ; Binkova et al., 1999 ; 2007), principalement en raison de sa sensibilité plus élevée (habituellement un adduit pour 10^9 nucléotides non modifiés) et des faibles quantités d'ADN utilisées (2-10 μg). Brièvement, l'ADN est isolé du tissu d'intérêt et digéré en desoxynucléoside 3' monophosphate par deux enzymes, une endonucléase (nucléase de Staphylocoque) et une exonucléase (phosphodiesterase de rate). A ce stade, l'hydrolysant contient un mélange de nucléotides normaux et modifiés (adduits).

L'hydrolysate est ensuite traité par la nucléase P1 qui déphosphoryle sélectivement les nucléotides normaux et laisse les nucléotides adduités phosphorylés (enrichissement en adduits).

Les adduits d'ADN sont marqués sélectivement au ^{32}P provenant de la position γ ^{32}P -ATP par la T4 polynucléotide kinase qui a pour propriété de transférer un phosphate radioactif sur la position 5' du nucléotide déjà phosphorylé en 3'. Les adduits marqués dans le mélange de digestion sont séparés par chromatographie sur couche mince et la quantification est faite à l'aide de compteur de radioactivité. Il convient de noter toutefois, que les récents progrès dans le développement des compteurs de radioactivité permettent une numérisation des données qui facilite ainsi leur quantification et la protection du personnel de laboratoire.

II.5.2. Développement et modifications du test des comètes dans l'analyse des dommages dans l'ADN

Initialement développé par Ostling et Johanson (1984), le test des comètes était utilisé pour quantifier les dommages dans l'ADN au niveau cellulaire. Leur technique consistait à lyser les cellules avec des détergents riches en sels, et à soumettre l'ADN libéré à une électrophorèse dans des conditions neutres. L'ADN est ensuite coloré avec l'acridine qui fluoresce en donnant une émission verte quantifiable avec un photomètre. La quantité d'ADN dans la queue de la comète dépend de l'effet de l'agent mutagène qui est utilisé. Cette première version de la technique ne permettait d'évaluer que les cassures double-brin (CDB).

Singh et collaborateurs, (1988) ont modifié par la suite le protocole, notamment l'étape d'électrophorèse de l'ADN qui est réalisée en conditions alcalines ($\text{pH} > 13$). Les cellules étaient lysées à $\text{pH} 10$ avec $2,5 \text{ M}$ de NaCl , Triton X-100 et du Sarkosyle pendant 1 h , suivie d'un traitement alcalin ($0,3 \text{ M NaOH}$) et d'une électrophorèse à pH élevé (> 13). A ce pH , l'augmentation de la migration de l'ADN est associée à l'augmentation des niveaux de cassures simple brin (CSB). Mais puisque presque tous les agents génotoxiques induisent plus de CSB que des CDB, cette version du test proposé permettait d'augmenter la sensibilité pour l'identification des agents génotoxiques.

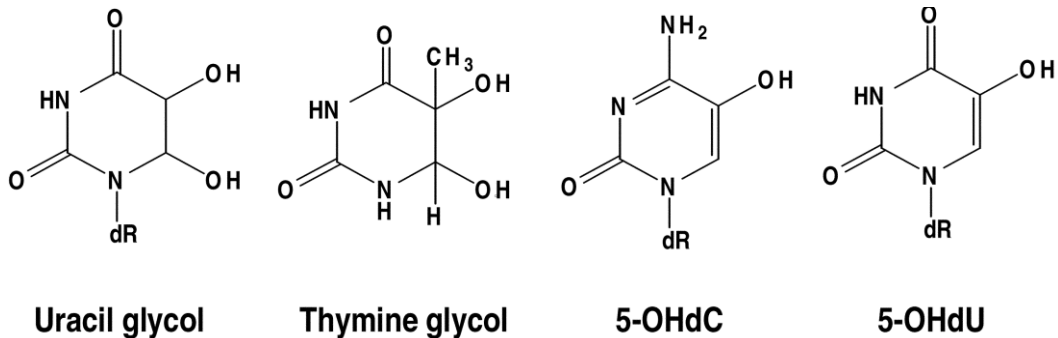
Deux ans après les modifications de Singh, Olive et collaborateurs, ont présenté une autre version alcaline de cet essai dans lequel l'électrophorèse est réalisée à un $\text{pH} 12,3$, où les cellules sont lysées dans une solution alcaline faible ($0,03 \text{ M NaOH}$) pendant 1 h avant l'électrophorèse (Olive et al., 1990). Cette variante du test a été développée pour une détection optimale des sous-populations de cellules qui montrent des différences de sensibilité aux médicaments ou aux rayonnements.

La modification la plus largement adoptée de cette technique est celle incluant une digestion enzymatique de l'ADN avec une glycosylase et/ou endonucléase spécifique permettant ainsi l'identification des grandes classes de lésions de l'ADN (Collins et al., 1993). Cette version modifiée par Collins et collaborateurs, permet de détecter les pyrimidines oxydées par digestion avec l'endonucléase III (ENDOIII) et formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) d'identifier les principaux produits d'oxydation des purines incluant la 8-oxoguanine ainsi que d'autres purines modifiées. La lésion prémutagène 7-hydro-8-oxo-2'-

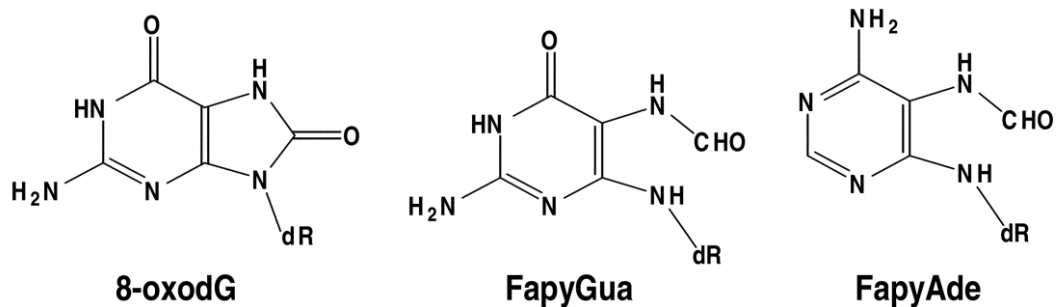
deoxyguanosine (8-OxodG) est l'une des lésions les plus importantes qui peut être examinée avec l'utilisation de la protéine FPG.

Il existe aussi d'autres enzymes qui sont utilisées moins souvent, par exemple la 3-méthyladénine ADN glycosylase II (enzyme qui peut être utilisé pour détecter l'alkylation) des dommages dans l'ADN. Les nouvelles applications du test des comètes utilisant la méthode d'hybridation fluorescente in situ permettent l'identification des crosslinks ADN-ADN et les dommages des gènes spécifiques (Anderson et al., 1997 ; Santos et al., 1997). Le test des comètes sous la forme adoptée par Collins et ses collaborateurs, permet de mesurer l'activité de réparation de l'ADN. Ces auteurs l'ont utilisé pour mesurer la capacité d'incision de sites spécifiques dans les lymphocytes humains, ce qui est une étape initiale de la réparation des bases oxydées de l'ADN (Collins et al., 2001). Le test des comètes est aussi utilisé dans de nombreux domaines, y compris la toxicologie génétique, l'écotoxicologie et les recherches sur la réparation de l'ADN.

Les bases modifiées reconnues par ENDOIII sont : 5,6-dihydroxy- 2'-déoxyuridine (uridine glycol), 5-hydroxy-2'-déoxycytidine (5-OHdC), and 5-hydroxy-2'-déoxyuridine (5-OHdU).



Les bases modifiées reconnues par FPG : 7-hydro-8-oxo-2'-déoxyguanosine (8-oxodG), 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine guanine (FapyGua), et 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine adénine (FapyAde).



II.6. Les biomarqueurs de susceptibilité

Les différentes phases de la carcinogénèse sont connues à des degrés divers. C'est la phase d'initiation cancéreuse qui est mieux connue. En effet, le métabolisme des xénobiotiques peut conduire à la formation de métabolites électrophiles potentiellement génotoxiques (induction de dommages dans l'ADN, tels que les CSB et CDB, formation d'adduits). Cependant, tous les cancérogènes ne nécessitent pas une métabolisation préalable. Certains sont directement génotoxiques (agents alkylants), alors que d'autres exercent leurs effets par des mécanismes épigénétiques (dioxines, phtalates). Au cours des dix dernières années, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle des polymorphismes des gènes impliqués dans le métabolisme des substances xénobiotiques dans la susceptibilité individuelle au développement de cancer. En effet, l'homme est exposé à une grande variété de substances exogènes dont la plupart sont lipophiles et susceptibles de s'accumuler dans les cellules. Cette accumulation est toxique pour la cellule et peut provoquer sa mort. Il est donc primordial d'éliminer ces substances de l'organisme. Cette élimination se fera grâce à la transformation biochimique des substances exogènes initiales en composés hydrosolubles, éliminés alors facilement dans les urines. Le métabolisme est classiquement découpé en deux phases : La première phase encore appelée phase I ou de fonctionnalisation correspond à l'activation des xénobiotiques. Elle conduit à la formation de métabolites intermédiaires électrophiles. Leur conjugaison avec des molécules de glutathion, de sulfate ou avec des groupements acétyles les rend suffisamment hydrosolubles pour permettre leur élimination de l'organisme. C'est la phase de conjugaison encore appelé phase de détoxification (phase II). Cette étape de conjugaison constitue un point critique du métabolisme car elle peut conduire au risque de l'initiation cancéreuse (Figure 7 ci-dessous).

Plusieurs enzymes du métabolisme des xénobiotiques participent aux processus de détoxification/activation des précancérogènes chimiques. Il est bien documenté que les

polymorphismes génétiques de certains enzymes surtout des familles des CYP450 constituent une des sources de variations dans l'activité de ces enzymes. Ce polymorphisme affecte potentiellement le devenir des pré-cancérogènes qui pénètrent dans l'organisme.

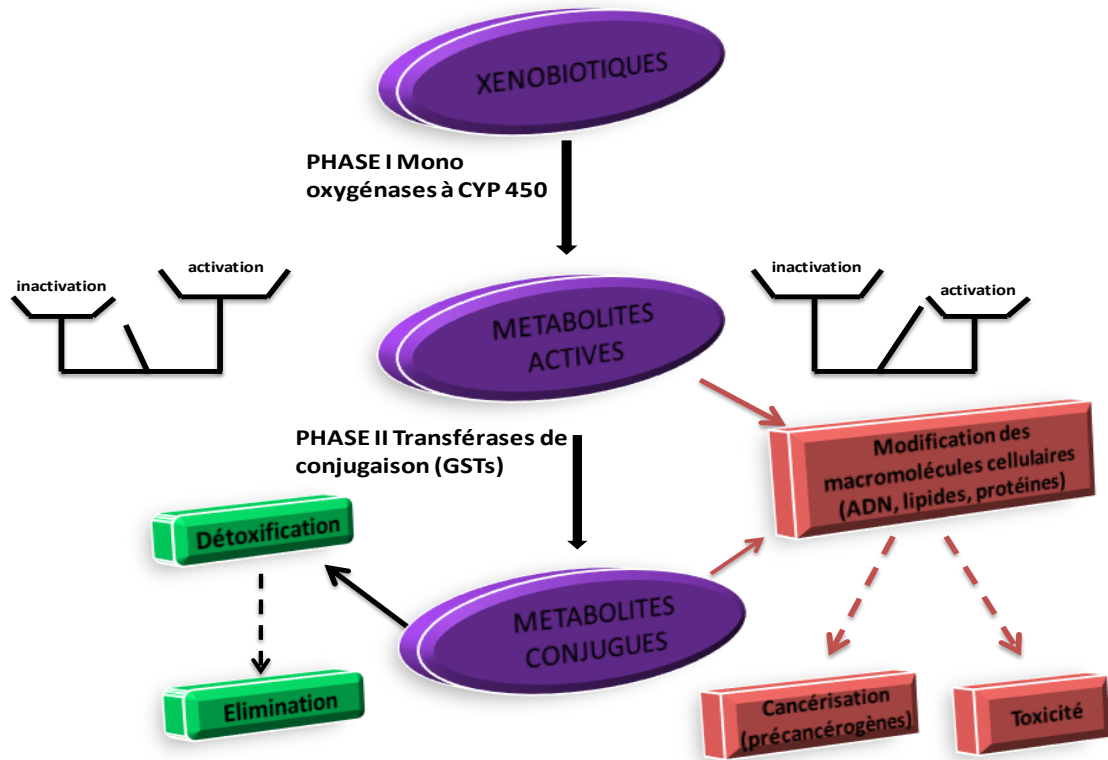


Figure 7 : Métabolisme des xénobiotiques : équilibre entre toxicité et détoxification

II.6.1. Principales enzymes de la phase I

Les réactions de phase I sont principalement catalysées par les mono-oxygénase à cytochrome P450. Ces dernières sont des enzymes microsomales surtout présentes dans le foie mais aussi dans d'autres tissus comme l'intestin. Parmi elles on peut citer les déshydrogénases de type alcool déshydrogénase (ADH) et aldéhyde déshydrogénase (ALDH), des réductases comme les NAD(P)H-quinone oxydoréductases.

II.6.2. Principales enzymes de phase II

Les réactions de phase II (tableau 2) sont pour la plupart des réactions de conjugaison. Parmi les enzymes de conjugaison, figurent les *N*-acétyltransférases (NAT), les glutathion *S*-transférases (GST) et les sulfo-transférases (SULT). Les enzymes de phase II sont généralement cytosoliques et sont exprimées dans le foie ainsi que dans de nombreux tissus périphériques.

Tableau 2 : Principales réactions de la phase d'activation et de conjugaison

<i>Réactions</i>	<i>Enzymes</i>	<i>Substrats</i>
Sulfoconjugaison	Sulfotransférase	Stéroïdes, phénols, amines, hydroxylamines
Glucuroconjugaison	UDP-glucuronosyl transférase	Hydroxylamines, arylamines
Acétylation	N-acétyltransférases	Arylamines, hydrazines
Conjugaison avec acides aminés	N-acétyltransférases	Acides carboxyliques aromatiques et aliphatiques
Mercaptoconjugaison	Glutathion S-transférases	Epoxydes des HAPs, arylamine
Méthylation	Méthyltransférases	Amines, catécholamines,
Transsulfuration	Thioltransférases	Echange disulfure

UDP = Uridine diphosphate

II.6.2.1. Le cytochrome P 450 (CYP450)

La famille des cytochromes P450 est très largement impliquée dans le métabolisme des substances exogènes. Le génome humain contient au moins 50 différents Gènes P450, répartis

en 10 familles différentes. *CYP1A1* est un gène de la phase I qui est impliqué dans le métabolisme des acides gras, les stéroïdes et HAPs.

Les CYP1A1, CYP2A2 et CYP3A3 jouent un rôle majeur dans le métabolisme des xénobiotiques et les études épidémiologiques ont montré que les variations d'activités enzymatiques sont associées à des variations importantes des niveaux des différents biomarqueurs, par exemple les adduits d'ADN et Le 1-HOP (Autrup., 2000).

II.6.2.2. Quelques polymorphismes identifiés dans la glutathion-S-transférase

Les glutathion-S-transférases sont une importante famille d'isoenzymes (Alpha, Mu, Pi et Thêta) impliqués dans la phase de détoxification de nombreux agents cancérigènes par conjugaison avec une molécule de glutathion (Mannervick, 1985; Meyer, 1991). Ils sont également impliqués dans la transformation des radicaux libres, issus des réactions entre des ions Fe^{2+} ou Fe^{3+} et l'oxygène. La conjugaison de ces métabolites avec un glutathion permet soit une excrétion directe des composés dans l'urine ou la bile, soit la poursuite d'autres réactions métaboliques avant excrétion.

II.6.2.2.1. La GSTM1

GSTM1, une enzyme de phase II est exprimée de façon importante au niveau du foie mais pas dans les poumons, où GSTM3 est exprimé. De larges variations ethniques dans les fréquences des allèles de GSTM1 ont été observées. Il a été rapporté qu'environ 50 % de la population caucasienne présente une délétion complète du gène *GSTM1*, conduisant à une enzyme totalement inactive (Garte et al., 2001). GSTM1 est connu pour détoxifier les époxydes de composés aromatiques (pas ceux d'amines aromatiques), par exemple l'époxyde du B(a)P, B(a)P 7,8-diol-époxyde, métabolite terminal très mutagène (figure 8).

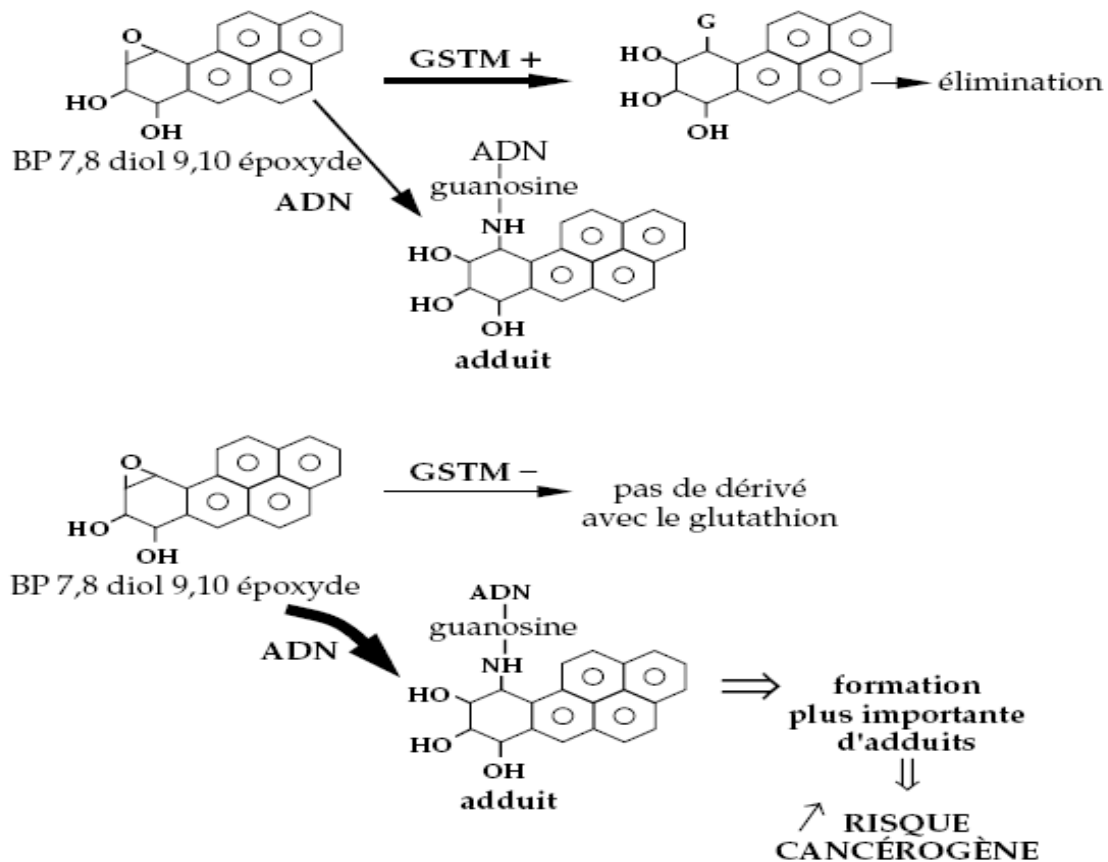


Figure 8: Illustration du rôle des polymorphismes dans la limitation de la formation des adduits par la GSTM1

Des études épidémiologiques suggèrent que les individus, porteurs d'une délétion de GSTM1 ont une capacité de conjugaison moindre et un risque accru de certains types de cancers : poumon, vessie et colon. Ces individus porteurs de délétion doivent donc théoriquement avoir un niveau élevé d'adduits d'ADN. Cependant, des études en milieu professionnel où l'exposition au B(a)P est forte (5-43 ng/m³), n'ont rapporté aucune influence de GSTM1 bien qu'un niveau élevé d'adduits ait été observé (Hemminki et al., 1997 ; Motykiewicz et al., 1998).

De nombreuses études sur la relation entre le polymorphisme de *GSTM1* et le risque de cancer du poumon ont été publiées. Une méta-analyse sur 130 études (Ye et al., 2006) met en évidence un risque de cancer du poumon de 1,18 (IC 95 % [1,14-1,23]), résultats qui sont confirmés par une autre méta-analyse de Benhamou et al. (2002) qui a rapporté, à partir de 43 études, un risque de cancer du poumon de 1,17 (IC 95 % [1,07-1,27]).

II.6.2.2.2. La GSTT1

Les conséquences biologiques de ce polymorphisme sont assez difficiles à prévoir car l'enzyme est impliquée à la fois dans les réactions d'activation et de détoxification. GSTT1 est impliqué dans le métabolisme de molécules de petites tailles telles que l'oxyde d'éthylène, les méthanes mono halogénés et le dichlorométhane. Par exemple GSTT1 peut détoxifier les oxydes d'éthylène mais rend plus toxique le chlorure de méthylène (Thier et al., 1996). Il a été induit *in vitro* une augmentation du niveau d'échange de chromatides sœurs (ECS) par le 1,3-époxy-3-butène dans les lymphocytes en culture provenant d'individus porteurs de l'allèle muté de GSTT1 (Bernardini et al., 1998). De plus, il a été démontré que chez les travailleurs exposés au benzène, le polymorphisme de la GSTT1 représentait un excellent marqueur prédictif des ECS (Xu et al., 1998). Par ailleurs, il a été rapporté chez des travailleurs porteurs d'une délétion de GSTT1 que l'exposition au 1,3-butadiène s'accompagne d'une augmentation significative des aberrations chromosomiques (Sorsa et al., 1996).

L'influence de la GSTT1 dans le développement des cancers a fait l'objet de deux méta-analyses récemment publiées. La première incluant 37 études a rapporté qu'une délétion de GSTT1 est associée à une augmentation de l'incidence du cancer de vessie (Zeng et al., 2009). La deuxième incluant 36 études a montré que le risque de cancer gastrique est significativement augmenté chez les sujets porteurs de délétion pour GSTT1 et GSTM1. Cette même étude a montré que le polymorphisme de la GSTT1 est associé à une augmentation du cancer gastrique chez les Européens, Américains et Asiatiques (Chen et al., 2009).

II.6.2.3. La NQO1

NQO1 est une autre enzyme importante de phase II. Elle catalyse une détoxification des quinones et est considérée à ce titre comme un puissant antioxydant empêchant la formation des ROR susceptibles d'attaquer les macromolécules cellulaires. Le polymorphisme génétique détecté dans la NQO1 provoque la substitution d'une proline en sérine au niveau du codon 187, qui inactive l'enzyme. Par rapport aux homozygotes sauvages (Pro/Pro), l'activité NQO1 est diminuée de 33% chez les hétérozygotes Pro/Ser et complètement absente chez les homozygotes mutés Ser / Ser (Moran et al., 1999 ; Kuehl et al., 1995). L'allèle muté NQO1 (ser/ser) est associée à un risque accru de leucémie et divers cancers notamment du poumon, des ovaires, prostate, vessie et le cancer colorectal (Begleiter et al., 2006 ; Cunningham et al.,

2007 ; Wang et al., 2008). En revanche d'autres études ont rapporté que le polymorphisme Pro187Ser de NQO1 joue un rôle protecteur dans le cancer du poumon, une incohérence qui pourrait être liée à des différences dans les niveaux d'exposition ou aux variations génétiques entre les populations étudiées (Wiencke et al., 1997). En effet, des variations ethniques sont rapportées pour la fréquence de polymorphisme Pro187Ser, qui est par exemple de 38 % chez les Japonais, 20% chez les Caucasiens et 22% chez les Hawaïens (Chen et al., 1999). En milieu professionnel, il a été rapporté qu'une exposition au benzène est associée à une augmentation de risque de développement des signes d'empoisonnement chez les individus homozygotes Ser/Ser (Rothman et., 1997).

II.7. Facteurs nutritionnels modulant le niveau des dommages dans l'ADN

A ce jour, la plupart des études investiguant sur l'influence des facteurs nutritionnels sur le niveau des dommages dans l'ADN a mis un accent particulier sur les antioxydants. Les études épidémiologiques ont clairement montré que la consommation de fruits et légumes peut protéger contre le développement du cancer. Il est aussi admis que beaucoup d'autres produits présents dans les aliments végétaux (les caroténoïdes, les flavonoïdes, les composés phénoliques non-flavonoïdes et des vitamines E et C) ont des propriétés antioxydantes, Il est important de signaler que les dommages dans l'ADN jouent un rôle important dans la cancérogenèse (Halliwell et al., 1992). Ainsi tout composé alimentaire qui peut protéger contre ces dommages de l'ADN a indirectement un effet protecteur contre le cancer.

III. MATERIEL ET METHODES

III.1. Cadre d'étude

Les différentes analyses se sont déroulées à l'Université d'Abomey-Calavi (UAC) dans le Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire (LBBM) sis à l'Institut des Sciences Biomédicales Appliquées (ISBA), en collaboration avec l'Université de Copenhague (Danemark) et dans les universités françaises (de Strasbourg, de Pierre Marie Curie de Paris VI et du Littoral Côte d'Opale).

Les prélèvements de l'air ont été effectués aux carrefours Saint Michel, Marina, Dédokpo à Cotonou et au village Sohon pour évaluer les polluants (Figure 9).

Les prélèvements d'urine et de sang proviennent des résidents qui habitent près de ces carrefours à Cotonou pour l'étude des biomarqueurs et des effets biologiques. La banlieue de Cotonou, Godomey et le village de Sohon ont servi également de site de prélèvement à faible exposition.

Pour l'étude des adduits, les prélèvements de sang et d'urine ont été effectués au marché Dantokpa et au carrefour Sèmè Podji chez les vendeurs d'essence frelatée, de même que chez les femmes fumeuses de poissons ou vendeuses de nourritures du marché Gbégamey.

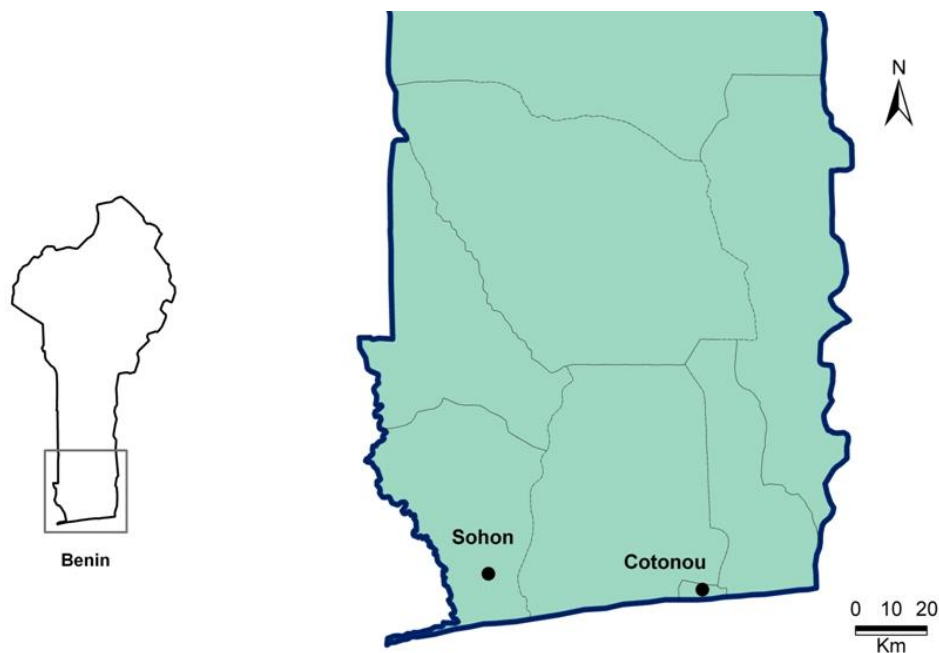


Figure 9 : Zones d'étude des prélèvements

III.2. Recrutement des populations cibles

III.2.1. Conditions de recrutement

La population d'étude est composée de volontaires, tous des hommes, bien portant ayant eu au moins cinq ans d'exposition aux polluants présents dans leur environnement de travail. Afin d'obtenir un large gradient dans l'exposition à l'air pollué, six différentes populations ont été sélectionnées. Il s'agit :

- des conducteurs de taxi-moto (Zémidjans) de Cotonou (n=42),
- des habitants près des grands carrefours de Cotonou (Marina, Saint Michel) où la circulation est très intense (n= 37),
- des résidants dans la banlieue de Godomey (n= 42),
- des individus vivant à Sohon comme population témoin (n= 28),
- les vendeurs d'essence du marché Dantokpa et de Sèmè (n= 17),
- les femmes fumeuses de poissons du marché de Gbégamey (n= 16).

L'étude s'inscrit dans la continuité des travaux antérieurs que nous avons menés avec l'Unité de Recherche et d'Enseignement en Santé au Travail (UREST) du professeur Benjamin Fayomi. Tous les participants sont examinés par un médecin de l'UREST avant tout prélèvement de matériels biologiques.

L'étude a été approuvée par l'Agence Béninoise pour l'Environnement (ABE).

III.2.2. Critères d'exclusion

Les femmes sont exclues de l'étude, mais celles qui vendent aux abords des rues et fumeuses de poissons sont incluses dans l'étude des adduits d'ADN afin d'examiner le gradient d'exposition aux HAPs.

Les fumeurs sont aussi exclus pour éliminer les contributions dues à la fumée de la cigarette sur le niveau des différents biomarqueurs étudiés.

III.3. Matériel

III.3.1. Matériel biologique

III.3.1.1. Le sang

Nous avons prélevé chez chaque sujet 20 ml de sang hépariné qui a servi à l'isolement des lymphocytes utilisés dans l'analyse des comètes, de l'ADN pour l'étude des polymorphismes génétiques et quantification d'adduits. Les lymphocytes sont congelés à -80°C jusqu'à l'analyse.

III.3.1.2. L'urine

Chaque participant à l'étude a fourni environ 50 ml d'urine qui sont congelés à -20°C pour l'analyse du benzène urinaire et le métabolite du benzène (APM) et la 1-HOP, métabolite du B(a)P.

III.3.1.3. Les enzymes

La phosphodiesterase bovine de rate (SPD) (P 9041), la nucléase de staphylocoque (MN) (N 3755), la protéinase K (P 6556), et la Ribonucléase pancréatique de boeuf (RNase A) (R 4875) sont fournies par Sigma. La nucléase P1 (236 225) (*Penicillium citrinum*) et laT4 polynucléotide kinase (R838 292) proviennent de Roche Diagnostic (Meylan, France).

La formamidopyrimidine glycosylase (FPG) nous a été donnée généreusement par l'équipe du Dr. Andrew Collins, University of Oslo.

III.3.2. Matériel chimique

Les produits chimiques utilisés sont dits "pour analyse". Le Phosphate de Sodium dihydraté ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), le tampon phosphate (10 fois) pH 7.4, le milieu de séparation des lymphocytes (LMS media) ou lymphoprep, l'alcool isoamilique, l'albumine bovine, RPMI 1640, tris hydroxyle méthyle amino méthane (Tris), le phénol stabilisé en tris-HCl, l'Urée, l'Hydroxyde de Lithium (LiOH), la soude (NaOH), l'acide chlorhydrique (H-CL), l'acétate de potassium ($\text{C}_2\text{H}_3\text{OOK}$), le sodium dodécyl sulfate (SDS), Le bromure d'éthidium (BET) et l'éthanol proviennent également de chez Sigma. La bicine, le chlorure de magnésium (MgCl_2), l'éthylène diamine tétra acétique (EDTA), le chlorure de sodium (NaCl), le triton X-100, le kit Nucléon Bacc₃ d'extraction d'ADN, le ^{32}P -ATP (6000 Ci/mmmole, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)

proviennent d'Amersham Biosciences (France). Hydroquinone (HQ) ($C_6H_6O_2$) minimum 99%, SIGMA ; Benzoquinone (pBQ) GR 97 % ($C_{12}H_{10}O_4$), ALDRICH ; Bovin Serum Albumin (BSA), Roche ; Anti-Hu IgG horseradish peroxydase conjugate ; O-Phénylènediamine Tablets (P-5412), SIGMA ; Eau oxygénée 30 % H_2O_2 , GILBERT ; Chlorure de sodium (NaCl), MERCK ; Acide chlorhydrique 37 % (HCl), MERCK ; Acide citrique monohydraté ($C_6H_7O_8$, H_2O), MERCK ; Phosphate de sodium disodique (Na_2HPO_4), MERCK ; Phosphate Buffered Saline Tablets (PBS), pH 7,4 SIGMA ; Tween-20, MERCK ;

- Essence France : SP 98
- Essences Benin : Echantillons 1 à 10 (5 échantillons d'essences prélevées dans les stations et 5 échantillons d'essence vendues aux abords des voies).

III.3.3. Matériel de chromatographie et d'électrophorèse

L'agarose normale (Invitrogen) et le « low melting point » agarose (Sigma) sont utilisés pour examiner les fragmentations de l'ADN.

Les plaques de polyéthylène-imine-cellulose (PEI-cellulose) sont fournies par Macherey-Nagel (Allemagne). Avant utilisation elles sont lavées au méthanol (1 minute) rincées dans deux bains d'eau distillée et séchées à température ambiante sous hotte pendant environ une nuit et sont stockées à $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à utilisation.

Le papier Whatman no1 provient de Whatman international Ltd (Maidstone, England). Pour les autoradiographies, on utilise des films de radiographie Kodak de $20\text{cm} \times 40\text{ cm}$ et de $30\text{ cm} \times 40\text{ cm}$, le révélateur Kodak LX24 et le fixateur Kodak AL4 à 20 % (Coradio, France). Les microtubes (1,5 et 2 ml) provenant d'Eppendorf (Hambourg, Allemagne), sont lavés au méthanol puis rincés deux fois à l'eau distillée et séchés avant utilisation.

III.4. Méthodes utilisées

III.4.1. Méthode d'analyse de l'essence

Le benzène étant en forte concentration dans l'air de Cotonou, l'analyse de l'essence s'est focalisée sur sa teneur en benzène, aromatiques et Ethyl Tertio Butyl Ether (ETBE). ETBE est un carburant synthétique qui oxygène l'essence et augmente son indice d'octane. Dix échantillons des essences de Cotonou et une essence française (Sans Plomb 98) ont été analysées par injection directe en GC/MS avec un split de 20. Le benzène et l'ETBE ont été

identifiés grâce à leurs ions caractéristiques, l'ion 78 pour le benzène et les ions 57 et 89 pour l'ETBE. La composition des essences a été déterminée en utilisant le mode TIC (Total Ion Current). Ces analyses ont été réalisées au Centre Commun de Mesures de l'Université du Littoral Côte d'Opale (ULCO) en France.

III.4.2. Mesure des polluants de l'air

III.4.2.1. Mesure et analyse du benzène et ses dérivés dans l'air ambiant

III.4.2.1.1. Prélèvement des COVs

Les prélèvements individuels du benzène, et dérivés dans l'air sont réalisés à l'aide de préleveurs à diffusion passive de Radiello constitués d'une colonne de charbon actif enfermée dans une enceinte de polystène poreux (Fondazione Salvatore Maugeri, Paduva, 203 Italy). Les tubes Radiello sont fixés à la poitrine des sujets participant à l'étude avec un débit de 80 Cm^3/min à 25°C et à 1 atm pendant huit heures d'exposition. Après désorption des tubes Radiello au laboratoire, le benzène, toluène et xylène sont analysés par chromatographie en phase gazeuse/masse spectrométrie (GC/MS) ou GC/FID conformément à la procédure décrite par Sorensen et al., (2003).

III.4.2.1.2. Principe de la GC/MS

La GC/MS est l'une des techniques utilisées pour identifier les COVs dans un mélange complexe. L'échantillon préparé sous forme liquide, généralement dans du dichlorométhane, est injecté dans un système constitué d'une colonne qui permet la séparation des différents composants du mélange. Ces composés introduits dans le spectromètre de masse sont ionisés par bombardement électronique. Les ruptures de liaisons au sein de ces composés conduisent à la formation des ions fragments qui sont séparés en fonction de leur rapport de masse/charge.

III.4.2.2. Mesure des HAPs et des particules de l'air

Les HAPs associés aux particules sont collectés avec des pompes munies de filtres à membrane (37 mm). Ces pompes, alimentées par des batteries (battery SKC model 224), sont placées sur des poteaux électriques à 2 m du niveau du sol à différents carrefours de Cotonou et dans un village à 80 km de Cotonou. Pour le prélèvement à domicile, la pompe est placée sur une table à 1 m du sol au salon. Les pompes ont un débit de 1.7 l/min et fonctionnent pendant 12 h. Après le prélèvement, les filtres sont retirés et emballés dans un papier aluminium. L'ensemble est enfermé dans un sac plastique et conservé à -20°C jusqu'à

l'analyse. L'extraction et l'analyse des HAPs sont réalisées selon le protocole US EPA (1984), comme décrit par Ruchirawat et al., (2002). Les résultats sont exprimés ng/m³. Le rapport entre les HAPs les plus légers (benzo(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène et benzo(k)fluoranthène) et les HAPs les plus lourds (benzo(a)pyrene, dibenzo(a,h)anthracène, benzo(g,h,i)perylène et indeno(1,2,3-cd)pyrène) fournit des renseignements sur l'origine des HAPs. Fluoranthène et pyrène sont considérés comme des PAHs semi-volatils de l'air pollué.

Quant aux particules ultrafines (PUFs), elles sont mesurées dans six localités dont quatre sont à forte exposition (4 différents sites à fort trafic dans la ville de Cotonou) et deux à faible exposition (banlieue de Cotonou et au village Sohon) à l'aide de compteur de particules portable (TSI 3007; St Paul, MN). Cet appareil mesure de façon continue le nombre de particules de diamètre aérodynamique compris entre 10-1000 nm exprimé en nombre de particules/cm³.

III.5. Etude de l'impact biologique de la pollution sur la population cible

III.5.1. Détermination du niveau des métabolites du benzène

III.5.1.1. Détermination du niveau de benzène urinaire

Le benzène urinaire est mesuré selon la méthode modifiée de Fustinoni et al., (1999). Le volume de l'urine est réduit de 2 ml à 0.5 ml, les échantillons sont incubés à 45°C pendant 15 mn puis portés à l'équilibre entre les phases gazeuse et liquide comme l'a décrit précédemment Waidyanatha et al., (2001). Ils sont immédiatement analysés par CG/MS.

III.5.1.2. Détermination du niveau d'excrétion de l'acide S-APM urinaire

III.5.1.2.1. Préparation des standards et échantillons d'urine

Les échantillons d'urine préalablement conservés à -20°C sont ramenés à la température ambiante juste avant l'analyse. 4 ml de chaque échantillon sont prélevés et le pH ajusté à 2 avec l'acide chlorhydrique concentré. L'urine contrôle (provenant d'un individu n'ayant pas une exposition au benzène ambiant) utilisé pour préparer les standards, reçoit l'APM et l'acide benzylmercapturique (ABM) comme standards interne alors que seul l'ABM est ajouté aux échantillons d'urine à analyser. La méthodologie utilisée pour préparer les échantillons est présentée sur la figure 10 ci-après.

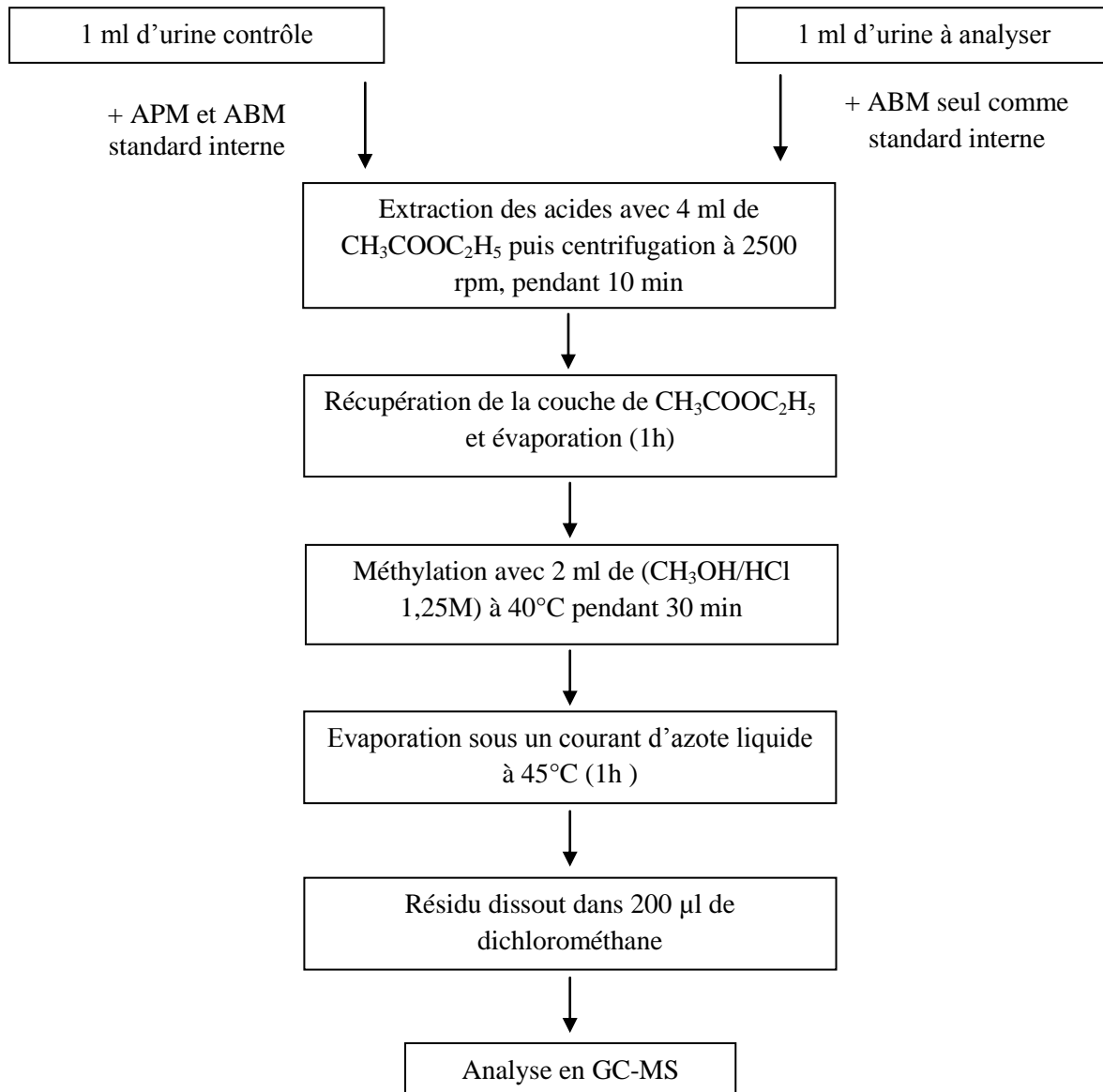


Figure 10 : Diagramme de préparation des échantillons d'urine pour la détermination de l'APM

III.5.1.2.2. Analyse et quantification de S-APM par GC/MS

Les échantillons sont analysés avec un chromatographe en phase gazeuse, série HP 6890, couplé à un spectromètre de masse, série HP 5973 équipé d'une colonne capillaire (30 x 0,25 m) remplie avec du DB-1 (Durabond film thickness 0,25 µm). Cette colonne est parcourue par de l'hélium circulant à un débit de 1 ml /min. 1µl de chaque échantillon rendu volatil est injecté dans le GC. Pour le calibrage, les solutions standards de l'APM (0 à 100 ng/ml) précédemment préparées sont analysées ensemble avec les échantillons d'urine. Le port d'injection et l'interface du GC-MS sont respectivement maintenus à 250°C et 290°C. La température à l'intérieur du chromatographe est de 160°C à l'injection. L'élution des derniers composés s'effectue par une élévation de la température jusqu'à 280°C. La température de la source d'ions varie entre 230°C et 250°C. L'énergie des électrons est de 1741eV. La quantification de l'APM se réalise grâce à une intégration des pics correspondant aux ions à m/z 194 (fragment de l'APM) et à m/z 208 (fragment de l'ABM). Les temps de rétention de ces deux ions sont respectivement 7,10 et 8,35 min. Ces temps de rétention permettent de repérer sur le chromatogramme les deux pics à intégrer.

Le ratio entre les concentrations de l'APM (standard interne) et l'ABM permet de rendre la mesure quantitative.

III.5.1.2.3. Détermination de la créatinine urinaire

La créatinine urinaire a été déterminée selon la méthode colorimétrique de la réaction de Jaffé. Cette réaction est basée sur le principe qu'à un pH alcalin, la créatinine réagit avec le picrate pour former un adduit rouge-orangé dont l'intensité est directement proportionnelle à la concentration en créatinine.

Brièvement, les échantillons d'urine sont dilués au 1/10 à l'eau distillée. Ensuite 10 µl de chaque échantillon sont déposés dans une plaque ELISA avec les solutions de créatinine standard ainsi que des échantillons d'urine provenant des sujets témoins. Chaque échantillon d'urine reçoit 90 µl d'acide trichloroacétique 10 % puis 150 µl de picrate (1% acide picrique/ 5M NaOH). La lecture est réalisée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 500 nm.

III.5.1.3. Détermination des titres des anticorps anti-métabolites du benzène HQ + BQ

III.5.1.3.1. Fixation de l'antigène ou coating

100 µl de BSA à 2 % dissout dans du PBS sont déposés dans tous les puits des plaques ELISA. Après 2h d'incubation à 37°C, les plaques sont lavées 4 fois avec du PBS-Tween 0,05 %. 100 µl du mélange des métabolites à 5.10^{-5} mg/ml dans NaCl 0,9 % sont ajoutés dans tous les puits des plaques et après 2 h d'incubation à 37°C elles sont soumises à un choc thermique à 4°C toute la nuit pour permettre la formation des liaisons covalentes entre les métabolites et la plaque d'ELISA. La BSA permet de saturer les sites non spécifiques capables de réagir avec les anticorps métabolites du benzène.

III.5.1.3.2. Fixation d'anticorps spécifiques sur l'antigène et de l'anticorps marqué

Le lendemain, les plaques sont retirées, lavées 4 fois avec le tampon de lavage et recouvertes avec 100 µl de plasma d'étude dilué au 1/1000. Après 2 h d'incubation à 37°C, les plaques sont lavées 4 fois avec le tampon de lavage et l'anti-IgG humaine marquée à la peroxydase diluée au 1/5000, est fixé sur les complexes antigène-anticorps IgG humaine. Après 1 h 30 mn d'incubation à 37°C, les plaques sont à nouveau lavées avec le tampon de lavage.

III.5.1.3.3. Révélation

100 µl de solution du substrat ortho-phénylènediamine (OPD) dissous dans du tampon (phosphate citrate pH 5) sont distribués dans tous les puits et après 30 mn d'incubation à l'obscurité et à température ambiante, la réaction est arrêtée avec 50 µl d'HCl 4M, et la lecture est réalisée à 492 nm. La densité optique (D.O.) lue, représente le titre d'anticorps anti HQ et pBQ. L'intensité de la coloration produite est proportionnelle à la teneur en anticorps spécifiques dans l'échantillon de plasma. Chaque échantillon de plasma est analysé en triplicate et la D.O. moyenne calculée représente les titres d'anticorps anti HQ et pBQ de l'échantillon correspondant.

III.5.2. Analyse du niveau du 1-hydroxypyrene (1-HOP), métabolite des HAPs

L'analyse du 1-HOP a été réalisé conformément à la procédure décrite par Ovrebo et al., (1995). Après un traitement avec sulphatase et glucuronidase pendant 16 h à 37,8° C, les échantillons sont purifiés sur une phase solide (Millipore, Milford, MA) puis lavés à l'eau et le 1-hydroxypyrene est élué avec du méthanol. Environ 20 µl de l'éluat ont été analysés par

HPLC avec un détecteur à fluorescence (Perkin-Elmer Ltd, Beaconsfield, Royaume-Uni) à 242 nm (excitation) et 288 nm (émission). Cinq échantillons d'urine contenant du 1-HOP à des concentrations de 10, 20, 40, 100 et 250 nmol / L ont servi de standards.

III.5.3. Analyse des niveaux de modifications de l'ADN

III.5.3.1. Etude de la fragmentation de l'ADN

III.5.3.1.1. Extraction de l'ADN à partir des lymphocytes circulants

L'extraction de l'ADN est réalisée à partir des lymphocytes circulants. 10 ml de sang hépariné sont dilués au ½ avec du PBS 1x. Ensuite 10 ml de lymphoprep sont ajoutés lentement au fond du tube contenant le sang dilué et une centrifugation à 2500 rpm est conduite à 4°C pendant 20 min (Eppendorf Centrifuge 5415R ; Centrifuge 5810R). La couche de lymphocytes recueillie après la centrifugation est lavée deux fois avec du PBS 1x. Le culot de lymphocytes obtenu sert à l'extraction de l'ADN à l'aide du kit d'extraction Nucleon Bacc3 fourni par Amersham.

III.5.3.1.2. Electrophorèse de l'ADN

L'étude de la fragmentation de l'ADN extrait des lymphocytes est réalisée par électrophorèse en gel d'agarose 1% en pH alcalin (Tris-Borate-EDTA : TBE 1× PH= 8) suivant la procédure décrite par Traoré et al., (2001). Le gel contenant 1% bromure d'éthidium est soumis à une électrophorèse à 80 V pendant une heure à température ambiante. Le degré de fragmentation est estimé selon l'intensité croissante de la fragmentation par +0, +1, +2, +3.

III.5.3.2. Analyse des cassures de brins et modification de bases par le test des comètes

III.5.3.2.1. Isolement des lymphocytes pour le test des comètes

Les lymphocytes sont isolés à partir de 500 µl de sang comme précédemment décrit dans l'étude de la fragmentation. Le culot de lymphocytes obtenu est dissous dans du RPMI 1640 (Roosevelt-Parc Medium Institute) supplémenté avec 50 % de BSA et 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO). Les échantillons de lymphocytes ainsi préparés sont conservés à -80°C jusqu'à l'analyse.

III.5.3.2.2. Détermination du niveau de coupures de brins et de bases modifiées

Nous avons utilisé dans cette étude la version modifiée du test développé par Collins et al., (1993). Cette version permet l'identification non seulement des coupures de brins, mais aussi des purines modifiées grâce à l'utilisation de la formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) qui est une enzyme extraite d'*Escherichia coli* qui hydrolyse les liaisons N-glycosidiques des purines (adénine et guanine).

75 µl de lymphocytes sont mélangés avec 600 µl d'agarose low melting point à 0,75 % préparé dans du PBS et conservé à 37°C. 120 µl du mélange (agarose + cellules) sont déposés sur la face rugueuse d'une lame spéciale pour l'analyse des comètes. Les lames sont ensuite laissées à 4°C pendant 5 min pour permettre la solidification du gel.

Pour chaque échantillon de lymphocytes, deux gels sont préparés : l'un pour quantifier les taux de coupures de brins dans l'ADN et l'autre pour évaluer les purines modifiées dans le DNA.

Les lames sont placées dans une solution de lyse (NaCl 2,5 M, EDTA 0,1M et Tris base 10mM, pH = 10 + Triton X-100 1% ajouté extemporanément et agitée 10 min avant utilisation) pendant une heure à 4°C.

Les lames sont ensuite lavées trois fois avec le tampon (KCl 0,1M, HEPES 40 mM, EDTA 0,5 mM et BSA à 0,2g/l, pH=8) approprié à la formamidopyrimidine glycosylase (FPG). Ensuite 50 µl de la solution enzymatique sont déposés sur les gels qui doivent subir le traitement enzymatique puis recouverts d'une lamelle couvre-objet. Les autres lames reçoivent 50 µl du tampon de l'enzyme seul. Les lames ainsi traitées sont placées dans une boîte humide (pour éviter une dessiccation du gel) et incubées dans une étuve à 37°C pendant 45 min.

