



(12) FASCICULE DE BREVET

(11) N° de publication : **MA 30997 B1** (51) Cl. internationale : **A24D 3/06**

(43) Date de publication :
01.12.2009

(21) N° Dépôt :
31997

(22) Date de Dépôt :
15.06.2009

(86) Données relatives à l'entrée en phase nationale selon le PCT :
PCT/US2006/044704 17.11.2006

(71) Demandeur(s) :
BIOSYNTHEC, 16 Place Vendome F-75001 Paris (FR)

(72) Inventeur(s) :
EMAMI, Iman

(74) Mandataire :
ABU-GHAZALEH INTELLECTUAL PROPERTY TMP AGENTS

(54) Titre : **FILTRE DE CIGARETTE CONTENANT DE L'EXTRAIT DE ROMARIN ET PROCÉDE DE REDUCTION DES LESIONS DE L'ADN PROVOQUEES PAR LES AGENTS NOCIFS DE LA FUMEE DE CIGARETTE PAR L'UTILISATION DUDIT FILTRE**

(57) Abrégé : LA PRÉSENTE INVENTION CONCERNE UN FILTRE DE CIGARETTE CONTENANT DE L'EXTRAIT DE ROMARIN ET UN PROCÉDÉ DE RÉDUCTION DES LÉSIONS DE L'ADN PROVOQUÉES PAR DIVERS AGENTS NOCIFS CONTENUS DANS LA FUMÉE DE CIGARETTE. PLUS PRÉCISÉMENT, LA PRÉSENTE INVENTION CONCERNE L'UTILISATION DUDIT FILTRE POUR RÉDUIRE LES LÉSIONS DE L'ADN PROVOQUÉES PAR LES BENZO (A) PYRÈNES DANS LES CELLULES HUMAINES PAR LA RÉDUCTION DE L'ADDUCT DU BENZO (A) PYRÈNE PULMONAIRE HUMAIN DIOL ÉPOXYDE-DG (BPDE-DG).

RESUME

La présente invention concerne un filtre de cigarette contenant de l'extrait de romarin et un procédé de réduction des lésions de l'ADN provoquées par divers agents nocifs contenus dans la fumée de cigarette. Plus précisément, la présente invention concerne l'utilisation dudit filtre pour réduire les lésions de l'ADN provoquées par les benzo (a) pyrènes dans les cellules humaines par la réduction de l'adduct du benzo (a) pyrène pulmonaire humain diol époxyde-dG (BPDE-dG).

**FILTRE DE CIGARETTE CONTENANT DE L'EXTRAIT DE ROMARIN ET
PROCÉDÉ DE RÉDUCTION DES LÉSIONS DE L'ADN PROVOQUÉES PAR LES
AGENTS NOCIFS DE LA FUMÉE DE CIGARETTE PAR L'UTILISATION DUDIT
FILTRE**

1. Domaine de l'invention

L'invention concerne un filtre de cigarette contenant de l'extrait de romarin et un procédé pour réduire les lésions d'ADN provoqués par de divers agents nocifs dans la fumée de cigarette. Plus spécifiquement, la présente invention concerne l'utilisation dudit filtre pour réduire les lésions d'ADN provoqués par benzo (a)pyrènes dans les cellules humaines par la réduction de l'adduit benzo(a)pyrène diol époxyde-dg (BPDE-dg) du poumon humain.

2. Conexte

L'adduct de poumon humain benzo(a)pyrène diol époxyde-dg (BPDE-dg) se concentre dans les cellules bronchiques. Cet adduct est identifié maintenant comme un événement critique dans la genèse des tumeurs par les benzo(a)pyrènes. La fumée de cigarette est un contribuant significatif à la formation du BPDE-dg.