Immédiatement à la fin du traitement enzymatique, les lamelles sont retirées du gel et les lames sont placées dans une solution alcaline (300 mM NaOH et 1 mM EDTA pH > 13) pendant 40 min pour subir une dénaturation alcaline.

Après ce traitement alcalin et révélation des sites alcali-labiles, une électrophorèse est réalisée à 25V, 300 mA pendant 20 min à 4°C dans la même solution alcaline pour produire des comètes.

Après l'électrophorèse, les fragments d'ADN au sein du gel sont rincés deux fois avec le tampon de neutralisation (Tris-HCl 400 mM, pH 7,5). Ce lavage permet d'éliminer l'excès de solution alcaline qui pourrait éventuellement gêner la coloration des lames. Après neutralisation, les lames sont soit colorées et les comètes visualisées, soit séchées à température ambiante après deux heures d'immersion dans l'éthanol à 90 %. Cette dernière option permet de conserver les lames sur une longue période.

Une coloration de ces lames est réalisée à l'aide de YOYO-1 (Benzoxazolium-4-quinolinum oxazole yellow homodimer) qui a une meilleure sensibilité que le bromure d'éthidium et la DAPI (4',6-diamidine-2-phenylindol dichloride).

Les comètes sont visualisées avec un microscope fluorescent couplé à une caméra Olympus qui est reliée à un ordinateur doté d'un logiciel de traitement d'image (Komet 4.0 kinetic Imaging Ltd).

Une analyse visuelle des cellules est aussi possible en regroupant, les différents niveaux de dommages dans 5 classes (0 à 4) (figure 11 ci-dessous). Cette méthode nous a permis de redéfinir l'étendue d'ADN endommagé lorsque le logiciel de traitement d'images définit mal la queue de la comète. Sur chaque gel 50 cellules sélectionnées au hasard sont visualisées.

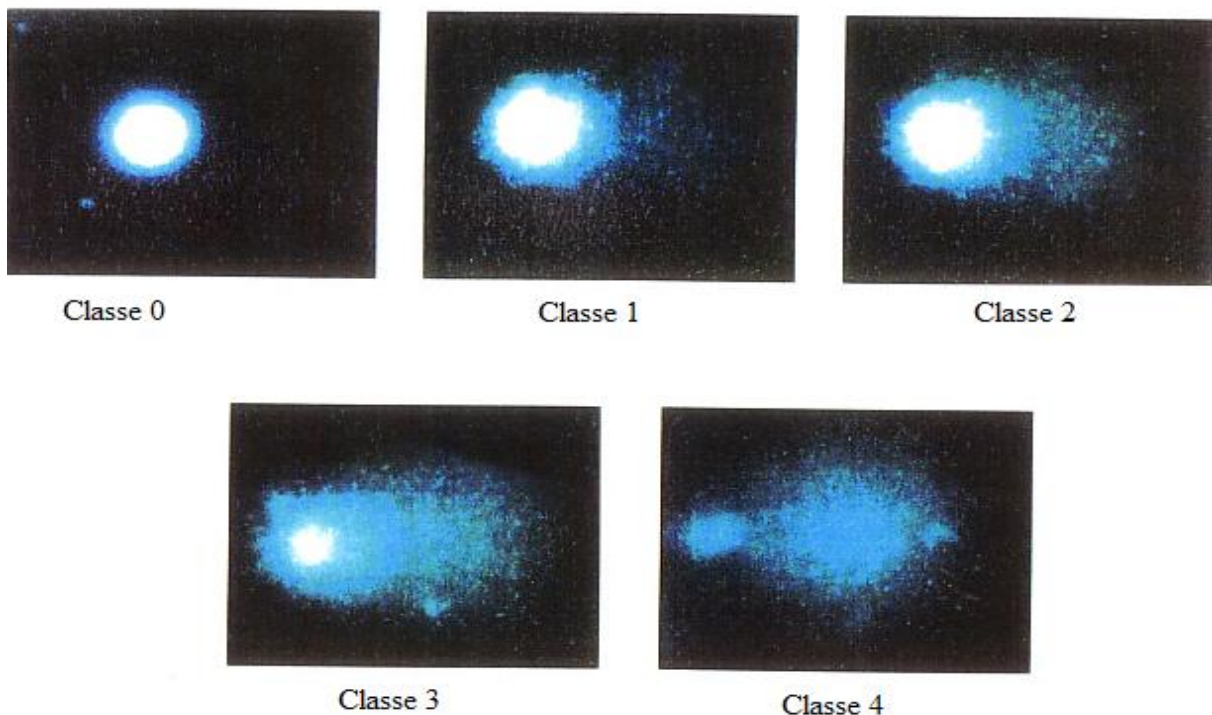


Figure 11 : Les différentes classes de comètes.

Légende : Classe 0 : ADN non endommagé bien circulaire en couleur blanche

Classe 1 : ADN faiblement endommagé, le rond commence à s'étirer

Classe 2 : ADN un peu plus endommagé, la comète est munie d'une queue

Classe 3 : Les $\frac{3}{4}$ d'ADN sont endommagés et ont migré dans la queue de la comète

Classe 4 : La totalité de l'ADN est endommagé et a migré dans la queue de la comète.

Les comètes sont quantifiées en évaluant le pourcentage de DNA migré dans la queue de la comète. Les taux de coupures de brins sont évalués en calculant le pourcentage moyen d'ADN à l'échelle des 50 cellules sélectionnées sur les gels incubés avec le tampon de l'enzyme seul.

$$\% \text{ moyen CB} = \frac{\Sigma \% \text{ DNA au niveau de 50 cellules}}{50}$$

L'estimation du taux de purines modifiées s'obtient par une soustraction entre le pourcentage moyen d'ADN endommagé sur les lames incubées avec la FPG et le pourcentage moyen de cassure de brin.

$$\% \text{ purines modifiées} = \% \text{ DNA avec FPG} - \% \text{ DNA avec tampon}$$

III.5.3.3. Détermination des adduits par la méthode de post marquage au ^{32}P

La détermination des adduits a été réalisée à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg (France). La méthode de radiomarquage au ^{32}P combinée avec l'enrichissement à la nucléase P1, comme décrite précédemment par Binkova et al., 1998 a été utilisée avec des modifications mineures pour quantifier le niveau des adduits d'ADN. Brièvement, 7 μg d'ADN sont digérés pendant 4h à 37°C avec 290 mU nucléase micrococcale

(Sigma, St Louis, MO) et 1,2 mU de phosphodiesterase de rate (ICN Biomédicales Inc Irvine, CA), suivi d'un enrichissement des adduits à la nucléase P1. Cette étape est suivie par celle de radiomarquage avec 50 μCi de $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP et 6 U de T4 polynucléotide kinase. L'ADN radiomarqué est soumis à une chromatographie sur membrane de cellulose polyéthylèneimine avec les tampons suivants (D1 : 1M tampon phosphate, pH 6,0; en D2 : 3,5 M formiate de lithium, 8,5 M urée, pH 3,5; en D3 ; 0,8 M de chlorure de lithium, de 0,5 M Tris, 8,5 M urée, pH 8,0, et en D4 ; 1,7 M de sodium tampon phosphate, pH 6,0).

Les adduits marqués sont détectés par autoradiographie dans les 24 ou 48 h qui suivent l'exposition des films, et quantifiés avec Bio-ImagerBas2000 phosphoranalyser (Fuji, Tokyo, Japon). Les niveaux d'adduits sont exprimés sous forme de moyenne d'adduits d'ADN par 10^8 nucléotides non modifiés calculée à partir de deux essais indépendants.

III.5.3.4. Analyse du niveau de la 8-oxodG

La 8-oxodG est analysée comme décrit par Traoré et collaborateurs (2000). Les échantillons d'ADN sont hydrolysés et analysés par HPLC (Beckman Gold System).

III.6. Analyse statistique

L'analyse statistique a été effectuée en utilisant les logiciels GraphPad Prism version 4.0. et SPSS for Windows version 11.0, (2001). Les données distribuées de façon asymétrique sont transformées avant utilisation des tests paramétriques. Les différences sont considérées statistiquement significatives au seuil $\alpha < 5 \%$. La valeur de la probabilité p indiquée dans le test correspond au seuil de signification statistique.

IV. RESULTATS

Les résultats de nos travaux ont fait l'objet de trois articles déjà publiés et un soumis pour publication. Ils sont regroupés dans l'annexe 1. L'objectif de cette thèse était d'étudier l'impact des polluants majeurs (comme le benzène, les HAPs et les PM) présents dans l'air ambiant sur la santé des populations exposées en utilisant des biomarqueurs d'exposition et d'effets biologiques.

Puisque la pollution en milieu urbain au Bénin est essentiellement causée par le trafic automobile, nous avons dans un premier temps analysé l'essence utilisée au Bénin (essences vendues aux abords des rues (vendeurs ambulants) et dans des stations d'essence et avons comparé les composants de l'essence béninoise à celle vendue en France.

Dans un second temps nous avons quantifié les niveaux des composés organiques volatils (COVs), des particules en suspension (PM) et les particules ultrafines (PUFs) ainsi que les hydrocarbures aromatiques (HAPs) associés. Ensuite, nous avons analysé le profil hématologique chez les populations cibles et enfin avons examiné les biomarqueurs d'exposition ainsi que les altérations du génome de lymphocytes circulants.

IV.1. Résultats d'analyse de l'essence

L'analyse des essences prélevées au Bénin montre qu'elles ne contiennent pas du tout ou très peu d'Ethyl Tertio butyl Ether (ETBE) par rapport à l'essence sans plomb de la France. A l'inverse, la concentration en benzène dans les essences de Cotonou est trois à six fois plus élevée que dans l'essence vendue en France. En ce qui concerne les composés aromatiques, les concentrations dans les essences de Cotonou et de France sont semblables.

Les résultats sont illustrés par les figures 12, 13 et 14 ci-après

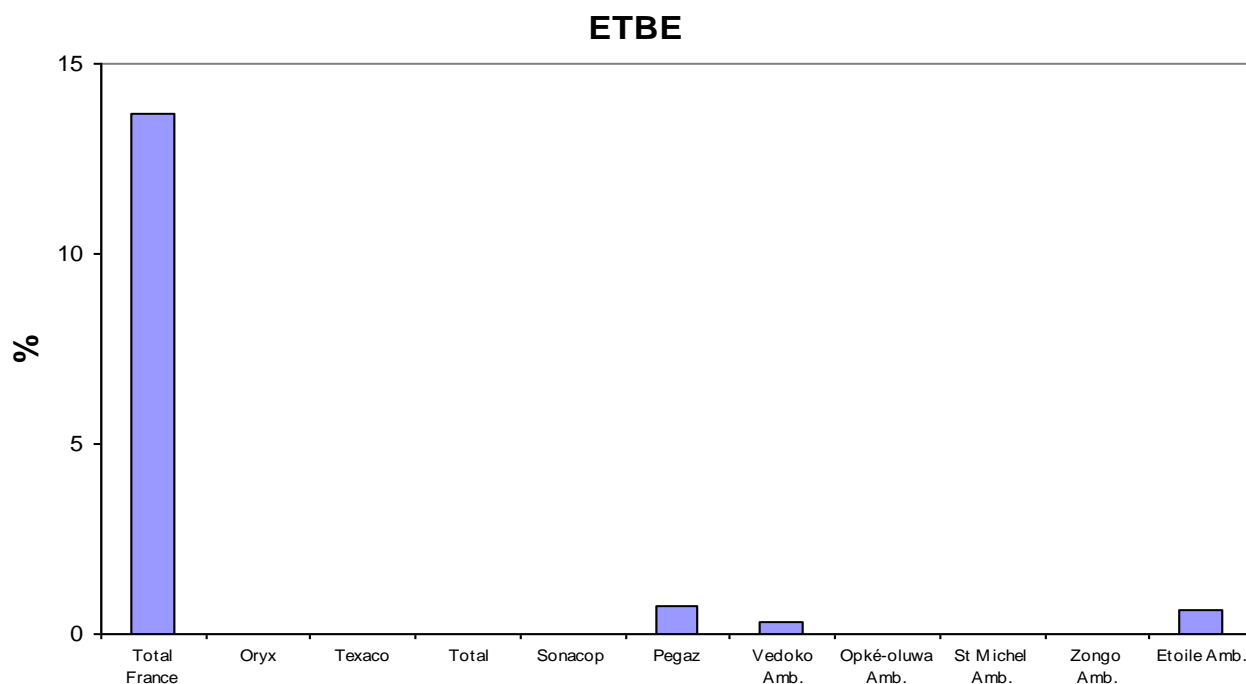


Figure 12: Comparaison des concentrations en ETBE

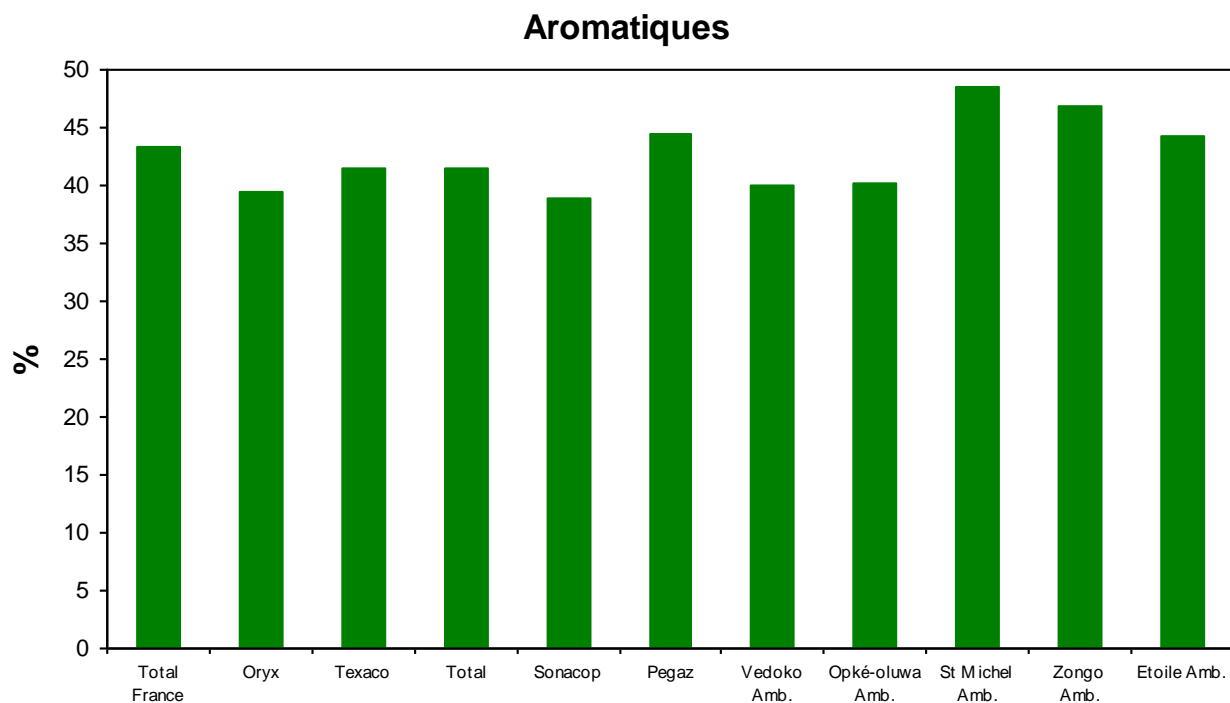


Figure 13 : Comparaison des concentrations en aromatiques

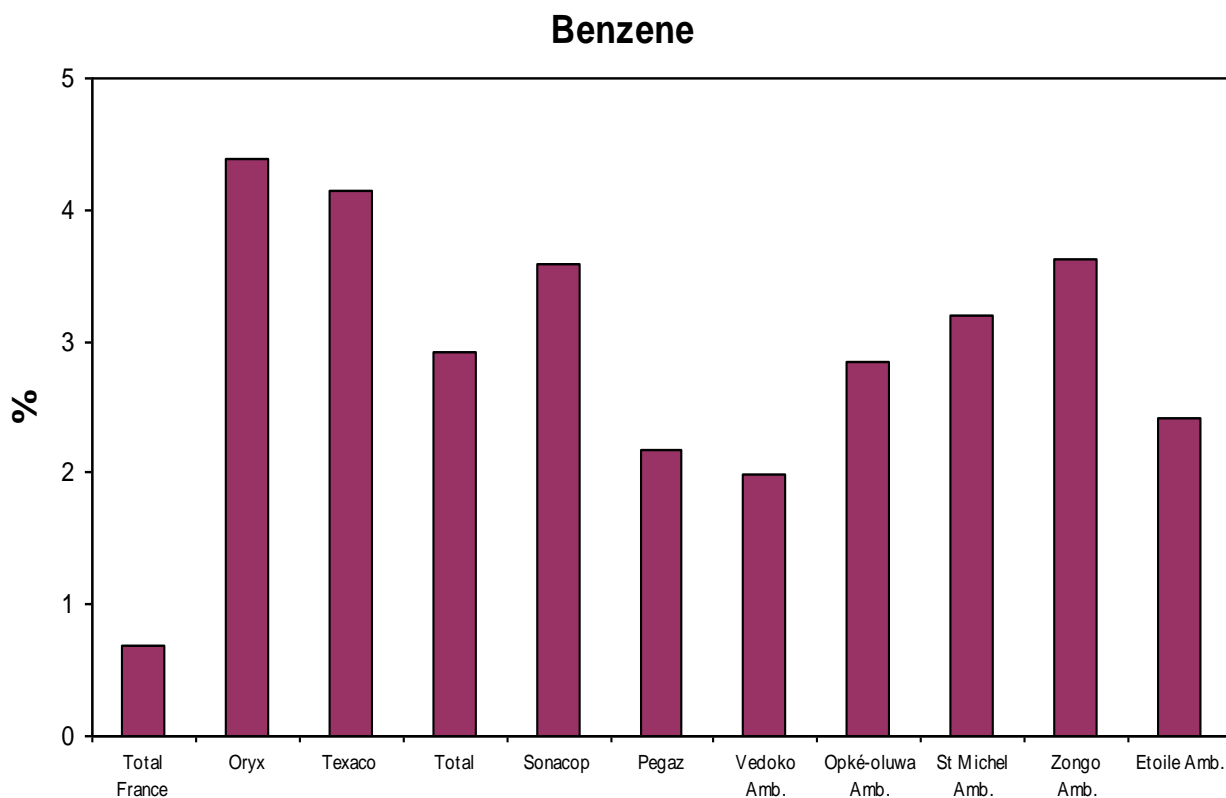


Figure 14 : Comparaison des concentrations en benzène

IV.2. Niveaux des différents polluants dans l'air analysé : ces résultats sont publiés par Avogbe et al., 2005 et Ayi-Fanou et al., 2006 dans des articles qui figurent en annexe 1

IV.2.1. Les composés organiques volatiles (COVs) à Cotonou et à Sohon

Les COVs mesurés sont le benzène, le toluène, l'éthylbenzène, O-xylène et m,p-xylène. Ces COVs ont été mesurés au niveau des carrefours à haut trafic routier (St Michel, Marina) et au village. L'exposition individuelle est évaluée chez les conducteurs de taxi-moto, les habitants des carrefours St Michel et Marina ainsi qu'au village.

Le Benzène (conducteurs de taxi-moto - valeur moyenne de $76,0 \mu\text{g}/\text{m}^3$) et autres composés organiques volatils (COVs) sont significativement élevés dans l'air ambiant à Cotonou par rapport au village (valeur moyenne de 3,4), c'est le cas par exemple du toluène, éthylbenzène, méta-, para-xylène, et l'ortho-xylène. Ces différences sont statistiquement significatives chez les habitants de Cotonou par rapport au village: benzène ($p = 0.001$), le

toluène ($p = 0.0041$), de l'éthylbenzène ($p = 0.001$), meta-, para-xylènes ($p = 0.001$), l'ortho-xylène ($p = 0.001$). Par ailleurs, nous n'avons observé aucune différence significative entre les conducteurs de taxi moto et les personnes vivant à proximité de Saint Michel et Marina ($p > 0.05$). Ces résultats figurent dans Science of the Total Environment (Ayi-Fanou et al., 2006) et sont illustrés par la figure 15 et tableau 3 (page 54).

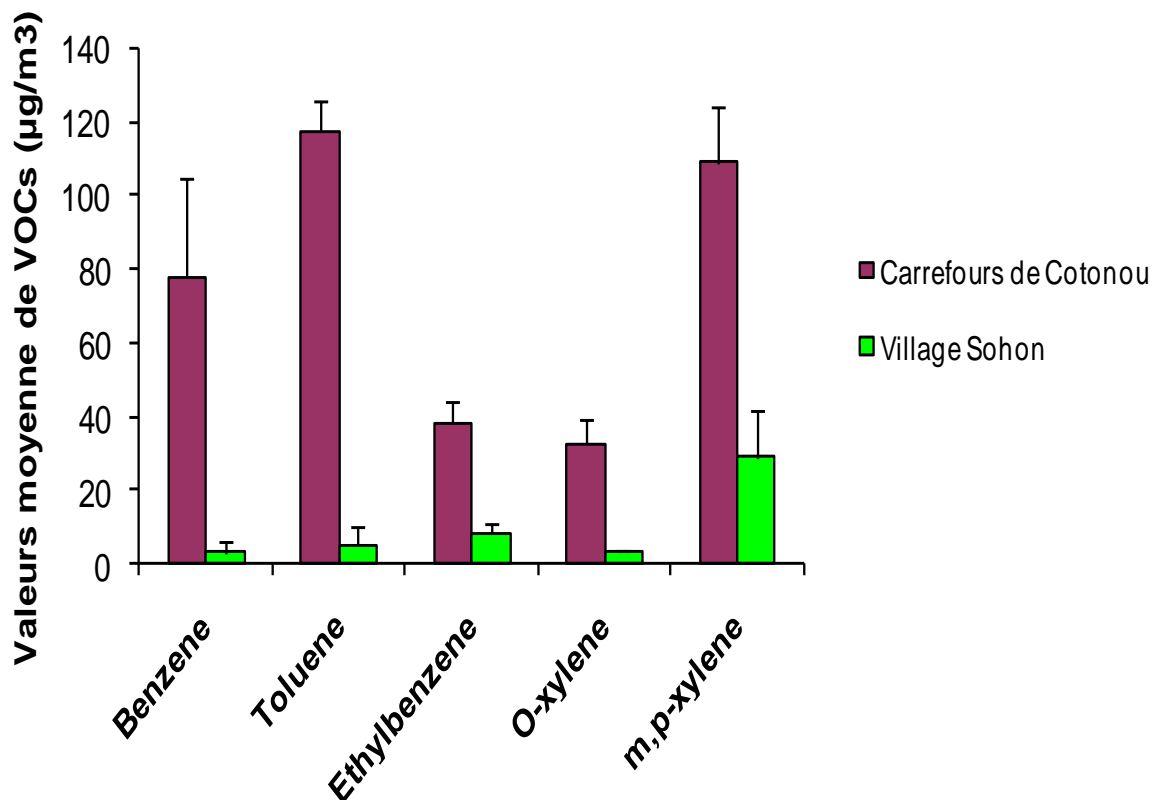


Figure 15 : Concentrations moyennes de six COVs mesurés dans l'air ambiant à Cotonou comparées au village de Sohon

Tableau 3 : Valeurs moyennes des expositions individuelles aux COVs dans la population cible.

Sujets	Benzène µg/m ³	Toluène µg/m ³	Ethyl benzène , µg/m ³	méta et para- xylènes, µg/m ³	Ortho- xylène, µg/m ³	Ratio Benzène / toluène
Taxi-moto (n = 6)	76,0 ±26,8	142,7 ±52,9	47,0 ±12,6	128,2 ±27,8	39,2 ±11,0	0,53
Saint Michel (n = 6)	48,2 ±32,2	123,2 ±77	34,7 ±20,1	98,8 ±52,8	28,2 ±18,7	0,39
Marina (n = 6)	60,0 ±19,1	111,7 ±59,6	42,3 ±8,6	119,8 ±20,7	37,5 ±6,3	0,54
Village (n = 5)	3,4 ±3,0	5,2 ±5,0	8,4 ±3,1	29,2 ±12,9	3,8 ±0,43	0,65
P	0,0004	0,0041	0,0001	0,0001	0,0003	

IV.2.2. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) à Cotonou et à Sohon

Le niveau ambiant de 10 HAPs différents a été déterminé au niveau de différentes stations de mesure. Il s'agit des carrefours de St Michel, Marina, de Dedokpo et du village Sohon. En général, le niveau des HAPs était significativement plus élevé à Cotonou que dans le village. La concentration totale de tous les HAPs à Cotonou s'élève à 103 ng/m³ contre 1,55ng/m³ au village. Des différences statistiquement significatives ($P < 0.05$) entre les échantillons du village de Sohon et les échantillons de la ville ont été observées pour le fluoranthène, le pyrène, le benzo (b) fluoranthène, benzo (k) fluoranthène, dibenzo (a, h) anthracène, le benzo (g, h, i) pérylène et indéno (1,2,3-cd) pyrène. Aucune différence statistiquement significative n'est notée pour le benzo (a) anthracène, chysene et le benzo (a) pyrène. Les HAPs semi volatils (fluanthrene et pyrène) étaient significativement plus élevés dans les zones à grand trafic automobile comme Saint Michel et Marina par rapport au village ainsi que les HAPs lourds (benzo (a) pyrène 3.39 ± 2.26 à St Michel contre 0.02 ± 0.02 au village), dibenzo (a, h) anthracène (0.65 ± 0.24 contre $0.09 \pm 0,11$), le benzo (g, h, i) pérylène (29.41 ± 12.17 contre 0.06 ± 0.07) et indéno (1,2,3-cd) pyrène ($13.63 \pm 6,54$ contre 0).

Afin d'examiner la qualité de l'air intérieur, nous avons réalisé des mesures dans une résidence de Dedokpo non loin du carrefour Dedokpo où l'intensité du trafic de poids lourds est forte. Nos résultats montrent que le niveau intérieur total des HAPs dans la journée était plus élevé ($57,33 \text{ ng} / \text{m}^3$) que dans la nuit ($34,94 \text{ ng} / \text{m}^3$), bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative ($p > 0.05$). Le niveau élevé des HAPs obtenus dans la maison provient probablement des particules fines en suspension dans l'air qui pénètrent à l'intérieur mais aussi des particules non-ambiantes générées par les activités humaines quotidiennes.

Le ratio entre les hydrocarbures aromatiques polycycliques légers et lourds, à Saint Michel et au carrefour Marina sont respectivement de 0,52 et 0,45. Ce ratio reflète une activité à fort trafic à ces endroits. Le ratio des HAPs à l'intérieur de la maison de Dedokpo est de 0,64 pendant la journée tandis qu'il atteint 0,68 pendant la nuit. Ce ratio est d'environ 7,29 dans le village de Sohon, ce qui suggère l'existence d'une source différente des HAPs dans le village par rapport à la ville, par exemple les HAPs de la fumée de bois de chauffage plutôt que de la circulation. Ces résultats figurent dans le tableau 4 ci-après.

Tableau 4 : Moyennes des mesures de dix différents HAPs dans l'air à différents endroits pendant une semaine.

PAHs (ng/m ³)	St. Michel		Marina		Dedokpo jour		Dedokpo nuit		Control village		p
	Mediane	Etendue	Mediane	Etendue	Mediane	Etendue	Mediane	Etendue	Mediane	Range	
Fluoranthene	9.33 ±6.05	3.2–18.87	7.26 ±3.87	0.84–11.15	1.76 ± 1.79	0.64–5.48	1.12 ± 1.34	0–3.61	0	0	0.0033
Pyrene	22.21 ±14.15	7.08–44.99	16.05 ±8.63	1.82–24.96	2.28 ±1.99	1.04–6.22	1.61 ±2.68	0,08–6.9	0.14 ±0.11	0–0.29	0.0240
Benzo(a)anthracene	5.77 ±4.89	0.76–13.2	1.86 ±0.94	0.21–2.47	2.68 ±2.70	0.57–7.8	1.75 ±2.45	0–5.44	0	0	0.8340
Chysene	7.18 ±3.52	2.55–10.93	5.49 ±3.14	0.23–8.59	5.94 ±4.86	2.01–15.57–	4.22 ±5	0–12.91	1.19 ±1.37	0–3.69	0.1137
Benzo(b)fluoranthene	8.55 ±3.42	3.92–12.44	6.77 ±2.82	1.83–8.67	8.31 ± 5.51	3.52–18.82	4.66 ± 5.61	0–11.86	0.03 ±0.06	0–0.04	0.0056
Benzo(k)fluoranthene	3.11 ±1.35	1.27–4.41	2.44 ±1.13	0.46–3.09	3.93 ±2.85	2.02–9.34	2.43 ±3.91	0–6.27	0,02 ±0.02	0–0.04	0.0287
Benzo(a)pyrene	3.39 ±2.26	0.34–5.79	3.81 ±1.44	0.19–4.04	4.6 ±4.85	0.92–13.03	4.64 ±6.41	0–13.74	0.02 ±0.02	0–0.05	0.2850
Dibenzo(a,h)anthracene	0.65 ±0.24	0.34–0.89	0.69 ±0.12	0.58–0.84	1.06 ±0.77	0.3–2.33	0.48 ±0.72	0–1.76	0.09 ±0.11	0–0.24	0.0480
Benzo(g,h,i)perylene	29.41 ±12.17	11.68–42.62	21.96 ±12.43	0–30.11	15.57 ±9.54	8.45–33.72	9.24 ±10.82	0–24.3	0.06 ±0.07	0–0.17	0.0024
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	13.63 ±6.54	5.01–21.43	9.88 ±5.65	0–14.15	11.2 ±10.01	3.52–12.78	4.79 ±6.32	0–11.86	0	0	0.0054
Total HAPs	103.23		76.21		57.33		34.94		1.55		
Petits PM/Lourds PM	0.52		0.45		0.64		0.68		7.29		

IV.2.3. Niveaux des particules ultrafines (PUFs) à six carrefours : Cotonou (4), Godomey (1) et Sohon (1)

Les mesures de la concentration des PUFs ont été effectuées sur six lieux différents à Cotonou (4), à la banlieue de Cotonou (1) et en milieu rural village (1) (Figure 16). Les résultats montrent l'existence d'un gradient dans la concentration des PUFs aux différents carrefours très pollués de Cotonou, dans la banlieue de Godomey et au village Sohon. Il existe également un gradient de concentrations des PUFs entre les quatre carrefours pollués de Cotonou.

Les moyennes des PUFs dans l'air ambiant sont respectivement $166816 \pm 53532,9$; $38074,31 \pm 31953,35$; $5276,5 \pm 2119,2$ au niveau des grands carrefours, dans la banlieue et au village Sohon.

On observe une diminution progressive du nombre de PUFs au cours de la journée, et une augmentation de la concentration des PUFs en fin de journée / soirée, lesquelles variations sont très probablement liées aux conditions météorologiques complexes comprenant la température qui augmente pendant la journée, entraînant une augmentation de la formation des PUFs par condensation des aérosols provenant des tuyaux d'échappement et la vitesse du vent (surtout une plus grande vitesse du vent en fin d'après midi engendrant une sédimentation moindre des PUFs).

Par ailleurs, les changements au cours de la journée sont plus prononcés sur les sites les plus pollués, soit trois petits pics dans la mesure aux grands carrefours (08h.00-09h.00, 13h.00 – 14h.00 et 19h.00 à 20h.00) coïncidant aux heures de pointe - départ et retour de service – suggérant un lien direct avec le trafic automobile.

La figure 16 ci-après rend compte de ce résultat.

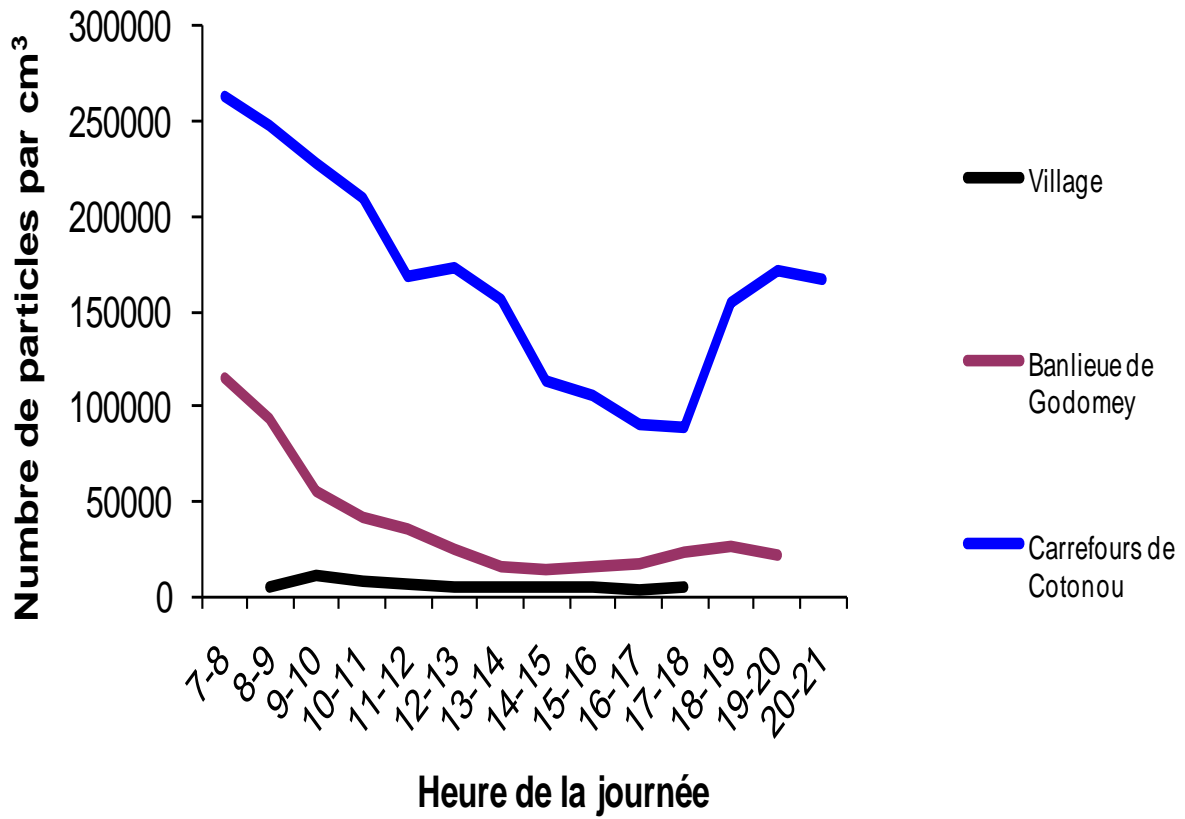


Figure 16 : Evaluation du nombre de particules ultrafines au niveau de six carrefours de Cotonou, Godomey et Sohon

IV.3. Profils hématologiques des populations cibles

Les différents paramètres analysés ainsi que leurs valeurs moyennes chez les populations étudiées sont rassemblés dans le tableau 5 ci-après.

Tableau 5 : Profil hématologique général des populations cibles.

Sujets Paramètres	Taxi moto		Carrefours		Banlieue		Village
	Moyenne ±SD	P	Moyenne ±SD	P	Moyenne ±SD	P	Moyenne ±SD
Hématie (10³)	5323±463	NS	4962,7±565,8	NS	5322±613,8	NS	4897,78±1,2
Hémoglobine	14,4±1,7	NS	14,3±1,7	NS	14,01±1,74	NS	14,36±1,14
Hématocrite	44,6±6,9	NS	44,1±6,9	NS	44,09±6,9	NS	43,13±1,14
VGM	87,4±6,3	NS	87,4±6,1	NS	87,42±6,07	NS	87,94±1,07
TCMH	28,9±2,8	NS	28,8±2,7	NS	28,8±2,7	NS	29,17±1,1
CCMH	32,9±1,3	NS	32,9±1,2	NS	32,5±1,3	NS	33,24±1
Leucocyte (10³)	4,9±1,1	<0,001	4,87±1,13	<0,001	5,05±1,33	<0,001	6,73±1,83
Neutrophile	2203,5±814	<0,001	2053,1±863	<0,001	2024,84±709	<0,001	1995,3±1,4
Eosinophile	245,3±280,9	NS	236,7±271	NS	551,3±818,1	0,01	253,86±251
Monocyte	176,9±135,3	<0,001	180,44±93,4	<0,001	180,4±93,4	<0,001	175,95±1,8
Lymphocyte (10³)	2,2±0,71	<0,001	2,53±0,81	NS	2,51±0,9	NS	3,05±1,4
Plaquettes (10³)	205±54,6	<0,001	222,7±126,7	0,001	230±52,6	<0,001	282,97±1,35

Les résultats des données hématologiques montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre sujets exposés et témoins quant aux paramètres de la lignée rouge : hématie, hémoglobine, hématocrite, volume globulaire moyen (VGM), teneur corpusculaire moyenne en hémoglobine (TCMH), concentration corpusculaire moyenne en hémoglobine (CCMH).

On observe une diminution statistiquement significative du nombre de leucocytes chez les sujets exposés (conducteurs de taxi-moto, habitants de carrefours et banlieue) par rapport aux témoins du village. De plus, on note une augmentation significative du nombre de neutrophiles chez les populations exposées par rapport aux témoins. Les résultats sur la lignée blanche montrent une diminution significative du nombre de lymphocytes chez les conducteurs de taxi-moto exposés par rapport aux habitants du village. Le taux de plaquettes est significativement plus faible chez les sujets exposés par rapport aux témoins du village.

IV.4. Niveaux des biomarqueurs d'évaluation de la dose interne dite d'exposition (Cf. fig. 1)

IV.4.1. Niveau de benzène urinaire non métabolisé

Les résultats montrant les niveaux d'excrétion de benzène urinaire sont rassemblés dans le tableau 6 ci-dessous

Tableau 6 : Niveaux de benzène urinaire chez les populations cibles.

<i>Populations cibles</i>	<i>Valeurs moyennes de benzène en $\mu\text{mol/mol}$ créatinine</i>
Taxi-moto (n = 6)	0,204 \pm 0,109
Saint Michel (n = 6)	0,217 \pm 0,102
Marina (n = 6)	0,791 \pm 0,500
Village (n = 5)	0,165 \pm 0,041
p	< 0,0001

Les résultats montrent que le niveau d'excrétion du benzène non métabolisé urinaire est beaucoup plus élevé chez les habitants du carrefour de la Marina par rapport aux taxi-moto et habitants de Saint Michel, avec une différence statistiquement significative ($p < 0,0001$) par

rapport aux villageois. La grosse variation notée chez les habitants de Cotonou pourrait être imputée aux grandes variations interindividuelles chez ces sujets.

IV.4.2. Niveaux d'excrétion de S-APM

Les résultats de l'excrétion de S- APM urinaire montrent que chacun des quatre groupes est statistiquement différent des autres ($P < 0,05$, post-hoc, LSD). De plus, on observe un gradient de Log S-APM entre les villageois et les sujets les plus exposés de la ville (conducteurs de taxi-moto, habitants des carrefours). Les résultats sont représentés sur la figure 17 ci-dessous.

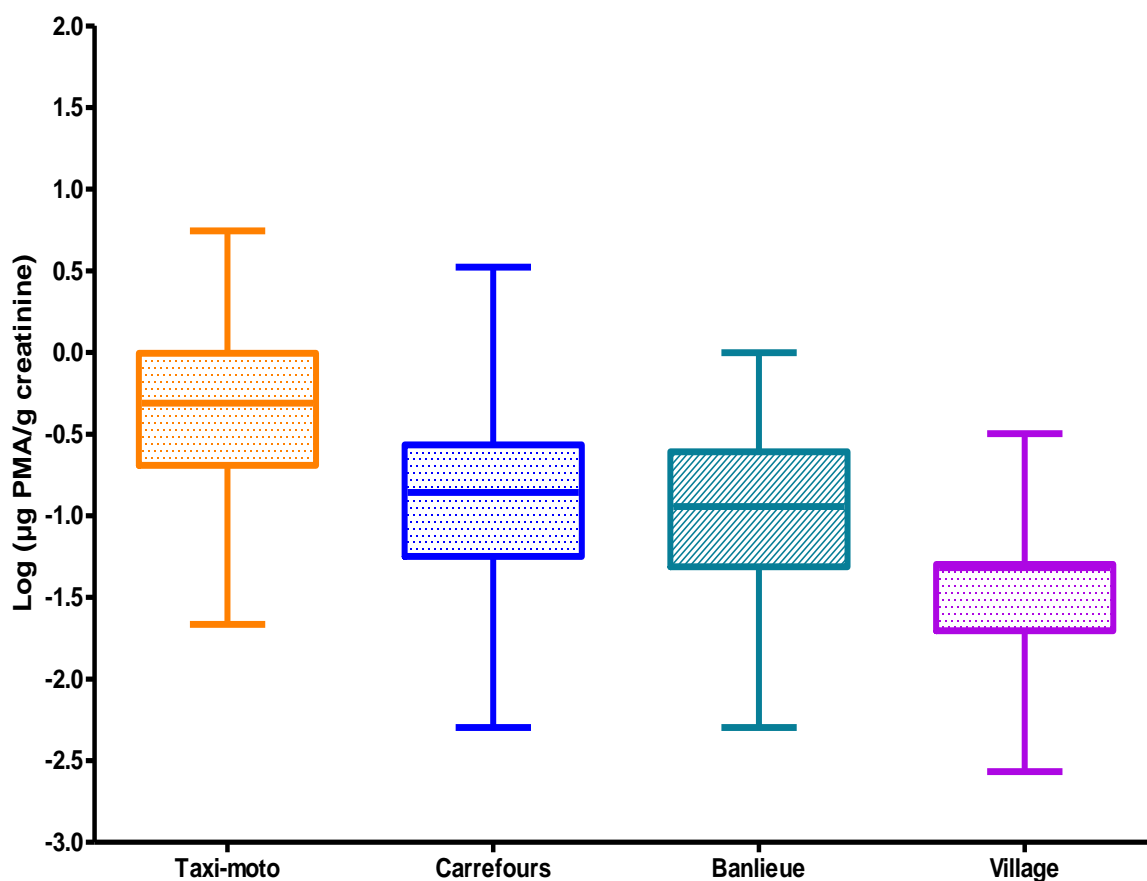


Figure 17 : Niveaux d'excrétion de S-APM chez les populations cibles

IV.4.3. Niveaux d'excrétion du 1-HOP dans la population cible

Le 1-HOP urinaire mesuré, sert de biomarqueurs aux HAPs, pour évaluer l'exposition aux pyrènes. Bien que le niveau moyen du 1-HOP chez les personnes du village ($0,33 \pm 0,05$ $\mu\text{mol} / \text{mol}$ créatinine) soit plus faible que les concentrations obtenues chez les sujets vivant à Cotonou ($0,60 \pm 0,06$ $\mu\text{mol} / \text{mol}$ pour Marina), il n'y a aucune différence statistiquement significative entre les sujets de la ville de Cotonou et ceux du village. Les résultats du niveau du 1-HOP sont représentés sur la figure 18 ci-dessous

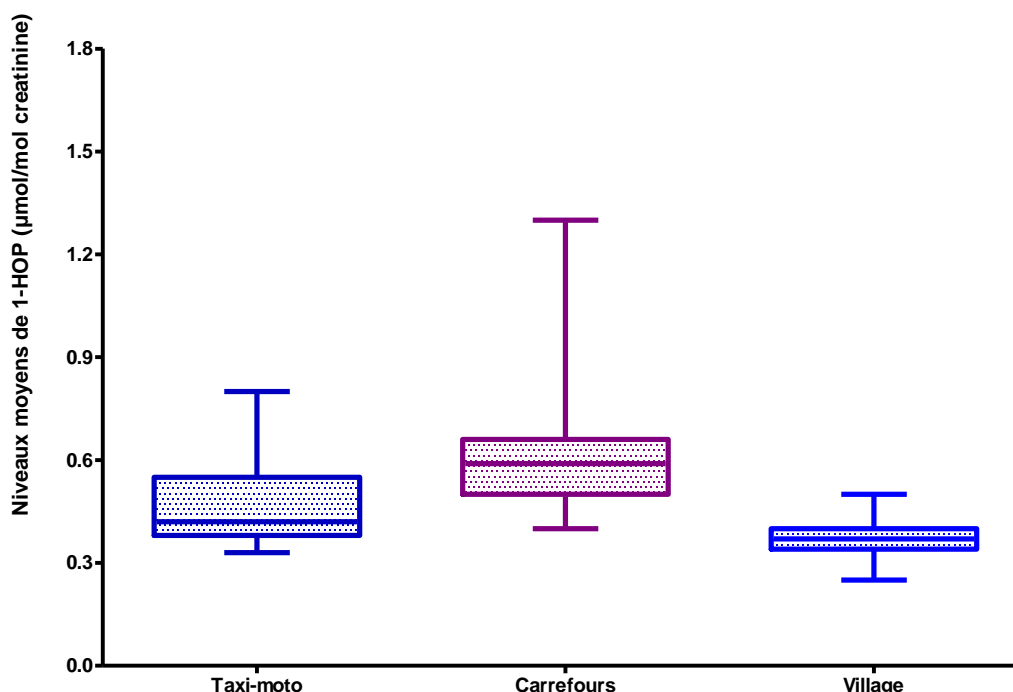


Figure 18: Variations du niveau d'excrétion du 1-HOP

IV.4.4. Evaluation du niveau des anticorps AAMB

Cette analyse a été faite chez les conducteurs de taxi-moto et chez des sujets donneurs de la banque de sang de Cotonou comme population témoin. Les AAMB (HQ et BQ) sont significativement plus élevés chez les conducteurs de taxi-moto par rapport aux sujets témoins de la banque de sang ($p < 0.001$, test de Student) (Fig. 19 A). Parmi les conducteurs de taxi-moto, on observe une variation importante du titre d'AAMB en fonction de la durée d'activité donc de l'exposition journalière. En effet, les conducteurs de taxi-moto n'excédant pas 5h de conduite journalière et donc d'exposition aux polluant par jour présentent des titres d'anticorps AAMB avec une différence statistiquement significative par rapport à ceux ayant une durée d'exposition supérieure à 5h/j ($P < 0,001$, test de Student). De plus on obtient une

corrélation statistiquement significative entre la durée d'exposition journalière et les concentrations d'anticorps AAMB ($r = 0,783$; $P < 0,001$; Pearson correlation) (Fig. 19 B). Les résultats du niveau des AAMB sont représentés sur la figure 18 ci-après.

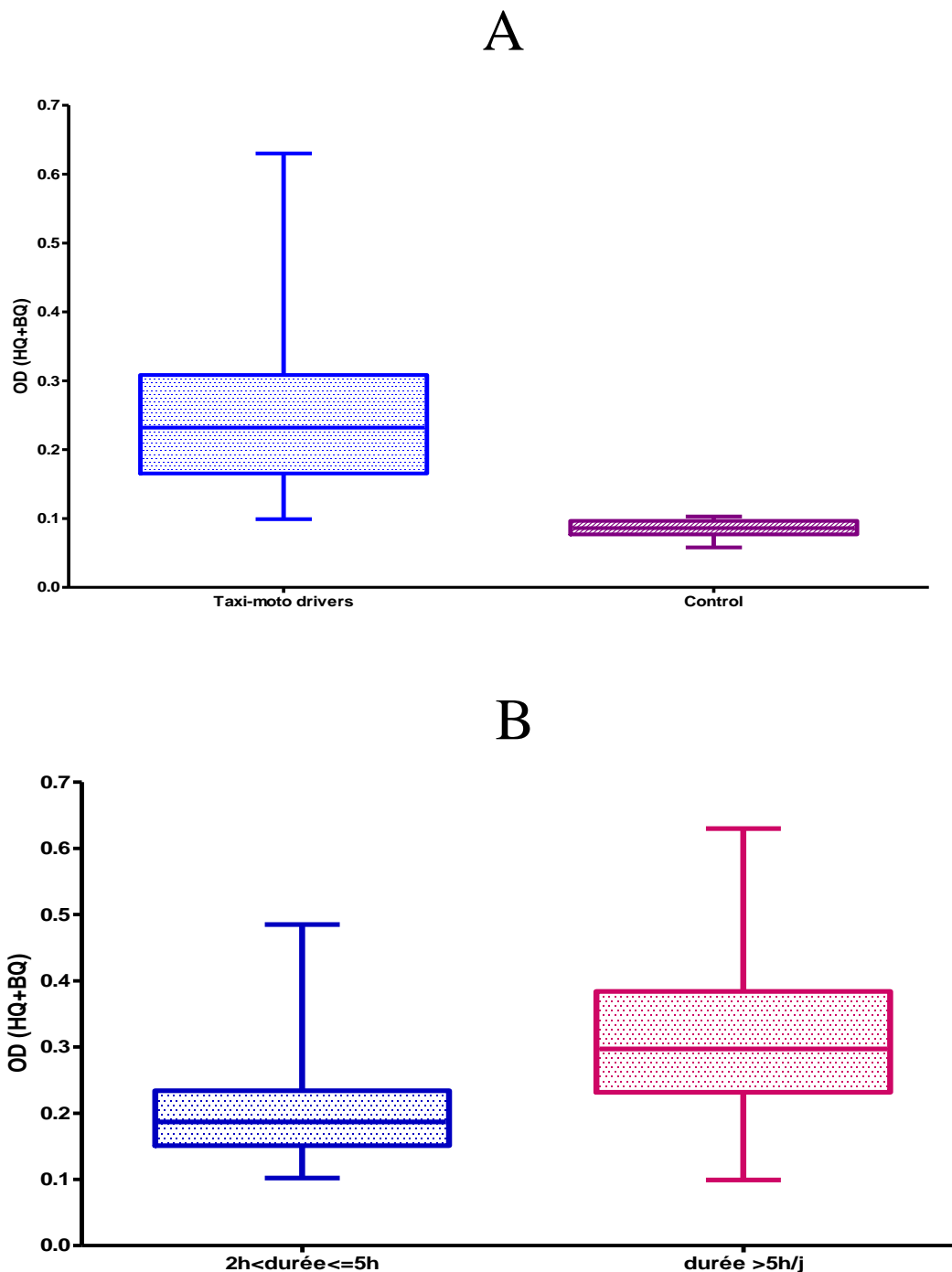


Figure 19 Niveaux d'anticorps anti-métabolites du benzène chez les conducteurs de taxi-moto comparés aux sujets témoins de la banque de sang

IV.5. Biomarqueurs d'évaluation de la dose biologiquement active : impact sur le génome des populations exposées

IV.5.1. Niveaux de coupures de brins d'ADN

Nos résultats montrent qu'il y a une différence statistiquement significative entre les habitants du village de Sohon et les conducteurs de taxi-moto ($p < 0,05$, post-hoc Turkey Test) et les habitants des carrefours ($p < 0,05$, post-hoc Turkey Test) pour le niveau des cassures de brin d'ADN. Les conducteurs de taxi-moto ont le niveau le plus élevé de cassures de brins. Aucune différence entre conducteurs de taxi-moto et les habitants de carrefours ($p > 0,05$, post-hoc Turkey Test) suggérant que ces deux populations ont un niveau quasiment identique d'exposition aux polluants de l'air. De même il n'y a pas de différence significative entre les habitants des carrefours et ceux de la banlieue. Les résultats sont présentés sur la figure 19 ci-après.

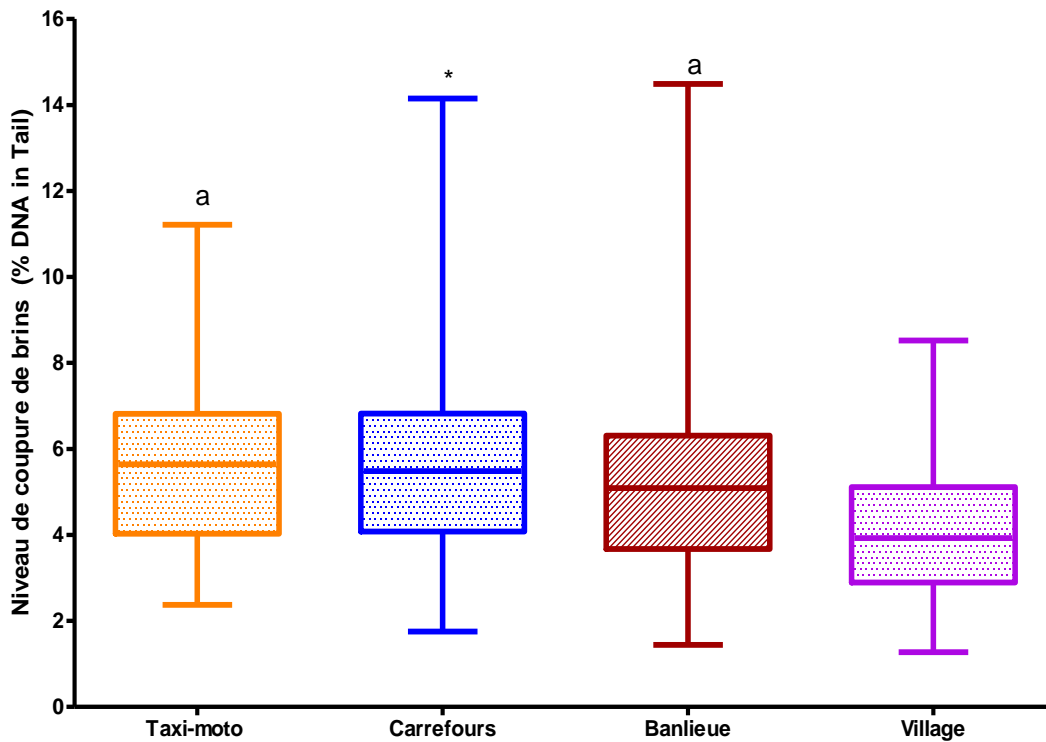


Figure 20 : Niveaux de coupures de brins d'ADN dans la population cible

IV.5.2. Niveaux de sites sensibles à la FPG

Les taux de purines modifiées sont beaucoup plus élevés chez les conducteurs de taxi-moto. En effet, nous avons obtenu chez ceux-ci 11 % de purines modifiées contre 9 % chez les sujets résidant près des carrefours, 8 % chez ceux de la banlieue et 5,5 % chez les villageois.

On observe une différence statistiquement significative entre le groupe des conducteurs de taxi-moto ($p < 0,001$, post-hoc Turkey Test) et ceux habitant près des carrefours. Notons qu'aucune différence significative n'est obtenue entre les habitants des carrefours et les sujets habitant la banlieue de Godomey ($p > 0,05$, post-hoc Turkey Test), confirmant ainsi le fait que ces deux groupes ont des niveaux d'exposition identique aux polluants de l'air. Les conducteurs de taxi-moto, les habitants près des carrefours et les résidents de la banlieue ont des taux de purines significativement différents de ceux vivant en zone rurale ($p < 0,001$, post-hoc Turkey Test). La figure 21 ci-après illustre ces résultats.

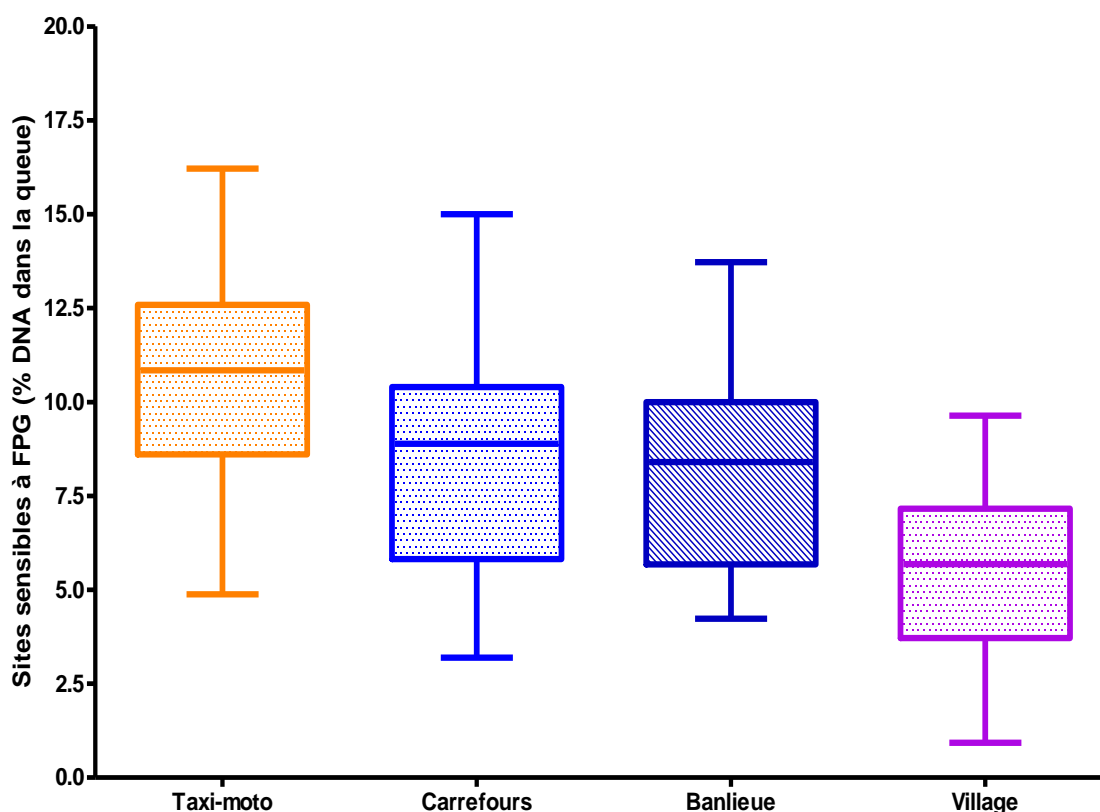


Figure 21 : Niveaux de sites sensibles à la FPG dans l'ADN de la population cible

IV.5.3. Analyse des niveaux d'adduits d'ADN par marquage au ^{32}P

L'analyse des données révèle que les conducteurs de taxi moto, les sujets résidant près des carrefours, les vendeurs aux abords des voies, et les vendeurs d'essence ont les niveaux les plus élevés d'adduits par rapport aux sujets de la banlieue et ceux vivant au village ($P < 0,001$, post hoc, LSD). Par contre, les niveaux d'adduits d'ADN ne sont pas significativement différents entre les sujets de banlieue et les habitants des villages ($P > 0,05$, post hoc LSD). De plus, aucune différence statistiquement significative n'est observée dans les sous-groupes d'exposition élevée comprenant les conducteurs de taxi moto, les sujets habitant près des carrefours, les vendeuses de la rue et vendeurs d'essence ($P > 0,05$, post hoc LSD). En revanche, leurs niveaux d'adduits montrent de grandes variations interindividuelles. L'étendue des niveaux d'adduits par 10^8 nucléotides sont de 1-69 pour les conducteurs de taxi moto, 1-76 chez les personnes vivant au voisinage des grands carrefours, 3-169 chez les vendeurs de rue, 4-124 chez les vendeurs d'essence, 0-9 chez ceux vivant en banlieue et de 0-8 chez les habitants du village. La figure 22 ci-dessous renseigne sur ces différences observées entre les groupes, tandis que la figure 23 ci-après représente une autoradiographie typique décrivant les profils d'adduits chez les villageois de Sohon, les conducteurs de taxi-moto et les habitants du voisinage des carrefours de Cotonou.

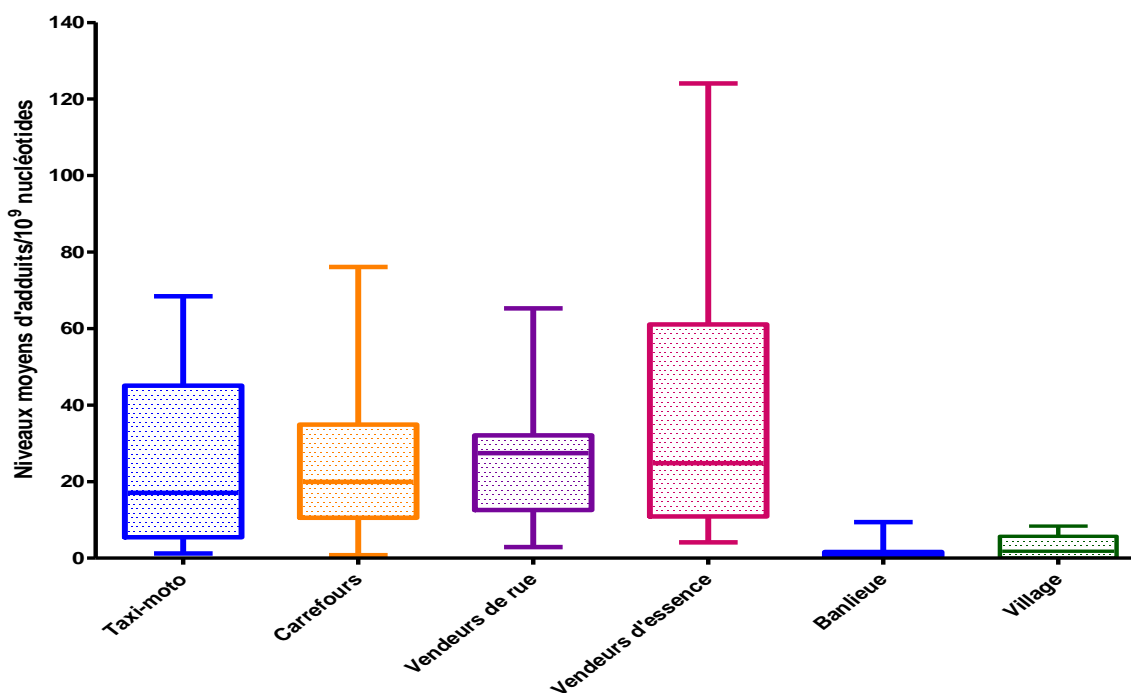


Figure 22: Niveaux des adduits d'ADN chez les populations cibles

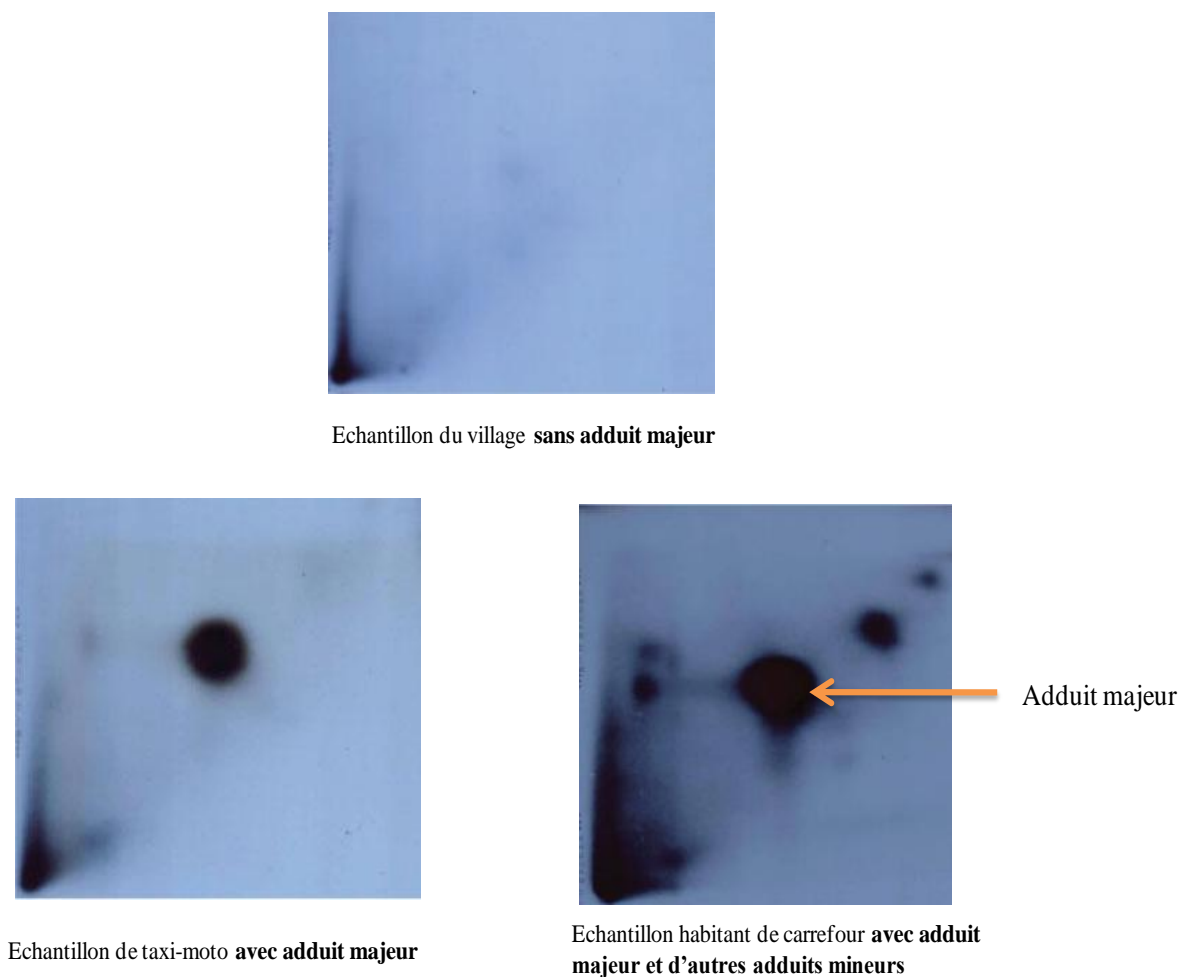


Figure 23: Profil radiographique des adduits analysés par marquage au ^{32}P des populations cibles

IV.5.4. Niveaux de la 8-oxodG chez les taxi-moto et habitants de Sohon

Le niveau des lésions oxydatives de l'ADN est investigué par la mesure de la 8-OxodG dans l'ADN des lymphocytes des conducteurs de taxi-moto de Cotonou et les habitants de Sohon. Les résultats montrent un niveau d'adduits de 8-oxodG significativement plus élevé chez les conducteurs de taxi-moto ($2,05 \pm 1,25$ 8-oxodG/ 10^5 dG) par rapport aux habitants du village ($1,11 \pm 0,82$) ($P < 0,05$, Student T test). La figure 24 ci-après illustre ces résultats.

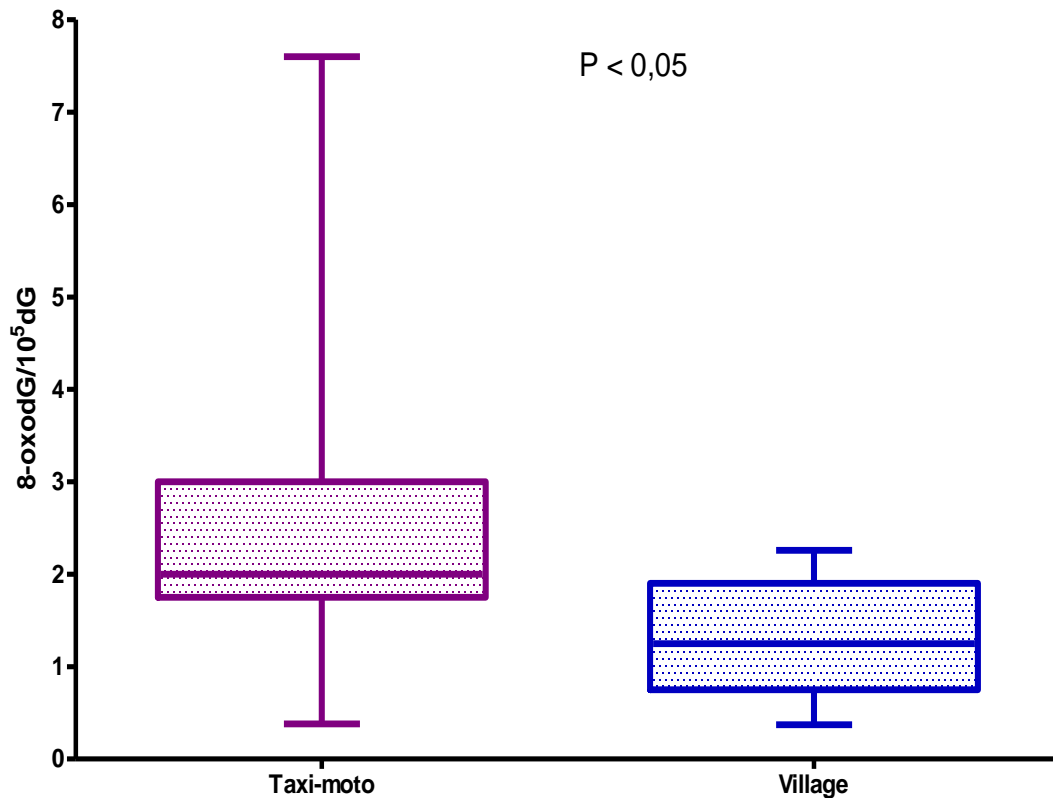


Figure 24: Niveaux de la 8-oxodG chez les conducteurs de taxi-moto et les villageois

IV.5.5. Fragmentation de l'ADN

La fragmentation de l'ADN tel que déterminé par électrophorèse de l'ADN des lymphocytes (figure 25 ci-après) montre que 10 des 35 conducteurs de taxi-moto ont leur ADN fragmenté tandis que 1 sur 6 parmi les villageois qui servent de groupe contrôle a son ADN fragmenté. Mais la distribution n'est pas statistiquement significative ($P = 0,54$, χ^2 -test).

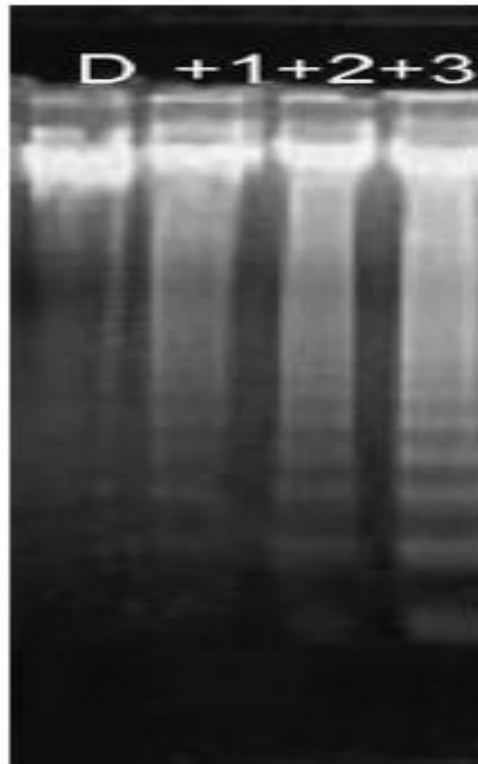


Figure 25 : Photographie d'un gel d'agarose montrant l'état de fragmentation de l'ADN

IV.6. Polymorphismes génétiques des enzymes de détoxification

La distribution des allèles des différents gènes étudiés sont résumés dans le tableau 7 ci-après.

Les résultats montrent une distribution non homogène de la plupart des gènes étudiés. Pas de différence statistiquement significative entre les gènes étudiés : $\alpha=5\%$. La distribution non homogène diffère entre les génotypes : par exemple le groupe des conducteurs de taxi-moto contient beaucoup de sujets possédant le génotype $*B/*B$ du gène GSTP1. Quant au GSTT1, on observe une répartition presque égale des deux allèles (délecté et non délecté) chez les conducteurs de taxi-moto, habitants des carrefours et du village tandis que chez les sujets vivant dans la banlieue, on a une répartition différente : 30% ayant l'allèle délecté et 70% l'allèle sauvage. Quant au polymorphisme de NQO1, il n'y a pas une différence dans la répartition des génotypes, exception faite pour la distribution entre les sujets de la banlieue et du village.

Tableau 7: Répartition des polymorphismes de GSTM1, GSTP1, GSTT1, GPX et NQO1

Polymorphismes	Taxi-moto	Carrefours	Banlieue	Village	Total	χ^2 -test
GSTT1						
-	10	18	12	14	54	(45%)
+	11	15	28	13	67	(55%)
GSTM1						5.78
-	9	5	12	10	36	(30%)
+	12	28	28	17	85	(70%)
GSTP1						4.6
*A/*A	4	8	8	9	29	(22%)
*A/*B	11	20	23	12	66	(50%)
*B/*B	14	5	11	6	36	(27%)
GPX						0.25
*1/*1	14	16	21	12	63	(49%)
*1/*2	13	15	17	12	57	(44%)
*2/*2	2	2	4	1	9	(7%)
NQO1						5.95
Pro/Pro	19	22	33	12	86	(65%)
Pro/Ser	9	12	8	11	40	(30%)
Ser/Ser	1	0	1	4	6	(5%)

IV.7. Influence du polymorphisme de la GSTT1 sur le niveau d'excrétion de S-APM

L'effet de la pollution atmosphérique sur Log S-APM a été étudié en mode GLM avec les groupes cibles et les polymorphismes comme variables catégoriques. Cette analyse a montré que GSTT1 a une influence sur les taux d'excrétion du S-APM des groupes étudiés. En effet, une stratification suivant le génotype de GSTT1, indique que la délétion de GSTT1 est associée à une baisse du niveau d'excrétion de S-APM (en moyenne 0,08 μg S-APM / g de créatinine, $n = 54$) par rapport à l'allèle sauvage de GSTT1 (moyenne de 0,15 μg S-APM / g de créatinine, $n = 67$). Des analyses similaires avec GSTM1, GSTP1, GPX ou NQO1 montrent des interactions statistiquement non significatives. La figure 26 ci-après illustre l'effet modulateur de la GSTT1 sur le niveau d'excrétion de l'S-APM.

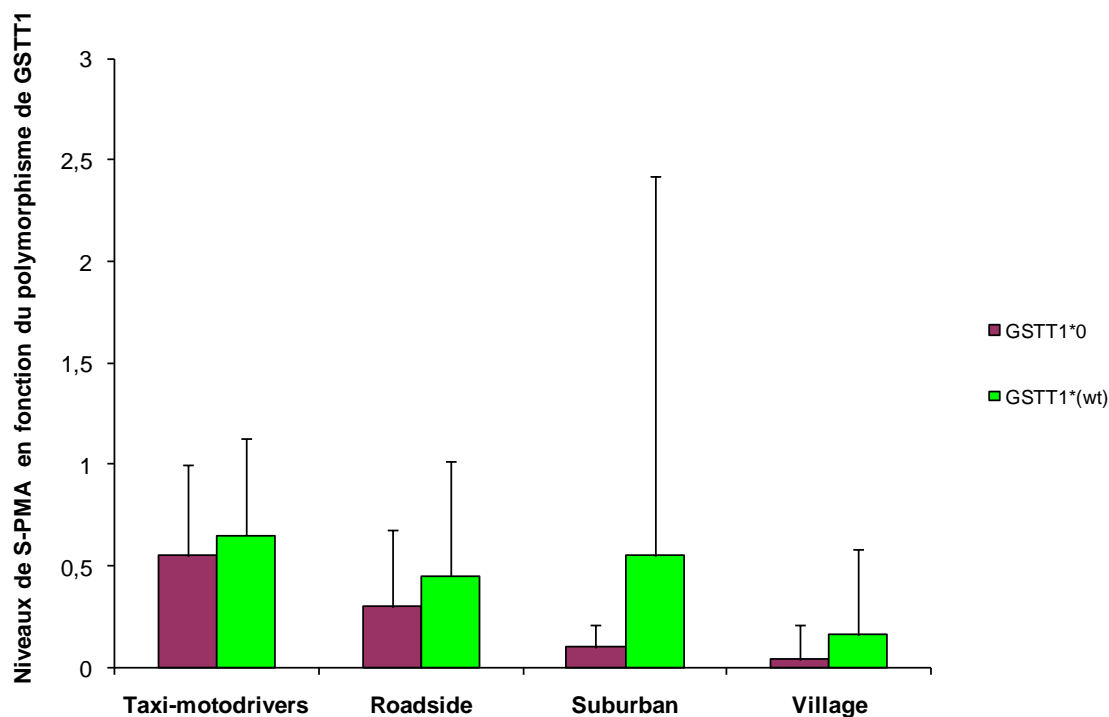


Figure 26 : Influence de la GSTT1 sur le taux d'excrétion de S-APM

V. DISCUSSION

L'objectif de cette thèse était d'étudier l'impact des polluants génotoxiques (comme le benzène, les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAPs) et les Particules Ultra Fines (PUFs) présents dans l'air ambiant sur la santé des populations cibles en utilisant des biomarqueurs d'exposition et d'effets biologiques. Nos résultats portent sur la qualité de l'essence vendue au Bénin afin de la comparer à celle vendue en France, sur les niveaux des polluants et des biomarqueurs ainsi que les altérations du génome de lymphocytes circulants.

V.1. La qualité de l'essence vendue au Bénin

L'essence vendue au Bénin ne contient presque pas de l'ETBE qui est un carburant synthétique qui oxygène l'essence et augmente son indice d'octane, réduisant ainsi les concentrations en aromatiques dans le mélange (Nadim et al., 2001). Cet additif peut être incorporé à hauteur de 15% dans les essences en France. Contrairement à l'éthanol, il n'entraîne pas l'augmentation de la pression de vapeur du carburant, réduisant ainsi les pertes par évaporation (da Silva et al., 2005). Par ailleurs, une étude américaine réalisée dans le cadre de l'American Auto/Oil Program a montré que l'addition d'ETBE dans l'essence conduit à une diminution des émissions de monoxyde de carbone et d'hydrocarbures (Guibet., 1998). Si nous considérons le taux de benzène dans les essences béninoises, ce taux est trois à six fois supérieur à l'essence Sp 98 de France. Toutes ces considérations nous amène à admettre que l'essence vendue au Bénin est différente de celle vendue en France. Donc dans une certaine mesure le taux élevé de benzène dans l'air ambiant peut être imputé en partie à la qualité de l'essence utilisée (toute origine confondue). On peut aussi se poser la question de savoir si l'ETBE n'a pas été remplacé dans l'essence du Bénin par un autre additif ayant la même fonction ? D'autres investigations nous éclaireront dans ce domaine.

V.2. Niveaux des COVs à Cotonou comparés au village

Parmi les COVs, les données de la littérature conduisent à s'intéresser particulièrement au benzène en raison de son caractère cancérigène prouvé (IARC, 2006). Les échantillons d'air prélevés à Cotonou en fin de saison des pluies (août 2002), montraient que la concentration moyenne de benzène était de $76 \mu\text{g}/\text{m}^3$, laquelle concentration est largement au dessus de la norme de $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ recommandée par l'OMS. En revanche, les habitants du village de Sohon ont un faible niveau de benzène ($3.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$) dans l'air ambiant en raison de l'absence ou de la faiblesse du trafic automobile. Il est important de signaler que les données préliminaires provenant de la première phase de notre étude (Mars 2001; données non publiées) révélaient que les conducteurs de taxi-moto communément appelés « Zémidjan »

ont un niveau d'exposition plus élevé de benzène ($292 \mu\text{g}/\text{m}^3$), que les habitants du carrefour Marina qui ont un niveau d'exposition de $280 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Les variations saisonnières de la concentration du benzène dans l'air pourraient être liées aux conditions météorologiques, par exemple les températures plus élevées, l'humidité, et la faible vitesse du vent en mars sont contraire aux conditions climatiques en août. En effet, Il est bien connu que le niveau de benzène ambiant diminue avec la température et l'humidité.

Les concentrations de benzène à Cotonou sont plus élevées que celles rapportées dans différents pays de l'Union Européenne. Malgré l'intensité du trafic élevé dans les villes européennes, les concentrations de benzène dans l'air ambiant varient de $1\text{-}50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Skov et al., 2001) mais l'essence est d'une qualité meilleure. En effet, dans nombre de pays européens les concentrations ambiantes de benzène sont considérablement plus faibles que celles observées à Cotonou, par exemple à Grenoble, France ($23,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$, Maître et al., 2002), Biella et de Turin, Italie ($10,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$, Bono et al., 2003) et Copenhague, Danemark ($2,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$, Sørensen et al., 2003). Cependant, la concentration de benzène obtenue à Cotonou en Août 2002 est largement inférieure aux $250 \mu\text{g}/\text{m}^3$ rapportés dans une étude conduite à Lagos, (Nigéria), ville où le trafic automobile est très intense (Baumbach et al., 1995). Il faut remarquer que la concentration de benzène à Cotonou est 2 fois supérieure aux $42,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ mesurées dans une étude conduite à Bangkok (Leong et al., 2002) et 30 fois supérieure à celle de $2,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ mesurées à Copenhague (Sorensen et al., 2003a) et 2,5 fois supérieure à celle de Mexico ($43,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$) (Ortiz et al., 2002).

L'association étroite observée entre les concentrations ambiantes de benzène et l'intensité du trafic dans cette étude a été également observée dans d'autres villes moins polluées. C'est le cas par exemple de l'Italie où une étude précédente a montré que la concentration de benzène dans une zone suburbaine à faible trafic était de $2,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ contre $10,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ dans le centre-ville (Bono et al., 2003). La zone rurale au Bénin (cas du village Sohon) avait un niveau de benzène comparable à celui mesuré dans les pays européens et est donc dans la norme recommandée par L'OMS.

Le ratio de benzène / toluène à Copenhague est 0,13 (Sørensen et al., 2003a), et 0,22 pour le Mexique City (Ortiz et al., 2002). Toutefois, ce ratio est beaucoup plus élevé dans les pays moins développés comme Téhéran, Iran (0,63 ; Bahrami, 2001). Les valeurs de ratio obtenues au Bénin sont respectivement de 0,53 ; 0,39 ; 0,54 et 0,65 chez les conducteurs de taxi-moto, les personnes vivant à proximité des carrefours de Saint Michel, de Marina et les

habitants du village. Ces valeurs sont comparables à celles obtenues dans d'autres pays en développement. Les différences observées entre pays développés et pays les moins développés pourraient être dues aux différences de composition des combustibles et/ou le type et l'âge des véhicules utilisés. Les différences observées entre le village Sohon et Cotonou pourraient être dues à des différences dans le mode de cuisson des aliments, par exemple l'utilisation de charbon de bois et du bois constitue aussi une source de benzène (Olsson et Petersson, 2003).

V.3. Niveaux des HAPs à Cotonou comparés au village

Nos résultats montrent que les niveaux des HAPs sont beaucoup plus élevés à Cotonou qu'au village (103,23 ng/m³ Saint Michel contre 1,55 pour le village). Ces concentrations de HAPs sont plus élevées que celles mesurées par Ruchirawatt et al., (2002) chez des policiers circulant dans la ville de Bangkok par rapport à leurs collègues travaillant dans les bureaux (72,79 ng/m³ pour les policiers en circulation dans la ville contre 6,88 ng/m³ chez leurs collègues aux bureaux). De plus nos concentrations d'HAPs sont supérieures à celles des villes Européennes, par exemple Athènes (Kyrtopoulos et al., 2001). Le ratio entre les HAPs de poids moléculaires légers et HAPs de poids moléculaires lourds varie selon la zone d'étude, par exemple 0,52 pour Saint-Michel et de 0,45 pour Marina. Ces ratios suggèrent qu'au niveau de ces carrefours, les concentrations des HAPs les plus lourds sont 2 fois plus élevées que les HAPs plus légers. Une observation similaire a été faite à Bangkok, Thaïlande (Ruchirawat et al., 2002). Cette différence dans les profils de HAPs à différents endroits au Bénin serait liée à l'intensité du trafic et aux types d'engins utilisés, par exemple le carrefour Marina est beaucoup plus utilisé par les camions gros porteurs transportant des marchandises en direction des pays voisins comme le Togo, le Niger, le Burkina Faso et le Mali.

Le niveau des HAPs à l'intérieur des maisons était plus élevé à Cotonou pendant la journée (57,33 ng/m³) que la nuit (34,94 ng /m³). La différence entre les HAPs intérieurs totaux pendant le jour et la nuit pourrait s'expliquer par la pénétration dans les maisons des HAPs issus du trafic automobile mais aussi des HAPs provenant de l'utilisation de feu de bois ou de charbon de bois pour la cuisson des aliments à petite ou grande échelle (fins commerciales). Le niveau de benzo(a)pyrène (B(a)P) dans l'air ambiant à Cotonou était similaire à celui observé à Bangkok comme dans la plupart des villes d'Europe occidentale et des États-Unis d'Amérique, à savoir 1-5 ng/m³ (Menichini, 1992). Cependant, contrairement à Bangkok et aux pays d'Europe, les personnes vivant à proximité des carrefours à Cotonou sont exposés à de forts niveaux de B(a)P (concentrations variant de 0,92-13,74 par exemple à

Dedokpo) qui pourraient probablement être liés à une co-exposition, par exemple B(a)P de l'air et celui provenant de l'effet de la pollution de l'air intérieur. Le ratio entre HAPs de faibles PM et HAPs de PM élevés est 7 fois plus élevé dans le village qu'à Cotonou. Ceci serait dû à la forte contribution de HAPs générés par les feux de brousse ou à l'utilisation excessive de bois pour la cuisson des aliments dans les villages. A ces facteurs, s'ajoute la mauvaise ventilation des chambres dans les villages ce qui accentue l'accumulation des polluants à l'intérieur des maisons.

V.4. Niveaux des PUFs à Cotonou comparés au village

Les concentrations des PUFs mesurées à Cotonou sont largement supérieures à celles mesurées dans la banlieue et au village Sohon. Le niveau des PUFs est aussi plus élevé à Cotonou que dans les pays développés comme le Danemark où la concentration ne dépasse pas en général 50 000 particule/cm³. Signalons tout de même que nous ne disposons pas de données sur l'exposition individuelle aux PUFs en raison de l'état de dégradation poussée de la plupart de nos routes à Cotonou, puisque le matériel de mesure est très sensible aux secousses.

Malgré le fait que l'évaluation du niveau d'exposition individuel aux PUFs soit difficile, les études épidémiologiques indiquent que l'exposition aux PUFs issues des pots d'échappement des véhicules, est associée à une augmentation du risque de maladies cardiovasculaires et pulmonaires et même de cancers (Brunekreef et Holgate, 2002 ; Pope et al., 2002). Il convient de signaler que les données dont nous disposons actuellement sur les PUFs ne fournissent aucune indication sur leur toxicité.

V.5. Données hématologiques

Les études épidémiologiques indiquent que l'exposition à un niveau élevé de benzène est associée à une incidence plus élevée de leucémie (Guénel et al., 2002), ainsi que la fréquence plus élevée d'aberrations chromosomiques et des échanges de chromatides sœurs dans les lymphocytes circulants (Tsutsui et al., 1997). Récemment une enquête sur l'incidence du cancer au Bénin, a montré une augmentation de 6,8% à 15,4% du niveau de différents cancers (néoplasme, sang, neutropénie, lymphopénie), entre 1995 et 1999 (Adjagba, 2000). Ces résultats confortent nos données actuelles qui montrent l'état pathologique des hémogrammes de conducteurs de taxi-moto révélant une neutropénie, lymphopénie et une baisse du niveau des plaquettes sanguines (données à publier très

prochainement). Les travaux d'Adeothy-Koumakpaï et al., (2006), réalisés sur les enfants vendeurs d'essence illicite, révèlent les mêmes anomalies observées dans notre étude. Il est rapporté la présence des anomalies hématologiques comme : une hyperéosinophilie (65%), une lymphopénie (67%), une anémie arégénérative (52%) et une neutropénie (20%).

Contrairement à certaines études, nous n'avons pas noté une réduction du nombre d'hématies chez les sujets exposés par rapport aux témoins du village. Ceci serait probablement lié aux différences dans les niveaux d'exposition au benzène (plus faible dans l'air ambiant par rapport aux études menées en milieu professionnel).

Par ailleurs, nos résultats montrent une réduction du nombre de globules blancs, de plaquettes, d'éosinophiles et plus particulièrement du nombre de lymphocytes chez les conducteurs de taxi-moto par rapport aux sujets vivant en zone rurale. Ces données sont comparables à ceux rapportés par une récente étude conduite en Chine qui a montré une diminution importante des cellules sanguines, plus particulièrement les lymphocytes, globules blancs, granulocytes et plaquettes chez 250 sujets exposés à des niveaux de benzène < 1 ppm (soit 3.25 mg/m^3) par rapport aux 140 témoins non exposés (Lan et al., 2004). Cependant, Collins et al. (1997) n'ont trouvé aucune réduction du nombre de lymphocytes et bien d'autres paramètres de mesure d'hématotoxicité, comme le volume globulaire moyen, le nombre total de globules blancs, globules rouges, l'hémoglobine et des plaquettes chez des travailleurs exposés à une concentration moyenne de benzène de l'ordre de 0,55 ppm. Tsai et al. (2004) ont rapporté des résultats similaires dans une grande étude sur 1.200 employés exposés à une concentration moyenne de benzène de 0,60 ppm.

L'interprétation de ces discordances entre les études n'est pas simple, mais pourraient être liées à des différences dans les populations étudiées, les niveaux d'exposition, et surtout le métabolisme du benzène qui est influencé par un certain nombre de polymorphismes génétiques.

Les résultats obtenus sont aussi en accord avec une récente étude qui a montré une réduction significative du nombre de neutrophiles et plaquettes chez des travailleurs exposés au benzène (Schnatter et al., 2009). L'équipe de Shen et ses collaborateurs, (2008) ont aussi rapporté une diminution significative du nombre de ces cellules chez les sujets exposés au benzène par rapport à la population témoin.

Il convient de mentionner ici que malgré de nombreuses études, au cours de ces dernières décennies, sur l'exposition au benzène, le mécanisme exact par lequel le benzène induit l'hématotoxicité est encore mal élucidé. Cependant, il est généralement admis que le benzène peut exercer son effet toxique à travers sa biotransformation en métabolites toxiques, et que les dommages collatéraux occasionnés par ces métabolites dans l'ADN peuvent conduire à des aberrations chromosomiques (aneuploïdie, délétion, translocation, etc.) (Smith et al., 1996). Au cas où ces dommages ne sont pas réparés on peut assister à des transformations malignes. En outre, le benzène et ses métabolites, par exemple, Hydroquinone et para-Benzoquinone sont capables de former des adduits avec les protéines et l'ADN (Rappaport et al., 1996). Le benzène peut aussi exercer sa toxicité en provoquant le stress oxydatif, des cassures de l'ADN, dysfonctionnement du système immunitaire (Cho 2008). Il a été rapporté que le benzène inhibe la production de cytokine IL-1 qui est essentielle pour l'hématopoïèse (King et al., 1989).

V.6. Les biomarqueurs d'exposition et effets modulateurs de certains polymorphismes génétiques

Ils regroupent, le benzène urinaire non métabolisé, la S-APM urinaire, le 1-HOP et les anticorps anti-hydroquinone et para-benzoquinone.

Nos résultats montrent que le niveau de benzène non métabolisé est environ 10 fois plus élevé chez les sujets vivant à Cotonou par rapport aux habitants du village. Parmi les Cotonois, les habitants près du carrefour Marina ont le taux le plus élevé de benzène dans leur urine. Par ailleurs, chacun des quatre groupes (taxi-moto, carrefours, banlieue et village) ont des niveaux significativement différents de S-APM. Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par Qu et al., (2000) chez des employés Chinois travaillant dans une industrie de fabrication de colle et de chaussures, avec un niveau d'exposition au benzène de l'ordre de 98,9 mg/m³. Cependant, le niveau de S-APM chez les habitants de Cotonou est 2 fois plus élevé que chez les villageois de Sohon, suggérant l'existence d'autres systèmes de détoxification qui prendraient le relais à un niveau d'exposition plus élevée au benzène. Cette hypothèse est confortée par nos données sur l'analyse des polymorphismes des enzymes du système de détoxification montrant que les individus porteurs d'une délétion de GSTT1 avaient des taux d'excrétion plus faible de S-APM (Avogbe et al., 2005).

Le 1-HOP, couramment utilisée comme biomarqueur de HAPs, est plus élevée chez les conducteurs de taxi-moto que chez les personnes vivant au village (0,60±0,06 µmol / mol

créatinine versus $0,33 \pm 0,05 \mu\text{mol}$). Ces niveaux étaient plus élevés que ceux rapportés dans les études précédentes, par exemple à Bangkok (0,18; Ruchirawat et al., 2002) chez des travailleurs exposés aux émanations des moteurs diesel au Danemark (0,11; Nielsen et al., 1996) et chez les Danois à Copenhague (0,25; Autrup et al., 1999). Toutefois, les valeurs de Cotonou sont très faibles par rapport au niveau de 1-HOP rapporté chez des travailleurs potentiellement exposés à de forts niveaux de HAPs (5,53; Øvrebø et al., 1995). Nous avons observé un niveau nettement plus faible de 1-HOP chez un expatrié Européen vivant dans un quartier résidentiel de Cotonou. Cela s'explique par le fait que le mode de vie africain est un important contributeur d'exposition au pyrène, par exemple l'alimentation ou la préparation des aliments. Il a été démontré précédemment que les aliments constituent une source importante de pyrène (Knize et al., 1999).

Les concentrations des anticorps anti-métabolites de benzène (HQ et BQ) sont significativement plus élevées chez les taxi-moto que chez les témoins de la banque de sang ($0,25 \pm 0,009$ pour taxi-moto versus $0,08 \pm 0,002$ pour la banque de sang). Ces résultats sont comparables à ceux rapportés par Dimitrova et al., (2005) dans une cohorte de travailleurs d'une industrie de pétrochimie ($0,285 \pm 0,141$ chez les sujets exposés à $4,6 \text{ mg/m}^3$ de benzène versus $0,046 \pm 0,019$ chez les témoins). Mais les niveaux d'exposition au benzène sont significativement plus élevés dans la cohorte de Dimitrova que dans celle de Cotonou. Par ailleurs nos résultats montrent une différence significative de concentration d'anticorps anti HQ et BQ en fonction de la durée d'exposition journalière chez les taxi-moto avec une corrélation statistiquement significative. Ces résultats sont en désaccord avec ceux de Dimitrova ne révélant aucune corrélation significative en terme de nombre d'années d'expérience et les concentrations d'anticorps anti HQ et BQ, suggérant qu'à un niveau d'exposition beaucoup plus fort, d'autres mécanismes incluant les enzymes de détoxification pourraient influencer sur le niveau plasmatique des anticorps anti HQ et BQ. En revanche Dimitrova a obtenu une corrélation significative entre le niveau des anticorps HQ et BQ et l'excrétion d'acide trans muconique.

V.7. Les biomarqueurs d'effets biologiques

En général, les altérations dans l'ADN des sujets vivant à Cotonou sont beaucoup plus importantes pour tous les biomarqueurs d'effets analysés à savoir : cassures de brins (CB) d'ADN, sites de bases modifiées reconnues par la FPG, la fragmentation d'ADN, la 8-oxo-guanosine, et les adduits d'ADN.

Comme il est indiqué dans la section résultats, les cassures de brins d'ADN sont plus élevées chez les habitants de Cotonou par rapports à ceux du village. La régression linéaire montre des corrélations positives entre CB et Log S-APM ($r = 0,17$) et entre les sites sensibles FPG et log S-APM ($r = 0,25,$) indiquant des associations significatives entre l'exposition au benzène et les dommages mesurés dans l'ADN. Nous avons trouvé une corrélation positive entre l'excrétion urinaire de S-APM et les CB d'ADN chez les sujets hétérozygotes ou mutés pour NQO1, alors que la corrélation entre log S-APM et le niveau de FPG dans l'ADN est indépendante du génotype de NQO1. Il n'y avait aucune différence dans le niveau de CB entre les conducteurs de taxi-moto et les résidents près des carrefours très pollués, bien que ces deux groupes aient des taux élevés de CB par rapport aux sujets habitant la zone rurale. Ce manque de rapport dose - réponse avec des niveaux d'exposition plus élevés au benzène ambiant ne peut s'expliquer par la saturation dans la quantification des dommages dans l'ADN par la technique des comètes ou par la distribution des polymorphismes de NQO1. En effet, il a déjà été démontré auparavant chez des sujets vivant en milieu urbain à Copenhague, au Danemark, qu'une exposition à faible dose de benzène était associée à une corrélation positive entre l'excrétion urinaire de S-APM et le niveau de la 8-oxodG dans les lymphocytes circulants, alors qu'aucune corrélation n'a été observée avec le niveau de CB (Sorensen et al., 2003b). Considérant le fait que les niveaux de CB étaient légèrement différents entre les sujets de Cotonou dans la présente étude, malgré le niveau d'exposition au benzène plus élevé à Cotonou, le manque d'effet observé à Copenhague pourrait être lié à une exposition au dessous de la limite de détection de ce biomarqueur. Des résultats similaires ont été rapportés chez des sujets à Rome, en Italie, où le niveau d'exposition au benzène et aux particules n'était pas associé à des différences dans le niveau de CB des lymphocytes (Carere et al., 2002). Toutefois, les travailleurs d'une station d'essence professionnellement exposés à $300 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de benzène ont des niveaux significativement plus élevés de CB dans leur ADN par rapport aux témoins non- exposés au benzène (Andreoli et al., 1997).

En utilisant une courbe de calibration adoptée par le comité européen de normalisation des dommages dans l'ADN, nous avons pu calculer le nombre moyen de sites sensibles à la FPG grâce aux modifications par cellule diploïde (ADN de PM de $4 \cdot 10^{12}$ Dalton). Ainsi nous avons obtenu respectivement 650 ± 160 ; 1110 ± 188 , 1250 ± 198 et 1620 ± 310 chez les sujets habitant le village, la banlieue, les habitants résidant aux abords des carrefours très pollués et les conducteurs de taxi-moto. Ces estimations sont similaires aux valeurs rapportées dans une étude utilisant les lymphocytes, soit 870 lésions/cellule (Collins et al., 1997), 1100 lésions /

cellule (0,28 lésions/ 10^9 Dalton) (Collins et al., 1996), 1375 lésions /cellule (0,23 lésions/ 10^6 bp) (Merzenich et al., 2001), 1440 lésions / cellule (0,24 lésions / 10^6 pb) (Pflaum et al., 1997) et 3500 lésions / cellule (1,33 lésions/ 10^6 pb) (Gedik et al, 2002). Ces données indiquent que le niveau de dommages oxydatifs de l'ADN rapportés dans cette étude est dans la fourchette des valeurs fournies par de nombreux laboratoires utilisant l'ADN des lymphocytes ces dernières années.

Il a été démontré que l'exposition aux composés xénobiotiques est associée à une oxydation de la 2'-désoxyguanosine, produisant en particulier de la 8-oxodG (Sørensen et al., 2003b). Nos résultats montrent que les conducteurs de taxi-moto présentaient le niveau de 8-oxodG le plus élevé ($2,05 \pm 1,25 / 10^5$ dG) par rapport aux villageois de Sohon ($1,11 \pm 0,82 / 10^5$ dG). Cependant, ce niveau de la 8-oxodG est plus faible que celui observé chez des charpentiers exposés aux fumées d'asphalte (12,4-15,7 / 10^5 dG ; Toraason et al., 2001). Ces résultats sont confirmés par une étude récente qui a montré l'augmentation des niveaux de coupures de brins (CSB et CDB) et de 8-oxodG chez des travailleurs d'une industrie de pétrochimie en situation de co-exposition au benzène et HAPs par rapport à leur population témoin (Ruchirawat et al., 2009). Par ailleurs, il convient de noter que les niveaux de 8-oxodG observés dans cette étude sont plus élevés que le niveau basal recommandé par le consortium ayant travaillé sur les niveaux de référence des dommages oxydatifs dans l'ADN des lymphocytes humains (ESCODD, 2003).

Par ailleurs, nos résultats montrent que les niveaux d'adduits d'ADN sont significativement plus élevés chez les habitants de la ville de Cotonou, par exemple les conducteurs de taxi- moto, les sujets habitant près des carrefours, les vendeurs ambulants et les vendeurs d'essence par rapport aux habitants des zones rurales, ce qui confirme de manière évidente leurs niveaux d'exposition plus élevés aux polluants génotoxiques dans l'air ambiant à Cotonou. De plus, le fort niveau d'adduits observé chez les vendeurs de carburant pourrait être expliqué par l'exposition concomitante aux HAPs générés à la fois par le trafic automobile et aux HAPs provenant des vapeurs d'essence. Puisque la formation des adduits constitue un point de départ pour le développement de cancer, il devient évident que les populations les plus exposées de Cotonou, notamment les vendeurs de carburants présentent un risque élevé de développer, à long terme, des maladies pulmonaires incluant le cancer de poumon.

En quantifiant les niveaux d'exposition aux HAPs chez les vendeurs de viande grillée et des vendeurs de vêtements de Bangkok, Ruchirawat et al., (2005) ont fait la même observation que nous, à savoir que le niveau des adduits d'ADN était plus élevé chez les vendeurs de viande grillée. Globalement, nos résultats sont en accord avec de nombreuses études qui ont indiqué une augmentation des niveaux d'adduits à l'ADN chez les populations exposées à l'air pollué (Farmer et al., 2003 ; Singh et al., 2007). Il a été rapporté chez des policiers travaillant dans les rues de Prague un niveau d'adduits significativement plus élevé que les témoins non exposés (Binkova et al., 2007). Par ailleurs, Autrup et ses collaborateurs (1999) avaient déjà fait le même constat que l'équipe de Binkova entre des chauffeurs de bus Danois de Copenhague et ceux conduisant en direction de la banlieue ou en milieu rural. Mais il est important de signaler que le niveau d'adduits à l'ADN observé chez les chauffeurs Danois de Copenhague ($75,4$ adduits/ 10^8 nucléotides) était trois fois supérieur à celui que nous rapportons chez les conducteurs de taxi-moto circulant dans la ville de Cotonou ($24,6$ adduits/ 10^8 nucléotides). Bien que non encore identifié, l'adduit observé dans cette étude serait celui généré par les HAPs, un des polluants majeurs retrouvé à forte concentration dans l'air à Cotonou.

Sans réparation, les adduits d'ADN engendrent une mutation ou une apoptose cellulaire. Par conséquent les polymorphismes génétiques dans les gènes impliqués dans les processus de détoxification peuvent moduler les niveaux d'adduits d'ADN. Mais les données de la littérature ont rapporté des résultats conflictuels concernant l'influence de polymorphismes génétiques de certains gènes, dans la formation des adduits d'ADN. Par exemple Garte et al., (2007) ont trouvé une association entre l'inactivation de la glutathion-S-transférase (GST) et la formation d'adduits par les HAP, mais d'autres études n'ont pas pu confirmer cette observation (Peluso et al., 2004 ; Ruchirawat et al., 2007).

VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Nos résultats montrent clairement que l'air à Cotonou est d'une "qualité" médiocre. L'air à Cotonou contient une forte concentration de benzène ($76\mu\text{g}/\text{m}^3$) largement au-dessus de la limite de $5\mu\text{g}/\text{m}^3$ recommandée par l'OMS, taux de benzène dans l'air en relation avec le taux de benzène dans le carburant vendu au Bénin (4,39% contre 0,68% dans l'essence sans plomb de France). De plus l'absence de l'éthyl tertio butyl éther (ETBE), composé qui permet une bonne combustion) dans l'essence mise en consommation au Bénin, entraîne l'augmentation de l'émission des hydrocarbures aromatiques et du monoxyde de carbone dans l'air ambiant. De plus l'utilisation des vieux véhicules en mauvais état mécanique ne fait qu'aggraver l'émission des hydrocarbures (HAPs) ($103,3\text{ ng}/\text{m}^3$) qui s'associent aux particules ultrafines (PUFs) ($166816\text{ particules}/\text{cm}^3$) pour engendrer un impact néfaste sur la santé des populations cibles. En zone rurale les concentrations de ces mêmes polluants sont très faibles (benzène : $3,4\mu\text{g}/\text{m}^3$, HAPs : $1,55\text{ ng}/\text{m}^3$, PUFs : $5276\text{ particules}/\text{cm}^3$).