L'utilisation du tabac est de loin le lien le plus répandu entre l'exposition aux carcinogènes connus et la mort due au cancer, et est donc un modèle pour la compréhension des mécanismes de l'induction du cancer. Le benzo(a)pyrène (BP) est un présent polycyclique fortement cancérigène de l'hydrocarbure aromatique (PAH) en les émission d'échappements, la nourriture cuite au charbon de bois et dans de petites quantités dans la fumée des cigarettes, en général moins de 10 ng par cigarette. BP est l'un de plus de 60 carcinogènes dans la fumée de cigarette qui est impliquée dans l'étiologie du cancer de poumon. Il est métaboliquement activé dans benzo(a)pyrène-7,8-diol-9,10-époxyde (BPDE) qui réagit avec l'ADN principalement aux lésions à la position N² de guanine, par exemple l'adduct benzo(a)pyrène-7, 8-diol-9,10-époxyde-N²-désoxyguanosine (BPDE-dg). La présence des adducts BPDE-ADN dans les tissus humains a été d'une manière concluante établie et l'adduct BPDE-dg se concentre exclusivement dans les cellules bronchiques et impliqué ainsi dans le déclenchement du cancer de poumon humain.

L'herbe et l'huile du romarin (*Rosmarinus officinalis Labiatae*), les extraits de romarin, l'acide carnosique et le carnosol sont généralement utilisés comme épice et aromatisants dans la transformation des produits alimentaires pour leur saveur souhaitable et activité antioxydante élevée.

Cependant, avant la présente invention, il n'y avait aucune identification que l'utilisation d'un extrait de romarin dans un filtre de cigarette réduirait les lésions d'ADN provoqués dans les cellules humaines par les benzo(a)pyrènes, spécifiquement l'adduct benzo(a)pyrène diol époxyde-dg ((BPDE-dg) du poumon humain est maintenant identifié comme événement critique dans le genèse des tumeurs par les benzo(a)pyrènes.

3. Résumé de l'invention

BP est considéré comme un carcinogène important impliqué dans l'induction du cancer de poumon chez les fumeurs et, comme est démo dans cette étude, les espèces réactives à

l'oxygène contribuent sensiblement dans la formation de l'adduct tumorigène critique du poumon. Alors qu'il est critique d'empêcher le penchant au tabac et d'augmenter l'efficacité des programmes de cessation et de réduction de tabagisme, ces approches ont eu peu d'impact. La prévention de la formation de l'adduct BPDE-dg est une approche qui peut mener à la réduction du risque de cancer de poumon chez les fumeurs.

L'invention concerne un filtre de cigarette contenant un extrait de romarin et un procédé pour réduire des lésions d'ADN provoqués par les agents nocifs dans la fumée de cigarette. Plus spécifiquement, la présente invention prévoit l'utilisation dudit filtre pour réduire les lésions d'ADN provoqués par benzo(a)pyrènes dans les cellules humaines par la réduction de l'adduct benzo(a)pyrène diol époxyde-dg (BPDE-dg) du poumon humain.

Il a été constaté que la quantité de l'adduct (-)-anti- BPDE-dg augmente linéairement avec la concentration de la fumée de cigarette en présence du (+)-BP-7,8-diol. La catalase et la dismutase de superoxyde inhibent sa formation de plus de 80%. Quand les cellules MCF-7 sont traitées pendant 2 heures avec le (+)-bp-7,8-diol, la fumée de cigarette augmente la dose conséquemment la formation de (-)-anti-BPDE-dg et diminue la formation dépendante des CYPs de (+)-syn-BPDE, l'adduct.

J'ai traité des cellules pendant jusqu'à un jour avec benzo(a)pyrène et puis les ai exposé pendant 2 heures à la fumée de cigarette. Pendant ces 2 heures, j'ai découvert qu'il y a une 'augmentation double de la formation de l'adduct dans les cellules traitées avec de la fumée de cigarette par rapport aux niveaux dans des cellules non traitées en raison de l'activité des CYPs. Ainsi, j'ai constaté que la fumée de cigarette active à travers les espèces réactives à l'oxygène qu'elle contient la deuxième étape de la voie métabolique du benzo(a)pyrène menant à la formation de l'adduct BPDE-dg.

La fumée de cigarette peut de cette manière être responsable de la formation de l'adduct tumorigène critique de poumon.

En conclusion, j'ai constaté que le filtre modifié de cigarette contenant un extrait de romarin diminue plus de 70% du niveau des adducts BPDE-dg dus à la fumée de cigarette dans les cellules MCF-7. Je crois que cette découverte constitue une avancée significative dans le domaine de la diminution du risque de cancer de poumon chez les fumeurs.