Les différents biomarqueurs examinés montrent une forte association avec les niveaux des polluants dans l'air ambiant : benzène urinaire en $\mu\text{mol}/\text{mole}$ de créatine (conducteurs de taxi-moto - 0,204, résidents carrefour St Michel - 0,217, résidents carrefour Marina - 0,791, villageois - 0,165) ; acide S-phénylmercapturique en $\mu\text{mol}/\text{mole}$ de créatine (conducteurs de taxi-moto - 9,3, résidents carrefour St Michel - 7,0, résidents carrefour Marina - 6,8, villageois - 4,2) ; 1-hydroxypyrene en $\mu\text{mol}/\text{mole}$ de créatine (conducteurs de taxi-moto - 0,33, résidents carrefour St Michel - 0,42, résidents carrefour Marina - 0,60, villageois - 0,33). En effet, les habitants de Cotonou (conducteurs de taxi-moto, résidents des carrefours) présentent des niveaux élevés pour tous les biomarqueurs d'exposition analysés par rapport aux villageois. Nos résultats démontrent aussi que les niveaux des biomarqueurs d'effets biologiques sont significativement plus élevés chez les populations de Cotonou par rapport aux villageois : nombre d'adduits/ 10^8 nucléotides (conducteurs de taxi-moto - 24,6, résidents carrefours - 23,7, villageois - 3,1) ; taux de 8-hydroxy-désoxyguanosine/ 10^5 désoxyguanosine (conducteurs de taxi-moto - 2,05, villageois - 1,11).

La suite de nos travaux consistera à :

- identifier l'adduit majeur observé dans cette étude,
- à étudier la toxicité particules ultrafines par stimulation des cellules en culture.
- analyser les gènes impliqués dans les processus de réparation de l'ADN dans la population.

Le gouvernement du Bénin a opté depuis l'an 2000 à l'essence sans plomb. Certes, c'est une bonne initiative, mais il faut s'intéresser aussi au taux de l'ETBE pour savoir s'il s'évapore pendant le transport ou au cours du stockage, ou si c'est depuis la fabrication que le carburant en est dépourvu.

Notre étude s'est focalisée sur l'impact de la pollution atmosphérique sur la santé des populations exposées, et a montré les différents dommages qu'elle peut engendrer dans l'organisme (modification des bases, cassures de brin et formation d'adduits d'ADN). Ces modifications sur le génome peuvent engendrer des affections (respiratoires, cardiovasculaires, cancéreuses, etc.) qui sont en partie responsables de l'absentéisme au travail et de la réduction de l'espérance de vie. La pollution atmosphérique a donc une incidence directe sur l'économie voire le développement, car l'homme est à la base de tout développement. De nombreuses études ont montré que la pollution atmosphérique affecte non seulement les hommes, mais tous les êtres vivants, le climat, l'agriculture, les monuments touristiques, en somme une bonne partie de l'économie. Le gouvernement du Bénin est sensible aux problèmes de cette pollution atmosphérique et a estimé dans une étude sur la qualité de l'air à Cotonou, à 3,2% du Produit Intérieur Brut (PIB) de Cotonou et à 1,2% du PIB de tout le pays, le coût de la pollution atmosphérique (Initiative in Sub-Saharan African City Benin: Ministère de l'Environnement et de la Protection de la Nature, 2007).

Cette étude permettra aussi de part la vulgarisation de ses résultats sur la santé avec son cortège de maladies graves (cardio-pulmonaires, allergiques, cancéreuses et sur la fécondité) de mieux sensibiliser les habitants de Cotonou ou plutôt du Bénin voire de la sous région aux conséquences néfastes de la pollution afin qu'ils adhèrent aux mesures de lutte contre la pollution atmosphérique prises par les pouvoirs publics.

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas, I., Saint-Georges, F., Billet, S., Verdin, A., Mulliez, P., Shirali, P., Garcon, G., 2009. Air pollution particulate matter (PM_{2.5})-induced gene expression of volatile organic compound and/or polycyclic aromatic hydrocarbon-metabolizing enzymes in an in vitro coculture lung model. *Toxicol. In vitro* 23:37–46.
- ADEME., 1996. Définition de la pollution atmosphérique www.ademe.fr/midi-pyrenees/a_4_01.html
- Adeothy, K., Fayomi, B., Lalya, F., Sagbo, G.G., D'Almeida, M., Anjorin, A., 2006. Impact de la vente libre du carburant sur la santé des enfants au Bénin. *Sci. Med.* 4:59-61.
- Adjagba, M.P.D., 2000. Contribution à l'étude épidémiologique des cancers en République du Bénin Thèse de Doctorat en Médecine à l'Université Nationale du Bénin. N°. 868.
- Anderson, D., Yu, T.W., Browne, M.A., 1997. The use of the same image analysis system to detect genetic damage in human lymphocytes treated with doxorubicin in the Comet and fluorescence in situ hybridisation (FISH) assays. *Mutat. Res.* 390:69–77.
- Andreoli, C., Leopardi, P., and Crebelli, R., 1997. Detection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gel electrophoresis after exposure to benzene or benzene metabolites. *Mutat. Res.* 377:95-104.
- Autrup, H., 2000. Genetic polymorphisms in human xenobiotic-metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat. Res.* 464:65–76.
- Autrup, H., Daneshvar, B., Dragsted, L.O., Gamborg, M., Hansen, M., Loft, S., Okkels, H., Nielsen, F., Nielsen, P.S., Raffn, E., Wallin, H., Knudsen, L.E., 1999. Biomarkers for exposure to ambient air pollution--comparison of carcinogen-DNA adduct levels with other exposure markers and markers for oxidative stress. *Environ Health Perspect.* 107(3):233-8.
- Avogbe, P.H., Ayi-Fanou, L., Autrup, H., Loft, S., Fayomi, B., Sanni, A., Vinzents, P., and Møller, P., 2005. Ultrafine particulate matter and high-level benzene urban air pollution in relation to oxidative DNA damage. *Carcinogenesis* 26:613–20.
- Ayi-Fanou, L., Mobio, T.A., Creppy, E.E., Fayomi, B., Fustoni, S., Møller, P., Kyrtopoulos, S., Georgiades, P., Loft, S., Sanni, A., Skov, H., Øvrebø, S., Autrup, H., 2006. Survey of air pollution in Cotonou, Benin—air monitoring and biomarkers. *Sci. Total Environ.* 358 (1–3):85–96.
- Bahrami, A.R., 2001. Distribution of volatile organic compounds in ambient air of Tehran. *Arch Environ Health* 56(4):380–3.
- Baumbach, G., Vogt, U., Hein, K.R.G., Oluwole, A.F., Ogunsola, O.J., Olaniyi, H.B.,

Akeredolu, F.A., 1995. Air pollution in a large tropical city with a high traffic density: results of measurements in Lagos, Nigeria. *Sci. Total Environ.* 169:25–31.

Begleiter, A., Hewitt, D., Maksymiuk, A.W., Ross, D.A., Bird, R.P., 2006. A NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 polymorphism is a risk factor for human colon cancer, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15:2422–26.

Benhamou, S., Lee, W.J., Alexandrie, A.K., Boffetta, P., Bouchardy, C., Butkiewicz, D., Brockmöler, J., Clapper, M., Daly, A., Dolzan, V., Ford, J., Gaspari, L., Haugen, A., Hirvonen, A., Husgafvel-Pursiainen, K., Ingelman-Sundberg, M., Kalina, L., Kihara, M., Kremers, P., Lemarchand, L., London, S., Nazar-Stewart, V., Onon-Kihara, M., Rannug, A., Romkes, M., Ryberg, D., Seidegard, J., Shields, P., Stang, R., Stücker, I., To-Figueras, J., Brennan, P., Taioli, E., 2002. Meta and pooled analyses of the effects of glutathione S-transferase M1 polymorphisms and smoking on lung cancer risk. *Carcinogenesis*, 23:1343-50
Erratum in: *Carcinogenesis* 23(10):1771.

Bernardini, S., Hirvonen, A., Pelin, K., Norppa, H., 1998. Induction of sister chromatid exchange by 1,2-epoxy-3-butene in cultured human lymphocytes: influence of GSTT1 genotype, *Carcinogenesis* 19:377–80.

Billet, S., Abbas, I., Le Goff, J., Verdin, A., Andrè, V., Lafargue, P.E., Hachimi, A., Cazier, F., Sichel, F., Shirali, P., Garçon, G., 2008. Genotoxic potential of polycyclic aromatic hydrocarbons-coated onto airborne particulate matter (PM_{2.5}) in human lung epithelial A549 cells. *Cancer Lett.* 270:144–55.

Binkova, B., Chvatalova, I., Lnenickova, Z., Milcova, A., Tulupova, E., Peter, B., Farmer, P.B., Sram, R.J., 2007. PAH-DNA adducts in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair gene polymorphisms. *Mutat. Res.* 620:49–61.

Binková, B., Veselý, D., Veselá, D., Jelínek, R., and Šrám, R. J., 1999. Genotoxicity and embryotoxicity of urban air particulate matter collected during winter and summer period in two different districts of the Czech Republic. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 440:45-58.

Binková, B., Leníček, J., Benes, I., Vidová, P., Gajdos, O., Fried, M., Srám, R.J., 1998. Genotoxicity of coke-oven and urban air particulate matter in in vitro acellular assays coupled with ³²P-postlabeling and HPLC analysis of DNA adducts. *Mutat. Res.* 414(1-3):77-94.

Boffetta, P., Jourenkova, N., Gustavsson, P., 1997. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, *Cancer Causes Control* 8 (3):444–72.

Bono, R., Seursatone, E., Schiliro, T., Gilli, G., 2003. Ambient air levels and occupational exposure to benzene, toluene, and xylenes in north-western Italy. *J. Toxicol. Environ. Health* 66:519–31.

Brook, R.D., Franklin, B., Cascio, W., Hong, Y., Howard, G., Lipsett, M., Luepker, R., Mittleman, M., Samet, J., Smith, S.C., Tager, I., 2004. Expert panel on population and prevention science of the American health association, air pollution and cardiovascular disease a statement for healthcare professionals from the expert panel on population and prevention science of the American hearth association. *Circulation* 109:2655–71.

Brunekreef, B., Holgate, B., 2002. Air pollution and health. *Lancet* 360, 1233–42.

Carere, A., Andreoli, C., Galati, R., Leopardi, P., Marcon, F., Rosati, M.V., Rossi, S., Tomei, F., Verdina, A., Zijno, A., Crebelli, R., 2002. Biomonitoring of exposure to urban air pollutants: analysis of sister chromatid exchanges and DNA lesions in peripheral lymphocytes of traffic policemen. *Mutat. Res.* 518:215-24.

Carere A., A. Antoccia, R., Crebelli, F., Degrassi, M., Fiore, I., Iavarone, G., Isacchi, S., Lagorio, P., Leopardi, F., Marcon, F., Palitti, C., Tanzarella, A., Zijno., 1995. Genetic effects of petroleum fuels: cytogenetic monitoring of gasoline station attendants, *Mutation Res.* 332:17–26.

Carrieri, M., Tranfo, G., Pigni, D., Paci, E., Salamon, F., Scapellato, M.L., Fracasso, M.E., Manno, M., Bartolucci, G.B., 2009. Correlation between environmental and biological monitoring of exposure to benzene in petrochemical industry operators. *Toxicol Lett.* In Press.

Carrieri, M., Bonfiglio, E., Scapellato, M.L., Maccà, I., Tranfo, G., Faranda, P., Paci, E., Bartolucci, G.B., 2006. Comparison of exposure assessment methods in occupational exposure to benzene in gasoline filling-station attendants. *Toxicol. Lett.* 162(2-3):146-52.

Castano-Vinyals, G., D'Errico, A., Malats, N., and Kogevinas, M., 2004. Biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental air pollution. *Occup. Environ. Med.* 61:12.

Chen, B., Cao, L., Zhou, Y., Yang, P., Wan, H.W., Jia, G.Q., Liu, L., Wu, X.T., 2009. Glutathione S-Transferase T1 (GSTT1) Gene Polymorphism and Gastric Cancer Susceptibility: A Meta-Analysis of Epidemiologic Studies. *Dig Dis Sci.* In Press

Chen, H., Lum, A., Seifried, A., Wilkens, L.R., Le Marchand, L., 1999. Association of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase 609C->T polymorphism with a decreased lung cancer risk, *Cancer Res.* 59:3045–48.

Cho, J.Y. 2008. Suppressive effect of hydroquinone, a benzene metabolite, on in vitro inflammatory responses mediated by macrophages, monocytes, and lymphocytes. *Mediat. Inflamm.* 298-10.

Claxton, L.D., Matthews, P.P., Warren, S.H., 2004. The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: salmonella mutagenicity. *Mutat. Res.* 567:347–99.

- Collins, A.R., Dusinská, M., Horváthová, E., Munro, E., Savio, M., Stětina, R., 2001. Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured in vitro with the comet assay. *Mutagenesis* 16(4):297-01
- Collins, A.R., Duthie, S.J., Fillon, L., Gedik, C.M., Vaughan, N., and Wood, S.G., 1997. Oxidative DNA damage in human cells: the influence of antioxidants and DNA repair. *Biochem. Soc. Trans.* 25:326-31.
- Collins, A.R., Duthie, S.J., Dobson, V.L., 1993. Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14:1733–35.
- Cunningham, J.M., Hebring, S.J., McDonnell, S.K., Cicek, M.S., Christensen, G.B., Wang, L., Jacobsen, S.J., Cerhan, J.R., Blute, M.L., Schaid, D.J., Thibodeau, S.N., 2007. Evaluation of genetic variations in the androgen and estrogen metabolic pathways as risk factors for sporadic and familial prostate cancer, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 16: 969–78.
- Da Silva, R., Cataluna, R., Menezes, E.W.D., Samios, D., Piatnicki, C.M.S., 2005. Effect of additives on the antiknock properties and Reid vapor pressure of gasoline. *Fuel.* 84 (7-8):951-59.
- Declercq, C., 2009. Pollution atmosphérique (2) : données épidémiologiques DIU Tox Med www.centres-antipoison.net/.../C_Declercq_Pollution_atmospherique_2_DIU_Tox_Med_2009_2010.pdf -
- De Kok, T.M.C.M., Driee, A.L., Hogervorst, J.G.F., Briedè, J.J., 2006. Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter a review of recent studies. *Mutat. Res.* 613:103–22.
- Delfino, R.J., Staimer, N., Thomas, T., Daniel, L., Gillen, A., Polidori, M., Arhami, M.T., Kleinman, N. D., Vaziri, J.L., and Constantinos, S., 2009. Air Pollution Exposures and Circulating Biomarkers of Effect in a Susceptible Population: Clues to Potential Causal Component Mixtures and Mechanisms. *Environ. Health Perspectives* 117(8):1232-38.
- Dimitrova, N.D., Kostadinova, R.Y., Marinova, S.N., Popov, T.A., Panev. T.I., 2005. Specific immune responses in workers exposed to benzene. *Int. Immunopharmacol.* 5(10):1554-59.
- Dipple, A., Moschel, R.C., Bigger, C.A.H., 1984. Polynuclear aromatic carcinogens. In: Searle, C.E. (Ed.), *Chemical Carcinogens*, ACS Monograph, vol. 182. American Chemical Society Press, Washington DC 41–163.
- Ducos, P., Gaudin, R., Robert, A., Francin, J.M., Maire, C., 1990. Improvement in HPLC analysis of Urinary trans,trans-muconic acid, a promising substitute for phenol in the assessment of benzene exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 62:529-34.

- ESCODD., 2003. (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). Comparative analysis of baseline 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: an approach to consensus. *Carcinogenesis* 23:2129–33.
- Farmer, P.B., Singh, R., Kaur, B., Sram, R.J., Binkova, B., Kalina, I., Popov, T.A., Garte, S., Taioli, E., Gabelova, A., Cebulska-Wasilewska, A., 2003. Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* 544:397–02.
- Franklin, M., Schwartz, J., Koutrakis, P., 2008. The role of particle composition on the association between PM_{2.5} and mortality. *Epidemiology* 19:680–89.
- Fustinoni, S., Giampiccolo, R., Pulvirenti, S., Buratti, M., Colombi, A., 1999. Headspace solid-phase microextraction for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in urine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 723(1-2):105-15.
- Gábelová, A., Valovicřová, Z., Horváthová, E., Slamenová, D., Binková, B., Srám, R.J., Farmer, P.B., 2004. Genotoxicity of environmental air pollution in three European cities: Prague, Kosice and Sofia. *Mutat. Res.* 563:49–59.
- Garte, S., Taioli, E., Raimondi, S., Paracchini, V., Binkova, B., Sram, R.J., Kalina, I., Popov T.A., Singh, R., Farmer, P.B., 2007. Effects of metabolic genotypes on intermediary biomarkers in subjects exposed to PAHS: Results from the EXPAH study. *Mutat. Res.* 620:7-15.
- Garte, S., Gaspari, L., Alexandrie, A.K., Ambrosone C., Autrup, H., 2001. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10:1239-48
- Gedik, C.M., Boyle, S.P., Wood, S. G., Vaughan, N.J., and Collins, A.R., 2002. Oxidative stress in humans: validation of biomarkers of DNA damage. *Carcinogenesis* 23:1441-46.
- Georgiadis, P., Demopoulos, N.A., Topinka, J., Stephanou, G., Stoikidou, M., Bekyrou, M., Katsouyianni, K., Sram, R., Autrup, H., Kyrtopoulos, S.A., 2004. Impact of phase I or phase II enzyme polymorphisms on lymphocyte DNA adducts in subjects exposed to urban air pollution and environmental tobacco smoke. *Toxicol. Lett.* 149(1-3):269-80.
- Guénel, P., Imbernon, E., Chevalier, A., Crinquand-Clastreng, A., Goldberg, M., 2002. Leukemia in relation to occupational exposures to benzene and other agents: a case-control study nested in a cohort of gas and electric utility workers. *Am. J. Ind. Med.* 42:87– 97.
- Guibet J.C., 1998. Carburants liquides, *Techniques de l'Ingénieur*. réf. BE8545.

- Halliwell, B., Gutteridge, J. M., Cross, C. E., 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now?. *J. Lab. Clin. Med.* 119:598-620.
- Hayes, R.B., Songnian, Y., Dosemeci, M., and Linet, M., 2001. Benzene and lymphohematopoietic malignancies in humans. *Am. J. Ind. Med.* 40:117-26
- Hemminki, K., Dickey, C., Karlsson, S., Bell, D., Hsu, Y., Tsai, W.-Y., Mooney, L.A., Savela, K., Perera, F.P., 1997. Aromatic DNA adducts in foundry workers in relation to exposure, life style and CYP1A1 and glutathione transferase M1 genotype. *Carcinogenesis* 18:345–50.
- Hsieh, L.L., Liou, S.H., Chiu, L.L., Chen, Y.H., 1999. Glutathione Stransferase (GST) M1 and GST T1 genotypes and hematopoietic effects of benzene exposure. *Arch. Toxicol.* 73:80-2.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 1974. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man. Geneva: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 2006. Air Pollution, Part 1. Some Nonheterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Industrial Exposures Summaries and Evaluations. 92:18.
- Initiative in Sub-Saharan African City Benin: Ministère de l'Environnement et de la Protection de le Nature. Etude de la qualité de l'air à Cotonou, Novembre 2007
- Iskander ,K., Jaiswal, A.K., 2005. Quinone oxidoreductases in protection against myelogenous hyperplasia and benzene toxicity. *Chem. Biol. Interact.* 153-154:147-57
- Jongeneelen, F.J., Anzion, R.B., Henderson, P.T., 1987. Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *J. Chromatogr.* 413:227-32.
- Kelvin, E.A., Edwards, S., Jedrychowski, W., Schleicher, R.L., Camann, D., Tang, D., Perera, F.P., 2009. Modulation of the effect of prenatal PAH exposure on PAH-DNA adducts in cord blood by plasma antioxidants. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18(8):2262-8.
- Kim, S.Y., Choi, J.K., Cho, Y.H., Chung, E.J., Paek ,D., Chung, H.W., 2004. Chromosomal aberrations in workers exposed to low levels of benzene: association with genetic polymorphisms, *Pharmacogenetics* 14(7):453–63.
- King, A.G., Landreth, K.S., Wierda, D., 1989. Bone marrow stromal cell regulation of b-lymphopoiesis. II. Mechanisms of hydro-quinone inhibition of pre-b cell maturation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 250:582-90.
- Knaapen, A.M., Shi, T., Borm, P.J.A., Shins, R.F.P., 2004. Inhaled particles and lung cancer Part. A. Mechanisms. *Int. J. Cancer* 109:799–09.

- Knaapen, A.M., Shi, T., Borm, P.J.A., Schins, R.F.P., 2002. Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol. Cell. Biochem.* 234/235:317–26.
- Knize, M.G., Salmon, C.P., Pais, P., Felton, J.S., 1999. Food heating and the formation of heterocyclic aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons mutagens/carcinogens. *Adv. Exp. Med. Biol.* 459:179–93.
- Kolmetz, Gentry., 2007. Guidelines for BTX Revamps, AIChE Spring Conference.
- Kristin, A.M., David, S.S., Lianne, S., Kristen, S., Jeffrey, H.S., Garnet, L.A., Joel, D.K., 2007. Long-Term Exposure to Air Pollution and Incidence of Cardiovascular Events in Women. *N Engl J Med* 356:447-58.
- Kuehl, B.L., Paterson, J.W., Peacock, J.W., Paterson, M.C., Rauth, A.M., 1995. Presence of a heterozygous substitution and its relationship to DT-diaphorase activity. *Br. J. Cancer* 72:555–61.
- Kyrtopoulos, S.A., Georgiadis, P., Autrup, H., Demopoulos, N.A., Farmer, P., Haugen, A., Katsouyanni, K., Lambert, B., Ovrebo, S., Sram, R., Stephanou, G., Topinka, J., 2001. Biomarkers of genotoxicity of urban air pollution. Overview and descriptive data from a molecular epidemiology study of populations exposed to moderate-to-low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons: the AULIS project. *Mutat. Res.* 496:207–28.
- Lan, Q., Zhang, L., Li, G., Vermeulen, R., Weinberg, R.S., Dosemeci, M., Rappaport, S.M., Shen, M., Alter, B., Wu, Y., Kopp, W., Waidyanatha, S., Rabkin, C., Guo, W., Chanock, S., Hayes, R.B., Linet, M., Kim, S., Yin, S., Rothman, N., Smith, M.T., 2004. Hematotoxicity in Workers Exposed to Low Levels of Benzene. *Science*, 306: 1774-76.
- Lee, C.Y., Lee, J.Y., Kang, J.W., and Kim, H., 2001. Effects of genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 on the urinary levels of 1-hydroxypyrene and 2-naphthol in aircraft maintenance workers. *Toxicol. Lett.*, 123:115-24.
- Leong, S.T., Muttamara, S., Laortanakul, P., 2002. Influence of benzene emission from motorcycles on Bangkok air quality. *Atmos. Environ.* 36:651–61.
- Maitre, A., Soulat, J.M., Masclet, P., Stoklov, M., de Gaudemari, R., 2002. Exposure to carcinogenic air pollutants among policemen working close to traffic in an urban area. *Scand. J. Work Environ. Health* 28:402–10.
- Mannervick, B., 1985. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv. Enzymol.* 57:357-17.

- Menichini, E., 1992. Urban air pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons: levels and sources of variability. *Sci Total Environ.* 116:109–35.
- Merzenich, H., Hartwig, A., Ahrens, W., Beyersmann, D., Schlepegrell, R., Scholze, M., 2001. Biomonitoring on carcinogenic metals and oxidative DNA damage in a cross-sectional study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10:515–22.
- Meyer, D.J., Coles, B., Pemble, S.E., Gilmore, K.S., Fraser, G.M., and Ketterer, B., 1991. Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man. *Biochem. J.* 274:409-14.
- Møller, P., Knudsen, L.E., Loft, S., Wallin, H., 2000. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factor. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10:1005-15.
- Moran, J.L., Siegel, D., Ross, D., 1999. A potential mechanism underlying the increased susceptibility of individuals with a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) to benzene toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:8150-55.
- Motykiewicz, G., Michalska, J., Pendzich J., Malusecka, E., Strozyk, M., Kalinowska, E., Butkiewicz, D., Mielzynska, D., Midro, A., Santella, R.M., Chorazy, M.A., 1998. Molecular epidemiology study in women from upper Silesia, Poland. *Toxicol. Lett.* 96/97:195–02.
- MSS (Ministère de la Santé et des Sports), 2000. Politiques publiques, pollution atmosphérique et santé : poursuivre la réduction des risques. Juin.
- Muller, R., Rajewsky, M.F., 1978. Sensitive radiomunoassay for detection of O6-ethyldeoxyguanosine in DNA exposed to the carcinogen ethylnitrosourea in vivo or in vitro. *Z Naturforsch* 33:897-01
- Nadim, F., Zack, P., Hoag, G.E., Liu, S., 2001. United States experience with gasoline additives. *Energy Policy* 29:1–5.
- Nielsen, P.S., de Pater, N., Okkels, H., and Autrup, H., 1996. Environmental air pollution and DNA adducts in Copenhagen bus drivers: effect of GSTM1 and NAT2 genotypes on adduct levels. *Carcinogenesis*, 17:1021–27.
- Olive, P.L., Banath, J.P., Durand, R.E. J., Nat, I., 1990. Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual Chinese hamster cells. *Cancer Inst.* 82:779–83.
- Olsson, M., Petersson, G., 2003. Benzene emitted from glowing charcoal. *Sci. Total Environ.* 303:215–20.

- Ortiz, E., Alemon, E., Romero, D., Arriaga, J.L., Olaya, P., Guzman, F., Rios, C., 2002. Personal exposure to benzene, toluene and xylene in different microenvironment at the Mexico city metropolitan zone. *Sci Total Environ* 287:241–8.
- Ostling, O., and Johanson, K.J., 1984. Study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun. Microelectrophoretic.* 123: 291–98.
- Ovrebø, S., Haugen, A., Farmer, P.B., Anderson, D., 1995. Evaluation of biomarkers in plasma, blood, and urine samples from coke oven workers: significance of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Occup. Environ. Med.* 52(11):750-6.
- Palli, D., Russo, A., Masala, G., Saieva, C., Guarrera, S., Carturan, S., Munnia, A., Matullo, G. and Peluso, M., 2001. DNA adduct levels and DNA repair polymorphisms in traffic-exposed workers and a general population sample. *Int. J. Cancer* 94:121–27.
- Peluso, M., Munnia, A., Hoek, G., Krzyzanowski, M., Veglia, F., Airoidi, L., Autrup, H., Dunning, A., Garte, S., Hainaut, P., Malaveille, C., Gormally, E., Matullo, G., Overvad, K., Raaschou-Nielsen, O., Clavel-Chapelon, F., Linseisen, J., Boeing, H., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Kaladidi, A., Palli, D., Krogh, V., Tumino, R., Panico, S., Bueno-De-Mesquita, H.B., Peeters, P.H., Kumle, M., Gonzalez, C.A., Martinez, C., Dorransoro, M., Barricarte, A., Navarro, C., Quiros, J.R., Berglund, G., Janzon, L., Jarvholm, B., Day, N.E., Key, T.J., Saracci, R., Kaaks, R., Riboli, E., Vineis, P., 2005. DNA adducts and lung cancer risk: a prospective study. *Cancer Res.* 65:8042–48.
- Peluso, M., Merlo, F., Munnia, A., Valerio, F., Perrotta, A., Puntoni, R., and Parodi, S., 1998. ³²P-postlabelling detection of aromatic adducts in the white blood cell DNA of nonsmoking police officers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7:3–11.
- Peluso, M., Neri, M., Margarino, G., Mereu, C., Munnia, A., Ceppi, M., Buratti, M., Felletti, R., Stea, F., Quaglia, R., Puntoni, R., Taioli, E., Garte, S., Bonassi, S., 2004. Comparison of DNA adduct levels in nasal mucosa, lymphocytes and bronchial mucosa of cigarette smokers and interaction with metabolic gene polymorphisms. *Carcinogenesis* 25:2459–65.
- Perera, F., Brenner, D., Jeffrey, A., Mayer, J., Tang, D., Warburton, D., Young, T., Wazneh, L., Latriano, L., Motykiewicz, G., Grzybowska, E., Chorazy, M., Hemminki, K., Santella, R., 1992. DNA adducts and related biomarkers in populations exposed to environmental carcinogens. *Environ. Health Perspect.* 98:133–37.
- Pflaum, M., Will, O., and Epe, B., 1997. Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis.* 18:2225-31.
- Poirier, M.C., 1984. The use of carcinogen-DNA adduct antisera for quantitation and localization of genomic damage in animal models and the human population. *Environ. Mol. Mutagen.* 6:879-87.

- Poirier, MC., 1981. Antibodies to carcinogen-DNA adducts. *J. Natl. Cancer Inst.* 67:515-19.
- Pope, C.A, III., Burnett, R.T., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., Ito, K., Thurston G.D., 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA.* 287:1132–41.
- Qu, Q., Melikian, A.A., Li, G., Shore, R., Chen, L., Cohen, B., Yin, S., Kagan, M.R., Li,H., Meng,M., Jin,X., Winnik,W., Li,Y., Mu,R., Li,K., 2000. Validation of biomarkers in humans exposed to benzene: urine metabolites. *American J. of Industrial Med.* 37:522-31.
- Rappaport, S.M., McDonald, T.A., Yeowell-O'Connell K., 1996. The use of protein adducts to investigate the disposition of reactive metabolites of benzene. *Environ Health Perspect.* 104:1235-7.
- Riedl, M., Diaz-Sanchez, D., 2005. Biology of diesel exhaust effects on respiratory function. *J. Allergy Clin. Immunol.* 115:221-8.
- Risom, L., Moller, P., and Loft, S., 2005. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution, *Mutat. Res.* 592:119–37.
- Robin, M., Peffault de Latour, R., Socié, G., 2008. Long-term follow-up after hematopoietic stem cell transplantation. *Rev Prat.* 58 (19):2123-8.
- Rossi, A.M., Guarnieri, C., Rovesti, S., Gobba, F., Ghittori, S., Vivoli, G., Barale, R., 1999. Genetic polymorphisms influence variability in benzene metabolism in humans. *Pharmacogenetics* 9:445–51.
- Rossner, P. Jr., Svecova, V., Milcova, A., Lnenickova, Z., Solansky, I., Sram, R.J., 2008. Seasonal variability of oxidative stress markers in city bus drivers. Part I. Oxidative damage to DNA. *Mutat. Res.* 642(1-2):14-20.
- Rothman, N., Smith, M.T., Hayes, R.B., Traver, R.D., Hoener, B., Campleman, S., Li, G.L., Dosemeci, M., Linet, M., Zhang, L., Xi, L., Wacholder, S., Lu, W., Meyer, K.B., Titenko-Holland, N., Stewart, J.T., Yin, S., Ross, D., 1997. Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with the NQO1 609C→T mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxazone. *Cancer Res.* 57:2839–42.
- Ruchirawat, M., Navasumrit, P., Settachan, D., 2009. Exposure To Benzene In Various Susceptible Populations: Co- Exposures To 1,3-Butadiene And Pahs And Implications For Carcinogenic Risk. *Chemico-Biological Interactions.* In Press.
- Ruchirawat, M., Settachan, D., Navasumrit, P., Tuntawiroon, J., Autrup, H., 2007. Assessment of potential cancer risk in children exposed to urban air pollution in Bangkok, Thailand. *Toxicology Letters* 168:200–9

- Ruchirawat, M., Navasumrit, P., Settachan, D., Tuntawiroon, J., Buthbumrung, N., Sharma, S., 2005. Measurement of genotoxic air pollutants exposures in street vendors and school children in and near Bangkok. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 206:207–14.
- Ruchirawat, M., Mahidol, C., Tangjarukij, C., Pui-ock, S., Jensen, O., Kampeerawipakorn, O., Tuntaviroon, J., Aramphongphan, A., and Autrup, H., 2002. Exposure to genotoxins present in ambient air in Bangkok, Thailand—particle associated polycyclic aromatic hydrocarbons and biomarkers. *Sci. Total Environ.* 287:121–32.
- Rundle, A., Tang, D., Hibshoosh, H., Estabrook, A., Schnabel, F., Cao, W., Grumet, S., Perera, F.P., 2000. The relationship between genetic damage from polycyclic aromatic hydrocarbons in breast tissue and breast cancer. *Carcinogenesis.* 21(7):1281-9.
- Santos, S.J., Singh, N.P., Natarajan, A.T., 1997. *Exp. Cell Res.* 232:407–11.
- Savitz, D.A., Andrews, K.W., 1997. Review of epidemiologic evidence on benzene and lymphatic and hematopoietic cancers. *Am. J. Ind. Med.* 31(3):287–95.
- Sawada, H., Hara, A., Nakayama, T., Seiriki, K., 1985. Kinetic and structural properties of diacetyl reductase from hamster liver. *J Biochem.* 98(5):1349-57.
- Saxon, A., Diaz-Sanchez, D., 2005. Air pollution and allergy : you are what you breathe. *Nat Immunol.* 6:223-6.
- Schnatter, A.R., Kerzic, P.J., Zhou, Y., Chen, M.J., Nicolich, K., Lavelle, T.W., Armstrong, M.G., Bird, L., Lin, H., Fu, R.D., 2009. Irons, Peripheral Blood Effects in Benzene-Exposed Workers, *Chemico-Biological Interaction.* in Press
- Sharma, A.K., Jensen, K.A., Rank, J., White, P.A., Lundstedt, S., Gagne, R., Jacobsen, N.R., Kristiansen, J., Vogel, U., Wallin, H., 2007. Genotoxicity, inflammation and physico-chemical properties of fine particle samples from an incinerator energy plant and urban air. *Mutat. Res.* 633:95–111.
- Shen, M., Zhang, L., Bonner, M.R., Liu, C.S., Li, G., Vermeulen, R., Dosemeci, M., Yin, S., Lan, Q., 2008. Association between mitochondrial DNA copy number, blood cell counts, and occupational benzene exposure. *Environ. Mol. Mutagen.* 49(6):453-7.
- Singh, C., Ahmad, I., Kumar, A., 2007. Pesticides and metals-induced Parkinson' s disease: involvement of free radicals and oxidative stress. *Cell. Mol. Biol.* 53:19-28.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. *Exp. Cell Res.* 175:184–91.
- Skov, H., Hansen, A.B., Lorenzen, G., Andersen, H.V., Løfstrøm, P., Christensen, C.S., 2001. Benzene exposure and the effect of traffic pollution in Copenhagen, Denmark. *Atmospheric Environment* 4:2463-71.
- Smith, M.T., 1999. Benzene, NQO1, and genetic susceptibility to cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:7624-26.

- Smith, M.T., 1996. The mechanism of benzene-induced leukemia: a hypothesis and speculations on the causes of leukemia. *Environ Health Perspect.* 104:1219–25.
- Smith, M.T.L., Zhang, Y., Wang, R.B., Hayes, G., Li, J., Wiemels, M., Dosemeci, N., Titenko-Holland, L., Xi, P., Kolachana, S., Yin, N., Rothman., 1998. Increased translocations and aneusomy in chromosomes 8 and 21 among workers exposed to benzene. *Cancer Res.* 58: 2176-81.
- Snyder, R., Hedli, C.C., 1996. An overview of benzene metabolism. *Environ Health Perspect* 104(6):1165-71.
- Snyder, R., Witz, G., Goldstein, B.D., 1993. The toxicology of benzene. *Environ Health Perspect.* 100:293–06.
- Sorensen, M., Autrup, H., Hertel, O., Wallin, H., Knudsen, L.E., and Loft, S., 2003b. Personal exposure to PM_{2.5} and biomarkers of DNA damage. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12:191-96.
- Sørensen, M., Autrup, H., Møller, P., Hertel, O., Jensen, S.S., Vinzents, P., Knudsen, L.E., Loft, S., 2003c. Linking exposure to environmental pollutants with biological effects *Mutat. Res.* 544(2-3):255-71.
- Sørensen, M., Skov, H., Autrup, H., Hertel, O., Loft, S., 2003a. Urban benzene exposure and Oxidative DNA damage: influence of genetic polymorphisms in metabolism genes. *Sci. Total Environ.* 309:69-80.
- Sorsa, M., Osterman-Golkar, S., Peltonen, K., Saarikoski, S.T., Sram, R., 1996. Assessment of exposure to butadiene in the process industry. *Toxicology* 113:77–83.
- Subrahmanyam, V.V., Kolachana, P., Smith, M.T., 1991. Hydroxylation of phenol to hydroquinone catalyzed by a human myeloperoxidase-superoxide complex: possible implications in benzene-induced myelotoxicity. *Free Radic Res Commun.* 15:285-96.
- Their, R., Pemble, S.E., Kramer, H., Taylor, J.B., Taylor, F.P., Ketterer, B., 1996. Human glutathione S- transferase T1-1enhances mutagenicity of 1,2-dibromoethane, dibromomethane and 1,2,3,4-diepoxybutane in *Salmonella typhimurium*. *Carcinogenesis* 17:163–6.
- Toraason, M., Hayden, C., Marlow, D., Rinehart, R., Mathias, P., Werren, D., Olsen, L.D., Neumeister, C.E., Mathews, E.S., Cheever, K.L., Marlow, K.L., DeBord, D.G., Reid, T.M., 2001. DNA strand breaks, oxidative damage, and 1-HO pyrene in roofers with coal-tar pitch dust and/or asphalt fume exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 74:396-04.
- Traoré, A., Baudrimont, I., Ambaliou, S., Dano, S.D., Creppy, E.E., 2001. DNA breaks and cell cycle arrest induced by okadaic acid in Caco-2 cells, a human colonic epithelial cell line. *Arch. Toxicol.* 75(2):110-7.

Tsai, S.P., Fox, E.E., Ransdell, J.D., Wendt, J.K., Waddell, L.C., Donnelly, R.P., 2004. A hematology surveillance study of petrochemical workers exposed to benzene. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 40:67-73.

Tsutsui, T., Hayashi, N., Maizumi, H., Huff, J., Carl Barrett, J., 1997. Benzene, catechol, hydroquinone and phenol-induced cell transformation, gene mutation, chromosomes aberration, aneuploidy, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells. *Mutat. Res.* 373:113–23.

Tuo, J., Deng, X., Loft, S., Poulsen, H.E., 1999. Dexamethasone ameliorates oxidative DNA damage induced by benzene and LPS in mouse bone marrow. *Free Radic. Res.* 30:29-36.

Tuo, J., Loft, S., Thomsen, M.S., Poulsen, H.E., 1996. Benzene-induced genotoxicity in mice in vivo detected by the alkaline comet assay: reduction by CYP2E1 inhibition. *Mutat. Res.* 368:213-219.

U.S.EPA., 1984. Carcinogen assessment of coke oven emissions. Washington, DC, US Environmental Protection Agency, (Final report No. EPA-600/6-82-003F).

Valavanidis, A., Fiotakis, K., Vlachogianni, T., 2008. Airborne particulate matter and human health: toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 26:339–62.

Vineis., et Perera., 2000. DNA adducts as markers of exposure to carcinogens and risk of cancer. *Int. J. Cancer:* 88:325–28

Waidyanatha, S., Rothman, N., Fustinoni, S., Smith, M.T., Hayes, R.B., Bechtold, W., Dosemeci, M., Guilan, L., Yin, S., Rappaport, S.M., 2001. Urinary benzene as a biomarker of exposure among occupationally exposed and unexposed subjects. *Carcinogenesis.* 22(2):279-86.

Wallace, L., 1996. Environmental Exposure to Benzene: An Update. *Environ Health Perspect.* 104(6):1129-36.

Wang, Y.H., Lee, Y.H., Tseng, P.T., Shen, C.H., Chiou, H.Y., 2008. Human NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and sulfotransferase 1A1 (SULT1A1) polymorphisms and urothelial cancer risk in Taiwan. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 134:203–09.

Wiencke, J.K., Spitz, M.R., McMillan, A., Kelsey, K.T., 1997. Lung cancer in Mexican-Americans and African-Americans is associated with the wild-type genotype of the NAD(P)H: quinone oxidoreductase polymorphism. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 6:87–92.

WHO., 1996. Guideline on ambient air quality. Regional Office for Europe, World Health Organisation, Copenhagen, EURO Reports on WHO meeting,

Xu, X., Wiencke, J.K., Niu, T., Wang, M., Watanabe, H., Kelsey, K.T., Christiani D.C., 1998. Benzene exposure, glutathione S-transferase theta homozygous deletion and sister chromatid exchanges. *Am. J. Ind. Med.* 33: 157–63.

Yardley-Jones, A., Anderson, D., Lovell, D.P., Jenkinson, P.C., 1990. Analysis of chromosomal aberration in workers exposed to low level benzene. *Br. J. Ind. Med.* 47:48–51.

Ye, Z., Song, H., Higgins, J.P., Pharoah, P., Danesh, J., 2006. Five glutathione s-transferase gene variants in 23,452 cases of lung cancer and 30,397 controls: meta-analysis of 130 studies. *PLoS. Med.* 3(4):e91.

Yin, S.N., Hayes, R.B., Linet, M.S., 1996. A cohort study of cancer among benzene-exposed workers in China: overall results. *Am. J. Ind. Med.* 29:227-35.

Zeng, F.F., Liu, S.Y., Wei, W., Yao, S.P., Zhu, S., Li, K.S., Wan, G., Zhang, H.T., Zhong, M., Wang, B.Y., 2009. Genetic polymorphisms of glutathione S-transferase T1 and bladder cancer risk: a meta-analysis. *Clin. Exp. Med.* in Press.

Zhang L., Wang, Y., Shang, N., Smith, M.T., 1998. Benzene metabolites induce the loss and long arm deletion of chromosomes 5 and 7 in human lymphocytes. *Leuk. Res.* 22(2): 105-13.

Zhang, L., Rothman, N., Wang, Y., Hayes, R.B., Li, G., Dosemeci, M., Yin, S., Kolachana, P., Titenko-Holland, N., Smith, M.T., 1998. Increased aneusomy and long arm deletion of chromosomes 5 and 7 in the lymphocytes of Chinese workers exposed to benzene, *Carcinogenesis* 19(11):1955–61.

Zhang L., Rothman, N., Wang, Y., Hayes, R.B., Bechtold, W., Venkatesh, P., Yin, S., Wang, Y., Dosemeci, M., Li, G., Lu, W.M.T., 1996. Interphase cytogenetics of workers exposed to benzene. *Environ. Health Perspect.* 104(Suppl. 6):1325–29.

Zhang, Y., Tao, S., Shen, H., Ma, J., 2009. Inhalation exposure to ambient polycyclic aromatic hydrocarbons and lung cancer risk of Chinese population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106(50):21063-7

VIII. ANNEXES

ANNEXE 1

PUBLICATION N°1

Ultrafine particulate matter and high-level benzene urban air pollution in relation to oxidative DNA damage

Patrice H. Avogbe^{1,2}, Lucie Ayi-Fanou¹,
Herman Autrup³, Steffen Loft², Benjamin Fayomi⁴,
Ambaliou Sanni¹, Peter Vinzents² and Peter Møller^{2,5}

¹Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, République du Bénin, ²Institute of Public Health, University of Copenhagen, Denmark, ³Department of Environmental and Occupational Medicine, Aarhus University, Denmark and ⁴Unité d'enseignement et de recherche au travail et environnement, Faculté des Sciences de la Santé, Université d'Abomey-Calavi, République du Bénin

⁵To whom correspondence should be addressed
Email: p.moller@pubhealth.ku.dk

Air pollution, containing high-level of ultrafine particles (UFP) and benzene, is a prominent environmental health problem in many cities of the World. We investigated the level of oxidative DNA damage in mononuclear blood cells (MNBC) by the comet assay as DNA strand breaks (SB) and formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) sensitive sites in residents from three urban locations in Cotonou, Benin (taxi-moto drivers, subjects living near roads with intense traffic and suburban residents) and rural residents. Exposure was characterized by urinary excretion of S-phenylmercapturic acid (S-PMA), a biomarker of benzene exposure, and by ambient UFP. There were clear stepwise gradients with respect to ambient UFP, S-PMA excretion and oxidative DNA damage with rural subjects < suburban subjects < residents living near highly trafficked roads < taxi-moto drivers. Polymorphisms in glutathione peroxidase (GPX), NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) and glutathione S-transferase (GST) genes were assessed for effect modification. Subjects with GSTT1 null genotype had lower urinary S-PMA excretion than subjects carrying the plus genotype. Urinary S-PMA excretion correlated with SB ($R = 0.17$) and FPG sites ($R = 0.25$) in MNBC. The correlation between S-PMA and SB was strongest in subjects with NQO1*1/*2 and *2/*2 genotypes ($R = 0.37$), and between S-PMA and FPG sensitive sites in subjects with the GSTP1*B/*B genotype ($R = 0.39$). In conclusion, this study shows that urban air with high levels of benzene and UFP is associated with elevated levels of SB and FPG sites in MNBC, and that NQO1 and GST genes may modulate the effect.

Introduction

Traffic-generated urban air pollution rich in benzene and particulate matter (PM) is a major health problem in many

Abbreviations: FPG, formamidopyrimidine DNA glycosylase; GPX, glutathione peroxidase; GLM, general linear model; GST, glutathione S-transferase; LSD, least statistical difference; MNBC, mononuclear blood cells; NQO1, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1; 8-oxodG, 8-oxo-7,8 dihydro-2'-deoxyguanosine; PAH, polyaromatic hydrocarbons; PM, particulate matter; ROS, reactive oxygen species; S-PMA, S-phenylmercapturic acid; SB, strand breaks; UFP, ultrafine particles.

large cities of developing countries because of widespread use of motorbikes and old automobiles for transportation. Vehicles with two-stroke engines are bound to emit large amounts of volatile organic compounds, polyaromatic hydrocarbons (PAH) and ultrafine particles (UFP), especially when using gasoline of poor quality. For example motorcycles with two-stroke engines emitted five times more benzene than four-stroke motorcycles did, depending on both the quality of fuel, type of engine and engine maintenance (1). Also, poorly maintained petrol powered cars emit blue smoke with high content of volatile organic compounds, including benzene (2).

High-dose exposure of benzene has been associated with a number of adverse health effects, including bone marrow depression and myelogenous leukemia in both rodents and humans (3), although epidemiologic evidence does not permit reliable conclusions following human exposure to the low level of benzene that typically is observed in environmental settings. Benzene undergoes hepatic metabolism, generating hydroquinone, phenol and other compounds with the ability of redox cycling, which may cause excess generation of reactive oxygen species (ROS) (4).

In most large cities, PM is an important constituent of urban air pollution, associated with increased mortality and morbidity of a number of prevalent diseases, including cancer (5). Especially the ultrafine fraction of PM of engine exhaust has received increased focus because of toxicological relevance and because it mainly is generated by local traffic whereas long-range transport is a major contributor to particles of larger size. The toxicological mechanism by which PM contributes to an excess risk is thought to be due to both the ability to directly cause generation of ROS and indirectly by causing inflammation (6). There is compelling evidence from animal experimental models that diesel exhaust particles generate oxidative DNA damage in the lung following pulmonary exposure (7–11).

Oxidative stress is typically assessed as elevated levels of oxidized biomolecules, e.g. oxidative DNA damage, which is relevant for carcinogenesis (12). Especially pre-mutagenic base oxidation products such as 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodG) have been extensively investigated in various human tissues (13). For biomonitoring purposes, enzymic detection of DNA oxidation products by, e.g. the single cell gel electrophoresis (comet) assay or similar assays is an easier and more feasible approach (14,15). Oxidative DNA damage can be analyzed by the comet assay in mononuclear blood cells (MNBC) as strand breaks (SB) and formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) sensitive sites. The FPG protein, purified from *Escherichia coli*, recognizes a broad range of oxidized lesions of adenine and guanine, encompassing 8-oxodG, 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine. These lesions are excised from the DNA strand by the FPG protein, and the level of FPG sensitive sites thus are measured as additional SB. A recent study conducted in Copenhagen found that 8-oxodG was a suitable marker for assessing individual

exposure to PM_{2.5} (16). Similarly, earlier studies have shown correlation between 8-oxodG and urinary excretion of S-phenylmercapturic acid (S-PMA), a metabolite and biomarker of internal dose of benzene (17–20). This effect was modulated by the NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) genotype, which can prevent redox cycling of benzene metabolites.

Previously, we have documented that the urban air in Cotonou city, the capital of the Republic of Benin, contained high levels of benzene (in excess of 70 µg/m³), which is markedly higher than 5 µg/m³ recommended by WHO (Ayi-Fanou *et al.*, unpublished). In a rural village, there were detectable concentrations of benzene in ambient air, and urine samples contained low, albeit detectable, concentrations of S-PMA. The aim of this study was to investigate the effect of high concentration of benzene and UFP in the urban air on the level of oxidative DNA damage in MNBC. To this end, we recruited three groups of subjects living and working in different areas of Cotonou with high ambient air pollution and a rural reference population, thus enabling a large exposure gradient. The widespread local behavior of self-administrated mixing of poor quality oil in gasoline, containing volatile hydrocarbons for two-stroke motorbikes, causes generation of excessive amounts of both UFP and volatile organic compounds, including benzene. Oxidative DNA damage in terms of SB and FPG sensitive sites was analyzed in MNBC. We measured the number of UFP at different locations in order to assess the contribution of these air pollution relevant constituents. Internal dose of benzene was assessed as urinary excretion of S-PMA. In comparison with earlier biomonitoring studies, we anticipated that the benzene exposure would be sufficiently high to allow reliable determination of the interactions between benzene exposure and genetic polymorphisms in relevant antioxidant and metabolism genes on the level of oxidative DNA damage. Effect modulation of air pollution or benzene exposure was investigated as polymorphisms that are associated with altered enzyme activity in glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPX) and NQO1 genes. The gene–environment interaction of polymorphisms in these metabolism and antioxidant defense genes has been investigated in many molecular epidemiology studies with cancer as the primary endpoint (21). These biomarkers of susceptibility also have proved to be of value as effect modifiers of exposure biomarkers in biomonitoring studies of air pollution (22).

Materials and methods

Subjects and sample collection

Healthy male non-smokers were recruited by announcement at a public meeting initiated to communicate the findings of a previous investigation of air pollution in Cotonou. The subjects were recruited into four groups based on residence and occupational setting. One group of subjects was recruited in a small village (Sohon) ~80 km from Cotonou. In Cotonou, three groups of residents were selected to give a wide range of exposure. The three groups are designated: taxi-moto drivers, roadside (consists of subjects living near roads with high intensity of traffic and occupation in Cotonou) and suburban [subjects living and working in a suburb (Godomey) of Cotonou]. The mean age ± SD (number of subjects) were: taxi-moto drivers (36 ± 6, *n* = 29), roadside residents (27 ± 8, *n* = 37), suburban (36 ± 13, *n* = 42) and rural (40 ± 12, *n* = 27). The sampling was carried out at each location and the samples were transported to the laboratory on ice. The sampling took place in January 2003, which is in the middle of the dry season. Subjects also answered a questionnaire related to variables that might influence biomarkers level, e.g. recent illnesses, job type, age and use of medication. The study was evaluated

and approved by the Benin Environmental Agency. All subjects signed an informed consent before entering the study.