4. Description succincte des figures, du schéma et du tableau :

Figure 1. Voie métabolique principale et liaison d'ADN du benzo(a)pyrène carcinogène. Le benzo(a)pyrène est un carcinogène de tabac qui peut être enzymatiquement converti in vivo ou par les espèces réactives à l'oxygène pour donner des époxydes réactifs de dihydrodiol à l'ADN. La génération du mutagénique stéréosélectif (+)-r- 7, t-8-dihydroxy-t-9, 10-oxy-7, 8,9, 10-tétrahydro-BP [(+)-anti BPDE] de (-)-BP-7, 8-dihydrodiol est catalysés par les mono-oxygénases du cytochrome dépendant de P450 (P450) ou les espèces réactives à l'oxygène. La réaction suivante de cette intermédiaire électrophile avec l'adduct stable du produit génomique d'ADN entre l'époxyde de dihydrodiol et le groupe d'animés exocyclique de guanosine. Ce genre de lésion d'ADN peut être converti en mutations dans le cycle suivant de réplique à moins que la réparation de cet adduct soit produite.

Figure 2. Résultats obtenus en utilisant un système sans cellule pour l'invocation de l'ADN : 6 mg d'ADN de thymus de veau en 2 ml d'eau a été ajoutée à 5 ml de CSS avec différentes

dilutions et réagi pendant 2 heures à la température ambiante avec (+)-BP-7, 8-diol (concentration finale de 3,6 μM). L'ADN a été hydrolysée et le BP-furanne I libéré été mesuré conformément aux matériaux et aux procédés.

Figure 3. (a) Stéréochimie de l'époxydation BP-7, 8-diol par les radicaux de peroxy et le cytochrome P450 aux espèces réactives (anti-BPDE et syn-BPDE) qui peuvent se lier à l'ADN, et (b) de l'hydrolyse acide de l'ADN à BP-furannes mesurée dans cette étude. L'hydrolyse de (-)-anti-BPDE-dg et de (-)-syn-BPDE mène à la formation de BP-furanne I-2 et de BP-furanne II-1 qui sont cependant instables et sont convertis en BP-furanne I-1 et BP-furanne II-2.

Figure 4. Résultats obtenus en utilisant les cellules MFC-7. Un flacon de 10×10^6 de cellules/150 cm^2 en volume total de 20 ml ont été traités pendant 2 heures avec (+)-BP-7,8-diol (0,2 μM) seulement ou en présence de différentes dilutions de l'ADN de CSS a été isolé, hydrolysé et les BP-furannes libéré ont été mesurés et les niveaux de liaison ont été déterminés conformément aux matériaux et aux procédés. Deux pics distincts ont été observés sur les chromatogrammes correspondants au BP-furanne I et au BP-furanne II dérivé de (-)-anti-BPDE-dg et (+)-syn-BPDE-dg respectivement (réf. 32-34). Les valeurs représentent les moyennes plus le STD de deux expériences indépendantes avec 3 à 4 CLHP.

Figure 4a. Panneau supérieur, augmentations de l'adduct (-)-anti-BPDE-dg avec la dilution de CSS ;

Figure 4b. Panneau inférieur, augmentations de l'adduct (+)-syn-BPDE-dg avec la dilution de CSS.

Figure 5. Liaison de BPDE-dg dans les cellules MCF-7 après exposition à une solution de 2,5 μM de BP ou de 2,5 μM de BP + CS (dilution 20 fois) pendant le temps indiqué. La solution de fumée de cigarette a été ajoutée les 2 dernières heures pendant l'exposition au BP (schéma 1). L'analyse de BPDE-dg était effectuée comme décrit dans les matériaux et les procédés. Les valeurs représentent les moyennes de deux expériences indépendantes avec 4 à 6 CLHP plus le standard. Les valeurs du BPDE-dg étaient de $11,7 \pm 0,5$ (moyenne \pm s.d.) mg des adducts par mg d'ADN après 12 heures d'incubation et de $17,6 \pm 0,4$, $26,1 \pm 0,9$ après 18 heures et 24 heures respectivement. Le métabolisme spontané de CYP a augmenté les valeurs de thèses à $17,2 \pm 0,5$, $27,8 \pm 0,8$ et $42,2 \pm 1,0$ deux heures après le temps de référence à 12, 18 et 24 heures respectivement. L'addition de la solution de fumée de cigarette (CSS) induit un changement beaucoup plus dramatique pendant la même période de deux heures menant à une valeur finale de BPDE-dg de $36,9 \pm 1,2$, $56,7 \pm 0,9$ et $80,2 \pm 1,2$ (moyenne \pm s.d.) mg des adducts par mg après 12, 18 et 24 heures respectivement.