Each subject delivered a 50 ml spot urine sample that was stored at –20°C until analysis, and 1 ml heparinized venous blood for isolation of MNBC. The venous blood was diluted with 1 ml PBS, and 200 µl Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norway) was added underneath the diluted blood. MNBC were obtained by collection of the cell layer after centrifugation at 1650 *g* for 20 min (4°C), washed twice with cold PBS and centrifuged at 400 *g* for 15 min at 4°C. Most of the supernatant was removed and the pellet was re-suspended in 1 ml cold RPMI1640 (Gibco, Grand Island, NY) media supplemented with 50% fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY) and 10% dimethylsulfoxide (AppliChem, Darmstadt, Germany). The MNBC samples were stored at –80°C until analysis.

Ambient UFP

The number concentration of ambient UFP was measured continuously in six locations representing the four exposure groups on separate days by a portable condensation particle counter (TSI 3007; St Paul, MN). The apparatus has continuous measurement of the number of particles with 10–1000 nm in diameter (as number of particles per cubic centimeter). At the University of Copenhagen, we have found that the counting efficiency of the TSI 3007 instrument for particles with 40–200 nm in diameter was within ±10% of the efficiency of a reference instrument (TSI 3010; St Paul, MN). The counting efficiency has been reported as linear from 10³ counts/cm³ to 3 × 10⁵ counts/cm³ (23). The measurements were intended to span the period from early morning (before the first rush hour) to late evening (after the last rush hour). Because isopropanol needed to be loaded to the particle counter approximately every 4 h, the datasets consist of interrupted measurements of the length of ~4 h. The measurements in the suburb and the village were shorter because of time of transport to the locations. The particle counter was set to record UFP counts in 10-s periods. For presentation, the data are presented as average over 1 h.

Oxidative DNA damage

The level of SB and FPG sensitive sites in MNBC were analyzed by single cell gel electrophoresis (comet) assay as described previously (24). Briefly, cells were embedded in 0.75% low-melting point agarose (Sigma) on Gelbond films (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME), and lysed for a minimum of 1 h at 4°C (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 mM Tris base, pH = 10, 1% Triton X-100). FPG sensitive sites were detected by incubation of the agarose-embedded nuclei with 1 µg/ml of FPG protein (kindly provided by Dr Andrew Collins, University of Oslo) for 45 min at 37°C. The nuclei were subsequently treated in alkaline solution (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH >13) for 40 min, and electrophoresed in the same solution at 4°C for 20 min, 25 V and 300 mA. The level of DNA damage was expressed as the mean percent fluorescence in the tail (%DNA in the tail) by the Comet 4.0 software system (Kinetic Imaging) in 50 cells. The net level of FPG sensitive sites was obtained as the difference in score between samples incubated with FPG protein and buffer. The level of DNA damage from each subject was analysed in duplicate. In each experiment (corresponding to one electrophoresis) one aliquot of control MNBC sample was included as assay control.

Urinary S-PMA

Determination of urinary S-PMA was carried out as described previously (18). In brief, the samples were thawed and adjusted to pH = 2. S-Benzylmercapturic acid (100 ng/ml) was added to the sample as an internal standard. The organic fraction of the urine was extracted with ethylacetate. After centrifugation at 2500 r.p.m. for 10 min, the ethylacetate layer (supernatant) was collected and dried by vacuum. The residue was dissolved in 1.25 M HCl (in methanol) and incubated for 30 min at 40°C. Subsequently the samples were evaporated under a gentle stream of nitrogen at 45°C. The residue was dissolved in dichloromethane and analyzed on a HP 6890 Series Gas Chromatography (GC) system coupled to a HP 5973 Mass Selective Detector. The results are expressed as ratio concentrations of S-PMA and creatinine determined by the Jaffé reaction in urine (µg S-PMA/g creatinine).

GSTM1, GSTP1, GSTT1, GPX and NQO1 genotypes

Genotypes of GPX (Pro¹⁹⁸Leu), GSTM1 (gene deletion), GSTP1 (Ile¹⁰⁵Val), GSTT1 (gene deletion) and NQO1 (Pro¹⁸⁷Ser) were determined as reported previously (18,25).

Statistics

All data were tested for normal distribution using the Shapiro–Wilks test. The groups were also tested for homogeneity of variance with Levene's test (*P* < 0.05). To fulfill the criteria for normality and homogeneity of variance, data on urinary S-PMA excretion was transformed by the natural logarithm with the base of 2.72 (denoted LogS-PMA below). Urine from five subjects did not contain detectable S-PMA and were given the value of 0.05 µg S-PMA/l,

which corresponds to half the detection limit (0.1 µg S-PMA/l). Differences in the distribution of gene polymorphisms between the groups were tested by χ^2 -test with $\alpha < 5\%$ as the significance level. Exposure-gene polymorphism relationships were analyzed by two different models, with group (model 1) and benzene (model 2) as exposure variables. In the statistical analysis, the NQO1*1/*2 and *2/*2 genotypes were combined, and the GPX*1/*2 and *2/*2 genotypes were combined, because of the small number of subjects with homozygous (*2/*2) genotypes in these genes. Statistical analysis of interactions between polymorphisms was not investigated because of insufficient power (i.e. lack of interactions would be due to type II statistical errors).

It is not possible from this study to discriminate directly between the effect of UFP and benzene because the UFP data were obtained on the group level. However, comparisons of the correlation coefficients provide a feasible estimate of the strength of the associations between different exposures and effects in terms of oxidative DNA damage. The correlation coefficients of models encompassing the group as categorical variables represent the contribution of air pollution as a complex mixture of UFP, benzene and other components, whereas statistical models with benzene and polymorphisms as variables represent the contribution of benzene exposure. The difference between these models may be viewed as follows: $R_{\text{group}} > R_{\text{LogS-PMA}}$ represents a description of the data where air pollution as a complex mixture provides a better explanation of the results than benzene. The magnitude of contribution of individual components in air pollution or interactions between components cannot be assessed by this approach.

Model 1. Group differences of urinary LogS-PMA excretion, and SB and FPG sensitive sites in MNBC were analyzed by general linear model (GLM) analysis with differences considered statistically significant at $\alpha < 5\%$ level, and post-hoc analysis as least significant difference (LSD) at $\alpha < 5\%$ level. We used GLM analysis on categorized data in order to obtain correlation coefficients (R) for comparison between different statistical models. The gene-environment interaction effect on the SB, FPG and LogS-PMA was investigated by GLM analysis with polymorphisms and group as categorical variables. The models were considered statistically significant at $\alpha < 1.67\%$ because data of polymorphism were evaluated on LogS-PMA, SB and FPG datasets (Bonferroni correction).

Model 2. The relationship between benzene exposure (LogS-PMA) and the level of DNA damage was investigated by GLM analysis with oxidative DNA damage as the dependent variable and LogS-PMA and polymorphisms as continuous and categorical variables, respectively. P -values of the GLM analysis were considered statistically significant at $\alpha < 2.5\%$ level, because data on polymorphisms were used for both SB and FPG sites (Bonferroni correction). Post-hoc analysis of the GLM models included linear regression analysis of LogS-PMA and DNA damage in stratified datasets of single genotypes.

The statistical analysis was performed in Statistica 5.5 for Windows, StatSoft (1997), Tulsa, OK.

Results

Ambient UFP

Measurements of the number concentration of UFP were carried out on five different locations in Cotonou and in a rural village (Figure 1). There was a large gradient in the concentration of UFP measured in the village, suburb, city background and near highly polluted streets. Moreover gradients in the exposure to UFP can also be discerned from the three measurements at the highly polluted streets. The intersection (street) measurement was obtained from a police stand in the middle of the intersection, whereas intersection (balcony) was obtained in first floor level near the intersection. A gradual decrease occurred during the morning of the day, and an increase in the late afternoon/evening, which most probably are due to complex meteorological explanations that include temperature (increasing during the day; increased UFP formation by condensation of aerosols in exhaust pipes) and wind speed (mainly greater wind speed in the late afternoon and evening; less sedimentation of UFP). However, alterations during the day are most pronounced at the most polluted sites, i.e. three small peaks in the measurement at the intersection (08.00–09.00, 13.00–14.00 and 19.00–20.00) coincide with rush hour.

Gene polymorphisms in GSTM1, GSTP1, GSTT1, GPX and NQO1

The distribution of genotypes of the metabolizing enzyme genes is outlined in Table I. There was a slight inhomogeneous distribution of most of the genes, although this was not statistically significant at $\alpha = 5\%$ level. The inhomogeneous distribution differed between the genotypes, e.g. it appears that taxi-moto drivers as a group contained slightly more subjects with the GSTP1*B/*B polymorphism. The GSTT1 genotype was almost equally distributed between the minus and plus genotype in three of the groups, whereas subjects in the suburban group had a 30 (minus) and 70% (plus) distribution. For the NQO1 polymorphism there is not a clear deviation in the

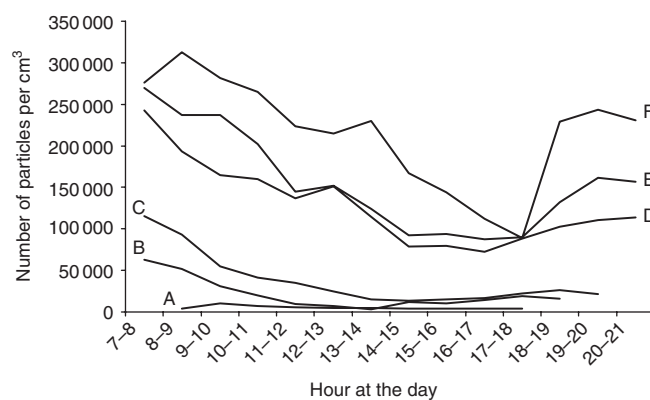


Fig. 1. Concentration of UFP at different locations (as numbers/cm³). Lines are rural (A), suburban (B), city background (C), intersection at balcony (D), traffic circle (E) and intersection in the street (F). The mean \pm SD for a midday hourly sampling with $n = 360$ in each group was: rural, 6961 ± 3223 ; suburban, $19\,980 \pm 10\,798$; city background, $41\,230 \pm 5822$; intersection at balcony, $160\,194 \pm 56\,908$; traffic circle, $201\,691 \pm 49\,083$; and intersection in the street, $265\,145 \pm 76\,111$.

Table I. Distribution of polymorphisms in groups of subjects

Polymorphism	Taxi-moto drivers	Roadside	Suburban	Rural	Total	χ^2 -test
GSTT1						5.42
Minus	10	18	12	14	54 (45%)	
Plus	11	15	28	13	67 (55%)	
Missing	8	4	2	0	14	
GSTM1						5.78
Minus	9	5	12	10	36 (30%)	
Plus	12	28	28	17	85 (70%)	
Missing	8	4	2	1	14	
GSTP1						4.6
*A/*A	4	8	8	9	29 (22%)	
*A/*B	11	20	23	12	66 (50%)	
*B/*B	14	5	11	6	36 (27%)	
Missing	0	4	0	0	4	
GPX						0.25
*1/*1	14	16	21	12	63 (49%)	
*1/*2	13	15	17	12	57 (44%)	
*2/*2	2	2	4	1	9 (7%)	
Missing	0	4	0	2	6	
NQO1						5.95
*1/*1	19	22	33	12	86 (65%)	
*1/*2	9	12	8	11	40 (30%)	
*2/*2	1	0	1	4	6 (5%)	
Missing	0	3	0	0	3	

χ^2 -tests are not significant at 5% level.

distribution of subjects in one of the groups, except possibly for the distribution between the suburban and rural subjects.

Group effect and gene polymorphism modulation on urinary excretion of S-PMA (Model 1)

The results of urinary LogS-PMA excretion indicated that each of the four groups were statistically significantly different from the others (Figure 2; $P < 0.05$, post-hoc LSD). There was an obvious gradient in LogS-PMA excretion from the village to the most exposed subjects (taxi-moto drivers).

The effect of air pollution on LogS-PMA was investigated by GLM analysis with the group and polymorphisms as categorical variables. This showed single factor effects of the group and GSTT1 genotype (Table II). Stratification of the GSTT1 phenotype indicated that the GSTT1 null genotype was associated with lower (mean = 0.08 μg PMA/g creatinine, $n = 54$) urinary S-PMA excretion as compared with the GSTT1 plus phenotype (mean = 0.15 μg PMA/g creatinine, $n = 67$). Similar analysis of GSTM1, GSTP1, GPX or NQO1 genotypes revealed statistically non-significant interactions and non-significant single factor effects of the polymorphisms, whereas urinary LogS-PMA excretion showed statistically significant single-factor effect ($P < 0.001$, GLM).

Group effect and gene polymorphism on oxidative DNA damage in MNBC (Model 1)

The results of SB and FPG sensitive sites in MNBC are outlined in Figure 3. The mean \pm SD of control MNBC

samples was 1.35 ± 0.30 and 2.23 ± 0.98 for SB and FPG sensitive sites, respectively ($n = 14$). Simple comparison of differences between the groups revealed a weaker effect on SB ($R = 0.27$, $P < 0.05$, GLM) than on FPG sensitive sites ($R = 0.54$, $P < 0.01$, GLM). The rural population had a lower level of SB than the taxi-moto drivers ($P < 0.05$, post-hoc LSD) and roadside subjects ($P < 0.01$, post-hoc LSD). The taxi-moto drivers had a higher level of FPG sensitive sites than the other groups: roadside ($P < 0.01$, post-hoc LSD), suburban ($P < 0.001$, post-hoc LSD) and rural subjects ($P < 0.001$, post-hoc LSD). There was no significant difference in FPG sites between the roadside and suburban group, whereas both groups had higher levels of FPG sensitive sites than the rural subjects ($P < 0.001$ for both groups, post-hoc LSD).

The effect of air pollution on the SB and FPG was investigated by GLM analysis with polymorphisms and group as categorical variables. This statistical analysis indicated no interaction between single polymorphisms and the group. For the FPG sites, there were single factor effects of the group, whereas polymorphisms had no effect. This indicates that the variation in FPG sites was only explained by difference in exposure between the groups, which could be air pollution. No effect was observed for SB when the analysis included both polymorphism and the group; this is possible due to the lower statistical power when polymorphisms and the group are included as categorical variables.

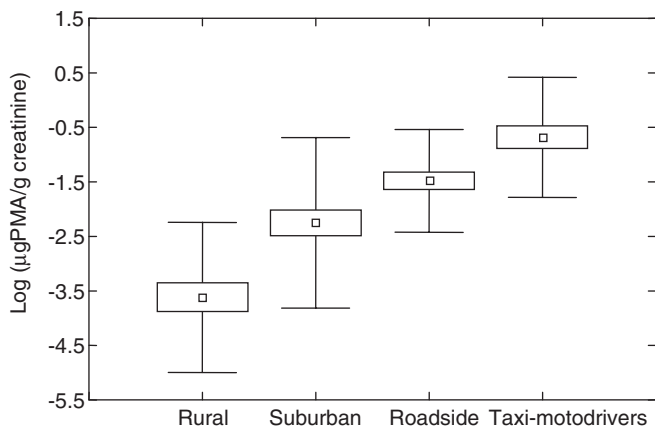


Fig. 2. Urinary S-PMA excretion per creatinine measured by GC-MS. GLM test is statistically significant ($P < 0.001$), and each group is different from the others (post-hoc LSD). Data are expressed as the mean (point) with SEM (boxes) and SD (whiskers).

Table II. Urinary S-PMA excretion stratified by group and GSTT1 polymorphism

Group	GSTT1 polymorphism	
	Minus	Plus
Taxi-moto drivers	0.55 \pm 0.45	0.65 \pm 0.48
Roadside	0.30 \pm 0.38	0.45 \pm 0.57
Suburban	0.10 \pm 0.11	0.55 \pm 1.87
Rural	0.04 \pm 0.17	0.16 \pm 0.42

GLM analysis for interaction between the group and polymorphism indicate single factor effects of the group ($P < 0.001$) and GSTT1 polymorphism ($P < 0.05$). Data are expressed as the mean \pm SD S-PMA excretion (μg S-PMA/g creatinine).

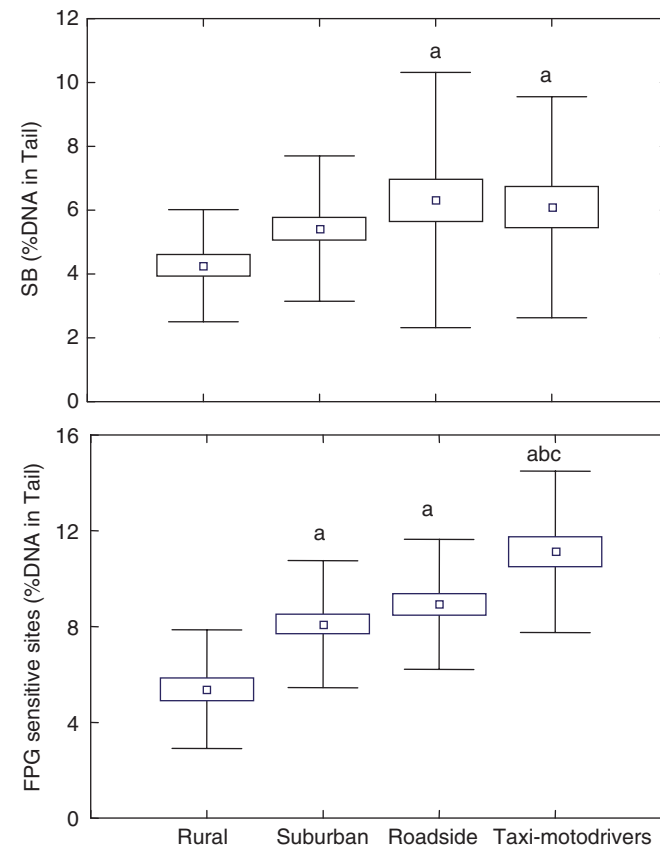


Fig. 3. SB and FPG sensitive sites in MNBC detected by the alkaline comet assay. GLM tests are statistically significant for SB ($P < 0.05$) and FPG sensitive sites ($P < 0.001$). Letters denote post-hoc LSD compared with the rural (a), roadside (b) and suburban (c) group. Data are expressed as the mean (point) with SEM (boxes) and SD (whiskers).

Table III. Correlation coefficients of models describing benzene-induced oxidative DNA damage and effect modification of polymorphism^a

Polymorphism	<i>n</i>	SB	FPG
LogS-PMA	135	0.17	0.25
LogS-PMA*GSTT1	121	0.27	0.27
LogS-PMA*GSTM1	121	0.28	0.25
LogS-PMA*GSTP1	131	0.21	0.37 ^b
*A/*A	29		0.15
*A/*B	66		0.18
*B/*B	36		0.39
LogS-PMA*GPX	129	0.21	0.24
LogS-PMA*NQO1	132	0.32 ^c	0.25
*1/*1	86	0.04	
*1/*2 and *2/*2	46	0.37	

^aAnalyzed by full factorial GLM test with LogS-PMA as continuous variable and polymorphism as categorical variable (Model 2). Values in the table refer to the correlation coefficient for the models. Models were considered statistically significant at $\alpha = 0.025$ value (Bonferroni correction).

^bSingle factor effect of LogS-PMA and GSTP1 polymorphism ($P < 0.01$). Post-hoc stratification indicates correlation between LogS-PMA and FPG sites in subjects with GSTP1*B/*B genotype.

^cInteraction between LogS-PMA and NQO1 polymorphism ($P < 0.01$). Post-hoc stratification indicates correlation between LogS-PMA and SB in subjects with NQO1*1/*1 and *2/*2 heterozygote or mutation genotype.

Benzene-exposure and gene polymorphism modulation on oxidative DNA damage in MNBC (Model 2)

Linear regression of SB on LogS-PMA ($R = 0.17$, $P < 0.05$, linear regression) and of FPG on LogS-PMA ($R = 0.25$, $P < 0.01$, linear regression) indicated positive associations between benzene exposure and DNA damage. The correlation coefficients are lower than the corresponding values obtained when using the group in the analysis (0.27 and 0.54 for the SB and FPG sites, respectively), indicating that the group better predicts DNA damage in MNBC than benzene.

The statistical analysis of the interaction between benzene exposure and polymorphism on DNA damage is outlined in Table III. Stratification of the dataset according to genotypes showed an effect of NQO1 polymorphism on the benzene-induced SB, where the effect was entirely due to the *1/*2 and *2/*2 genotype showing a positive correlation ($R = 0.32$, $P < 0.01$, linear regression). For the GSTP1 genotype, there was single factor effect of both LogS-PMA and the polymorphism on the level of FPG sites in MNBC ($P < 0.01$, GLM). However, although non-significant by χ^2 -test, there appears to be an over-representation of subjects with the GSTP1*B/*B genotype among the taxi-moto drivers (49 vs 15–26% in the other groups), which may hamper direct comparison of differences in FPG sites related to the GSTP1 genotype because of differences in exposure. Stratification of the polymorphism indicated that subjects with GSTP1*B/*B genotype showed a positive correlation ($R = 0.39$, $P < 0.05$, linear regression), whereas correlations were non-significant in the other genotype-based subgroups.

Discussion

This study showed clear-cut elevated levels of SB and oxidative DNA base damage in MNBC of non-smoking subjects with an apparent dose-response relationship according to the gradient of exposure to air pollution from rural to urban areas. The level of oxidative DNA damage correlated with the benzene exposure gradient assessed by urinary S-PMA excretion. The level of ambient UFP also showed an exposure gradient

similar to that of benzene exposure. The levels of SB and oxidative DNA base damage in terms of FPG sensitive sites may be caused by different mechanisms, with the NQO1 polymorphism modifying induction of SB, and the GSTP1 polymorphism linked to FPG sensitive sites.

Traffic emission is the most important source of air pollution in Cotonou, Benin, both in terms of polyaromatic hydrocarbons and volatile organic compounds (Ayi-Fanou *et al.*, unpublished). There exist no objective measurements of the traffic density in Benin. Compared with Europe and North America, there are many motorbikes and many old cars, and congested traffic is normal in the rush hours. A previous investigation showed that the ambient concentrations of benzene, measured by personal monitors, were 3 and 76 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ for rural referents and taxi-moto drivers, respectively (Ayi-Fanou *et al.*, unpublished). Two groups of subjects living near traffic-dense roads were exposed to benzene at concentrations of 48 and 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Ayi-Fanou *et al.*, unpublished). We did not measure the ambient concentration of benzene in the present study, but this can be estimated by the S-PMA excretion because there is a strong correlation between ambient benzene concentration and S-PMA excreted in urine. Using the relationship reported by Ghittori *et al.* (17), the ambient benzene concentration estimated from the urinary S-PMA excretion (mean and 95% confidence intervals) is: 2 (0.9–4), 13 (7–27), 40 (26–62) and 121 (67–219) $\mu\text{g}/\text{m}^3$ for rural, suburban, cityroad and taxi-moto drivers, respectively. The estimated ambient benzene concentrations are remarkably similar to the levels reported previously. It was not feasible in this study to analyze personal exposure of UFP because the apparatus used for personal sampling of UFP is vulnerable to shakes; this would interfere with the free motion of the subjects because the vehicles are heavily shaken due to the poor condition of many roads in Benin. The ambient concentration of UFP, measured as stationary locations was dependent on the traffic intensity, discerned as increases during rush hours and differences in UFP concentration between different locations. It should be noted that the particle measurements provide no information of the size distribution or toxicity of the UFP measured.

We found a positive correlation between urinary excretion of LogS-PMA and SB in subjects with the *1/*2 and *2/*2 NQO1 genotype, whereas the correlation between LogS-PMA and FPG sites did not depend on the NQO1 genotype. There was no difference in SB between taxi-moto drivers and residents living near polluted roads, although both of these groups had elevated SB compared with the rural subjects. This lack of dose-response relationship at the highest ambient benzene exposure cannot be explained by saturation of the comet assay or different distribution of NQO1 polymorphism. Previously, low-dose urban benzene exposure has indicated a positive correlation between urinary S-PMA excretion and 8-oxodG in lymphocytes of subjects living in Copenhagen, Denmark, whereas no correlation was observed with SB (16). Considering that the level of SB was only slightly elevated in the present study despite the wide benzene exposure gradient, the lack of effect seen in Copenhagen could be due to the exposure being below the detection limit for this biomarker. Similar results have been reported from subjects in Rome, Italy where urban benzene and particle exposure was not associated with differences in SB in MNBC (26). However, gasoline station attendants had higher levels of SB in MNBC than non-benzene exposed referents (27). Correlations have been reported

between *trans, trans*-muconic acid (benzene exposure biomarker) and SB, and urinary 1-hydroxypyrene (PAH exposure biomarker) and SB in subjects from areas polluted by lead smelter and waste incinerator plants (28). It is worthwhile to consider that these exposure situations differ from urban air settings and the effect may be due to co-exposure of other air pollution constituents, i.e. benzene may be a proxy-measure of other active components in the environment. Occupational benzene exposure was associated with increased SB in Chinese subjects (29,30). The effect may be more apparent in the Asian population because the susceptibility-associated allele of NQO1 (corresponding to the *2 allele) is more prevalent than among Caucasians. The statistical analysis in this study showed that the elevated level of SB could in part be related to the gene-environment interaction involving the NQO1 since the correlation coefficient increased by incorporation of both benzene and NQO1 in the model ($R_{\text{LogS-PMA}} = 0.17$, $R_{\text{group}} = 0.27$, $R_{\text{LogS-PMA/NQO1}} = 0.32$). NQO1 is a phase II enzyme responsible for the detoxification of quinones, which otherwise may produce ROS by redox cycling. Subjects with the *2/*2 genotype of the NQO1 gene are devoid of hydroquinone-induced enzyme activity, whereas subjects with the *1/*2 genotype have less enzyme activity compared with subjects with the *1/*1 genotype, indicating an inability of subjects with the *2 allele to detoxify benzene metabolites (31). It is probable that excessive amounts of quinone metabolites of benzene generate ROS that ultimately damage DNA by forming SB. The biologic implication of the NQO1 polymorphism can be inferred from observations that subjects with the NQO1*1/*2 genotype appear to be significantly over represented among patients with adult leukemia (32). Also, studies from China have shown that subjects with the NQO1*2/*2 genotype had higher risk of occupationally caused benzene poisoning, although this also depended on concomitant genetic constitution of other metabolic genes such as GSTT1 and CYP2E1 (33,34).

Animal experimental models have shown elevated FPG sites and 8-oxodG in MNBC and bone marrow cells of mice exposed to high dose of benzene (35–37). The present study showed a positive correlation between benzene exposure and FPG sites in MNBC of subjects with GSTP1*B/*B genotype. This is possible through a mechanism of GSTP1-mediated glutathione conjugation of benzene, which could alter the toxicity of some of the DNA damaging reactive intermediates generated from benzene metabolism. However, the highest correlation coefficient was achieved for the model with the group as the only variable, whereas models with LogS-PMA or LogS-PMA/GSTP1 produced lower correlation coefficients ($R_{\text{group}} = 0.54$, $R_{\text{LogS-PMA}} = 0.25$, $R_{\text{LogS-PMA/GSTP1}} = 0.37$). It is probable that other components than benzene in air pollution contribute to the elevated level of FPG sites in the exposed subjects; UFP exposure is a probable variable explaining the variation in FPG sensitive sites. Alternatively, the low correlation coefficient could be because of non-linear genotype-exposure interactions, as has been observed for, e.g. the effect modification of GSTM1 and *N*-acetyltransferase 2 polymorphisms on the level of DNA adducts in PAH-exposed subjects (21). The GSTP1 enzyme is a phase II metabolism protein that is involved in the detoxification of PAH compounds, and most studies of the GSTP1 polymorphisms have concentrated on PAH exposures. Topical application of PAH (7,12-dimethylbenzanthracene) has been associated with markedly higher skin cancer incidence in GSTP1 null mice

compared with wild-type mice (38), indicating a significant role of GSTP1 in PAH-induced carcinogenesis. In humans, a meta-analysis of eight case-control studies has shown increased odds ratio for lung cancer among subjects having the GSTP1*B/*B phenotype (39). Although associations between GSTP1 polymorphism with other cancer sites have been investigated, the results are conflicting and warrant formal meta-analysis before conclusions should be made. The effect of the polymorphism is not easily interpreted because it appears to cause opposite catalytic efficiency toward planar and non-planar PAH compounds, and this is to some extent dependent on other polymorphisms in the GSTP1 gene (40). To the best of our knowledge, there are no studies published from experimental animal models of PAH-induced FPG sites or 8-oxodG. A recent biomonitoring study showed that subjects with GSTP1*B/*B genotype who smoked had about twice the level of FPG sites in MNBC compared with non-smokers with that genotype, whereas there were no effects of smoking among subjects with GSTP1*A/*A or *A/*B genotype (41). Human PAH-rich exposure circumstances are typically complex with co-exposure from UFP or other constituents that induce oxidative DNA damage.

GSTT1 is normally involved in the detoxification of small molecules. Thus, the association of GSTT1 polymorphism with LogS-PMA excretion indicates that this polymorphism is involved in the glutathione conjugation of benzene. The results support recent results of benzene-exposed Estonian oil shale mine workers where subjects carrying GSTT1 plus genotype had higher urinary S-PMA excretion compared with subjects with the minus genotype (20). Studies of Italian bus drivers and Copenhagen residents, who had lower benzene exposure than observed in the present study, showed no effect of GSTT1 genotype on urinary S-PMA excretion (18,42). Collectively, we can conclude from these data: that GSTT1-mediated glutathione conjugation of benzene with subsequent urinary S-PMA excretion is important across ethnic groups; that the effect is dose-dependent with only effect observed above a moderate ambient benzene concentration. The biological consequence of the GSTT1 polymorphism is difficult to predict because it is involved both in activation and detoxification of environmental carcinogens, and there has been no consistent associations between the GSTT1 genotype and cancer risk (21).

By means of X-ray calibration curves as done by, e.g. the European Standards Committee on Oxidative DNA Damage, the mean \pm SD level of FPG modifications per diploid cell with 4×10^{12} dalton DNA can be calculated to 650 ± 160 , 1110 ± 188 , 1250 ± 198 and 1620 ± 310 for the subjects in the rural, suburb, roadside and taxi-moto driver groups, respectively. These values are similar to other estimations of FPG modifications in lymphocytes, i.e. 870 lesions/cell (43), 1100 lesions/cell ($0.28 \text{ lesions}/10^9 \text{ dalton}$) (44), 1375 lesions/cell ($0.23 \text{ lesions}/10^6 \text{ bp}$) (45), 1440 lesions/cell ($0.24 \text{ lesions}/10^6 \text{ bp}$) (46) and 3500 lesions/cell ($1.33 \text{ lesions}/10^6 \text{ bp}$) (47). Our estimation of FPG lesions also are similar to the consensus of baseline FPG modifications in lymphocytes, i.e. 790–1100 lesions per diploid cell (assuming consensus of $0.3\text{--}4.2 \text{ modifications}/10^6 \text{ dG}$) (48). These data indicate that the level of oxidative DNA damage in this study are within the range that many laboratories in recent years have reported as the basal level of oxidative DNA damage in MNBC.

Polymorphisms in metabolism or antioxidant enzymes are sparsely investigated in African populations. Presently, it is

difficult to draw firm conclusions of the distribution of most of the genotypes in the African population as has been done for Caucasians, because too few studies have been published to establish reliable meta-analysis. The GSTM1 genotype probably is the most studied polymorphism; the distribution of GSTM1 genotypes in this study was similar to that observed in an African control population, i.e. the frequencies are 27 and 73% for the null and plus genotypes, respectively (49). Also, the predominance of subjects with the homozygous NQO1*1/*1 genotype is similar to that observed (61%) among African-Americans (50). The distribution of GSTP1 genotypes was consistent with distribution among American-Africans [19% (*B/*B), 46% (*A/*B) and 35% (*A/*A) (51)], and east African (Gambia) subjects [21% (*B/*B), 66% (*A/*B) and 13% (*A/*A) (52)] whereas the distribution differed from South and East African populations who had frequencies of 7% (*B/*B), 25% (*A/*B) and 68% (*A/*A) (53).

In conclusion this study showed that subjects living in an urban setting heavily polluted by traffic emissions had high levels of oxidative DNA damage in MNBC. The effect of air pollution clearly was more pronounced on FPG sensitive sites than SB, and the magnitude of effect on these endpoints appeared to be influenced by gene polymorphisms in GSTP1 and NQO1, respectively.

Acknowledgements

The authors thank all the volunteers who agreed to participate in this study. The study was partially supported by a grant of the Beninese Agency for Environment of the Ministry of Environment, Housing and Town Planning, Republic of Benin. The Danish Embassy in Benin Republic provided the major financial support for this study, through its program on Health Research and Environmental Pollution in Benin Republic. Mr Patrice Avogbe is a recipient of a fellowship of the Danish Embassy in Benin Republic. Analysis performed in Benin Republic was carried out in the Institut de Sciences Biomedicales Appliquees (ISBA). We thank Annie Jensen and Anna Hansen for excellent technical support.

References

- Leong,S.T., Muttamara,S. and Laortanakul,P. (2002) Influence of benzene emission from motorcycles on Bangkok air quality. *Atmospheric Environ.*, **36**, 651–661.
- Baumbach,G., Vogt,U., Hein,K.R.G., Oluwole,A.F., Ogunsola,O.J., Olaniyi,H.B. and Akereolu,F.A. (1995) Air pollution in a large tropical city with a high traffic density—results of measurements in Lagos, Nigeria. *Sci. Total Environ.*, **169**, 25–31.
- Hayes,R.B., Songnian,Y., Dosemeci,M. and Linet,M. (2001) Benzene and lymphohematopoietic malignancies in humans. *Am. J. Ind. Med.*, **40**, 117–126.
- Bolton,J.L., Trush,M.A., Penning,T.M., Dryhurst,G. and Monks,T.J. (2000) Role of quinones in toxicology. *Chem. Res. Toxicol.*, **13**, 135–160.
- Borm,P.J., Schins,R.P. and Albrecht,C. (2004) Inhaled particles and lung cancer, part B: paradigms and risk assessment. *Int. J. Cancer*, **110**, 3–14.
- Knaapen,A.M., Borm,P.J., Albrecht,C. and Schins,R.P. (2004) Inhaled particles and lung cancer. Part A: mechanisms. *Int. J. Cancer*, **109**, 799–809.
- Nagashima,M., Kasai,H., Yokota,J., Nagamachi,Y., Ichinose,T. and Sagai,M. (1995) Formation of an oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in mouse lung DNA after intratracheal instillation of diesel exhaust particles and effects of high dietary fat and beta-carotene on this process. *Carcinogenesis*, **16**, 1441–1445.
- Ichinose,T., Yajima,Y., Nagashima,M., Takeshita,S., Nagamachi,Y. and Sagai,M. (1997) Lung carcinogenesis and formation of 8-hydroxydeoxyguanosine in mice by diesel exhaust particles. *Carcinogenesis*, **18**, 185–192.
- Sato,H., Sone,H., Sagai,M., Suzuki,K.T. and Aoki,Y. (2000) Increase in mutation frequency in lung of Big Blue rat by exposure to diesel exhaust. *Carcinogenesis*, **21**, 653–661.
- Møller,P., Daneshvar,B., Loft,S., Wallin,H., Poulsen,H.E., Autrup,H., Ravn-Haren,G. and Dragsted,L.O. (2003) Oxidative DNA damage in vitamin C supplemented guinea pigs after intratracheal instillation of diesel exhaust particles. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **189**, 39–44.
- Risom,L., Dybdahl,M., Bornholdt,J., Vogel,U., Wallin,H., Møller,P. and Loft,S. (2003) Oxidative DNA damage and defence gene expression in the mouse lung after short-term exposure to diesel exhaust particles by inhalation. *Carcinogenesis*, **24**, 1847–1852.
- Jackson,A.L. and Loeb,L.A. (2001) The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat. Res.*, **477**, 7–21.
- Cooke,M.S., Evans,M.D., Dizdaroglu,M. and Lunec,J. (2003) Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.*, **17**, 1195–1214.
- ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage) (2003) Comparative analysis of baseline 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: an approach to consensus. *Carcinogenesis*, **23**, 2129–2133.
- ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage) (2003) Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods. *Free Radic. Biol. Med.*, **34**, 1089–1099.
- Sørensen,M., Autrup,H., Hertel,O., Wallin,H., Knudsen,L.E. and Loft,S. (2003) Personal exposure to PM_{2.5} and biomarkers of DNA damage. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **12**, 191–196.
- Ghittori,S., Imbriani,M., Maestri,L., Capodaglio,E. and Cavalleri,A. (1999) Determination of S-phenylmercapturic acid in urine as an indicator of exposure to benzene. *Toxicol. Lett.*, **108**, 329–334.
- Sørensen,M., Skov,H., Autrup,H., Hertel,O. and Loft,S. (2003) Urban benzene exposure and oxidative DNA damage: influence of genetic polymorphisms in metabolic genes. *Sci. Total Environ.*, **309**, 69–80.
- Melikian,A.A., Qu,Q., Shore,R. et al. (2002) Personal exposure to different levels of benzene and its relationships to the urinary metabolites S-phenylmercapturic acid and trans,trans-muconic acid. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **778**, 211–221.
- Sørensen,M., Poole,J., Autrup,H., Muzyka,V., Jensen,A., Loft,S. and Knudsen,L.E. (2004) Benzene exposure assessed by metabolite excretion in Estonian oil shale mine workers: influence of GST polymorphisms. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **13**, 1729–1735.
- Autrup,H. (2004) Gene–environment interaction in environmental carcinogenesis. In Nicolopoulou-Stamati,P., Hens,L., Howard,V.C. et al. (ed.) *Cancer as an Environmental Disease*. Kluwer, Dordrecht, NL.
- Sørensen,M., Autrup,H., Møller,P., Hertel,O., Jensen,S.S., Vinzents,P., Knudsen,L.E. and Loft,S. (2003) Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutat. Res.*, **544**, 255–271.
- Hämmerli,K., Koponen,I.K., Aalto,P.P. and Kulmala,M. (2002) The particle detection efficiency of the TSI-3007 condensation particle counter. *J. Aerosol Sci.*, **33**, 1463–1469.
- Møller,P., Vogel,U., Pedersen,A., Dragsted,L.O., Sandström,B. and Loft,S. (2003) No effect of 600 g fruit and vegetables per day on oxidative DNA damage and repair in healthy human non-smokers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **12**, 1016–1022.
- Vogel,U., Olsen,A., Wallin,H., Overvad,K., Tjønneland,A. and Nexø,B.A. (2004) No association between GPX Pro198Leu and risk of basal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **13**, 1412–1413.
- Carere,A., Andreoli,C., Galati,R. et al. (2002) Biomonitoring of exposure to urban pollutants: analysis of sister chromatid exchanges and DNA lesions in peripheral lymphocytes of traffic policemen. *Mutat. Res.*, **518**, 215–224.
- Andreoli,C., Leopardi,P. and Crebelli,R. (1997) Detection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gel electrophoresis after exposure to benzene or benzene metabolites. *Mutat. Res.*, **377**, 95–1044.
- Staessen,J.A., Nawrot,T., Hond,E.D. et al. (2001) Renal function, cytogenetic measurements, and sexual development in adolescents in relation to environmental pollutants: a feasibility study of biomarkers. *Lancet*, **357**, 1660–1669.
- Lam,T.H., Zhu,C.Q. and Jiang,C.Q. (2002) Lymphocyte DNA damage in elevator manufacturing workers in Guangzhou, China. *Mutat. Res.*, **515**, 147–157.
- Sul,D., Lee,D., Im,H., Oh,E., Kim,J. and Lee,E. (2002) Single strand DNA breaks in T- and B-lymphocytes and granulocytes in workers exposed to benzene. *Toxicol. Lett.*, **134**, 87–95.
- Moran,J.L., Siegel,D. and Ross,D. (1999) A potential mechanism underlying the increased susceptibility of individuals with a polymorphism in NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) to benzene toxicity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 8150–8155.

32. Larson, R.A., Wang, Y., Banerjee, M., Wiemels, J., Hartford, C., Le Beau, M.M. and Smith, M.T. (1999) Prevalence of the inactivating 609C->T polymorphism in the NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene in patients with primary and therapy-related myeloid leukemia. *Blood*, **94**, 803–807.
33. Rothman, N., Smith, M.T., Hayes, R.B. *et al.* (1997) Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with the NQO1 609C->T mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxazone. *Cancer Res.*, **57**, 2839–2842.
34. Wan, J., Shi, J., Hui, L., Wu, D., Jin, X., Zhao, N., Huang, W., Xia, Z. and Hu, G. (2002) Association of genetic polymorphisms in CYP2E1, MPO, NQO1, GSTM1, and GSTT1 genes with benzene poisoning. *Environ. Health Perspect.*, **110**, 1213–1218.
35. Tuo, J., Loft, S. and Poulsen, H.E. (1999) Enhanced benzene-induced DNA damage in PMA-stimulated cells *in vitro* and in LPS-treated animals. *Free Radic. Biol. Med.*, **26**, 801–808.
36. Tuo, J., Deng, T., Loft, S. and Poulsen, H.E. (1999) Dexamethasone ameliorates oxidative DNA damage induced by benzene and LPS in mouse bone marrow. *Free Radic. Res.*, **30**, 29–36.
37. Vestergaard, S., Loft, S. and Møller, P. (2002) Role of inducible nitrogen synthase in benzene-induced oxidative DNA damage in the bone marrow of mice. *Free Radic. Biol. Med.*, **32**, 481–484.
38. Henderson, C.J., Smith, A.G., Ure, J., Brown, K., Bacon, E.J. and Wolf, C.R. (1998) Increased skin tumorigenesis in mice lacking pi class glutathione S-transferases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 5275–5280.
39. Stucker, I., Hirvonen, A., de, W., I. Cabelguenne, A., Mitrunen, K., Cenee, S., Koum-Besson, E., Hemon, D., Beaune, P. and Lorient, M.A. (2002) Genetic polymorphisms of glutathione S-transferases as modulators of lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis*, **23**, 1475–1481.
40. Hu, X., Xia, H., Srivastava, S.K., Pal, A., Awasthi, Y.C., Zimniak, P. and Singh, S.V. (1998) Catalytic efficiencies of allelic variants of human glutathione S-transferase P1-1 toward carcinogenic anti-diol epoxides of benzo[*c*]phenanthrene and benzo[*g*]chrysene. *Cancer Res.*, **58**, 5340–5343.
41. Dusinska, M., Ficek, A., Horska, A. *et al.* (2001) Glutathione S-transferase polymorphisms influence the level of oxidative DNA damage and antioxidant protection in humans. *Mutat. Res.*, **482**, 47–55.
42. Rossi, A.M., Guarnieri, C., Rovesti, S., Gobba, F., Ghittori, S., Vivoli, G. and Barale, R. (1999) Genetic polymorphisms influence variability in benzene metabolism in humans. *Pharmacogenetics*, **9**, 445–451.
43. Collins, A.R., Duthie, S.J., Fillon, L., Gedik, C.M., Vaughan, N. and Wood, S.G. (1997) Oxidative DNA damage in human cells: the influence of antioxidants and DNA repair. *Biochem. Soc. Trans.*, **25**, 326–331.
44. Collins, A.R., Dusinska, M., Gedik, C.M. and Stetina, R. (1996) Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ. Health Perspect.*, **104** (suppl. 3), 465–469.
45. Merzenich, H., Hartwig, A., Ahrens, W., Beyersmann, D., Schlegel, R., Scholze, M., Timm, J. and Jöckel, K.-H. (2001) Biomonitoring on carcinogenic metals and oxidative DNA damage in a cross-sectional study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **10**, 515–522.
46. Pflaum, M., Will, O. and Epe, B. (1997) Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis*, **18**, 2225–2231.
47. Gedik, C.M., Boyle, S.P., Wood, S.G., Vaughan, N.J. and Collins, A.R. (2002) Oxidative stress in humans: validation of biomarkers of DNA damage. *Carcinogenesis*, **23**, 1441–1446.
48. Collins, A.R., Cadet, J., Moller, L., Poulsen, H.E. and Vina, J. (2004) Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Arch. Biochem. Biophys.*, **423**, 57–65.
49. Garte, S., Gaspari, L., Alexandria, A.K. *et al.* (2001) Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **10**, 1239–1248.
50. Wiencke, J.K., Spitz, M.R., McMillan, A. and Kelsey, K.T. (1997) Lung cancer in Mexican-Americans and African-Americans is associated with the wild-type genotype of the NAD(P)H: quinone oxidoreductase polymorphism. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **6**, 87–92.
51. Watson, M.A., Stewart, R.K., Smith, G.B., Massey, T.E. and Bell, D.A. (1998) Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution. *Carcinogenesis*, **19**, 275–280.
52. Wild, C.P., Yin, F., Turner, P.C., Chemin, I., Chapot, B., Mendy, M., Whittle, H., Kirk, G.D. and Hall, A.J. (2000) Environmental and genetic determinants of aflatoxin-albumin adducts in the Gambia. *Int. J. Cancer*, **86**, 1–7.
53. Dandara, C., Sayi, J., Masimirembwa, C.M., Magimba, A., Kaaya, S., De Sommers, K., Snyman, J.R. and Hasler, J.A. (2002) Genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1 (Cyp1A1) and glutathione transferases (M1, T1 and P1) among Africans. *Clin. Chem. Lab. Med.*, **40**, 952–957.

Received September 1, 2004; revised November 15, 2004;
accepted November 23, 2004

PUBLICATION N°2



Survey of air pollution in Cotonou, Benin—air monitoring and biomarkers

Lucie Ayi Fanou^a, Théophile A. Mobio^b, Edmond E. Creppy^b, Benjamin Fayomi^c,
Silvia Fustoni^d, Peter Møller^e, Soterios Kyrtopoulos^f, Panos Georgiades^f, Steffen Loft^e,
Ambaliou Sanni^{a,*}, Henrik Skov^g, Steinar Øvrebo^h, Herman Autrupⁱ

^aLaboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, République du Bénin. 04 BP 0320 Cotonou, République du Bénin

^bLaboratory of Toxicology and Applied Hygiene: University Bordeaux2 Victor Segalen, Bordeaux, France

^cUnité d'enseignement et de recherche au travail et Environnement, Faculté des Sciences de la Santé, Université d'Abomey-Calavi, République du Bénin

^dLaboratory of Industrial Hygiene and Toxicology, University of Milan, Milan, Italy

^eInstitute of Public Health, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

^fNational Hellenic Research Foundation, Institute of Biological Research and Biotechnology, Athens, Greece

^gNational Institute of Environmental Research, Risø, Denmark

^hDepartment of Toxicology, National Institute of Occupational Health, Oslo, Norway

ⁱInstitut of Public Health, Department of Environmental and Occupational Medicine, University of Aarhus, Århus, Denmark

Received 21 October 2004; accepted 22 March 2005

Available online 23 May 2005

Abstract

Exposure to genotoxic compounds present in ambient air has been studied in Cotonou, Benin, a city where two-stroke motorbikes are the major form of transportation and gasoline quality is poor. Personal monitoring and biomarkers were used to assess the exposure. Non-smoking taxi-moto drivers (city) and village residents were the study subjects. Benzene exposure was significantly higher in the city, as compared to the village ($76.0 \pm 26.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ versus 3.4 ± 3.0 , $p=0.0004$). Urinary excretion of benzene and *S*-phenylmercapturic acid (*S*-PMA) were also highest in subjects living in the city, whereas 1-hydroxypyrene was not different.

The level of total polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), associated with particles, ranged from 76.21 to 103.23 in Cotonou versus $1.55 \text{ ng}/\text{m}^3$ for the village.

Determination of DNA damage in lymphocytes showed that subjects from the city had elevated number of lesions compared to subjects in the village in terms of bulky DNA adducts, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 5-methylcytosine, whereas DNA fragmentations analysed by alkaline gel electrophoresis was not different between the subjects.

* Corresponding author. Tel.: +229 30 10 24; fax: +229 30 10 24.

E-mail address: sanni@intnet.bj (A. Sanni).

In conclusion, this study shows that air pollution is pronounced in Cotonou, Bénin and is associated with elevated levels of DNA damage in residents of the city compared to people living in a non-polluted rural village.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Ambient air; Polycyclic aromatic hydrocarbons; Benzene; DNA damage; Biomarker

1. Introduction

Air pollution is associated with an increased risk of many adverse health effects, e.g. mortality, respiratory diseases and cancer. Urban air pollution mainly originates from incomplete combustion of fossil fuel. The chemical composition of ambient air is very complex and depends on many different factors, traffic generated air pollution being a major source in large cities. Most of the studies on air pollution and exposure to air pollutants have been conducted in developed countries, i.e. western Europe and the USA. There is limited information on exposure to air pollutants in developing tropical countries. The population in Cotonou, the economic capital of Benin, has increased rapidly in the last decade (more than 1 million residents), and in the absence of a reliable public transport system, air pollution has worsened because of an increasing number of old second-hand cars (more than 240,000) and of taximotorbikes (more than 80,000) (Gounougbe, 2002; Hounkpe, 2002). Gasoline is also of poor quality, due to illegal import of sub-standard products from neighbouring Nigeria. No data on health effect of air pollution in Benin is available, but it may be anticipated that air pollution will become a major public health problem. Exposure to air pollution is normally assessed by environmental monitoring, using either fixed monitoring stations or personal air collecting instruments. Recently, a number of studies have integrated biomarkers in order to assess individual exposure compared to air monitoring measurements. The advantage of biomarkers is that they reflect the activity pattern.

A preliminary study in Cotonou showed that the ambient concentration of benzene exceeded the WHO recommended level ($5 \mu\text{g}/\text{m}^3$) by several fold (Sanni et al., unpublished data). The number-concentration of ultrafine air pollution particles also is very high on different locations in Cotonou, whereas it is lower in the suburb and rural village (Avogbe et al., 2005).

Exposure to benzene is associated with an increased risk for haematological disorders (Yin et al., 1996). Benzene is found at high concentration in poor-quality gasoline and can be detected in the exhaust of both cars and motorbikes, and depends to some extent on engine maintenance. Two-stroke engines emit more benzene than four-stroke ones and the level increases with mileage (Leong et al., 2002). Benzene is metabolically transformed to a variety of ring-hydroxylated and ring-opened metabolites, such as benzene oxide, benzene-dihydrodiol, phenol, benzoquinone, *S*-phenylmercapturic acid (S-PMA), muconic acid and catechol (Snyder et al., 1993; Waidyanatha et al., 2001). Urinary excretion of S-PMA has been used as a biomarker for benzene exposure in occupational and environmental studies. Unmetabolised benzene in urine and blood has also been suggested as a biomarker following benzene exposure (Fustinoni et al., 1999; Waidyanatha et al., 2001).

Light polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) can be found in the low molecular weight exhaust or associated with particles, e.g. pyrene, whereas heavier ones are particle-bound. The exhaust of diesel-powered engines is the major source of particles in urban air. Urinary 1-hydroxypyrene (1-OHP) has served as a biomarker for exposure to volatile PAH mostly in occupational studies and in smokers, since its level in people only exposed to ambient air pollution is low (Øverbo et al., 1995). Carcinogenic PAHs are metabolised to products reacting with DNA forming carcinogen-DNA adducts. These bulky adducts can be detected with the ^{32}P postlabelling procedure. The level of bulky adducts is not correlated with those of specific or total carcinogenic PAHs at low exposure levels (Georgiadis et al., 2001), but it is considered as a risk indicator of lung cancer (Autrup, 2000). Bulky carcinogenic DNA adducts have been used to assess the exposure in both occupational and general population (Autrup et al., 1999; Peluso et al., 2001). In addition to DNA adduction, PAHs, as well as benzene, induce oxida-

tive stress that results in oxidation of guanine in DNA. Numerous *in vitro*, animal experimental models, and biomonitoring studies have shown elevated levels of oxidative DNA damage, including 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), in various tissues and lymphocytes following exposure to air pollution or the particulate fraction hereof (Risom et al., *in press*). One of the consequences of chemically induced DNA damage is fragmentation that can be detected by gel electrophoresis. *In vitro* studies suggest that fragmented DNA is caused by apoptosis (Traore et al., 2001). However this procedure has not been used to assess exposure to ambient air pollution. Methylated deoxycytosine (m^5dC) appears to be another marker for toxic response, e.g. cadmium and okadaic acid induce hypermethylation in cultured colon cancer cell lines (Traore et al., 2000). Thus, this marker can be explored to assess exposure to genotoxic compounds in ambient air despite the fact that its role in carcinogenesis is unknown yet.

The aim of this study was to evaluate the exposure to genotoxic compounds present in ambient air, using biomarkers. The exposure was studied in different groups of subjects living in Cotonou and compared to that of residents living in a village with no traffic generated air pollution.

2. Materials and methods

2.1. Study subjects and collection of samples

The study was performed in two phases. Phase 1 was performed in March 2001 at the end of dry season. The stationary exposure to PAH was measured in two crossroads (St Michel and Marina), and in the central square of a small village (Sohon) in a rural area. Indoor PAH exposure was assessed in a house near a busy crossroad (Dedokpo). Samples were collected during a 1-week period. The effect of air pollution on different biomarkers for genotoxic damage was analysed in blood and urine samples of healthy human subjects, e.g. bulky carcinogen-DNA adducts, DNA fragmentation and m^5dC were measured. Six volunteers from the village and 35 taxi-moto drivers from Cotonou, who had held this job for at least 5 years, were recruited for the study. All subjects were males and non-smokers with a mean age of 36 ± 5

years (range 18 to 55 years). They were recruited by announcement at public meeting initiated to communicate the preliminary results of a previous investigation of air pollution in Cotonou. The collection of blood and urine was carried out at the end of an 8-h work time.

Phase 2 of the study was conducted in August 2002 at the end of the rainy season. This part of the investigation focused on benzene exposure, biomarker for benzene (S-PMA) and urinary benzene, and 1-hydroxypyrene, urinary metabolite of PAHs. Samples for biomarker measurements were collected from taxi-moto drivers ($n=6$), who drive all over the city, subjects living in places where traffic is heavy, e.g. Marina ($n=6$) and Saint Michel ($n=6$), and subjects in the village ($n=5$). Samples were collected during a 1-week period. The temperature in Benin was in the range 27–31 °C during the collection period.

In both phases of the study, heparinised blood (30 ml) was collected from each participant. Peripheral blood lymphocytes were isolated from FICOLL-PÂQUE (Eurobio) and stored at -20 °C until analysis. Urine samples (30 ml) were collected at the end of monitoring period and stored at -20 °C until shipment to laboratories for analysis. The subjects answered a questionnaire focusing on potential confounding factors, e.g. passive smoking, residential area, medicine use, including tar-containing products, diet and current and former work settings.

The study was approved by the Benin Environmental Agency (ABE), and the Environmental and Occupational authorities, responsible for toxicology. All participants agreed to participate in the study after being informed about the purpose and signing an informed consent.

2.2. Determination of benzene, toluene and xylene

Personal exposure to ambient concentrations of benzene, toluene and xylene were determined by using Radiello diffusive samplers consisting of an active carbon cartridge enclosed in a porous polyethylene body (Fondazione Salvatore Maugeri, Paduva, Italy). The Radiello tube has an uptake of 80 cm³ per min at 25 °C and 1 atm. Samples were analysed for benzene, toluene and xylene as previously described by Sørensen et al. (2003a).

2.3. Determination of benzene in urine

Urinary benzene was measured according to the modified procedure of Fustinoni et al. (1999). The volume of urine was reduced from 2 to 0.5 ml and the temperature of samples increased from 40 to 45 °C as previously described by Waidyanatha et al. (2001). Sample vials were brought to equilibrium between gas and liquid phases in a dry block at 45 °C for 15 min. Analysates were sampled from the vial headspace, using a manual SPME assembly containing a polydimethylsiloxane fibre (10 mm, 100 µm film thickness). The fibre was housed in a stainless steel needle, which allowed penetration of the PTFE septum into the vial without damaging the fibre. Once within the vial the fibre was exposed to the headspace for 15 min, retracted and the sample was immediately analysed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS).

2.4. Determination of phenylmercapturic acid (S-PMA)

S-PMA was measured in urine by GC–MS based on a previously published method described by Van Sittert et al. (1993). One microgram of *S*-benzylmercapturic acid (Tokyo Kasei, Japan) was added as an internal standard to 1 ml of urine adjusted to pH 2; the mixture was extracted with 4 ml ethyl acetate. The supernatant obtained after 10 min of centrifugation at 700×*g* was dried in vacuum, and resuspended in 2 ml of 1.25 M HCl in methanol. After derivatation for 30 min at 40 °C, samples were dried under a gentle stream of nitrogen at 45 °C. The residue was diluted in 150 µl of dichloromethane. One microliter was injected into a Hewlett

Packard 6890 GC–MS with a capillary column (30 m × 0.25 mm) cross-linked 5% PH-ME soloxane (Hewlett Packard 9). The initial column temperature of 35 °C was maintained for 1 min and raised, firstly to 170 °C (120 °C/min), then to 280 °C (30 °C/min).

2.5. Environmental exposure assessment

Stationary measurements of PAH levels were analysed in particle samples collected with battery operated pumps (SKC battery model 224) equipped with Glass fibre filters (37mm). The pumps were placed on a lamppost at 2 m above the ground at different crossroads in the city. For indoor measurements the pump was put on a table, 1 m above the living room floor.

Pumps had a flow rate of 1.7 l/min and worked for 12 h. After collection, filters were wrapped in aluminium foil and put in a plastic bag at –20 °C until analysis. Extraction and analysis of PAHs were performed with a modified version of the standard EPA procedure (US EPA, 1984) described by Ruchirawat et al. (2002). Results were expressed in ng/m³. The ratio between lighter PAHs (benzo(*a*)anthracene, chrysene, benzo(*b*)fluoranthene and benzo(*k*)fluoranthene) relative to higher (benzo(*a*)pyrene, dibenzo(*a,h*)anthracene, benzo(*g,h,i*)perylene and indeno(1,2,3-*cd*)pyrene) gives an indication of the PAHs sources. Fluanthene and pyrene were considered as semi-volatile PAHs of polluted air.

2.6. Determination of 1-hydroxypyrene (1-HOP)

Determination of 1-hydroxypyrene was done as previously described by Øverbo et al. (1995).

Table 1
Mean levels^a of VOCs in Cotonou city and Sohon village people (phase 2)

Subjects	Mean value of benzene, µg/m ³	Mean value of toluene, µg/m ³	Mean value of ethyl benzene, µg/m ³	Mean value of <i>meta</i> - and <i>para</i> -xylenes, µg/m ³	Mean value of <i>ortho</i> -xylene, µg/m ³	Ratio, benzene/toluene
Taxi-moto (<i>n</i> =6)	76.0 ± 26.8	142.7 ± 52.9	47.0 ± 12.6	128.2 ± 27.8	39.2 ± 11.0	0.53
St Michel (<i>n</i> =6)	48.2 ± 32.2	123.2 ± 77	34.7 ± 20.1	98.8 ± 52.8	28.2 ± 18.7	0.39
Marina (<i>n</i> =6)	60.0 ± 19.1	111.7 ± 59.6	42.3 ± 8.6	119.8 ± 20.7	37.5 ± 6.3	0.54
Village (<i>n</i> =5)	3.4 ± 3.0	5.2 ± 5.0	8.4 ± 3.1	29.2 ± 12.9	3.8 ± 0.43	0.65
P	0.0004	0.0041	0.0001	0.0001	0.0003	

VOCs: volatile organic compounds.

^a Mean levels are expressed in mean ± S.D. (standard deviation).

After treatment with sulphatase and glucuronidase for 16 h at 37 °C, samples were purified by solid phase extraction with Sep-pack C18 cartridge (Millipore, Milford, MA). Cartridges were washed with water and 1-hydroxypyrene was eluted with methanol. The eluate (20 µl) was analysed by HPLC with a fluorescence detector (Perkin-Elmer Ltd, Beaconsfield, UK) at 242 nm (excitation) and 288 nm (emission). Five spiked control urines were used as standards with additional of 10, 20, 40, 100 and 250 nmol/l 1-hydroxypyrene.

2.7. Determination of DNA adducts (³²P postlabelling)

DNA was extracted from lymphocytes and DNA adducts were determined by the butanol enrichment procedure as previously described by Nielsen et al. (1996). The adduct spots were measured by phosphor-image analysis (Molecular Image, Bio-Rad GS-363). B(a)P-diolepoxide DNA adduct was included in the analysis as an internal standard. The level of DNA adduct was obtained as the average of at least two independent assays, and expressed as adducts/10⁸ nucleotides.

2.8. DNA modified bases as 8-OHdG and m⁵dC

The level of 8OH-dG and m⁵dC was analysed as described by Traore et al. (2000). DNA samples were digested and analysed by HPLC (Beckman Gold System) with simultaneous UV (260 nm) and electrochemical detection (column of 4.6 × 250 mm, 5 µm Uptisphere, LC-18S protected by a 4.6 × 45 mm, 5 µm Ultrasphere C18 pre column from Interchrom Beckman ODS). Isocratic mode elution was performed with a mobile phase of helium-sparged 10 mM citric acid, 25 mM sodium acetate, 30 mM sodium hydroxide and 10 mM acetic acid in 10% methanol. The electrochemical detector (Kontron, model 105) has a sensitivity of 1 nA/V for a potential of oxidation of 650 mV. Standard bases (dC, dT, dG, dA) and 8-OHdG (100 µg/ml), m⁵dC (10 µg/ml) were purchased from Sigma, France and used for measurements after sequential injection into the HPLC system. The area under the curve adjusted to the known concentration of each base was used with computer-aided software to quantify the bases. The results (in µg) were

to calculate the concentration of m⁵dC and 8-OHdG as compared respectively to (m⁵dC + dC) × 100% and to 10⁵ dG.

2.9. DNA fragmentation

DNA fragmentation was detected using the method described by Traore et al. (2001). Lymphocytes were suspended in lysis buffer (20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1% sarcosine, pH 8) and digested with proteinase K (100 µg/ml) overnight at 37 °C. DNA was extracted using the phenol/chloroform method and treated with 6 µg/ml RNAase. DNA was then precipitated with 2 volumes of ethanol 96° at –20 °C for 4 h, collected after centrifugation and dissolved in TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8). Conventional agarose gel electrophoresis of DNA was performed in 1% agarose gel containing ethidium

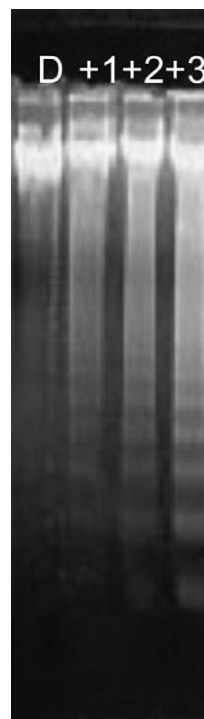


Fig. 1. DNA fragmentation. Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from peripheral blood lymphocytes in alkaline buffer. The gel is stained with ethidium bromide and the electrophoresis is performed at 80 V for 1 h at room temperature. The degree of DNA fragmentation is estimated by +0, +1, +2, +3.

bromide (80 V, 1 h). Migration of low molecular weight DNA fragments was estimated visually (Fig. 1), using a fragment scoring system: 0, +1, +2, +3.

2.10. Statistical analysis

One-factor ANOVA followed by Tukey tests were used to compare means values obtained from various study sites. Paired *t*-test was used to compare levels of S-PMA and benzene urine samples.

Epi Info version 6.0 was used for comparison of variances.

3. Results

Air pollution in Cotonou and personal exposure to genotoxic compounds were assessed using a combination of stationary and personal monitoring, including the use of biomarkers, in two phases. Although exposures of potential confounding exposures were recorded by questionnaire, the data could not explain relative differences in biomarker values.

3.1. Assessment of benzene and PAH exposure (phase 2)

Benzene and other volatile organic compound (VOCs) were found at high level in ambient air and in local gasoline, e.g. toluene, ethyl-benzene, *meta*- and *para*-xylenes, and *ortho*-xylene. Table 1 shows the mean levels of VOCs for personal exposure of subjects in the village and the city (taxi-moto

drivers and inhabitants of high traffic crossroads as Saint Michel and Marina). All of the VOCs were significantly higher in Cotonou compared to the village: benzene ($p < 0.001$), toluene ($p < 0.01$), ethyl-benzene ($p < 0.001$), *meta*- and *para*-xylenes ($p < 0.001$), *ortho*-xylene ($p < 0.001$). We observed no significant difference between taxi-moto drivers and people living near Saint Michel and Marina intersections ($p > 0.05$). Urinary biomarkers of benzene were used to assess the internal exposure, e.g. non-metabolised benzene and S-PMA. There were statistically significant differences between the groups on both non-metabolised benzene ($p < 0.001$) and S-PMA ($p < 0.05$) (Table 2). Post hoc analysis indicated that each of the three groups of city subject had higher urinary excretion of non-metabolised benzene and S-PMA compared to the subjects in the village ($p < 0.05$, Tukey test), whereas the excretion was not different between the three city subjects. The higher excretion of non-metabolised benzene in the group of subjects living near the Marina crossroad was not statistically significant compared to the other taxi-moto drivers and Saint Michel groups. Clearly the high urinary excretion of non-metabolised benzene in the Marina subjects arises because of large variation in the data; it was not possible from the questionnaire data to find exposures that explained the variation.

Urinary 1-HOP was used to assess the exposure to pyrene (Table 2). Although the mean level of 1-HOP in village people (0.33 ± 0.05 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine) was lower than that found in subjects living city (0.60 ± 0.06 $\mu\text{mol/mol}$ creatinine for Marina) there was no significant difference between subjects in the city and village.

Table 2
Level of biomarkers in urine (phase 2)

Location	Mean value ^a of benzene in urine ($\mu\text{mol/mol}$ creatinine)	Mean value ^a of S-PMA ($\mu\text{mol/mol}$ creatinine)	Mean value ^a of 1-HOP ($\mu\text{mol/mol}$ creatinine)
Taxi-moto ($n=6$)	0.204 ± 0.109	9.3 ± 3.9	0.33 ± 0.06
St Michel ($n=6$)	0.217 ± 0.102	7.0 ± 4.9	0.42 ± 0.27
Marina ($n=6$)	0.791 ± 0.500	6.8 ± 5.3	0.60 ± 0.06
Village ($n=5$)	0.165 ± 0.041	4.2 ± 2.6	0.33 ± 0.05
<i>p</i>	< 0.0001	0.0370	0.4900

S-PMA: *S*-phenylmercapturic acid.

1-HOP: 1-hydroxypyrene.

^a Mean levels are expressed as described in Table 1.

3.2. Assessment of ambient PAH and DNA damage biomarkers in lymphocytes (phase 1)

The ambient level of 10 different PAHs was determined by stationary monitors (Table 3). In general, the level of PAHs was significantly higher in Cotonou than in the village. Statistically significant differences ($p < 0.05$) between village and city samplings were seen for fluoranthene, pyrene, benzo(*b*)fluoranthene, benzo(*k*)fluoranthene, dibenzo(*a,h*)anthracene, benzo(*g,h,i*)perylene and indeno(1,2,3-*cd*)pyrene, but not for benzo(*a*)anthracene, chysene and benzo(*a*)pyrene. The semi-volatile PAHs (fluanthrene and pyrene) were the most common in areas with high traffic density (Saint Michel and Marina). PAHs from heavy traffic were also high in these locations, e.g. comparing Saint Michel with the village revealed obvious differences in ambient PAH concentrations of benzo(*a*)pyrene (3.39 ± 2.26 versus 0.02 ± 0.02), dibenzo(*a,h*)anthracene (0.65 ± 0.24 versus 0.09 ± 0.11), benzo(*g,h,i*)perylene (29.41 ± 12.17 versus 0.06 ± 0.07), and indeno(1,2,3-*cd*)pyrene (13.63 ± 6.54 versus 0).

In order to investigate indoor air pollution in Cotonou, samplings were carried out in a residence near the Dedokpo crossroad close to the harbour with high intensity of heavy-duty traffic. The total indoor level of PAHs in the day was higher (57.33 ng/m^3) than at night (34.94 ng/m^3), although not statistically significant ($p > 0.05$). The high level of PAHs obtained in the house probably originate from ambient particulates that penetrate indoor and non-ambient particulates generated by daily human activities.

The ratio between light and heavy PAHs in Saint Michel and Marina crossroads were respectively 0.52 and 0.45. This ratio reflected a high traffic activity at these locations. The indoor ratio was 0.64 for day versus 0.68 for night. A ratio of about 7.29 was observed in the village, suggesting a different source of PAHs in the village compared to the city, e.g. PAHs from the smoke of firewood rather than traffic.

Investigations of DNA damage were carried out in order to assess the biological effective dose at presumed target molecule for carcinogenesis. Large inter-individual variations in the DNA adduct levels measured by ^{32}P postlabelling were observed (Table 4); the mean level of DNA adducts in $\text{fmol}/\mu\text{g}$ DNA was 0.31 ± 0.16 (range to 0.06–0.64) and 0.13 ± 0.03

Table 3
Mean stationary levels^a of PAHs in air during a 1-week period in different locations in Benin (phase 1)

PAHs (ng/m^3)	St. Michel			Marina			Dedokpo day			Dedokpo night			Control village			<i>p</i>
	Median	Range		Median	Range		Median	Range		Median	Range		Median	Range		
Fluoranthene	9.33 ± 6.05	3.2–18.87		7.26 ± 3.87	0.84–11.15		1.76 ± 1.79	0.64–5.48		1.12 ± 1.34	0–3.61		0	0–0.29		0.0033
Pyrene	22.21 ± 14.15	7.08–44.99		16.05 ± 8.63	1.82–24.96		2.28 ± 1.99	1.04–6.22		1.61 ± 2.68	0.08–6.9		0.14 ± 0.11	0–0.29		0.0240
Benzo(<i>a</i>)anthracene	5.77 ± 4.89	0.76–13.2		1.86 ± 0.94	0.21–2.47		2.68 ± 2.70	0.57–7.8		1.75 ± 2.45	0–5.44		0	0		0.8340
Chysene	7.18 ± 3.52	2.55–10.93		5.49 ± 3.14	0.23–8.59		5.94 ± 4.86	2.01–15.57		4.22 ± 5	0–12.91		1.19 ± 1.37	0–3.69		0.1137
Benzo(<i>b</i>)fluoranthene	8.55 ± 3.42	3.92–12.44		6.77 ± 2.82	1.83–8.67		8.31 ± 5.51	3.52–18.82		4.66 ± 5.61	0–11.86		0.03 ± 0.06	0–0.04		0.0056
Benzo(<i>k</i>)fluoranthene	3.11 ± 1.35	1.27–4.41		2.44 ± 1.13	0.46–3.09		3.93 ± 2.85	2.02–9.34		2.43 ± 3.91	0–6.27		0.02 ± 0.02	0–0.04		0.0287
Benzo(<i>a</i>)pyrene	3.39 ± 2.26	0.34–5.79		3.81 ± 1.44	0.19–4.04		4.6 ± 4.85	0.92–13.03		4.64 ± 6.41	0–13.74		0.02 ± 0.02	0–0.05		0.2850
Dibenzo(<i>a,h</i>)anthracene	0.65 ± 0.24	0.34–0.89		0.69 ± 0.12	0.58–0.84		1.06 ± 0.77	0.3–2.33		0.48 ± 0.72	0–1.76		0.09 ± 0.11	0–0.24		0.0480
Benzo(<i>g,h,i</i>)perylene	29.41 ± 12.17	11.68–42.62		21.96 ± 12.43	0–30.11		15.57 ± 9.54	8.45–33.72		9.24 ± 10.82	0–24.3		0.06 ± 0.07	0–0.17		0.0024
Indeno(1,2,3- <i>cd</i>)pyrene	13.63 ± 6.54	5.01–21.43		9.88 ± 5.65	0–14.15		11.2 ± 10.01	3.52–12.78		4.79 ± 6.32	0–11.86		0	0		0.0054
Total PAHs	103.23			76.21			57.33			34.94			1.55			
Low MW/heavy MW	0.52			0.45			0.64			0.68			7.29			

PAHs: polycyclic aromatic hydrocarbons.

MW: molecular weight.

^a Mean levels are expressed as described in Table 1.

Table 4

Mean^a levels of VOCs and PAHs biomarkers in taxi-moto drivers and control (phase 1)

Biomarkers	Taxi-moto driver (n=35)	Village control (n=6)	p
DNA adducts (fmol/μg DNA)	0.31 ± 0.16 (0.06–0.64)	0.13 ± 0.03 (0.0–0.74)	<0.05
8-OHdG/10 ⁵ dG	2.05 ± 1.25 (0.38–7.64)	1.11 ± 0.82 (0.37–2.26)	<0.05
m ⁵ dC (%), 10 μg DNA	46.6 ± 13.6 (5–86)	26.83 ± 8.08 (15–36)	<0.05

VOCs: volatile organic compounds.

PAHs: polycyclic aromatic hydrocarbons.

8-OHdG: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine.

m⁵ dC: methylated 5-deoxycytosine.^a Mean levels are expressed in Table 1.

(0.06–0.25) for taxi-moto drivers and village control subjects, respectively ($p < 0.05$).

The level of oxidative DNA base modification measured by 8-OHdG in lymphocyte DNA was higher in Cotonou group (2.05 ± 1.25 8-OHdG/10⁵ dG) compared with village residents (1.11 ± 0.82) (Table 4) ($p < 0.05$).

The fragmentation of DNA as determined by electrophoresis of lymphocyte DNA (Fig. 1) showed that 10 out of 35 taxi-moto drivers had fragmented DNA as compared to 1 out of 6 among the controls; however, the distribution is not statistically significant ($p = 0.54$, χ^2 test). Alterations in the DNA structure such as hypermethylation of DNA bases may occur at high level of air pollution. Therefore, we analysed the ratio of m⁵dC/dC+m⁵dC in lymphocytes of exposed subjects and village peoples. The mean value was $46.6\% \pm 13.6$ in the exposed group for 10 μg DNA (range 5–86) and $26.8\% \pm 8.1$ (range 15–36) in control (Table 4).

4. Discussion

The aim of this study was to investigate the exposure to genotoxic compounds present in ambient air, using biomarkers. With regards to benzene level in air (phase 2), analysis of samples collected during the end of the rainy season (August 2002) in Cotonou, Benin, showed that most of the values by far exceeded the WHO recommended guidelines, 5 μg/m³. Preliminary data from the first phase of the study (March 2001; unpublished data) revealed a much higher level of benzene in taxi-moto drivers (292 μg/m³) and people living near the Marina intersection (280 μg/m³). The seasonal variation in benzene air concentration could

be due to meteorological conditions, e.g. because of higher temperature and humidity, and lower wind speed in March compared to August (level of benzene decreased with temperature and humidity). In comparison, subjects from the village were exposed to low concentrations of benzene in the air because of low traffic density. The benzene concentration in Cotonou we measured in this study was lower than the level reported in Lagos, Nigeria (250 μg/m³), city with a higher traffic density (Baumbach et al., 1995). However, the benzene level in the air in Cotonou was higher than the level in Bangkok (42.4 μg/m³, Leong et al., 2002) and Mexico city (43.2 μg/m³, Ortiz et al., 2002). In European cities where the traffic intensity is high but the gasoline is of good quality, ambient concentrations of benzene is considerable lower than observed in Cotonou, e.g. Grenoble (23.5 μg/m³, Maitre et al., 2002), Biella and Torino (10.3 μg/m³, Bono et al., 2003) and Copenhagen (2.5 μg/m³, Sørensen et al., 2003a). The close association between ambient benzene concentrations and traffic intensity observed in this study can also be observed in less polluted cities; e.g. our results are in agreement with a previous report from Italy showing that benzene concentration in a suburban area with low traffic was 2.3 μg/m³ versus 10.3 in the city centre (Bono et al., 2003). The rural area in Benin had lower level of benzene than the recommended guideline issued by WHO.

The ratio of benzene/toluene in Copenhagen is 0.13 (Sørensen et al., 2003a), and 0.22 for Mexico City (Ortiz et al., 2002). However, this ratio has been shown to be higher in less developed countries like Teheran, Iran (0.63, Bahrami, 2001). The values obtained in Cotonou among taxi-moto drivers (0.53), people living near intersections (0.39 for

Saint Michel and 0.54 for Marina) and people living in the village (0.65) are comparable to those obtained from other developing countries. The differences observed in developing and developed countries may be due to differences in composition of the fuels and/or vehicle type. The differences observed within Benin between the village and Cotonou could be due to different sources of the cooking behaviour, e.g. the use of charcoal, and firewood that emits benzene (Olsson and Petersson, 2003). Epidemiological studies indicate that high level of benzene is associated with higher incidence of leukemia (Guénel et al., 2002), as well as higher frequency of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in lymphocytes (Tsutsui et al., 1997). A survey on the incidence of cancer in Benin has shown an increase in the level of different cancers (blood neoplasm, neutropeny, lymphopeny) from 6.8% to 15.4% between 1995 and 1999 (Adjagba, 2000). In addition, a recent study on blood parameters indicated that taxi-moto drivers in Cotonou had haematological parameters showing pathologic conditions: anaemia and low level of blood platelets (Sanni et al., unpublished data).

Benzene can be excreted unmetabolised in the urine or can be transformed into primary and secondary metabolites that can be excreted into the urine and serve as biomarkers for benzene. The level of benzene excreted in urine was highest in inhabitants of Cotonou. People living in the Marina area showed a high level of benzene in urine compared to those living in rural area.

The differences in urinary S-PMA excretion was similar to that observed for urinary benzene; taxi-moto drivers and people who live near crossroads have higher level of S-PMA than those from the village (Table 2). Overall, the level of benzene was approximately 10-fold higher in urine obtained from people living in the city compared to those living in the village, whereas the level of S-PMA was only 2-fold higher in the city, suggesting that at high exposure, alternative detoxification pathway may take over. This pathway will also be influenced by genetic risk factors, e.g. GSTT1, but this study was too small to study the effect of genetic polymorphism in this family of genes.

This investigation showed that the level of particles in Cotonou was higher compared to the village (total

PAHs: Saint Michel 103.23 ng/m³ versus 1.55 for village). This level was also higher than in Bangkok (Ruchirawat et al., 2002) and in European cities, e.g. Athens (Kirtopoulos et al., 2001). The ratio between the different PAHs was not similar in the different areas where the study was conducted in Benin. The ratio between low and high molecular weight PAHs was 0.52 for Saint Michel and 0.45 for Marina. These ratios suggest that in crossroads, heavier PAHs were 2-fold higher than lighter ones. A similar observation has been reported in Bangkok, Thailand (Ruchirawat et al., 2002). This difference in profiles of PAHs at different locations in Benin could be due to intensity and types of traffic, e.g. diesel-powered vehicles. In fact, Marina is a crossroad used by heavy trucks and trailers conveying goods to the north of Benin and neighbouring countries (Togo, Niger, Burkina Faso and Mali).

The level of indoor PAHs in Cotonou was higher during the day (57.33 ng/m³) than at night (34.94 ng/m³). The difference between indoor total PAHs during the day and night could be explained by the higher generation of traffic-related PAHs that readily penetrate indoor, but the use of firewood and charcoal for domestic and commercial cooking during the day may also be of importance as local indoor sources of PAHs. The level of carcinogenic B(a)P in Cotonou ambient air was similar to the level reported in Bangkok and in most western European and US cities, i.e. range 1–5 ng/m³ (Menichini, 1992). However, in contrast to Bangkok and western cities, people living near crossroads in Cotonou are exposed to the high level of B(a)P (e.g. Dedokpo with B(a)P concentrations in the range of 0.92–13.74) probably due to the effect of air and indoor pollution. The ratio of low versus high molecular weight PAHs in the village was 7-fold. Forest fire or excessive use of firewood may be the reason behind the high PAH ratio found in the village.

Urinary 1-HOP, commonly used as a biomarker of PAH, was higher in taxi-moto drivers than in village residents (0.60 ± 0.06 μmol/mol creatinine versus 0.33 ± 0.05). This level was higher than previous studies in Bangkok (0.18; Ruchirawat et al., 2002). This value was also higher than that observed in diesel exhaust-exposed workers (0.11) in Denmark (Nielsen et al., 1996) and in Copenhagen (0.25; Autrup et al., 1999). However, this value was lower compared to the

level in coke oven workers (5.53; Øverbo et al., 1995). Surprisingly, a Caucasian living in a residential area of Cotonou had a significantly lower level of 1-HOP than that of African neighbours (unpublished). This could indicate that the African lifestyle is an important contributor to pyrene exposure, i.e. food or food preparation. Food has previously been shown to be an important source of pyrene (Knize et al., 1999).

Carcinogen-DNA adducts are commonly used biomarkers to assess exposure for carcinogens present in ambient air. Carcinogen-DNA adduct levels appear to be a good indicator for cancer risk, as current smokers with high level of PAH adducts in lymphocytes DNA had a higher risk of developing lung cancer (Veglia et al., 2003). The mean value of DNA adducts in lymphocytes of taxi-moto drivers was 0.31 ± 0.16 fmol/ μg DNA versus 0.13 ± 0.03 for village subjects. This level was lower than a previously reported mean value of DNA adducts for diesel exhaust-exposed workers (0.82 fmol/ μg DNA, Nielsen et al., 1996) and for Bangkok traffic police (Ruchirawat et al., 2002). Meanwhile, the level of bulky DNA adducts in Cotonou was similar to the level of non-exposed people living in central part of Copenhagen. The lower level of adducts observed among taxi-moto drivers in Cotonou could be a result of different composition of air pollution compounds that generate different types of bulky DNA adducts, or could be a result of different dietary intake of protective compounds, e.g. dietary nutrients modulate DNA adduct levels (Palli et al., 2003).

It has been demonstrated that exposure to xenobiotics is associated with oxidation of 2'-deoxyguanosine, especially generation 8-OHdG, and methylation of 2'-deoxycytosine to (m^5dC). Exposure to particles also increases the level of oxidized guanine (Sørensen et al., 2003b). The level of 8-OHdG was higher in taxi-moto drivers DNA (2.05 ± 1.25 per 10^5 dG) than in subjects from the village (1.11 ± 0.82 per 10^5 dG), but lower than the level of roofers exposed with coal-tar pitch dust and/or asphalt fume (12.4 – 15.7 per 10^5 dG) (Toraason et al., 2001). It should be noted though that the level of 8-OHdG observed in this study is in the excess of the level that is commonly accepted to be the baseline level of oxidative DNA damage in human lymphocyte DNA (ESCODD, 2003). This may well be due to spurious oxidation during isolation,

storage and transport of lymphocytes. Indeed, a recent study of subjects in Cotonou showed 30-fold lower levels of oxidized guanines (i.e. 0.06 oxidized guanine lesions per 10^5 dG), measured by the formamidopyrimidine DNA glycosylase-modified version of the alkaline comet assay (Avogbe et al., 2005).

In conclusion, this study has shown that the ambient air in Cotonou is polluted. Benzene and its derivatives are found in high level in the air. This may have many adverse health effects and diseases and enormous implication on public health in Cotonou. The WHO working Group on air pollution estimated the lifetime risk of leukaemia to six cases per million among people exposed to $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ of benzene in air (WHO, 1996). The level we are reporting in Benin Republic is alarming (benzene mean value $76 \mu\text{g}/\text{m}^3$ for moto-drivers). The risk of leukaemia exceeds by far the acceptable level of one case per 10^6 per lifetime. However, Cocheo et al. (2000) showed that ambient benzene concentrations are not sufficient per se to estimate personal exposure. Indeed we must consider biomarkers of internal and biological effective exposure, and all the process of enzymatic detoxication or activation of xenobiotics. This study shows a plethora of elevated DNA damage in air pollution exposed subjects, including oxidized, methylated and bulky DNA lesions, DNA structural changes as illustrated by DNA fragmentation as well as DNA modifications such as hydroxylation, methylation and likely bulky DNA adducts, on exposed studied populations. These results suggest that ambient air in Cotonou contains high levels of genotoxic compounds, such as benzene and PAHs, as compared to village. Benzene is of the most important concerns of the carcinogenic compounds, because its level is at least 10 times higher than that recommended by WHO.

Acknowledgements

The authors thank all the volunteers who agreed to participate to this study.

This study was partially supported by a grant of the Beninese Agency for Environment of the Ministry of Environment, Housing and Town Planning, Republic of Benin. The Danish Embassy in Benin Republic provided the major financial support for this study,

through its program on Health Research and Environmental Pollution in Benin Republic.

Analysis performed in Benin Republic were carried out in the Institut de Sciences Biomedicales Appliquees (ISBA).

The technical assistance of Duy Anh Dang, Århus, Dk and H. Tainia, Athens is greatly appreciated.

References

- Adjagba MPD. Contribution a l'étude épidémiologique des cancers en République du Bénin hèse de Doctorat en Medecine à l' Université Nationale du Bénin 2000. No. 868.
- Autrup H. Genetic polymorphism in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res* 2000;464:65–76.
- Autrup H, Daneshvar B, Dragsted LO, Gamborg M, Hansen AM, Loft S, et al. Biomarkers for exposure to ambient air pollution—comparison of carcinogen-DNA-adduct levels with other exposure markers and markers for oxidative stress. *Environ Health Perspect* 1999;107:233–8.
- Avogbe PH, Ayi-Fanou L, Autrup H, Loft S, Fayomi B, Sanni A, et al. Ultrafine particulate matter and high-level benzene urban air pollution in relation to oxidative DNA damage. *Carcinogenesis* 2005;26:613–20.
- Bahrami AR. Distribution of volatile organic compounds in ambient air of Tehran. *Arch Environ Health* 2001;56(4):380–3.
- Baumbach G, Vogt U, Hein KRG, Oluwole AF, Ogunsoola OJ, Olaniyi HB, et al. Air pollution in a large tropical city with a high traffic density Results of measurements in Lagos, Nigeria. *Sci Total Environ* 1995;169:25–31.
- Bono R, Seursatone E, Schiliro T, Gilli G. Ambient air levels and occupational exposure to benzene, toluene, and xylenes in north-western Italy. *J Toxicol Environ Health A* 2003;66:519–31.
- Cocheo V, Sacco P, Boaretto C, De Saeger E, Ballesta PP, Skov H, et al. Urban benzene and population exposure. *Nature* 2000;404:141–2.
- ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). Comparative analysis of baseline 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: an approach to consensus. *Carcinogenesis* 2003;23:2129–33.
- Fustinoni S, Giampiccolo R, Pulvirenti S, Buratti M, Colombi A. Headspace solid-phase microextraction for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in urine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999;723:105–15.
- Georgiadis P, Topinka J, Stoikidou M, Kaila S, Gioka M, Katsouyanni K, et al. Biomarkers of genotoxicity of air pollution (the AULIS project): bulky DNA adducts in subjects with moderate to low exposures to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and their relationship to environmental tobacco smoke and other parameters. *Carcinogenesis* 2001;22:1447–57.
- Gounougbe FCA. Pollution atmosphérique par les gaz d'échappement et état de santé des conducteurs de taxi-moto (Zemidjan de Cotonou (Bénin). Thèse de doctorat en Medecine 1999. No. 832.
- Guénel P, Imbernon E, Chevalier A, Crinquand-Clastreng A, Goldberg M. Leukemia in relation to occupational exposures to benzene and other agents: a case-control study nested in a cohort of gas and electric utility workers. *Am J Ind Med* 2002;42:87–97.
- Houkpe BA. Pollution atmosphérique par les gaz d'échappement et état de santé des conducteurs de taxi-moto dans les départements du Mono Thèse de Doctorat en medecine 2002. No. 991.
- Kirtopoulos SA, Georgiadis P, Autrup H, Demopoulos N, Farmer P, Haugen A, et al. Biomarkers of genotoxicity of urban air pollution. Overview and descriptive data from a molecular epidemiology study on populations exposed to moderate-to-low levels of polycyclic hydrocarbons: the AULIS project. *Mutat Res* 2001;496:207–28.
- Knize MG, Salmon CP, Pais P, Felton JS. Food heating and the formation of heterocyclic aromatic amines and polycyclic aromatic hydrocarbons mutagens/carcinogens. *Adv Exp Med Biol* 1999;459:179–93.
- Leong ST, Muttamara S, Laortanakul P. Influence of benzene emission from motorcycles on Bangkok air quality. *Atmos Environ* 2002;36:651–61.
- Maitre A, Soulat JM, Masclet P, Stoklov M, de Gaudemari R. Exposure to carcinogenic air pollutants among policemen working close to traffic in an urban area. *Scand J Work Environ Health* 2002;28:402–10.
- Menichini E. Urban air pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons: levels and sources of variability. *Sci Total Environ* 1992;116:109–35.
- Nielsen PS, Andreassen A, Moller P, Farmer B, Øverbo S, Autrup H. Biomonitoring of diesel exhaust exposed workers DNA and hemoglobin adducts and urinary 1-hydroxypyrene as markers of exposure. *Toxicol Lett* 1996;86:27–37.
- Olsson M, Petersson G. Benzene emitted from glowing charcoal. *Sci Total Environ* 2003;303:215–20.
- Ortiz E, Alemon E, Romero D, Arriaga JL, Olaya P, Guzman F, et al. Personal exposure to benzene, toluene and xylene in different microenvironment at the Mexico city metropolitan zone. *Sci Total Environ* 2002;287:241–8.
- Øverbo S, Fjelstad PE, Grzybowska E, Kurc EH, Chorazy M, Haugen A. A biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in a highly polluted area of Poland. *Environ Health Perspect* 1995;103:838–43.
- Palli D, Masala G, Vineis P, Garte S, Saieva C, Krogh V, et al. Biomarkers of dietary intake of micronutrients modulate DNA adduct levels in healthy adults. *Carcinogenesis* 2003;24:739–46.
- Peluso M, Ceppi M, Munia A, Puntoni R, Parodi S. Analysis of ³²P postlabelling studies on occupational cohorts exposed to air pollution. *Am J Epidemiol* 2001;153:546–58.
- Risom L, Møller P, Loft S. Oxidative stress-induced DNA damage and particulate air pollution. *Mutat Res* in press.
- Ruchirawat M, Mahidol C, Tangjarukij C, Pui-Ock S, Jensen O, Kampeerawipakorn O, et al. Exposure to genotoxins present in ambient air in Bangkok, Thailand—particle associated polycyc-

- lic aromatic hydrocarbons and biomarkers. *Sci Total Environ* 2002;287:121–32.
- Snyder R, Witz G, Goldstein BD. The toxicology of benzene. *Environ Health Perspect* 1993;100:293–306.
- Sørensen M, Skov H, Autrup H, Hertel O, Loft S. Urban benzene exposure and oxidative DNA damage: influence of genetic polymorphisms in metabolism genes. *Sci Total Environ* 2003a; 309:69–80.
- Sørensen M, Dragsted LO, Hertel O, Knudsen LE, Loft S. Personal PM_{2.5} exposure and markers of oxidative stress in blood. *Environ Health Perspect* 2003b;111:161–6.
- Toraason M, Hayden C, Marlow D, Rinehart R, Mathias P, Werren D, et al. DNA strand breaks, oxidative damage, and 1-HO pyrene in roofers with coal-tar pitch dust and/or asphalt fume exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 2001;74:396–404.
- Traore A, Ruiz S, Baudrimont I, Sanni A, Dano SD, Guarigues PH, et al. Combined effects of okadaic acid and cadmium on lipid peroxidation and DNA bases modifications (m5dC and 8-HO-dG) in Caco-2 cells. *Arch Toxicol* 2000;74:79–84.
- Traore A, Baudrimont I, Ambaliou S, Dano SD, Creppy EE. DNA breaks and cell cycle arrest induced by okadaic acid in caco-2 cells, a human colonic epithelial cell line. *Arch Toxicol* 2001; 75:110–7.
- Tsutsui T, Hayashi N, Maizumi H, Huff J, Carl Barrett J. Benzene, catechol, hydroquinone and phenol-induced cell transformation, gene mutation, chromosomes aberration, aneuploidy, sister chromatid exchanges and unscheduled DNA synthesis in Syrian hamster embryo cells. *Mutat Res* 1997;373:113–23.
- Van Sittert NJ, Boogaard PJ, Beulink GD. Application of the urinary S-phenylmercapturic acid test as a biomarker for low levels of benzene in industry. *Br J Ind Med* 1993;50:460–9.
- Veglia F, Matullo G, Vinies P. Bulky DNA adducts and risk of cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003;12:157–60.
- Waidyanatha S, Rothman N, Fustinoni S, Smith MT, Hayes RB, Bechtold W, et al. Urinary benzene as a biomarker of exposure among occupationally exposed and unexposed subjects. *Carcinogenesis* 2001;22:279–86.
- WHO. Guideline on ambient air quality. Regional Office for Europe, World Health Organisation, Copenhagen, EURO Reports on WHO meeting, 1996.
- Yin SN, Hayes R, Linet MS, Li GL, Dosemeci M, Travis LB, et al. An expanded cohort study of cancer among benzene exposed Workers in China Benzene Study Group. *Environ Health Perspect* 1996;104:1339–41.

PUBLICATION N°3

DNA-Adducts in Subjects Exposed to Urban Air Pollution by Benzene and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Cotonou, Benin

Lucie Ayi-Fanou,¹ Patrice H. Avogbe,¹ Benjamin Fayomi,² Gerard Keith,³ Codjo Hountondji,⁴ Edmond E. Creppy,^{5*} Herman Autrup,⁶ Bertrand Henri Rihn,⁷ Ambaliou Sanni¹

¹Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, FAST/UAC, Bénin

²Unité d'Enseignement et de Recherche au Travail et Environnement, FSS/UAC, Bénin

³Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France

⁴Laboratoire de Photobiologie Moléculaire, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

⁵Laboratory of Toxicology and Applied Hygiene, University of Bordeaux2 Victor segalen, Bordeaux

⁶Department of Environmental and Occupational Medicine, Institut of Public Health, University of Aarhus, Denmark

⁷EA 3452, Nancy-University, Nancy, France

Received 6 April 2009; revised 19 July 2009; accepted 21 July 2009

ABSTRACT: Air pollution effect on humans represents a major public health problem. Exposure to genotoxic compounds in the ambient air is evaluated using different biomarkers. In the present study we assessed DNA-adducts levels in apparently healthy people living and working in the city of Cotonou (Benin) in which exposure to air pollutants such as benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) mainly benzo(a)pyrene has been evidenced. Rural inhabitants were enrolled as control group. Taxi-motorbike drivers, street food vendors, and gasoline salesmen were recruited in Cotonou whereas suburban residents were recruited in Godomey, 12 km from Cotonou. We found that taxi-motorbike drivers, roadside residents, street vendors, taxi-motor-bike drivers and gasoline sellers had significantly higher levels of DNA-adducts than suburban and village inhabitants ($P < 0.001$; *post hoc*, LSD). Means values were 24.6 ± 6.4 , 23.78 ± 6.9 , 34.7 ± 9.8 , and 37.2 ± 8.1 in the exposed groups versus 2.1 ± 0.6 and 3.1 ± 0.8 adducts/ 10^8 nucleotides, in the two control groups, respectively. We did not find any significant difference within the high exposure groups and inside low exposure subgroups (namely suburban residents and villagers) because the mean individual exposure values to both PAHs and benzene were similar among subjects exposed in the city of Cotonou and those in suburban and village areas. However, there is significant interindividual variations in adducts levels that may reflect variation of genetic susceptibility factors.

*Correspondence to: Prof. E. E. Creppy; e-mail: edmond.creppy@tox.u-bordeaux2.fr

Contract grant sponsors: Denmark Republic (DANIDA Institution), Benin Republic (Ministère de l'environnement, de l'Habitat et de l'Urbanisme, MEHU), and France Republic (IBMC Strasbourg)

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/tox.20533

© 2009 Wiley Periodicals, Inc.

Ranges of adduct level/ 10^8 nucleotides were: 1–69, 1–76, 3–169, 4–124, 0–9, 0–8 adducts/ 10^8 for taxi-motorbike drivers, roadside residents, street vendors, gasoline sellers, suburban and village inhabitants, respectively. Our study demonstrated a clear-cut elevated level of DNA adducts in city residents than in none exposed people (or very low exposure levels people) and designate these city residents groups as people at risks for the chronic diseases possibly caused by benzene and PAHs. © 2009 Wiley Periodicals, Inc. Environ Toxicol 00: 000–000, 2010.

Keywords: air pollution; PAHs; benzene; exposed and none exposed subjects; DNA-adducts; ^{32}P postlabelling

INTRODUCTION

Epidemiologic studies published over the past years reported that exposure to ambient air pollution may be associated with increased risk of developing several chronic diseases including cancer in the general population. Human exposure occurs through inhalation of environmental cancer-causing pollutants such as, fossil fuel incomplete combustion products, benzene and PAHs.

Due to an absence of reliable public transportation, more than 80,000 motorbikes circulate in Cotonou (Ayi-Fanou et al., 2006). In the year 2000, the Ministry of Environment, House and Town Planning, estimated the number of all types of vehicles to be about 250,000 in the city of Cotonou, most of them were very often in bad mechanical state.

It has been demonstrated recently that ambient air in Cotonou, the economical capital of Benin, is heavily contaminated with various air pollutants (Ayi-Fanou et al., 2006). The main pollutants were benzene at concentrations of $76.0 \pm 26.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in Cotonou, compared with $3.4 \pm 3.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in villages located far from Cotonou. This benzene concentration in the air largely exceeded the $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ recommended by World Health Organization (WHO IARC 1983) and polycyclic aromatic hydrocarbons (total PAHs) at concentrations of $103 \text{ ng}/\text{m}^3$ in Cotonou *versus* $1.6 \text{ ng}/\text{m}^3$ in villages. It is well known that prolonged exposure to benzene causes a serious damage to hematopoiesis resulting in aplastic anemia and sometimes in blood cancers (Rinsky et al., 1987).

PAHs are among the major carcinogenic agents which have been associated to an increased risk of respiratory and

neoplastic diseases since 1983 (WHO, 1983). PAHs in general and benzene at a lesser extend are capable of forming DNA-adducts following metabolic activation. The capacity of DNA-adducts formation by benzene is evidenced by its covalent binding index of 10 (Arfellini et al., 1985). The DNA-adduct are predominantly formed with guanine or adenine (Nielsen et al., 1996a; Ayi-Fanou et al., 2006). In addition PAHs as well as volatile organic compounds (VOCs), such as benzene are capable of inducing oxidized bases in the DNA through reactive oxygen species production. These oxidized DNA bases are known to be highly mutagenic, (Collins, 1999).

Exposure to those genotoxic compounds is currently assessed using the DNA ATP- γ ^{32}P -postlabeling method of Randerath or personal monitoring of ambient air pollution (Keith and Dirheimer, 1995; Randerath et al., 1999; Ayi-Fanou et al., 2006; Avogbe et al., 2005), both methods qualified for risk assessment. A dose–response relationship between the amounts of bulky DNA-adducts and the levels of PAHs in both occupational conditions and in the general environment have been reported (Schoket et al., 1998). Moreover a study carried out in Copenhagen bus drivers, occupationally exposed to high ambient air pollution by PAHs, revealed significant DNA adducts levels in drivers working in central Copenhagen compared with those driving in the suburbs (Nielsen et al., 1996b).

The objective of the present study was to investigate the relationship between the levels of DNA-adducts as biomarkers of the exposure to PAHs using the ATP- γ ^{32}P postlabeling method in order to evaluate the risk for those exposed to these toxicants in the ambient air. In this purpose four target populations have been selected inside the city of Cotonou, namely taxi-motorbike drivers, roadside subjects, street vendors, gasoline salesmen who were compared with suburban residents and rural inhabitants.

MATERIALS AND METHODS

Subjects Recruitment

The study group consisted of 94 healthy consenting volunteers. Except the village participants all others subjects were recruited in the city of Cotonou, e.g., of taxi-motorbike drivers who use to drive daily for at least 8 h in

Abbreviations

ABE	Benin Environmental Agency
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$	adenosine triphosphate labelled on phosphate γ
B(a)P	benzo(a)pyrene
EDTA	ethylen diamin tetraacetic
DNA	Deoxy ribonucleic acid
GST	glutathion-S-transferase
1-(HOP)	1-hydroxypyrene (1-HOP)
LSD	least standard deviation
LsD	least significant difference
PAHs	polycyclic aromatic hydrocarbons
PEI	polyethyleneimine
SB DNA	strand break
TLC	thin layer chromatography
UFP	ultrafine particulate
VOCs	volatil organic compounds
WHO	World Health Organization

Cotonou, subjects living near polluted crossroads, such as Marina called "roadside residents," street food vendors, and people selling gasoline for the whole day nearby crossroads with high traffic intensity according to the previously published data (Ayi-Fanou et al., 2006). Some suburb residents of Godomey have been selected as representing an intermediate exposure condition. Each participant completed a consent form and answered questionnaire that provides the following information, age, and sex, history of tobacco use, and health status. Participants were divided into putative two groups, based on the level of exposure following the data obtained by Ayi-Fanou et al. (2006) before the individual exposure evaluation. The low exposure group consisted of suburban subjects and the village residents and the other four were considered as high exposure group. The study was approved by the Benin Environmental Agency (ABE).

Samples Collection

Venous blood samples were collected in Vacutainer EDTA[®] tubes during a period of 1 week in 2003. For comparison purpose of DNA-adduct levels in the general population, we sampled subjects from the village of Sohon that lies about 80 km far from Cotonou, as a control group. Samples were transported to the laboratory on ice. Upon arrival at the laboratory of Biochemistry and Molecular Biology in Cotonou, lymphocytes were isolated within 3 h using Ficoll-plaque Plus[™] procedure (Eurobio) and were stored frozen at -20°C until DNA extraction.

Air Sampling

Air sampling has been performed during at least 6 h per day using a glass fiber filter and a Chromosorb 102 solid sorbent tube. The samples have been analyzed for total PAHs and Benzo(a)pyrene, by high performance liquid chromatography (HPLC), and spectrofluorometric detection (SFD).

Urine Samples

Collection of spot urine samples was performed between 4 and 6 p.m. (i.e., after at least 8 h in the polluted air). Then 1-hydroxypyrene was separated by HPLC and quantified using a Spectrofluorometric detector.

PAHs and (B(a)P Analysis in Ambient Air

Attempts were made to measure 13 PAHs (naphthalene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benz(a)anthracene, chrysene, benzo(e)pyrene, perylene, benzo(a) pyrene, dibenz(a,h)anthracene, and benzo(g,h,i)perylene) following separation by high performance liquid chromatography and fluorescence detection (Jasco 821-FP spectrofluorometer, Japan Spectroscopic). A ChromSpher PAH column (200 mm length, 3 mm internal diameter)

from Chrompack was used. Elution was performed at a flow rate of 0–5 mL/min using a gradient of water/acetonitrile from two pumps (Bischoff Chromatography, Germany) according to the following program: 50/50 mixture from 0 to 15 min, then 0/100 for 12 min then 50/50 again for 8 min. One cycle lasting 35 min. Samples were injected with an autosampler (Bischoff, Germany). The detection of PAHs was performed by fluorimetry (821-FPJasco spectrofluorometer); for naphthalene, fluorene, and phenanthrene the excitation and emission wavelengths were 280 and 350 nm; for the other compounds, 305 and 430 nm. However conditions for benzo(a)pyrene (BaP) quantification were firstly applied, excitation 263 nm, emission 410 nm. Other conditions were applied for confirmation. Six standard PAH mixtures (Alltech Associates, Deerfield, IL) were used as reference materials. Results are reported as the sum of all PAHs measured (total PAHs concentration).