Figure 6. Liaison de BPDE-dg dans les cellules MCF-7 après exposition à 2,5 μM de BP 5 ou à 2,5 μM de BP + CSS obtenue à partir du filtre standard et du filtre contenant l'extrait de romarin. La solution de fumée de cigarette a été ajoutée pour les 2 dernières heures pendant l'exposition au BP pendant le temps indiqué (schéma 1). L'analyse de BPDE-dg a été effectuée comme décrit dans les matériaux et les procédés. La CLHP démontre qu'il y a seulement un pic sur les chromatogrammes qui correspondent au BP-furanne dérivé de (+)-anti-BPDE-dg. Les valeurs représentent les moyennes de deux expériences indépendantes avec 4 à 6 CLHP plus le Std.

Schéma 1. Les cellules MCF-7 ont été traitées avec BP pendant 12 heures et 18 heures suivies de la fumée de cigarette pendant encore 2 heures en même temps que BP (expériences A et B respectivement). Le but de cette expérience était d'activer à différentes heures BP pour produire BP-7,8-diol et après traiter les cellules avec de la fumée de cigarette et suivre son effet pendant les 2 dernières heures. Les témoins représentent des cellules traitées avec le BP seulement.

Tableau 1. Effet des extracteurs sur le niveau de BPDE-dg provoqué par la fumée de cigarette dans un système sans cellules

Traitement	% de BPDE-dg par rapport à CS standard
CSS Standard	100
+ SOD dismutase de superoxyde (20 µg)	16
+ Catalase (4 µg)	12
+ Catalase Inactivée (4µg)	100
CSS filtré au romarin au lieu de CSS	42

Le système standard de CSS comporte 2 ml d'ADN de thymus de veau (3 mg/ml), 600 µl 30 µM de (+) BaP-7, 8-diol et 5 ml de CSS dilués avec PBS (1:19) à pH 7,4, et a été incubé à la température ambiante pendant 2h. Chaque valeur a été obtenue à partir de trois expériences indépendantes exécutées deux fois. L'erreur moyenne était d'environ 12% dans chaque expérience double. La valeur BPDE-dg du standard était de $56 \pm 6,3$ (moyenne \pm s.d.) adducts par mg d'ADN.

5. Description Détaillée

Le tabagisme est associé comme cause à un grand nombre de cancers humains. L'utilisation de tabac est de loin le lien le plus répandu entre l'exposition aux carcinogènes connus et la mort du cancer, et est donc un modèle pour la compréhension des mécanismes de l'induction du cancer.

Le benzo(a)pyrène (BP) est un hydrocarbure aromatique polycyclique (PAH) fortement cancérigène présent dans les émissions d'échappements, la nourriture cuite au charbon de bois et dans en petite quantité dans la fumée de cigarette, en général moins de 10 ng par cigarette. Le BP est l'un de plus de 60 carcinogènes dans la fumée de cigarette qui est impliquée dans l'étiologie du cancer de poumon. Il est métaboliquement activé dans benzo(a)pyrène-7, 8-diol-9, 10-époxyde (BPDE) qui réagit avec de l'ADN principalement à la position n² de guanine pour produire principalement des lésions de guanine N², par exemple l'adduct benzo(a)pyrène-7, 8-diol- 9, 10-époxyde-N²-désoxyguanosine (BPDE-dg).

La présence des adducts BPDE-ADN dans les tissus humains a été d'une manière concluante établie et l'adduct BPDE-dg se concentre exclusivement dans les cellules bronchiques et est ainsi impliquée dans le déclenchement du cancer de poumon humain.