Hydroxypyrene and Phenol Analysis in Urine

For metabolites measurement in urines the technique included a prior enzymatic hydrolysis of the conjugates with a mixture of glucuronidase and sulfatase from Helix pomatia (Sigma Aldrich); followed by sample purification on octadecyl silica cartridges (Bond-Elut 100 mg, Analytichem, CA). Chromatography was carried out with a model of ET 250/8/4 Nucleosil 10, C18 column (VWR, Chromosorb, France); using two pumps (Bischoff Chromatography, Germany) delivering, either pure acetonitrile (solvent A) or 10% acetonitrile in water containing 0–5 mL glacial acetic acid/L (solvent B) at a flow rate of 1 mL/min to make the elution gradient: from 100 to 20% solvent B in 25 min, from 20 to 0% solvent B in 2 min, isocratic (pure solvent A) elution during 3 min, 100% solvent B in 2 min and re-equilibration of the column for 8 min before a new analysis cycle. Hydroxypyrene was detected by fluorimetry (excitation: 240 nm; emission: 390 nm; 821-FP Jasco spectrofluorometer). The calibration was made with a control urine sample spiked with 10 μg hydroxypyrene/l (Sigma-Aldrich); the detection limit was 0–2 $\mu\text{g}/\text{L}$.

In the same urine samples, phenol was measured by HPLC with UV detection as described previously by Weaver et al. (1996).

Results were standardized to 1 g urinary creatinine.

Enzymes and Chemicals

Proteinase K (EC 3.4.21.64), ribonuclease A (EC 3.1.4.22), micrococcal nuclease (EC 3.1.4.7), spleen alkaline 5'phosphodiesterase (EC 3.1.4.1), and T4 polynucleotide kinase (EC 2.7.1.78) were purchased from Amersham Bioscience and nuclease P1 (EC 3.1.30.1) from Sigma. Ficoll-plaque Plus[™], [γ -³²P] ATP were also from Amersham Bioscience and phenol (CAS Number 108-95-2), chloroform (CAS Number 67-66-3), isoamyl alcohol (CAS

TABLE I. Some data on individual exposure values to total PAHs and benzene by urinary excretion of phenol and 1-hydroxypyrene as biomarkers, expressed as mean \pm SEM

PAHs in Outdoor Air ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Benzene in Outdoor Air (mg/m^3)*	Urinary Excretion of Phenol Adjusted to Creatinine (mg/g)	1-Hydroxypyrene Adjusted to Creatinine ($\mu\text{g}/\text{g}$)
$1.6 \pm 1.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$	$3.4 \pm 3.0 \text{ mg}/\text{m}^3$	Village ($n = 17$) 9.1 ± 1.7^a	Village ($n = 17$) 3.07 ± 2.1 (d)
$2.5 \pm 1.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$	$4.3 \pm 2.5 \text{ mg}/\text{m}^3$	Suburban ($n = 20$) 13.5 ± 1.4^b	Suburban ($n = 20$) 4.8 ± 2.5 (d)
$103 \pm 13 \mu\text{g}/\text{m}^3$	$76.0 \pm 26.8 \text{ mg}/\text{m}^3$	TMD ($n = 13$) 155.5 ± 15.6 (c)	TMD ($n = 13$) 254.3 ± 27.6 (c)
$103 \pm 13 \mu\text{g}/\text{m}^3$	$76.0 \pm 26.8 \text{ mg}/\text{m}^3$	RR ($n = 11$) 155.5 ± 15.6^c	RR ($n = 11$) 254.3 ± 27.6^c
$103 \pm 13 \mu\text{g}/\text{m}^3$	$76.0 \pm 26.8 \text{ mg}/\text{m}^3$	SV ($n = 16$) 155.5 ± 15.6^c	SV ($n = 16$) 254.3 ± 27.6^c
$103 \pm 13 \mu\text{g}/\text{m}^3$	$76.0 \pm 26.8 \text{ mg}/\text{m}^3$	GS ($n = 17$) 155.5 ± 15.6^c	GS ($n = 17$) 214.3 ± 27.6^c

1 ppm = $3.2 \text{ mg}/\text{m}^3$

Those bearing the same letter ^c or ^d are not significantly different.

^aDifferent from ^b at $P = 0.05$.

^cDifferent from ^a and ^b at $P = 0.001$.

^dDifferent from ^d at $P = 0.001$.

Number 123-51-3), and the other chemical compounds from Sigma.

DNA Extraction and ^{32}P Postlabeling of DNA Adducts

DNA was extracted from lymphocytes using standard phenol/chloroform/isoamylalcohol extraction method. All DNA samples were stored frozen at -20°C and were shipped on dry ice to *Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire* at Strasbourg (France) for DNA-adducts determination using the ^{32}P -postlabeling method as previously described (Randerath et al., 1985; Reddy and Randerath, 1986; Binkova et al., 1998) with minor modifications. Briefly, $7 \mu\text{g}$ of DNA was digested by micrococcal nuclease and spleen phosphodiesterase for 4 h at 37°C . Adducts were then enriched by nuclease P1 treatment, afterward a postlabeling reaction was carried out and adduct purification was performed by thin layer chromatography (TLC) on polyethyleneimine (PEI, CAS 26913-06-4) cellulose. The labeled adducts were detected by autoradiography following 24 or 48 h exposure, and quantified with Bio-Imager Bas2000 phosphoranalyser (Fuji, Tokyo, Japan). DNA adduct levels were expressed as mean of DNA adducts per 10^8 nucleotides of two independent assays calculated from the amount of DNA hydrolyzed and the specific radioactivity of the used [γ - ^{32}P]-ATP (Phillips and Castegnaro, 1999).

A mixture of adducts from a heavily exposed individual and a less exposed individual (1/2 of the amounts loaded above for single chromatography) was comigrated in identical conditions and quantified similarly. This has been done taking randomly three different couples of individuals. The results are reported in Figure 3.

Statistical Analysis

Values are given as mean \pm SEM. of number of DNA-adducts per 10^8 nucleotides. Data were transformed by the natural logarithm before analysis to satisfy the distribu-

tional assumptions of conditional normality and homogeneity of variance. Differences between group were analyzed by ANOVA with differences being statistically significant at a P value $< 5\%$ and a *post hoc* analysis as least significant difference (LSD) at $\alpha < 5\%$. All statistical analyses were performed using SPSS version 11.0 for Windows 2001.

RESULTS

Ninety four subjects were recruited in the present study following the withdrawal of smokers (Tables I and II). The ages and respective numbers of individuals per group are given in Table II. The overall average age is 29 ± 7 , with a sexes ratio (M/F) of 0.88 (44/50).

Exposure Assessment

The exposure has been assessed, the following values were found: benzene in the outdoor ambient air was quantified at concentrations of $76.0 \pm 26.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in Cotonou, compared with $3.4 \pm 3.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in villages located far from Cotonou (Table I). This benzene concentration is a mean value of ($n = 9$) determinations performed on three consecutive days in three urban polluted areas ($101\text{--}170 \mu\text{g}/\text{m}^3$) where people were recruited. These benzene concentrations largely exceeded the $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ recommended by World Health Organization (WHO IARC, 1983).

AS for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) they were found to be at concentrations of $103 \pm 13 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in Cotonou versus $1.6 \pm 1.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in villages and $2.5 \pm 1.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in the suburban areas (Table I). The specific values from the polluted areas ranged from 87 ± 16 to 118 ± 11 .

Characterization of the airborne concentration of 13 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) was performed once per day (6 h) at each location on 3 consecutive days.

Validation of the urinary excretion of 1-hydroxypyrene (hydroxypyrene) as a biological marker of exposure to PAH was also performed once per individual either on day

TABLE II. Information on different groups and levels of DNA-adducts, as determined by ^{32}P -postlabelling method

	Low Exposure Groups		High Exposure Groups			
	Village	Suburban	TMD	RR	SV	GS
Number	17	20	13	11	16	17
Age \pm SD	40 \pm 12	36 \pm 13	36 \pm 6	37 \pm 9	30 \pm 8	32 \pm 9
Mean \pm SEM of DNA adducts ⁵	3.1 \pm 0.8	2.1 \pm 0.6	24.6 \pm 6.4	23.7 \pm 6.9	34.7 \pm 9.8	37.2 \pm 8.1
DNA adduct ranges	0–8	0–9	1–69	1–76	3–169	4–124
<i>P</i> value in comparison of DNA adducts between high and low exposure groups		NS	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

No declared smoker is included in the study. However, some suburban subjects and village residents may have not declare the use of wood fire for meal preparation or smoked fish in their diet.

TMD, Taxi-motor bike drivers; RR, roadside residents; SV, street vendors; GS, gasoline sellers, $\times 10^8$ nucleotides; NS: not significantly different from the "village" value.

1, 2, or 3 since they show-up every day and are exposed all day long, the half life for the urinary excretion of hydroxypyrene being around 18–22 h. The values were adjusted to creatinine (Table I).

These measurements showed urinary phenol values from 9.1 ± 1.7 mg/g of creatinine for the village, 13.5 ± 1.4 mg/g for the suburban area, and 155.5 ± 15.6 for the more polluted areas in Cotonou (Table I). The difference was highly significant between exposed people in the city of Cotonou ($P = 0.001$) and those in suburban areas and village. These two groups are also different for phenol excretion ($P = 0.05$).

Concerning hydroxypyrene urinary excretion the values ranged from 3.07 ± 2.1 $\mu\text{g/g}$ in village subjects, 4.8 ± 2.5 $\mu\text{g/g}$ and 254.3 ± 27.6 $\mu\text{g/g}$ in heavily exposed individuals (Table I). No difference could be seen between individuals from village and suburban areas while those exposed in the city of Cotonou showed clear-cut difference as compared to village and suburban people ($P = 0.001$).

Benzene has not been measured in the air this time because the air samples have not been stored in appropriate manner, so they were not useable for the purpose of quantifying this volatile compound.

Mean levels of DNA adduct are summarized on Table II. Taxi-motorbike drivers, roadside subjects, street vendors, and gasoline salesmen have significantly higher DNA adduct levels than suburban subjects and rural inhabitants ($P < 0.001$, *post hoc* LSD), Figure 1.

DNA-adduct levels were not significantly different between suburban subjects and village residents ($P > 0.05$, *post hoc* LSD). Furthermore no statistically significant difference was observed in high exposure subgroups, namely taxi-motorbike drivers, crossroad subjects, street vendors, and gasoline salesmen ($P > 0.05$, *post hoc* LSD). Instead a large inter individual variation in DNA-adducts levels was observed. Ranges of adducts per 10^8 nucleotide were for motorbike taxi-drivers, (1–69), roadside subjects, (1–76), street vendors, (3–169), gasoline

salesmen, (4–124), suburban inhabitants (0–9), and rural inhabitants, (0–8).

Autoradiographic Maps of the ^{32}P -Postlabeled Bulky DNA Adducts

Typical autoradiographic maps of the ^{32}P -postlabeled bulky DNA adducts from different groups of inhabitants living in town and village are shown in Figure 2. In all cases where DNA adducts were present, the major spot was quantified by means of the Mac Bas software. In some cases,

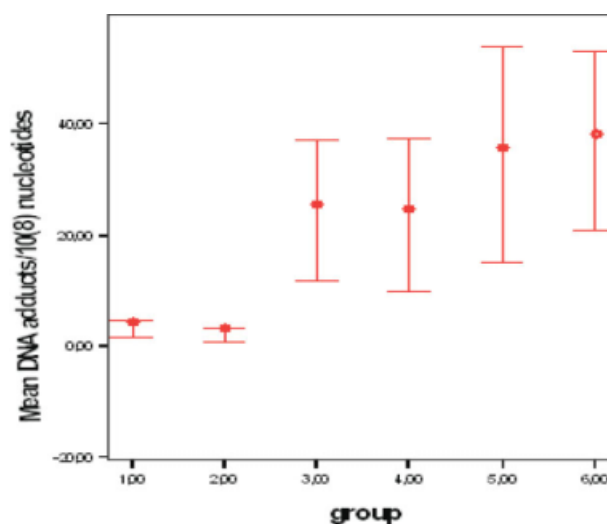


Fig. 1. DNA adducts levels as detected by ^{32}P -postlabeling assay. Anova is statistically significant ($P < 0.001$), and high exposure group is different from the low exposure group ($P < 0.001$, *post hoc* LSD). Data are expressed as mean (point), with SEM (error bar) (1 = village 2 = suburban; 3 = taxi-motor-bike; 4 = roadside; 5 = street vendors; 6 = gasoline sellers). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

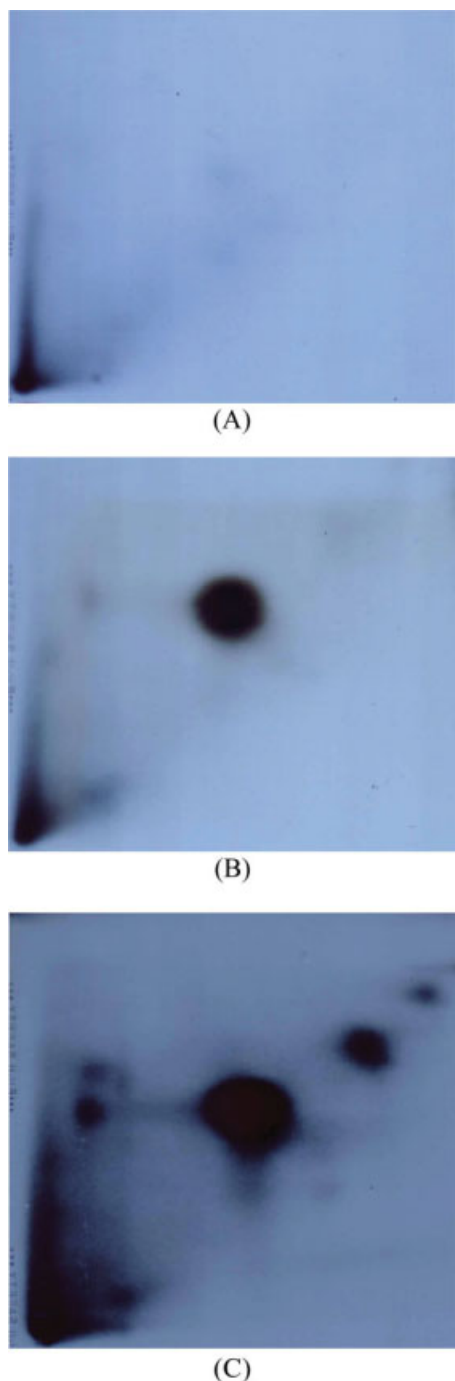


Fig. 2. Typical two-dimensional autoradiographs of ^{32}P -postlabeled DNA-adducts chromatographed on PEI-cellulose TLC plates from circulating white blood lymphocytes. A: No adduct (village resident); B: major adduct ('taxi-motorbike' driver); C: major and additional adducts (street vendor).

additional less intense spots even well resolved on TLC were not taken into account (data not shown). Co migration of DNA-adducts found in exposed groups has shown interestingly that one main spot could be seen indicating a likely

identity of adducts that have migrated to this place (data not shown). This is confirmed by the measurement of the distances of migration from the origin in the two dimensions in three different studies (Fig. 3) indicating possible identity.

A mixture of adducts from a heavily exposed individual and a less exposed individual (1/2 of the amounts loaded above for single chromatography) was comigrated in identical conditions and quantified similarly. This has been done taking randomly three different couples of individuals. The results are reported in Figure 3.

Finally, these DNA-adducts have been compared to adducts formed in WBC of rats exposed to a mixture of benzene and PAHs found to be identical for the main spot, (data not shown) indicating that mainly adducts with PAHs are detected herein. Very interestingly some minor adducts spots have migrated similarly to those found in heavily exposed people (Figs. 2 and 3).

DISCUSSION

In the present study we investigated the formation of bulky DNA-adducts as biomarkers of biologically effective dose of PAHs and some volatile compounds mainly benzene in outdoor air in the center of Cotonou in Benin. Individuals enrolled in this study were 94 adults Beninese, some of which were occupationally exposed to varying levels of genotoxic compounds through ambient air pollution, namely, benzene and PAHs. While village residents are exposed to lower levels of the same pollutants, city residents such as taxi-motorbike drivers and roadside residents are exposed to significantly higher levels of such cancer-causing agents in traffic-jammed areas of Cotonou (Ayi-Fanou et al., 2006).

Individual exposure to PAHs and benzene has been determined; it appeared that the values of PHAs exposure (mainly benzo(a)pyrene) in the urban areas are not

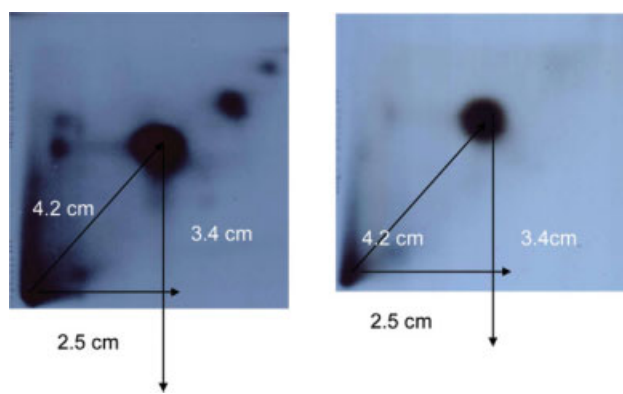


Fig. 3. Super imposition of the spots of the main DNA-adducts and migration distance from the origin.

different. Motorbike taxi-drivers, roadside subjects, street vendors, and gasoline salesmen are apparently equally exposed as indicated by the ambient air concentrations and urinary metabolites. So, it is accordingly normal that the DNA-adducts rates are not different. Our results demonstrated that DNA-adduct levels were significantly higher in city residents i.e., taxi-motorbike drivers, crossroad subjects, street vendors, and gasoline salesmen when compared to rural inhabitants, confirming the significantly higher exposure levels to genotoxic pollutants observed in ambient air in Cotonou. This may be explained by the fact that exposure to pollutants (PAH compounds including B[a]-P) generated from gasoline vapors increased the formation of DNA-adducts in exposed population. These findings are in agreement with those reported by (Ruchirawat et al., 2005) while measuring exposure to PAHs in grilled-meat vendors and clothe vendors in similar areas in Bangkok. Overall, our results are in agreement with a number of studies which reported that populations exposed to environmental air pollution show increased levels of DNA-adducts (Farmer et al., 2003; Singh et al., 2007). However, this is the first study evidencing DNA adduction in an African exposed population as a function of PAH, B[a]-P and benzene outdoor concentrations. Although not yet identified, the major adducts observed may be those generate by PAHs, the major air pollutants found in the ambient air. They could also be similar to the main adducts obtained in bitumen exposed rodents (Micillino et al., 2002; Bottin et al., 2006). Investigations on rat exposed by inhalation (namely whole body and inhalation chamber system) to B[a]-P show that the DNA-adducts found are identical to those found in heavily exposed people (data not shown). The most interesting is that the main spot is absolutely similar while some smaller spots of DNA-adducts migrate more or less to the same distances which are not significantly different following statistical comparison but show some very small differences by superimposition. So, some of the DNA-adducts in WBC of subjects enrolled in the survey may be assigned to B[a]-P in heavily exposed people.

Since DNA damage is believed to be a first step in development of cancer, an increased level of DNA-adducts in city residents may suggest that city residents are of elevated risk for development of chronic lung diseases and cancer related to, benzene and B[a]-P and other PAHs. Similar results have been reported in Thailand, where roadside residents exposed to PAHs (at concentrations about 2.5-fold lower than that found in Cotonou), bear DNA-adducts levels of 0.45 adducts per 10^8 nucleotides, higher than those of rural ones (0.09 adducts/ 10^8 nucleotides) Ruchirawat et al. (2007). As a matter of fact the levels of DNA adducts in the study of Ruchirawat et al. (2007) are lower than those in our study, probably because of the lower concentrations in the outdoor air in Bangkok and likely because of the

improved method of DNA-adducts detection applied in our study.

Likewise, B(a)P-induced DNA-adducts were found significantly higher in policemen working in the streets in Prague compared with nonexposed control (Binkova et al., 2007).

A study carried out in Denmark by (Astrup et al., 1999) found a significantly higher level of carcinogen-DNA adducts in Copenhagen bus drivers than suburban and semi-rural drivers. But levels of DNA-adducts reported in Danish bus drivers (75.4 adducts/ 10^8 nucleotides) are threefold higher than that we are reporting in taxi-motorbike drivers circulating in Cotonou city (24.6 adducts/ 10^8 nucleotides).

In this study, we failed to find differences in DNA adducts levels between taxi-motorbike drivers, crossroad subjects, street food vendors and gasoline salesmen, suggesting nonlinearity in adducts formation under high exposure circumstances to PAHs and also to B[a]-P. This absence of dose-response relationship in adducts formation in high exposure circumstances may be explained by several reasons. The main reason is that even though highly exposed, they show comparable urinary metabolites levels in response to similar ambient outdoor air concentrations of B(a)P and benzene. These results are in agreement with those reported by Binkova et al., (1998) in coke oven workers. In contrast, linear dose-response relationship has been found for both 1-HOP and DNA-adduct formation in nonsmoking Royal Thai trafficked policemen as compared with the reference group (Ruchirawat et al., 2002). We acknowledge here that only few people among taxi-motorbike drivers, crossroad subjects, street vendors and gasoline salesmen do smoke. They (all spontaneously declared and those bearing gray teeth induced by tobacco smoking) were discarded from the group of analyzed persons.

So, no declared smoker is included in the study. However some suburban subjects and village residents may have not declared the use of wood fire for meal preparation or smoked fish in their diet. This could have increased their exposure to PAHs and mainly to B[a]-P thus increasing their DNA-adducts levels in such an extent we cannot determine without assessing PAHs in their food intake. This was not the purpose of the present study and should be of concern in further investigations.

Depending on the extent of bioactivation and DNA damage, DNA-adducts can be repaired or lead to apoptosis or eventually to mutation if not repaired. Therefore, genetic polymorphisms in gene involved in detoxication may modulate the amounts of bulky DNA-adducts. Some studies have reported conflicting results regarding the influence of genetic polymorphism, in DNA adducts formation. For example (Garte et al., 2007) found association between glutathione S-transferase (GSTs)-genes inactivation and DNA-adducts formation by PAHs, but other studies did not find any relation (Peluso et al., 2004; Ruchirawat et al., 2007). It

is being suggested that polymorphisms in DNA repair genes involved in nucleotide excision repair may modify aromatic DNA-adduct levels and may be useful biomarkers to identify individuals susceptible to DNA damage following exposure to PAHs (Binkova et al., 2007).

We have previously investigated the level of oxidative DNA damage in mononuclear blood cells (MNBC) by the comet assay, DNA strand breaks (SB), and formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) sensitive sites in residents from three urban locations in Cotonou, Benin (taxi-motor bike drivers, subjects living near roads with intense traffic and suburban residents) and rural residents. The conclusion reached was that urban air with high levels of benzene and UFP is associated with elevated levels of SB and FPG sites in MNBC, and that NQO1 and GST genes may modulate the effect (Avogbe et al., 2005).

Wood burning particles and volatile wood compound could also be a source of DNA-adducts forming products to which some of the individuals enrolled in this study are maybe additionally exposed rendering the dose-effect relationship difficult to be established in a very accurate way. An illustration of this fact could be found in the study of Avogbe et al. (2005). These authors reported a large gradient in the concentration of ultrafine particulate (UFP) matter, with the highest levels in the center of Cotonou that decrease toward the periphery (Avogbe et al., 2005). UFP are mainly generated by poor combustion of fossil fuels in vehicles and by wood-burning fires. These particles are now receiving an increasing attention worldwide, due to their potential impact on morbidity and mortality (Dochery and Pope, 1994; Pope et al., 2002) with an excess risk of pulmonary and cardiovascular diseases and cancer (Katsouyanni and Pershagen, 1997; Pope et al., 2002). Indeed Each $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ elevation in fine particulate air pollution was associated with approximately a 4%, 6%, and 8% increased risk of all-cause, cardiopulmonary, and lung cancer mortality, respectively (Pope et al., 2002).

To draw attention on the ongoing situation of the outdoor pollution in Cotonou some examples were taken from the literature. Robinson and Paxman (1992) have analyzed the role of threshold limit values (TLVs) in national air pollution policy during the 1980s in U.S. These authors focused on 20 carcinogens and 11 substances with nongenotoxic health effects that were regulated by local air toxics programs using TLVs. Data from EPA's National Air Toxics Information Clearinghouse indicate that maximum TLV-based Ambient Air Level guidelines (AALs) frequently exceed minimum TLV-based AALs by a factor of greater than 1000. Cancer potency data from EPA's Integrated Risk Information System suggest significant risks remain at TLV-based AALs. Cancer risks at the median TLV-based AAL exceed 1000 cases per million exposed persons for coke oven emissions (1860) and benzene (2500) for example.

We found that the public health implications of outdoor concentrations of PAHs and benzene are also of concern in industrialized countries such as the USA and Norway or Denmark. A modeled outdoor HAP concentration estimate from the U.S. Environmental Protection Agency's Cumulative Exposure Project was used by Morrello-Frosch et al. (2000) to characterize the extent of the air toxics problem in California for the base year of 1990. These air toxics concentration estimates were used with chronic toxicity data to estimate cancer and non-cancer hazards for individual HAPs and the risks posed by multiple pollutants. Although hazardous air pollutants are ubiquitous in the environment, potential cancer, and noncancer health hazards posed by ambient exposures are geographically concentrated in three urbanized areas and in a few rural counties. This analysis estimated a median excess individual cancer risk of $2.7\text{E}-4$ for all air toxics concentrations and 8600 excess lifetime cancer cases, 70% of which were attributable to four pollutants: polycyclic organic matter, 1,3 butadiene, formaldehyde, and benzene.

In conclusion, the data from our study indicate that DNA-adducts levels are correlated with the levels of environmental carcinogenic compounds found in the outdoor air in the center of Cotonou. It seems that at high exposure conditions to benzene and PAHs (mainly B(a)P, DNA-adducts levels are not directly proportional, reflecting either saturation in adducts formation or stimulation of their repair because of chronic exposure and genetic polymorphism. However, the DNA-adducts levels could be correlated with individual exposure values as determined by urinary excretion of hydroxypyrene and phenol.

The highly exposed individuals bearing the higher DNA-adducts levels are being followed in a cohort study to find out those who will develop cancers in the coming times and implement prevention means to protect residents not exposed professionally.

The authors thank Professor Jean Cagnet for fruitful discussions, Doctors Latifou Lagnika, Michael Missihoun, and Nicodème Chabi for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Arfellini G, Grilli S, Colacci A, Mazzullo M, Prodi G. 1985. In vivo and in vitro binding of benzene to nucleic acids and proteins of various rat and mouse organs. *Cancer Lett* 28:159-168.
- Autrup H, Daneshvar B, Dragsted LO, Gamborg M, Hansen AM, Loft S, Okkels H, Nielsen F, Nielsen PS, Raffin E, Wallin H, and Knudsen LE. 1999. Biomarkers for exposure to ambient air pollution—Comparison of carcinogen-DNA-adduct levels

- with other exposure markers and markers for oxidative stress. *Environ Health Perspect* 107:3.
- Avogbe PH, Ayi-Fanou L, Autrup H, Loft S, Fayomi B, Sanni A, Vinzents P, Moller P. 2005. Ultrafine particulate matter and high-level benzene urban air pollution in relation to oxidative DNA damage. *Carcinogenesis* 26:613–620.
- Ayi-Fanou L, Théophile AM, Creppy EE, Fayomi B, Fustoni S, Møller P, Kyrtopoulos S, Loft S, Sanni A, Skov H, Øvrebø S, Autrup H. 2006. Survey of air pollution in Cotonou-Benin- personal monitoring and biomarkers. *Sci Total Environ* 358:85–96.
- Begbee WL, Vincze I. 1999. Biomonitoring of human genotoxicity induced by complex occupational exposures. *Mutat Res* 445:193–203.
- Binet S, Bonnet P, Brandt H, Castegnaro M, Delsaut P, Fabries JF, Huynh CK, Lafontaine M, Morel G, Nunge H, Rihn B, Vu Duc T, Wrobel R. 2002. Development and validation of a new bitumen fume generation system which generates polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations proportional to fume concentrations. *Ann Occup Hyg* 46: 617–628.
- Binkova B, Chvatalova I, Lnenickova Z, Milcova A, Tulupova E, Peter B, Farmer PB, Sram RJ. 2007. PAH-DNA adducts in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair gene polymorphisms. *Mutat Res* 620:49–61.
- Bottin MC, Gate L, Rihn B, Micillino JC, Nathalie M, Martin A, Nunge H, Morel G, Wrobel R, Ayi-Fanou L, Champmartin C, Keith G, Binet S. 2006. Genotoxic effects of bitumen fumes in Big Blue transgenic rat lung. *Mutat Res* 596:91–105.
- Collins AR. 1999. Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* 21:238–246.
- Farmer PB, Singh R, Kaur B, Sram RJ, Binkova B, Kalina I, Popov TA, Garte S, Taioli E, Gabelova A, Cebulska-Wasilewska A. 2003. Molecular epidemiology studies of carcinogenic environmental pollutants. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental pollution on exogenous and oxidative DNA damage. *Mutat Res* 544:397–402.
- Garte S, Taioli E, Raimondi S, Paracchini V, Binkova B, Sram RJ, Kalina I, Popov TA, Singh R, Farmer PB. 2007. Effects of metabolic genotypes on intermediary biomarkers in subjects exposed to PAHs: Results from the EXPAH study. *Mutat Res* 620:7–15.
- Georgiadis P, Topinka J, Stoikidou M, Kaila S, Gioka M, Katsouyanni K, Sram RG, Autrup H, Kyrtopoulos SA. 2001. Biomarkers of genotoxicity of air pollution (the AULIS project): Bulky DNA adducts in subjects with moderate to low exposures to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and their relationship to environmental tobacco smoke and other parameters. *Carcinogenesis* 22:1447–1457.
- Katsouyanni K, Pershagen G. 1997. Ambient air pollution exposure and cancer. *Cancer Causes Control* 8:289–291.
- Keith G, Dirheimer G. 1995. Postlabeling: A sensitive method for studying DNA adducts and their role in carcinogenesis. *Curr Opin Biotechnol* 6:3–11.
- Kuljukka-Rabb T, Nylund L, Vaaranrinta R, Savela K, Mutanen P, Veidebaum T, Sorsa M, Rannug A, Peltonen K. 2002. The effect of relevant genotypes on PAH exposure-related biomarkers. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 12:81–91.
- Micillino JC, Coulais C, Binet S, Bottin MC, Keith G, Moulin D, Rihn BH. 2002. Lack of genotoxicity of bitumen fumes in transgenic mouse lung. *Toxicology* 170:11–20.
- Morello-Frosch RA, Woodruff TJ, Axelrad DA, Caldwell JC. 2000. Air toxics and health risks in California: The public health implications of outdoor concentrations. *Risk Anal* 20:273–291.
- Nielsen PS, Andreassen A, Moller P, Farmer B, Overbo S, Autrup H. Biomonitoring of diesel exhaust exposed workers. 1996a. DNA and haemoglobin adducts and urinary 1-hydroxypyrene as markers of exposure. *Toxicol Lett* 86:27–37.
- Nielsen PS, de Pater N, Okkels H, Autrup H. 1996b. Environmental air pollution and DNA adducts in Copenhagen bus drivers—Effects of GSTM1 and NAT2 genotypes on adducts levels. *Carcinogenesis* 17:1021–1027.
- Peluso M, Neri M, Margarino G, Mereu C, Munnia A, Ceppi M, Buratti M, Felletti R, Stea F, Quaglia R, Puntoni R, Taioli E, Garte S, Bonassi S. 2004. Comparison of DNA adduct levels in nasal mucosa, lymphocytes and bronchial mucosa of cigarette smokers and interaction with metabolic gene polymorphisms. *Carcinogenesis* 25:2459–2465.
- Phillips DH, Castegnaro M. 1999. Standardization and validation of DNA-adduct postlabelling methods: Report on interlaboratory trials and production of recommended protocols. *Mutagenesis* 14:301–315.
- Pope III CA, Burett RT, Thun MJ, Cale EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. 2002. Lung cancer cardiopulmonary mortality and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 287:1132–1141.
- Randerath K, Randerath E, Agrawal HP, Gupta RC, Schurdak ME, Reddy MV. 1985. Postlabeling methods for carcinogen-DNA adduct analysis. *Environ Health Perspect* 62:57–65.
- Randerath K, Randerath E, Zhou GD, Li D. 1999. Bulky endogenous DNA modifications (I-compounds) -possible structural origins and functional implications. *Mutat Res* 424:183–194.
- Reddy MV, Randerath K. 1986. Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of 32P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis* 7:1543–1551.
- Rinsky RA, Smith AB, Hornung R, Filloon TG, Young RJ, Okun AH, Landrigan PJ. 1987. Benzene and leukemia. An epidemiologic risk assessment. *N Engl J Med* 23; 316:1044–1050.
- Robinson JC, Paxman DG. 1992. The role of threshold limit values in U.S. air pollution policy. *Am J Ind Med* 21:383–396.
- Ruchirawat M, Mahidol C, Tangjarukij C, Pui-ock S, Jensen O, Kampeerawipakorn O, Tuntawiroon J, Aramphongphan A, Autrup H. 2002. Exposure to genotoxins present in ambient air in Bangkok, Thailand—Particle associated polycyclic aromatic hydrocarbons and biomarkers. *Sci Total Environ* 287:121–132.
- Ruchirawat M, Navasumrit P, Settachan D, Tuntawiroon J, Buthumrung N, Sharma S. 2005. Measurement of genotoxic air pollutants exposures in street vendors and school children in and near Bangkok. *Toxicol Appl Pharmacol* 206:207–214.
- Ruchirawat M, Settachan D, Navasumrit P, Tuntawiroon J, Autrup H. 2007. Assessment of potential cancer risk in children

- exposed to urban air pollution in Bangkok, Thailand. *Toxicol Lett* 168:200–209.
- Schoket B, Poirier MC, Mayoer G, Torok G, Kolozsi-Ringelhann A, Bognar G, Topinka G, Mrackova D, Gajdosova P, Vidova Z, Stavkova V, Peterka T, Pilcik V, Rimar L, Dobias L, Farmer PB, Sram RJ. 1998. Coke oven workers study: The effect of exposure and GSTM1 and NAT2 genotypes on DNA adducts in white blood cells and lymphocytes as determined by ³²P-post-labelling. *Mutat Res* 416:67–84.
- Weaver VM, Davoli CT, Heller P, Fitzwilliam A, Peters H, Sunyer J, Murphy SE, Goldstein GW, Groopman JD. 1996. Benzene exposure, assessed by urinary trans, trans-muconic acid, in urban children with elevated blood lead levels. *Environ Health Perspect* 104:318–323.
- WHO. 1983. Polycyclic aromatic compounds. 1. Chemicals, environmental and experimental data. In evaluation of carcinogenic risk of chemical to humans. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Man 32:1–477.

PUBLICATION N°4 (Soumise)

Hematological changes among Beninese motor-bike taxi drivers exposed to benzene by urban air pollution

Patrice H. AVOGBE^{1,2}, Lucie AYI-FANOU¹, Boris CACHON¹, Agnes DEBENDE^{3,5},
Dorothee DEWAELE^{3,5}, Faustin AISSI^{4,5}, Fabrice CAZIER^{3,5} & Ambaliou SANNI¹.

¹Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, République du Bénin.

²INSERM U954, Nancy-Université, Faculté de Médecine, Nancy, France.

³Université du Littoral-Côte d'Opale, Dunkerque, France.

⁴Unité de Chimie Environnementale et Impact sur le Vivant, Université du Littoral Côte d'Opale, France

⁵Université Lille Nord de France

Corresponding author:

Ambaliou SANNI

Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire, Faculté des Sciences et Techniques, Université d'Abomey-Calavi, République du Bénin.

04 BP 0320, Cotonou, Benin

e-mail : ambaliou.sanni@fast.uac.bj

Running title: Outdoor air benzene exposure and hematological changes

Abstract

Background: Exposure to high-concentration of benzene in polluted air has been associated with bone marrow deficiency, aplastic anemia and leukemia. However, epidemiological data do not permit reliable conclusions following human exposure to benzene levels below 1ppm. Therefore we investigated the effects of benzene (<1ppm in the outdoor air) on peripheral blood cells among motor-bike-taxi drivers (MBTD) in which specific IgG antibodies against reactive benzene metabolites, such as hydroquinone (HQ) and para-benzoquinone (p-BQ) are identified and quantified for further use as biomarker of exposure.

Methods: We compared 144 MBTD with 30 unexposed age and sex-matched controls. Personal benzene exposure was assessed using GABIE diffusive samplers. The levels of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ were determined by ELISA. The peripheral blood cells were counted by an automated analyzer.

Results: Benzene, Toluene and Xylene levels were much higher in MBTD in comparison to the control group. Benzene exposure in MBTD ranged from 0.012 to 0.550 ppm (39.2 to 1755 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) with a median of 0.053 ppm (172.25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) for one week exposure.

Accordingly, MBTD had significantly higher levels of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ compared to the controls ($p < 0.001$).

WBC, lymphocytes, eosinophils and platelets were significantly decreased in exposed MBTD, whereas RBC and other blood cell numbers remain unchanged. Among WBC subtypes, the most significant difference was found for lymphocytes.

Conclusion: Our study suggests that depression in circulating lymphocytes may be the most sensitive blood cells disturbance in MBTD exposed to < 1 ppm benzene. Therefore, the use of this blood parameter is being proposed together with specific IgG antibodies to HQ and p-BQ as a biomarker in biological monitoring of exposure to low levels of benzene.

Larger studies are required for confirmation of this new approach of health survey of workers exposed to benzene.

Key words: benzene, motor-bike-taxi drivers MBTD, specific immune responses, circulating lymphocytes count.

Introduction

Urban air pollution is a major health hazard worldwide. In urban areas, air pollutants mainly originate from incomplete combustion of fossil fuels, e.g. automobiles exhaust, residential heating and industrial emissions¹. The composition of ambient air is complex, depending on both the quality of fuel and type of engine and also on engine maintenance². Vehicles exhaust generally contains polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), particulates and volatile organic compounds (VOC), e.g. carbon monoxide and benzene and also nitrogen oxides. Diesel-powered engines are the major source of particulate whereas two-stroke motorbikes and petrol powered cars emitted high level of VOC, including benzene.

Cotonou, the largest town and the economic capital of Benin has more than 1 million inhabitants, about 15% of the country's population³. Over the past decade the air quality has worsened in the city due to the widespread use of motorbikes and old second-hands cars. According to the data from the National Agency of Land Transport, there were more than 94,000 motorbikes and more than 350,000 old second-hand cars in the city of Cotonou⁴. Also, gasoline is of poor quality because of illegal import of sub-standard products from the neighboring Nigeria.

In a previous study carried out in Cotonou by our laboratory, it was found that motorbike-taxi drivers (MBTD) driving all day long six days a week were exposed to benzene at a mean level of $76.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$, while those living in the rural areas were exposed at a mean level of $3.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ⁵. It is noteworthy to point out that benzene level in the ambient air in Cotonou is markedly higher than the $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ recommended by WHO. However, the level of benzene in Cotonou is much lower than that reported, in several other countries, in workers occupationally exposed to benzene^{6,7}.

Benzene has been classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) as human carcinogen⁸. The main route of penetration of benzene in the organism is by inhalation, although it can also enter via the skin. In the body, benzene is metabolized in several steps,

starting in the liver by cytochrome P450 2E1, where a variety of ring-opened metabolites and ring-hydroxylated metabolites (e.g., phenols and catechols) are generated⁹ (see figure 1). These circulating phenolic compounds can be transported to other organs, (e.g. the bone marrow), where they are further oxidized via reactions mediated by peroxidases, such as myeloperoxidase into their highly reactive quinones¹⁰. These quinones e.g., hydroquinone (HQ) and para benzoquinone (p-BQ) are potent hematotoxic and genotoxic compounds that can be converted by NQO1 back to less toxic hydroxy metabolites¹¹. Biological monitoring of benzene exposure is based on well-validated urinary metabolites, e.g., trans,trans-muconic acid and S-phenylmercapturic acid (S-PMA)¹²⁻¹⁴.

Exposure to benzene has been associated with adverse health effects, including haematopoietic disorders such as bone marrow depression and acute myelogenous leukemia in both rodents and humans¹⁵. However, the mechanisms of benzene-induced hematotoxicity are not totally understood. Occupational exposure to benzene at the level between 0.05-29.25 mg/m³ (i.e. < 10 ppm) decreased WBC count in petrochemical workers¹⁶. In a study with a wide range of exposure to benzene (0.06 to 122 ppm) Qu et al. reported decreased red blood cells, WBC, and neutrophils in Chinese workers⁷. Rothman et al. found that all peripheral blood cell levels (i.e., white blood cells, absolute lymphocyte count, platelets red blood cells and haemoglobin)¹⁷ were decreased in benzene-exposed workers (median of 31 ppm as an 8-hr TWA). Moreover, WBC and platelets counts were decreased in workers exposed to < 1 ppm benzene¹⁸. However, no evidence of adverse haematological effects was observed by Tsai et al. in workers with mean benzene exposure of 0.60 ppm as 8-hr TWA¹⁹. In another occupational study that examined the health effect of benzene, Collins et al., did not find any significant difference in hematologic parameters in workers exposed to 0.55 ppm benzene as 8-hr TWA²⁰. Thus, data from the literature do not permit reliable conclusion following human exposure to lower concentrations of benzene.

There is also evidence suggesting that the immune system can be affected by benzene exposure²¹. Several studies have established that reactive metabolites of benzene, such as HQ, are ultimately responsible for the immunotoxicity associated with benzene exposure, including suppression of B lymphocytes^{22;23}.

It has been reported decreased IgG and IgA levels and increased IgM levels in the workers exposed to benzene concentrations of 34 to 49 ppm²⁴. However, the levels of antibodies, such as IgG, IgM remained unchanged in workers exposed to benzene concentrations of 1.9 to 14.8 ppm²⁵. A recently study by Dimitrova and co-workers reported an increased production of the specific IgG antibodies to HQ and p-BQ in petrochemical plant workers exposed to benzene concentrations lower than 15 ppm (0.18 to 47 mg/m³)⁶.

At present, only few studies have investigated and characterized hematological changes in human population exposed to low benzene levels. Furthermore, all these studies have been conducted in different countries, (mostly foreign) so that there is no reliable data available on hematological changes in workers (motorbike-taxi drivers) exposed to urban air pollution, such as that occurring in Cotonou⁵.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the hematological changes in MBTD exposed to urban air pollution by benzene at the levels ranging from 0.012 and 0.550 ppm (39.2-1755 µg/m³). Moreover, we investigated the effect of benzene on the immune system, showing some data on the in vivo production levels of specific IgG antibodies against two endogenous metabolites of benzene (e.g, HQ and p-BQ). Associations between benzene exposure, consequent immune response and hematological changes in motorbike-taxi drivers working in Cotonou are herein reported.

Materials and methods

Subject selection and blood sample collection

The study design and recruitment methods have been described previously^{5,13}. Briefly, the study group consisted of 144 exposed MBTD working in Cotonou and 30 healthy unexposed subjects living and working in a small village located 80Km from Cotonou. All participants were males. MBTD with at least 5-years job histories, which had no known disease and were not currently taking medication during the sampling period.

A questionnaire requesting information about the lifestyle and health status of each participant; including tobacco use, an important source of non-occupational benzene exposure, alcohol consumption, eating habits, residence, employment history, previous occupational exposure to other chemicals, height, weight, medication use, existing disease and activities involving exposure to combustion product was completed.

Each participant provided an EDTA blood sample for determination of the levels of the specific antibodies against HQ and p-BQ and blood cells counting. Blood samples were collected during the end of rainy season (July-August 2009). Ambient air measurements were carried out during the working day.

All participants gave their informed consent and the study was approved by the Beninese Environmental Agency (ABE).

Personal exposure sampling and analysis of benzene, toluene and xylene

Exposure to airborne benzene, toluene and xylene (BTX) was assessed by using GABIE (Gas Adsorbent Badge for Individual Exposure) diffusive samplers (ARELCO, ARC20001UP, France) containing activated charcoal cartridge. A random selection of MBTD was performed to obtain individual-level measurements of BTX. Selected MBTD have been bearing GABIE badges and driving all over the city for about sixty-three hours throughout one-week (i.e. 9 h/day).

After sampling, the badges were sealed, preserved at -20°C and sent for analysis to the Centre Commun de Mesure, ULCO, Dunkerque (France). Briefly, BTX were desorbed from the activated charcoal by using 2 ml of benzene-free carbon disulfide (Sigma, France) under agitation for 15 min. The mixture was filtered and 1 µl of the filtrate was analysed on a Gas Chromatograph (CP-3800, Varian USA) coupled to a Mass Spectrometer (1200 TQ, Varian USA) using Factor four VF-5 ms column (0.25 mm internal diameter, 30 m, film thickness 0.25 µm). The carrier gas was helium, and the flow rate was set at 1 ml/min. The GC oven was held at 40°C for 5 min and then increased to 310°C at the rate of 5°C/min.

Peripheral blood cell count

Twelve blood parameters derived from a complete blood cell count (CBC) were used in this study. These blood parameters were selected based on data from previous studies on benzene. The parameters were: total white blood cells (WBC) with four WBC subtypes (neutrophils, eosinophils, monocytes, and lymphocytes), total red blood cells (RBC) with five red cell-related measures (hemoglobin, hematocrit, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and mean corpuscular hemoglobin (MCH)) and platelets.

The CBC analysis was performed by an automated analyser (Sysmex SE 9000), which was calibrated daily.

Determination of specific IgG antibodies against benzene metabolites, p-BQ and BQ

The levels of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ were determined as previously described⁶. Briefly, 100 µl of Bovine Serum Albumin 2% (SIGMA) were applied as a carrier to fix the haptens on the flat-bottom micro plates. After 2 h incubation at 37°C, plates were washed 4 times with PBS-Tween 0.05% and 100 µl of pure chemicals HQ and pBQ (SIGMA, kindly provided by Prof. Herman Autrup, Aarhus University, Denmark) diluted at $5 \cdot 10^{-5}$ mg/ml in NaCl 0.9% were added. The plates were incubated for additional 2 h at 37°C followed by a

shock-cold fixation at 4°C overnight to allow the formation of covalent bound with BSA. Afterward, the plates were washed 4 times and 100 µl of plasma diluted at 1/1000 were added. After 2h incubation at 37°C, plates were washed 4 times and anti-human IgG peroxidase conjugate diluted at 1/5000 was added. After 1.5h incubation at 37°C, the plates were washed again and 100 µl substrate solution of ortho-phenylenediamine 2,2 mg/ml (o-PDA, SIGMA) made of o-PDA tablets in 0.05M phosphate-citrate buffer (pH 5.0), containing 0.01% hydrogen peroxide was added and after 30 min incubation in the dark at room temperature the reaction was stopped with 50 µl of 4M HCl (MERCK), and optical density (OD) was measured at 492 nm using Universal Microplate Reader BIO-TEK INSTRUMENTS ELx800. Each plasma sample was analyzed in triplicate to assure the reproducibility of the data.

Statistical analysis

All data were tested for normal distribution using the test of Kolmogorov-Smirnov. Most blood parameters were normally distributed except for eosinophils and WBC, which were skewed right necessitating a logarithmic transformation to obtain an adequate fit with the regression models. Correlation coefficients among blood parameters and the levels of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ were calculated. Linear regression analyses were used to estimate the influence of airborne benzene levels on blood cell parameters. Participants within each group were assigned the arithmetic mean of that group, based on individual weekly average benzene measurements over sixty-three hours (i.e, 9h/day). We used general linear model (GLM) analyses to evaluate several covariates as potential confounders, including, age, alcohol consumption, BMI, current smoking and length of occupation. A level of $P < 0.05$ was considered statistically significant. All analyses were conducted using SPSS version 11.0 for Windows software.

Results

Demographic characteristics and exposure assessment

The main characteristics of the participating subjects recruited are described in table 1. There was no statistically significant difference concerning age, BMI, current smoking and alcohol consumption between MBTD and the control group. All participants were of the same social class. Within MBTD, the length of employment was 11.3 ± 5.96 years (mean \pm SD).

The results of personal exposure monitoring are presented in table 2. The levels of BTX over one-week average exposure were much higher in exposed MBTD than in the rural population.

The MBTD were currently exposed to a wide range of benzene levels, with a median of 0.053 ppm ($172.25 \mu\text{g}/\text{m}^3$), range: 0.012- 0.550 ppm ($39.2\text{-}1755 \mu\text{g}/\text{m}^3$), as average exposure over one-week.

We acknowledged that benzene has not been measured simultaneously in village this time. As we have previously reported, the rural area in Benin had lower level ($3.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$) than the WHO recommended guidelines, $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ⁵.

Determination of IgG antibodies specific to HQ and p-BQ

The levels of IgG antibodies specific to HQ and p-BQ are summarized in table 2. As it can be seen from this table, motorbike-taxi drivers had a higher level of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ than the rural population ($p < 0.001$, Student's t test).

As evidenced by the range, there were large interindividual variations in the levels of specific IgG antibodies levels. Our results also show that MBTD driving more than five hour daily had a significantly higher level of specific IgG antibodies compared to those spending less time per day ($p < 0.001$, Student's t test, and figure 2).

Results from correlations analyses are summarized in table 3. The benzene concentration in the working atmosphere was significantly correlated with the formation of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ ($r = 0.522$; $p < 0.01$). Furthermore, there was a strong correlation between the

levels of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ and the daily driving hour ($r = 0.850$; $p < 0.001$, Pearson correlation), and a weaker but statistically significant correlation between the levels of specific antibodies to HQ and p-BQ and the duration of exposure i.e., duration of employment ($r = 0.338$; $p < 0.01$). Alcohol consumption had a significant impact on the levels of circulating IgG antibodies to HQ and p-BQ, whereas other confounding factors, such as age, smoking habit had no impact.

Hematological changes

There were significant exposure-dependent decrease in WBC, lymphocytes and eosinophils and platelets. Among WBC subtypes, the most significant difference was found for lymphocytes. Somewhat surprisingly, monocytes and neutrophils were significantly elevated in MBTD, even after adjustment for confounding factors. Red blood cell counts, haemoglobin, hematocrit, MCV and MCH were non-significantly decreased except for MCH and MCHC. Tests for a linear trend using airborne benzene levels as a dependent variable were significant for WBC and all white blood subtypes MCH and MCHC (table 4). Adjustment for a range of potential confounders including age, current alcohol consumption, BMI (Body Mass Index), length of occupation, recent infection and current smoking had a negligible effect on the strength of the associations (table 4). Adjusted haemoglobin and MCV values showed borderline significant differences between MBTD and rural subjects ($P = 0.051$, $P = 0.059$, respectively). In addition, the MCHC was significantly elevated in MBTD ($P = 0.003$). Also, platelets were significantly decreased in MBTD compared to the rural population ($P = 0.012$). We conducted an additional set of analyses to determine whether specific IgG antibodies levels were predictive of depressed blood cell counts beyond the rate of depression predicted by benzene exposure itself. The results showed that specific IgG antibodies to HQ and p-BQ levels were predictive of depression in WBC, lymphocytes and eosinophils (table 5).

Correlations between IgG antibodies and peripheral blood cell changes

Correlation coefficients between IgG antibodies and blood parameters are shown in table 3. There were significant associations between WBC, all WBC subtypes and IgG antibodies to HQ and p-BQ, although the spearman coefficients were relatively small. There were no significant correlations between IgG antibodies and RBC, hematocrit, MCV, platelets.

Discussion

In the absence of reliable public transportation system, motorbikes became the major mean of circulation in Cotonou, the largest town in Benin. There are more than 94,000 motorbikes in the city of Cotonou, more than 80,000 of which are used by MBTD who drive all over the city for at least 5h par day. Being the population at risk, due to their job, MBTD are potentially exposed to automobile exhausts at high traffic and busy areas in the Cotonou city. We have shown previously that benzene exposure was significantly higher in the city, as compared to the village ⁵.

Benzene is metabolized by CYP450 2E1, generating hydroxylated metabolites (e.g., phenols and catechols), which are converted in the bone marrow by myeloperoxidase to highly active quinones. Evidence suggests that quinones such as HQ and p-BQ are capable of causing dysfunction in the immune system ⁶.

Our results showed that exposed MBTD had elevated levels of IgG antibodies specific to HQ and p-BQ compared to the rural inhabitants, suggesting that this immunological parameter could be used to monitor exposure to low levels of benzene. This exposure-dependent increase in the formation of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ was consistent with the findings of an earlier study by Dimitrova et al. ⁶. These authors have studied three professional groups heavily exposed to benzene (0.18 to 47 mg/m³) and found an increase in the percentage of persons bearing specific antibodies in blood when benzene concentration increases.

The level of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ showed stronger association with daily driving hour than with the duration of employment, suggesting that the production of IgG antibodies specific to HQ and p-BQ most reflect recent exposure. However, in Dimitrova and co-workers' study a mean length of employment of 13.73 years was not associated with increased levels of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ.

It is of interest to note that the precise molecular mechanism by which benzene metabolites induce dysfunction in the immune system remains to be determined. One would assume that

because benzene and its metabolites adversely impact the bone marrow and all progenitors from lymphoblastic, myeloblastic and erythroblastic lineage, they will reduce all the responses triggered by these cells including immune response. Consistent with this hypothesis, Lee et al. reported that hydroquinone, a representative reactive benzene metabolite, acts as a strong inhibitor of activated macrophages; suppressing the production of proinflammatory cytokines, secretion of cytotoxic molecules, and the expression and activation of CD29²⁶. Further, it is being suggested that HQ directly inhibits T cells by blocking the activity of the transcription factor nuclear factor-kappa B (NFκB)²³. NF-kappa B, known to regulate the expression of a number of genes critical for normal T cell activation, also plays a critical role in normal B cell development and activation.

Amongst participants, we found an interindividual variation in the levels of circulating IgG antibodies specific to HQ and p-BQ. This variation could be related to life style factors, such as alcohol consumption, tobacco smoking as well as benzene metabolism. Furthermore, some of village residents may have not declared the use of wood for meal cooking. This could have increased benzene exposure in some of villagers and may explain in part individual variations seen in the levels of IgG antibodies. For instance, domestic wood burning has previously been shown to be an important source of benzene²⁷. Exposure to wood smoke can occur both outdoors from ambient air and indoors as a result of direct release from cooking devices and fireplaces.

Also, if increased production of IgG antibodies specific to HQ and p-BQ is observed in MBTD following benzene exposure, it might be expected that dietary compounds such as vitamin C, vitamin E, carotenoids and polyphenols, which are thought to be involved in the antioxidant defense system would protect against immunotoxic effect of benzene. Evidence from the literature suggests that higher consumption of vegetables and fruits, which are rich in antioxidants and other micronutrients, has a protective effect against DNA damage, e.g., DNA adducts formation²⁸.

We have recently investigated the level of oxidative DNA damage in mononuclear blood cells (MNBC) by the comet assay, DNA strand breaks (SB), and formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) sensitive sites in residents from three urban locations in Cotonou, including, MBTD, subjects living near roads with intense traffic and suburban residents compared to the rural residents as non-benzene-exposed group. The data obtained clearly showed that urban air with high levels of benzene and UFP is associated with elevated levels of SB and FPG sites in MNBC, and that NQO1 and GST genes may modulate the effect ¹³. Furthermore, we found that subjects carrying the GSTT1 null genotype had a lower level of urinary S-PMA excretion than subjects carrying the plus genotype. In a newly published study we investigated the relationship between the formation of DNA-adducts and the levels of PAHs in four target populations, including MBTD. The results clearly indicate that DNA-adducts levels are correlated with the levels of environmental carcinogenic compounds found in the ambient air in Cotonou ²⁹. In addition, a large interindividual variation in the levels of DNA-adducts was observed in exposed populations. It has been recently suggested that polymorphisms in DNA repair genes involved in nucleotide excision repair may modify aromatic DNA-adduct levels and may be useful biomarkers to identify individuals susceptible to DNA damage following exposure to PAHs ³⁰. Therefore, key determinants of interindividual variability and risk in response to the toxic effects of benzene may likely be the DNA repair enzymes required to restore genomic integrity after DNA damage.

At the present, the main role of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ remains to be determined. Nevertheless, it has been suggested that they could have protective functions, facilitating elimination from the body of reactive metabolites or could be harmful for the organism immune reactions ⁶.

Hematologic data revealed that exposed MBTD had lower of total WBC, as compared to the village residents. This result is consistent with many recent studies in which leucopenia has been consistently shown to be a more sensitive blood parameters associated with benzene exposure ^{7,17,18,22}. However, a study by Khuder et al, 1999, did not find decreased WBC number among workers exposed to low levels of benzene (0.14 to 2.08 ppm)³¹. It should be point out that, although this effect is well documented the level at which leucopenia occurs is still variable, possibly due to the metabolism of benzene which is mostly influenced by inter individual enzyme activities or genetic polymorphisms.

Beside leucopenia, various investigators found a decrease number of lymphocytes, as other disturbed hematological parameter in benzene-exposed workers^{18,25}. Our data show a strong exposure-dependent decrease of lymphocytes, no matter whether the regression analyses were conducted with or without adjustment for confounding factors. This result is in agreement with the findings of Rothman et al, where decrease in lymphocyte counts was shown to be the most sensitive indicator of benzene exposure in a group of workers exposed to higher levels of benzene (with a median of 31 ppm) ³². Lan and co-workers also reported depressed absolute lymphocytes count in shoe workers exposed to < 1 ppm benzene in comparison to unexposed controls ¹⁸. However, Collins et al. ²⁰ found no increase in the prevalence of lymphopenia and other measures of hematotoxicity, including mean corpuscular volume and counts of total white blood cells, red blood cells, hemoglobin, and platelets which produced similar results among workers with daily 8-hour time-weighted exposures averaging 0.55 ppm. Similar conclusion has been reached by Tsai et al. ¹⁹ in a large study on 1,200 employees exposed to a mean 8-hour time-weighted average (TWA) concentration of 0.60 ppm.

The reasons for these discrepancies are not entirely clear but could be related to differences in study populations, exposure levels, lack of statistical power and benzene metabolism as well.

Our data also show decreased eosinophils count. This result was similar to that of Qu et al. found in Chinese workers exposed to a broad range of benzene (0.06 to 122 ppm)⁷. While comparing the contribution of duration and intensity of benzene exposures to the effects on blood cell counts, these authors observed that depression in eosinophils count was correlated with elevated level of benzene exposure (0.06 to 122 ppm). However, Bogadi-Sare et al. did not detect depressed eosinophils count in workers exposed to benzene at the levels between 1.9 and 14.8 ppm for 17 years³³.

The statistical analysis in this study showed a significantly elevated neutrophils count in exposed MBTD compared to the rural residents. Increased neutrophils counts could be a result of some cancers³⁴, bacterial infection due to immune deficiency and weaker resistance to infectious diseases that could result from benzene exposure as well.

These findings are inconsistent with some previous studies which indicate decreased neutrophils counts as the most sensitive blood parameter in benzene-exposed workers^{7,35}. However, intraperitoneal injection of 50mg/Kg of HQ in adult male Wistar rats resulted in an increase in the number of circulating neutrophils compared to control rats³⁶. (Macedo et al, 2006). Presently, available evidence suggests that human exposure to benzene concentration of 1 ppm or below does not produce depression of neutrophils and monocytes^{18;37}.

In this study, we could not find significant decreased RBC counts in MBTD. However, a large number of studies found associations between benzene exposure and reduced RBC at various exposure levels^{7,17,38}. Bogadi-Sare et al.³³ and Kang et al.³⁷ found no decreased RBC at benzene exposure levels ranging from 1.9-14.8 ppm and 0.005-5.311 ppm, respectively. In Khuder and co-workers' study decreased RBC were found at benzene levels ranging from 0.14-2.08 ppm³¹. In addition, Ward et al.³⁸ found that both WBC and RBC were significantly declined in a rubber worker cohort heavily exposed to benzene (maximum level of 34 ppm). Considering data from these previous studies, the lack of exposure-response relationship seen for RBC in our study could be due to the significantly lower exposure level (< or = 0.550 ppm)

in the ambient air in Cotonou, as compared to the levels reported in heavily exposed Chinese workers (0.06 to 122 ppm)^{7,32}.

We observed a weak, but statistically significant exposure-dependent decreased total platelets counts. This result is in accordance with most previous studies in benzene-exposed workers^{7,18,33,35}.

Despite several studies over the last decades, the mechanisms underlying benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity are still unclear. It is generally believed that that benzene may exert a toxic effect through its biotransformation to toxic metabolites, and resulting DNA damage can lead to chromosomal aberration, e.g., aneuploidy, deletion and translocation³⁹ and malignant transformation if not properly repaired. Also, benzene and its metabolites e.g., HQ and-p-BQ are clearly capable of forming adducts with both proteins and DNA⁴⁰. Benzene may act by causing oxidative stress, DNA strand breaks, immune system dysfunction that leads to decreased immunosurveillance⁴¹(Cho 2008); altering stem cell pool sizes through hematotoxicity¹⁸. For instance, benzene disrupts production of the cytokine IL-1, which is essential for hematopoiesis⁴². Niculescu et al. found that p-BQ inhibits the activity of calpain, an enzyme that catalyzes the processing of pre-IL-1 α to the mature cytokine^{43;44}. All of these effects may be involved in causing the toxic effects of benzene, but it is not possible to determine which of these effects is the primary mechanism for benzene toxicity.

Hemoglobin, hematocrit, MCV and MCH are other hematologic parameters, which have shown conflicting results in workers exposed to benzene. Our study did not detect significantly decreased hemoglobin, hematocrit, MCV and MCH in MBTD compared to the village residents. These observations are consistent with the findings of three recent studies, which did not detect declined blood cell counts based on routine monitoring of workers exposed to low levels of benzene^{19;37;45}. In Rothman and co-workers study, hemoglobin values of exposed workers were non significantly decreased, and the MCV was significantly elevated¹⁷, whereas

Robert Schnatter et al. reported decreased hemoglobin and increased MCV values in exposed workers³⁵.

In conclusion, this study clearly demonstrates that exposure to benzene at the levels between 0.012 and 0.550 ppm (39.2 to 1755 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) can induce depression in peripheral blood cells, mainly in circulating lymphocytes. Furthermore, there was significant association between the in vivo production of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ and the level of ambient benzene. Therefore, the assessment of circulating lymphocytes populations is being proposed together with specific IgG antibodies to HQ and p-BQ as a biomarker in biological monitoring of exposure to low levels of benzene. In the future, larger studies are needed for confirmation of the use of circulating IgG antibodies specific to HQ and p-BQ as a suitable biomarker for benzene exposure assessment.

References

1. Nielsen PS, Andreassen A, Moller P, Farmer B, Øverbo S, Autrup H. Biomonitoring of diesel exhaust exposed workers DNA and hemoglobin adducts and urinary 1-hydroxypyren as markers of exposure. *Toxicol Lett* 1996; 86:27-37.
2. Leong ST, Muttamara S, Laortanakul P. Influence of benzene emission from motorcycles on Bangkok air quality. *Atmos Environ* 2002;36:651-61.
3. INSAE, Institut National de la Statistique et de l'Analyse Economique. 2008. Tableau de Bord Economique et Social du 4ème Trimestre 2008. Projections de la population du Bénin par Département de 2002 à 2030.
4. Kèlomé NC , Lévêque J , Andreux F , Milloux MJ, Oyédé LM. 14C plant isotopic composition ($\delta^{13}C$) evidence for urban CO₂ pollution in the city of Cotonou, Benin (West Africa). *Sci Total Environ*. 2006; 366:439-47.
5. Ayi Fanou, L., Mobio, T.A., Creppy, E.E., Fayomi, B., Fustoni, S., Møller, P., Kyrtopoulos, S., Georgiades, P., Loft, S., Sanni, A., Skov, H., Øvrebø, S., Autrup, H., Survey of air pollution in Cotonou, Benin - air monitoring and biomarkers. *Sci. Total Environ*. 2006; 358: 85–96.
6. Dimitrova ND, Kostadinova RY, Marinova SN, Popov TA, Panev TI. Specific immune responses in workers exposed to benzene. *Int Immunopharmacol*. 2005; 5:1554-9
7. Qu Q, Shore R, Li G, Jin X, Chen LC, Cohen B, Melikian AA, Eastmond D, Rappaport SM, Yin S, Li H, Waidyanatha S, Li Y, Mu R, Zhang X, Li K. Hematological changes among Chinese workers with a broad range of benzene exposures. *Am J Ind Med*. 2002;42:275-285.
8. International Agency for Research on Cancer, IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Suppl. 7, Overall Evaluations of Carcinogenicity; An Updating of IARC Monographs, vol. 1–42, Lyon, France, 1987, pp. 120–122.
9. Snyder R, Hedli CC. An overview of benzene metabolism. *Environ Health Perspect* 1996; 104:1165 –1171.
- 10.. Subrahmanyam VV, Kolachana P, Smith MT. Hydroxylation of phenol to hydroquinone

catalyzed by a human myeloperoxidase-superoxide complex: possible implications in benzene-induced myelotoxicity. *Free Radic Res Commun* 1991;15:285–296.

11. Smith MT, Zhang L, Jeng M, Wang Y, Guo W, Duramad P, Hubbard AE, Hofstadler G, Holland NT. Hydroquinone, a benzene metabolite, increases the level of aneusomy of chromosomes 7 and 8 in human CD34-positive blood progenitor cells. *Carcinogenesis*. 2000 Aug;21(8):1485-90.

12. Ducos P, Gaudin R, Robert A, Francin JM, Maire C. Improvement in HPLC analysis of urinary trans,trans-muconic acid, a promising substitute for phenol in the assessment of benzene exposure. *Int Arch Occup Environ Health*. 1990; 62:529-34.

13. Avogbe PH, Ayi-Fanou L, Autrup H, Loft S, Fayomi B, Sanni A, Vinzents P, and Møller P. Ultrafine particulate matter and high-level benzene urban air pollution in relation to oxidative DNA damage. *Carcinogenesis* 2005; 26:613-20.

14. Fustinoni S, Buratti M, Campo L, Colombi A, Consonni D, Pesatori AC, Bonzini M, Farmer P, Garte S, Valerio F, Merlo DF, Bertazzi PA. Urinary t,t-muconic acid, S-phenylmercapturic acid and benzene as biomarkers of low benzene exposure. *Chem Biol Interact*. 2005; 153-154:253-6.

15. Hayes,R.B., Songnian,Y., Dosemeci,M. and Linet,M. Benzene and lymphohematopoietic malignancies in humans. *Am. J. Ind. Med.* 2001; 40: 117-126.

16. Zhang L, Rothman N, Wang Y, Hayes RB, Bechtold W, Venkatesh P, Yin S-N, Wang Y-Z, Dosemeci M, Li G-L. Lu W, Smith MT. Benzene induces aneuploidy of chromosome 9 in the lymphocytes of exposed workers. *Environ Health Perspect* 1996;104: 1325-1329.

17. Rothman N, Li GL, Dosemeci M, Bechtold WE, Marti GE, Wang YZ, et al., Hematotoxicity among Chinese workers heavily exposed to benzene. *Am J Ind Med.* 1996; 29:236-46.

18. Lan Q, Zhang L, Li G, Vermeulen R, Weinberg RS, Dosemeci M, Rappaport SM, Shen M, Alter BP, Wu Y, Kopp W, Waidyanatha S, Rabkin C, Guo W, Chanock S, Hayes RB, Linet M, Kim S, Yin S, Rothman N, Smith MT. Hematotoxicity in workers exposed to low levels of benzene. *Science*. 2004; 306:1774-6.
19. Tsai SP, Fox EE, Ransdell JD, Wendt JK, Waddell LC, Donnelly RP. A hematology surveillance study of petrochemical workers exposed to benzene. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2004; 40:67-73.
20. Collins JJ, Ireland BK, Easterday PA, Nair RS, Braun J. Evaluation of lymphopenia among workers with low-level benzene exposure and the utility of routine data collection. *J Occup Environ Med*. 1997; 39:232-7.
21. Macedo SM, Vaz SC, Lourenço EL, de Sousa Mda G, Ligeiro-Oliveira AP, Ferreira JM Jr, Almeida SR, de Lima WT, Farsky SH. In vivo hydroquinone exposure impairs allergic lung inflammation in rats. *Toxicology*. 2007;241(1-2):47-57 Aug 19.
22. King AG, Landreth KS, Wierda D. Hydroquinone inhibits bone marrow pre-B cell maturation in vitro. *Mol Pharmacol*. 1987;32:807-12.
23. Pyatt DW, Stillman WS, Irons RD. Hydroquinone, a reactive metabolite of benzene, inhibits NF- κ B in primary human CD4+ T lymphocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998;149:178-84.
24. Lange A, Smolik R, Zatoński W, Szymańska J. Serum immunoglobulin levels in workers exposed to benzene, toluene and xylene. *Int Arch Arbeitsmed*. 1973;31:37-44.
25. Bogadi-Sare A, Zavalic M, Trosić I, Turk R, Kontosić I, Jelčić I. Study of some immunological parameters in workers occupationally exposed to benzene. *Int Arch Occup Environ Health*. 2000;73:397-400.

26. Lee JY, Kim JY, Lee YG, Shin WC, Chun T, MH, and Cho JY. Hydroquinone, a Reactive Metabolite of Benzene, Reduces Macrophage-mediated Immune Responses. *Mol. Cells.* 2007;23: 198-206.
27. Gustafson P, Barregard L, Strandberg B and Sallsten G. The impact of domestic wood burning on personal, indoor and outdoor levels of 1,3-butadiene, benzene, formaldehyde and acetaldehyde. *J. Environ. Monit.*, 2007, 9, 23–32.
28. Palli D, Vineis P, Russo A, et al. Diet, metabolic polymorphisms and dna adducts: the EPIC-Italy cross-sectional study. *Int J Cancer* 2000;87:444–51.
29. Ayi-Fanou L, Avogbe PH, Fayomi B, Keith G, Hountondji C, Creppy EE, Autrup H, Rihn BH, Sanni A. DNA-adducts in subjects exposed to urban air pollution by benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Cotonou, Benin. *Environ Toxicol.* 2010 *In press*
30. Binkova B, Chvatalova I, Lnenickova Z, Milcova A, Tulupova E, Peter B, Farmer PB, Sram RJ. 2007. PAH-DNA adducts in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair gene polymorphisms. *Mutat Res* 620:49–61.
31. Khuder SA, Youngdale MC, Bisesi MS, Schaub EA. Assessment of complete blood count variations among workers exposed to low levels of benzene. *J Occup Environ Med.* 1999; 41:821-6.
32. Rothman N, Smith MT, Hayes RB, Li GL, Irons RD, Dosemeci M, Haas R, Stillman WS, Linet M, Xi LQ, Bechtold WE, Wiemels J, Campleman S, Zhang L, Quintana PJ, Titenko-Holland N, Wang YZ, Lu W, Kolachana P, Meyer KB, Yin S. An epidemiologic study of early biologic effects of benzene in Chinese workers. *Environ Health Perspect.* 1996;104:1365-70.
33. Bogadi-Sare A, Zavalić M, Turk R. Utility of a routine medical surveillance program with benzene exposed workers. *Am J Ind Med.* 2003; 44:467-73.

34. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. Clin Cancer Res. 2008 Nov 1;14(21):6735-41.
35. Robert Schnatter A, Kerzic PJ, Zhou Y, Chen M, Nicolich MJ, Lavelle K, Armstrong TW, Bird MG, Lin L, Fu H, Irons RD. Peripheral blood effects in benzene-exposed workers. Chem Biol Interact. 2010; 184:174-81.
36. Macedo SM, Lourenço EL, Borelli P, Fock RA, Ferreira JM Jr, Farsky SH. Effect of in vivo phenol or hydroquinone exposure on events related to neutrophil delivery during an inflammatory response. Toxicology. 2006;220:126-35.
37. Kang SK, Lee MY, Kim TK, Lee JO, Ahn YS. Occupational exposure to benzene in South Korea. Chem Biol Interact. 2005; 153-154:65-74.
38. Ward E, Hornung R, Morris J, Rinsky R, Wild D, Halperin W, Guthrie W. Risk of low red or white blood cell count related to estimated benzene exposure in a rubberworker cohort (1940-1975). Am J Ind Med. 1996; 29:247-57.
39. Smith MT. The mechanism of benzene-induced leukemia: a hypothesis and speculations on the causes of leukemia. Environ Health Perspect 1996;104:1219–1225.
40. Rappaport SM, McDonald TA, Yeowell-O'Connell K. The use of protein adducts to investigate the disposition of reactive metabolites of benzene. Environ Health Perspect. 1996;104:1235-7.
41. Cho JY. 2008. Suppressive effect of hydroquinone, a benzene metabolite, on in vitro inflammatory responses mediated by macrophages, monocytes, and lymphocytes. Mediat. Inflamm. 2008:298010
42. King AG, Landreth KS, Wierda D. Bone marrow stromal cell regulation of b-lymphopoiesis. II. Mechanisms of hydro-quinone inhibition of pre-b cell maturation. J Pharmacol Exp Ther. 1989;250:582-90.

43. Niculescu R, Bradford HN, Colman RW, Kalf GF. Inhibition of the conversion of pre-interleukins-1 alpha and 1 beta to mature cytokines by p-benzoquinone, a metabolite of benzene. *Chem Biol Interact.* 1995 Dec 22;98(3):211-22.
44. Niculescu R, Renz JF, Kalf GF. Benzene-induced bone marrow cell depression caused by inhibition of the conversion of pre-interleukins-1alpha and -1beta to active cytokines by hydroquinone, a biological reactive metabolite of benzene. *Adv Exp Med Biol.* 1996;387:329-37.
45. Collins, J.J., Conner, P., Friedlander, B.R., Easterday, P.A., Nair,R.S., Braun, J., A study of the hematological effects of chronic low-level exposure to benzene. *J. Occup. Med* 1991; 33:619-26.
46. Pesatori AC, Garte S, Popov T, Georgieva T, Panev T, Bonzini M, Consonni D, Carugno M, Goldstein BD, Taioli E, Fontana V, Stagi E, Bertazzi PA, Merlo DF. Early effects of low benzene exposure on blood cell counts in Bulgarian petrochemical workers. *Med Lav.* 2009;100:83-90.

Acknowledgements:

The authors are grateful to Professor Herman Autrup who made this project possible as well as all the volunteers who agreed to participate in this study. . This work was partially supported by the Ministry of higher education and scientific research.**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that they have no conflict of interest

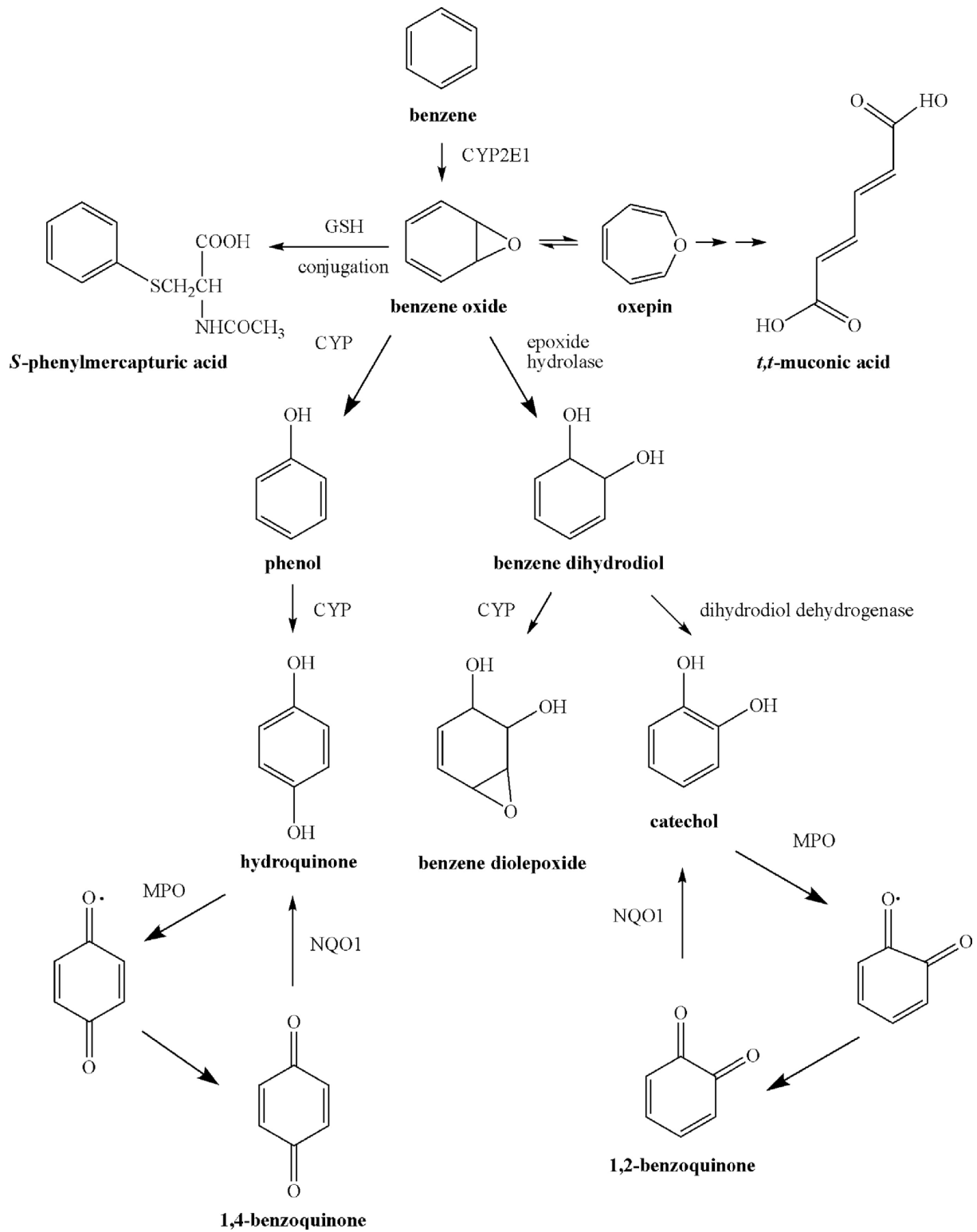


Figure 1: Major metabolic pathways of benzene (legend: CYP, cytochrome P450; GSH, glutathione; MPO, myeloperoxidase; NQO1, NAD(P)H:quinone oxidoreductase)

Table 1: Characteristic of the study groups

	Controls (n=30)	MBTD (n=144)	P-value
Age, mean years \pm SD	40.3 \pm 10.56	39.5 \pm 7.82	0.607 ^a
Current alcohol use, n (%)			
No	19 (54.29)	86(59.72)	0.702 ^b
Yes	16 (45.71)	58(40.28)	
Current smoking, n (%)			
No	33 (94.3)	133 (93)	0.969 ^c
Yes	2 (5.7)	10 (7)	
Driving hour/day, mean hour \pm SD	NA	6.21 \pm 2.06	
Duration of exposure, mean years \pm SD	NA	11.3 \pm 5.96	
BMI, mean \pm SD; Kg/m ²	22.35 \pm 1.89	23.54 \pm 3.86	0.08

Abbreviation: NA, not applicable. MBTD, motorbike-taxi drivers

^aStudent's t test; ^b χ^2 test; ^cFisher's Exact Test

Table 2: Summary of personal exposure monitoring for one-week and the levels of specific IgG (OD) antibodies to HQ and p-BQ in study population

	Controls ^a (n = 5)			MBTD (n = 6)			P
	Median	Range	Mean ± SD	Median	Range	Mean ± SD	
Benzene (ppm)	0.001	0 - 0.002	0.001 ± 0.001	0.053	0.012-0.550	0.126 ± 0.206	0.0005
Toluene (ppm)	0.001	0 - 0.004	0.001 ± 0.002	0.093	0.026-0.172	0.083 ± 0.057	0.0004
p-Xylene (ppm)	0.001	0 - 0.001	0.001 ± 0.001	0.040	0.01 - 0.151	0.050 ± 0.051	0.008
o-Xylene (ppm)	0.001	0 - 0.001	0.001 ± 0.0001	0.034	0 - 0.091	0.041 ± 0.035	0.002
OD Ab-(HQ + p-BQ)	0.086	0.07 - 0.10	0.085 ± 0.011	0.241	0.10 - 0.630	0.262 ± 0.117	<0.0001

Abbreviation: OD, optical density; HQ, hydroquinone; p-BQ, p-benzoquinone; MBTD, motorbike- taxi drivers ^alevels in previous years as described in Ayi-Fanou et al., 2006

Table 3: Spearman correlation coefficients for the specific IgG antibodies PaParameter	correlation coefficients	P value
Outdoor benzene level	0.522	< 0.0001
Driving hour/day	0.850	< 0.0001
Employment duration	0.338	< 0.001
Age	0.065	0.405
Alcohol consumption	- 0.230	0.003
Smoking habit	0.021	0.791
BMI	0.139	0.074
RBC	-0.012	0.901
Hemoglobin	-0.155	0.045
Hematocrit	0.012	0.876
MCV	-0.012	0.878
MCH	0.192	0.017
MCHC	- 0.340	< 0.001
WBC	- 0.182	0.018
Neutrophils	0.277	0.001
Eosinophils	- 0.290	< 0.001
Lymphocytes	- 0.346	< 0.001
Monocytes	0.309	< 0.001
Platelets	- 0.094	0.225

Definition of abbreviations: BMI, body mass index; RBC, red blood cell; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean corpuscular hemoglobin; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; WBC, white blood cell

Table 4: Blood cell counts in relation to benzene exposure in the study population

Variable*	Controls (n=30)	MBTD (n=144)	P- value ^a
RBC (x10 ¹⁰ /L)	531 ± 67	516 ± 52	0.126
Hemoglobin (g/dl)	14.26 ± 1.56	14.12 ± 1.43	0.051
Hematocrit (%)	43.89 ± 4.88	44.76 ± 4.32	0.255
MCV (fl)	86.63 ± 7.63	86.93 ± 5.30	0.059
MCH (pg)	28.25 ± 3.36	27.43 ± 2.36	0.030
MCHC	32.54 ± 1.97	35.39 ± 3.22	0.001
WBC (x10 ⁶ /L)	5,900 ± 1,213	5,041 ± 1,209	0.001
Lymphocytes (x10 ⁶ /L)	3,200 ± 691	1,767 ± 334	5.52x10 ⁻¹⁰
Neutrophils (x10 ⁶ /L)	2,162 ± 672	3,078 ± 346	1.18x10 ⁻⁵
Monocytes (x10 ⁶ /L)	189.0 ± 89.0	355.8 ± 86.7	2.43x10 ⁻⁵
Eosinophils (x10 ⁶ /L)	351.7 ± 88	126.0 ± 47	1.84x10 ⁻⁵
Platelets (x10 ⁹ /L)	238 ± 66	198 ± 50	0.032

Definition of abbreviations: MBTD, motorbike-taxi drivers; RBC, red blood cell; MCV, mean corpuscular volume; fl, femtoliter; MCH, mean corpuscular hemoglobin; pg, picograms; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; WBC, white blood cell

* Means ± standard deviation on raw data, but for WBC and eosinophils, the statistical tests were performed on the log transformed data

^a P-value was estimated in GLM analyses, adjusting for age, alcohol drinking, BMI, current smoking, recent infection and duration of exposure.

Table 5 : Regression analyses of blood counts by the IgG antibodies specific to HQ and p-BQ

Specific IgG antibodies regression coefficient ± SE		
Variable	Unadjusted	Adjusted
WBC (x10 ⁶ /L)	-1.69E-05 ± 8.1E-06*	-0.168 ± 0.007*
Lymphocytes (x10 ⁶ /L)	-1.35E-04 ± 9.5E-05*	-0.699 ± 0.009**
Eosinophils (x10 ⁶ /L)	-0.117 ± 0.066*	-0.228 ± 0.088*

*p < 0.05, test for exposure-response trend

**p < 0.01, test for exposure-response trend

SE, standard error

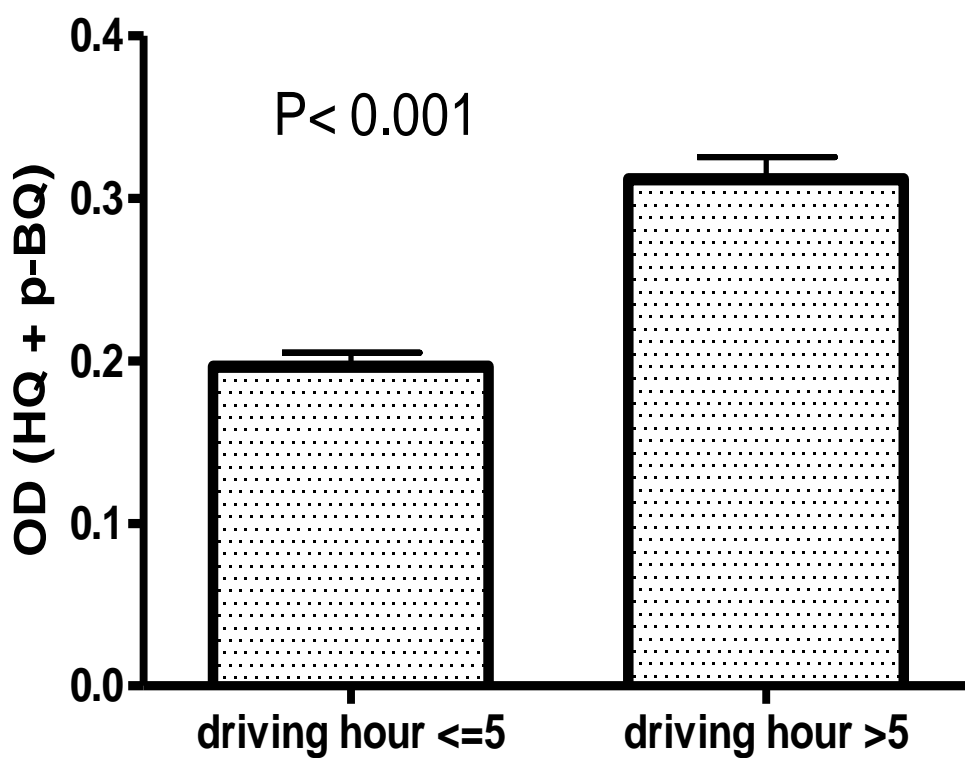


Figure 2: Mean level of specific IgG antibodies to HQ and p-BQ according to daily driving hour

Legend: OD, optical density; HQ, hydroquinone; p-BQ, p-benzoquinone

The error bars depict the standard errors on the means

ANNEXE 2

FICHE DE RECUEIL DE DONNEES SUR LES DONNEURS DE SANG

Numéro.....

Date.....

1. Identification du donneur

Nom et Prénom.....

Age..... Ethnie..... Religion.....

Domicile.....

Durée d'activité / Emploi.....

Profession d'appoint éventuelle.....

2. Plaintes éventuelles

.....

.....

3. Antécédents personnels

.....

.....

4. Examen clinique

Etat général.....

Taille..... Poids..... IMC..... T°..... Pouls..... TA.....

Coloration des muqueuses.....

Cavité buccale.....

Cœur

Fréquence cardiaqueSignes cardio-vasculaires.....

.....

Poumons

Fréquence respiratoire.....Signes pulmonaires.....

.....

Abdomen (foie, rate, reins)

.....

.....

Aires ganglionnaires

.....

Peau

.....

Autres signes

.....

.....

5. Bilan para clinique

Hémogramme.....

.....

VS..... Glycémie..... Glycosurie (Clinistix).....

Créatininémie..... Protéinurie (Albutix).....

Transaminases : ALAT..... ASAT.....

Radiographie des poumons.....

.....

.....

.....

Spirométrie : FEV1(vems)..... PEF(dep)..... FVC (cvf)..... FER.....

.....

6. Conclusion de l'examen

.....

.....

.....

.....

.....

FICHE DE RECUEIL DE DONNEES SUR LES CONDUCTEURS DE TAXI-MOTO

Numéro.....

Date.....

1. Identification du conducteur

Nom et Prénom.....

Age..... Ethnie..... Religion.....

Domicile.....

Durée dans la profession de taxi-moto.....

Profession d'appoint éventuelle.....

2. Plaintes éventuelles

3. Antécédents personnels

4. Examen clinique

Etat général.....

Taille..... Poids..... IMC..... T°..... Pouls..... TA.....

Coloration des muqueuses.....

Cavité buccale.....

Cœur

Fréquence cardiaqueSignes cardio-vasculaires.....

Poumons

Fréquence respiratoire.....Signes pulmonaires.....

Abdomen (foie, rate, reins)

Aires ganglionnaires

Peau

Autres signes

5. Bilan para clinique

Hémogramme.....

VS..... Glycémie..... Glycosurie (Clinistix).....

Créatininémie..... Protéinurie (Albutix).....

Transaminases : ALAT..... ASAT.....

Radiographie des poumons.....

Spirométrie : FEV1(vems) PEF(dep)..... FVC (cvf)..... FER.....

6. Conclusion de l'examen

ANNEXE 3

FICHE D'ENQUETE RELATIVE AUX CONDUCTEURS DE TAXI-MOTO

Questionnaire

I- Identification du conducteur

Numéro :.....

Date.....

Nom :
Prénom :
Age :
Domicile :
Tél. :

II- Renseignement sur l'exposition professionnelle

1- Quelles activités avez-vous exercé dans le passé (citez-en trois, de la plus récente à la plus ancienne) ?
.....

2- Depuis combien d'année exercez-vous le travail de taxi-moto ?
.....

4- En moyenne combien d'heures par jour passez-vous dans la circulation ?

5- Quels sont les quartiers que vous sillonnez le plus (citez dans l'ordre décroissant trois quartiers) ?
.....

6- a) Utilisez-vous un matériel de protection? OUI NON

b) Si oui, lequel ? Mouchoir cache-nez Autre

c) Si oui, l'utilisez-vous ? Rarement Fréquemment

III- Antécédents

	OUI	NON
1-a) Etes-vous fumeur ?		
b) Avez-vous fumé dans le passé ?		
c) Etes-vous fumeur occasionnel ?		
d) Avez-vous fumé ce matin ?		
2-a) Consommez-vous du café ?		
b) Avez-vous pris du café ce matin ?		
3-a) Consommez-vous de l'alcool ?		
b) Si oui, dans quelle proportion (combien de verres par jour ?).....		

4- De quoi est constituée en générale votre alimentation ?
.....
.....
.....

5- a) Recevez-vous des traitements particuliers pour une maladie donnée ? OUI NON

b) Si oui, quelle maladie? Et pendant quelle période avez-vous commencé par les recevoir ?

.....

c) Situez cette période par rapport à votre travail ; Avant Pendant

IV- Symptômes fonctionnels

➤ *Intoxication aiguë*

1- Vous arrive-t-il d'avoir une diminution de la pression artérielle ? OUI NON

2- Vous arrive-t-il d'avoir des céphalées atroces ? OUI NON

3- Avez-vous de la difficulté à respirer (dyspnée) ? OUI NON

4- Vous arrive-t-il d'avoir des troubles visuels ? OUI NON

5- Avez-vous fait une fois le coma ? OUI NON

6- Vous arrive-t-il d'avoir des vertiges ? OUI NON

7- Vous arrive-t-il d'avoir des nausées ? OUI NON

➤ *Intoxication chronique*

1- Vous arrive-t-il d'avoir des troubles de coordination des mouvements (ataxie) ? OUI NON

2- a) Vous a-t-on déjà dit une fois que vous avez l'anémie ? OUI NON

b) Si oui, pendant quelle période l'avez-vous eu ?
Avant Pendant votre travail de taxi-moto.

3- a) Vous a-t-on transfusé une fois du sang ? OUI NON

b) Si oui, pendant quelle période ? Avant Pendant votre travail

4- Vous arrive-t-il d'avoir des vomissements ? OUI NON

5- Vous arrive-t-il d'avoir des douleurs d'estomac (gastralgies) ? OUI NON

6- Vous arrive-t-il d'avoir des troubles de mémoire ? OUI NON

7- Vous arrive-t-il d'être fatigué après un effort physique ? OUI NON

8- Vous arrive-t- il d'avoir des manques d'appétit
ou refus de se nourrir (anorexie) ?

OUI NON

9- Vous arrive-t-il d'avoir des saignements anormaux ?

OUI NON

10- Vous arrive-t-il d'avoir des douleurs articulaires ?

OUI NON

11- Vous arrive-t-il d'avoir des essoufflements ?

OUI NON

AUTRE.....

Date :.....

FICHE D'ENQUETE RELATIVE AUX DONNEURS DE SANG

Questionnaire

I- Identification du donneur

Numéro :.....

Date.....

Nom :
Prénom :
Age :
Domicile :
Activité/Emploi :
Tél. :

II- Renseignement sur l'exposition professionnelle

1- Quelles activités avez-vous exercé dans le passé (citez-en trois, de la plus récente à la plus ancienne) ?

.....

2- Quel moyen de déplacement utilisez-vous pour vous rendre sur votre lieu de travail ?

.....

3- Depuis combien d'année exercez-vous ce travail ?

.....

4- En moyenne combien d'heures par jour passez-vous dans la circulation ?

5- Quels sont les quartiers que vous sillonnez le plus (citez dans l'ordre décroissant trois quartiers) ?

.....

6- a) Utilisez-vous un matériel de protection? OUI NON

b) Si oui, lequel ? Mouchoir cache-nez Autre

c) Si oui, l'utilisez-vous ? Rarement Fréquemment

III- Antécédents

	OUI	NON
1-a) Etes-vous fumeur ?		
b) Avez-vous fumé dans le passé ?		
c) Etes-vous fumeur occasionnel ?		
d) Avez-vous fumé ce matin ?		
2-a) Consommez-vous du café ?		
b) Avez-vous pris du café ce matin ?		
3-a) Consommez-vous de l'alcool ?		
b) Si oui, dans quelle proportion (combien de verres par jour ?).....		

4- De quoi est constituée en générale votre alimentation ?

.....
.....
.....

5- a) Recevez-vous des traitements particuliers pour une maladie donnée ? OUI NON

b) Si oui, quelle maladie? Et pendant quelle période avez-vous commencé par les recevoir ?

.....

c) Situez cette période par rapport à votre travail ; Avant Pendant

IV- Symptômes fonctionnels

➤ Intoxication aiguë

1- Vous arrive-t-il d'avoir une diminution de la pression artérielle ? OUI NON

2- Vous arrive-t-il d'avoir des céphalées atroces ? OUI NON

3- Avez-vous de la difficulté à respirer (dyspnée) ? OUI NON

4- Vous arrive-t-il d'avoir des troubles visuels ? OUI NON

5- Avez-vous fait une fois le coma ? OUI NON

6- Vous arrive-t-il d'avoir des vertiges ? OUI NON

7- Vous arrive-t-il d'avoir des nausées ? OUI NON

➤ Intoxication chronique

1- Vous arrive-t-il d'avoir des troubles de coordination des mouvements (ataxie) ? OUI NON

2- a) Vous a-t-on déjà dit une fois que vous avez l'anémie ? OUI NON

b) Si oui, pendant quelle période l'avez-vous eu ?
Avant Pendant votre travail de taxi-moto.

3- a) Vous a-t-on transfusé une fois du sang ? OUI NON

b) Si oui, pendant quelle période ? Avant Pendant votre travail

4- Vous arrive-t-il d'avoir des vomissements ? OUI NON

5- Vous arrive-t-il d'avoir des douleurs d'estomac (gastralgies) ? OUI NON

6- Vous arrive-t-il d'avoir des troubles de mémoire ? OUI NON

7- Vous arrive-t-il d'être fatigué après un effort physique ? OUI NON

8- Vous arrive-t-il d'avoir des manques d'appétit
ou refus de se nourrir (anorexie) ? OUI NON

9- Vous arrive-t-il d'avoir des saignements anormaux ? OUI NON

10- Vous arrive-t-il d'avoir des douleurs articulaires ? OUI NON

11- Vous arrive-t-il d'avoir des essoufflements ? OUI NON

AUTRE.....

Date :.....

ABSTRACT

Since more than one decade, atmospheric pollution became alarming in Cotonou, the most important city in Benin Republic. Data on the impact of air pollution on public health in Benin Republic are scarce. This study has been initiated to examine the impact of air pollution on public health in Cotonou. The samples were constituted of taxi-motor bike drivers (42 to 144), street vendors (fuel)-17; population of the household along the main street such as Marina and St Michel-37 and those from the cityside-42) compared to the population of the village of Sohoun-28 (located at 80 km far away from Cotonou) considered as control population. To achieve this goal, we have:

1. analyzed the gasoline sold in Benin by Gas chromatography coupled with the Mass Spectrometry (CG/SM);
2. evaluated the levels of major pollutants of the air such as benzen and its derivatives, the ultrafine particles (PUFs) and aromatic and polycyclic hydrocarbons associated (HAPs) by CG/SM and High Performance Liquid Chromatography (HPLC);
3. studied the hematologic profile of the target populations;
4. evaluated the level of biomarkers of exposure (acid S-Phenyl Mercaturic-APM, urinary benzen, 1-Hydroxy pyren-1-HOP, metabolite of the benzo (A) pyren) by selective CG/detector of mass as well as the antibodies anti metabolites of benzen-AAMB by ELISA;
5. quantified the damage in the DNA by the measurement of the levels of breaks of bits (CB), modifications of bases, as well as adducts of DNA by the test of comets and the method of post marking to the 32P;
6. and finally evaluated the capacity of the target populations to detoxify these pollutants by analyzing number of genes polymorphisms of the glutathion S-transferase (GST) and Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphates (NADPH) quinone oxydoreductase 1 (NQO1) by PCR.

The results showed that:

- a) The gasoline sold in Benin contains high levels of benzene and the ratio is higher (from 3 to 6 fold) than the gasoline sold in France for instance, and a this gasoline doesn't have the ethyl tertio butyl ether (ETBE) which allows better combustion of hydrocarbons;
- b) High concentration of the main compounds has been quantified including benzene with mean concentration of 76 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ compare to the limit of 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ recommended by WHO; of PUFs-166816 particles/ Cm^3 and HAPs-103 ng/m^3) compare to low concentrations obtained from the village of Sohon (benzen-3,4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$; PUFs-5276 particles/ Cm^3 and HAPs-1,55 ng/m^3);
- c) The examination of the hematologic profile showed a reduction of the number of blood cells (leucocytes, lymphocytes) of the exposed population compared to those from the village samples in which the hematologic profile was not affected. However, no significance difference was observed between the numbers of red blood cells in both exposed and control populations;
- d) The levels of biomarkers of exposure (urinary benzen, APM, 1-HOP and AAMB) are in general higher in the blood of the target population in Cotonou compared to those from the control village (Sohon);
- e) The levels of CB, modifications of bases, adducts of DNA are significantly higher in Cotonou compared to the village (Sohon);
- f) Polymorphisms of genes involved in detoxification revealed that the deletion of gene GSTT1 implies less excretion of APM compared to the wild allele. A positive correlation was observed between the levels of APM and CB for the transferred allele of NQO1 on the one hand, and between the levels of APM and hot sites of the formamidopyrimidin glycosylase for the deleted allele of the gene GSTP1 on the other hand.

In conclusion, the ambient air in Cotonou is more polluted by benzen, HAPs and the particles arise mainly from the incomplete combustion of the gasoline depleted from ETBE. The results showed that these pollutants have negative impact on public health, so are harmful for the studied populations: reduction in the number of blood cells, fragmentation, breaks of bits, modification of bases and formation of the adducts of DNA. The data resulting from this study revealed that damages in the DNA is more important in urban (Cotonou) than rural (Sohon) populations. Therefore, actions have to be taken for reducing the air pollution in Benin especially in urban areas.

Résumé

Depuis plus d'une décennie, la pollution atmosphérique est devenue préoccupante à Cotonou, la plus importante ville du Bénin. Cette étude porte sur l'impact de la pollution de l'air sur la santé des populations exposées de Cotonou comparées aux habitants du village Sohon (population témoin). Pour atteindre cet objectif, nous avons :

1. analysé l'essence vendue au Bénin par CG/SM ;
2. évalué les niveaux de certains polluants majeurs de l'air ainsi que leurs biomarqueurs par HPLC, CG/SM;
3. quantifié les dommages dans l'ADN par les modifications de bases, la formation d'adduits d'ADN par le test des comètes et la méthode de post marquage au ^{32}P ;
4. et enfin évalué la capacité des populations étudiées à détoxifier ces polluants par le polymorphisme de certains gènes par PCR.

Nos résultats montrent que :

- a) L'essence vendue au Bénin contient trois à six fois plus de benzène que l'essence vendue en France, et est dépourvue de l'éthyl tertio butyl éther (ETBE) qui permet une bonne combustion des hydrocarbures.
- b) L'air de Cotonou contient de fortes concentrations de polluants [benzène- $76 \mu\text{g}/\text{m}^3$ contre $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ recommandée par l'OMS ; Particules ultrafines (PUFs : $166816 \text{ particules}/\text{cm}^3$) ; Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs : $103 \text{ ng}/\text{m}^3$).
- c) Les niveaux de tous les biomarqueurs ainsi que les modifications de bases, d'adduits d'ADN sont en général plus élevés chez les sujets de la ville de Cotonou par rapport aux habitants du village témoin.
- d) La délétion des gènes de la glutathion-S-trasférase (GST) et de la NADP(H) oxydo-réductase (NQO1) entraîne une réduction de l'excrétion d'acide phényl mercapturique (APM) par rapport à l'allèle sauvage.

En conclusion, l'air ambiant à Cotonou est fortement pollué par le benzène, les hydrocarbures HAPs et les PUFs issus de la combustion incomplète du carburant dépourvu de l'ETBE. Ces polluants ont un impact négatif sur la santé des populations exposées surtout par les dommages observés dans l'ADN.

Mots clés : Pollution atmosphérique, ETBE, Biomarqueurs, Adduits d'ADN, Fragmentation d'ADN.

Abstract

Since more than ten years, urban air pollution became worrying in Cotonou city. The present study aimed to assess the effect of air pollution on citizens and rural population living respectively in Cotonou and in a village distant from 80 kms to Cotonou.

1. The study consisted to analyze fuel sold in Benin;
2. evaluated the level of exposure in Cotonou and in village by determining the level of pollutants (Benzene and its metabolites, ultrafine particles, polycyclic aromatic hydrocarbons) and biomarkers exposure (S-Phenyl Mercaturic acid, urinary benzene, antibodies anti benzene metabolites, 1-Hydroxy pyren, pyren metabolites);
3. identified the DNA damages
4. and evaluated the capacity of populations studied to detoxify these pollutants by studying gene polymorphism of glutathione S-transferase (GST) and Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (NADPH) quinone oxydoreductase 1 (NQO1).

The results obtained showed that:

- a) The rate of benzene in Benin fuel is higher than (3 to 6 time) those sold in France and this fuel doesn't contained ETBE.
- b) Cotonou air ambient is polluted and contained pollutants like volatile organic compounds such as benzene ($76 \mu\text{g}/\text{m}^3$), ultrafine particles ($166816 \text{ particles}/\text{cm}^3$) associated to polycyclic aromatic hydrocarbons ($103 \text{ ng}/\text{m}^3$) with high concentration in comparison with WHO'norm ($5 \mu\text{g}/\text{m}^3$) and values obtained from Sohon's village;
- c) Benzene metabolites, polycyclic aromatic hydrocarbons, the level of DNA damage observed in urban people are also higher than those obtained from rural people.

The results of this study showed that urban air in Cotonou is very polluted and has harmful effects on people exposed.

Keywords: Atmospheric pollution, ETBE, Biomarkers, Adducts of DNA, Fragmentation of DNA.