Ce carcinogène est métabolisé par des enzymes de la phase I à un grand nombre de métabolites comportant des phénols, des oxydes d'arène, des quinones, des dihydrodiols, et des époxydes de diol. Une vue d'ensemble de la manière métabolique de BP menant à la formation de l'adduct (+)-anti-BPDE-dg est présentée dans la figure 1.

En plus détail, l'ultime (+)-anti-BPDE carcinogène est formé du BP par deux séries d'oxydation du cytochrome induites par P450. La première étape de cette oxydation mène de préférence à (-)-7, 8-dihydro-7, 8-dihydrobenzo(a)pyrène [(-)BP-7,8-diol]. Le diol est encore oxydé principalement au (+)-r-7, t-8-dihydroxy-t-9, 10-oxy-7, 8, 9, 10-tétrahydro-BP [(+)-anti-BPDE] fortement mutagénique. De nombreuses études ont clairement identifié [(+)-anti-BPDE] en tant que métabolite cancérigène primaire de BP présentant une activité mutagénique augmentée in vivo et in vitro. Les études les plus précédentes de la variation génétique du métabolisme des carcinogènes de poumon se sont concentrées sur l'activation métabolique par divers cytochromes P450s, bien que l'expression de ces enzymes dans le poumon soit généralement faible. L'activation de BP-7,8-diol par les cellules épithéliales de poumon n'est pas provoquée seulement par des procédés classiques dépendants de la métabolisation des CYPs/GSTs, mais implique également plusieurs voies métaboliques autres que les CYPs. Celles-ci comportent, la lipooxygénase, produits de peroxydation de lipides et les voies dépendantes de peroxydase, Cox-1 et Cox-2.

De plus en plus de preuves suggèrent l'importance causale des radicaux sans tabac dans l'induction du cancer de poumon chez les fumeurs. Chaque souffle de fumée forme plus de 10 trillion de radicaux libres présents dans la fumée, qui, peuvent contribuer aussi bien au déclenchement de tumeur que la promotion de diverses formes de cancer humain provoquées par des attaques répétées à partir de ROS sur les macromolécules cellulaires. Les espèces principales de radicaux libres sont postulées comme étant un mélange d'équilibre des semiquinones, des hydroquinones et des quinones. Il est suggéré que ce complexe de radicaux libres cause le cyclonage redox qui produit l'anion de superoxyde de l'oxygène moléculaire et mène à la formation du radical de peroxyde et d'hydroxyle d'hydrogène. Ces espèces réactives mènent à ébrécher l'ADN et des ruptures à brin unique dans l'ADN des cellules humaines et de rongeur cultivées. Le cyclonage redox associé à la quinone peut également être impliqué dans ces effets ; l'hydroquinone et le catéchol sont censés y jouer un rôle important.

J'ai découvert que la fumée de cigarette peut activer par ses radicaux produits par l'oxygène la deuxième étape de la voie métabolique de BP menant à la formation de l'adduct BPDE-dg, vraisemblablement par le métabolisme du (-)-BP 7,8-diol à (+)-r-7,t-8-dihydroxy-t-9,10-oxy-7, 8, 9, 10- tétrahydro-BP [(+)-anti-BPDE] (figure 1) formé dans les cellules.

J'ai également découvert que cette activation est au moins deux fois plus haute que celle obtenue avec des machines de CYPs.

De plus, j'ai découvert que le ROS de la fumée de cigarette peut être en partie responsable de la formation accrue de l'adduct BPDE-dg.

J'ai également constaté qu'un filtre contenant une poudre formulée de romarin peut réduire considérablement le niveau BPDE-dg dû au radical produit par l'oxygène, et que mes découvertes peut être utilisés pour les filtres de cigarette qui réduisent la formation de l'adduct BPDE-dg cancérigène dans les cellules bronchiques épithéliales.

Mon invention fournit (i) un moyen pour déterminer la contribution relative du ROS dans la fumée de cigarette à l'activation de BP-7,8-diol en comparaison au cytochrome P450 ; (ii) un moyen d'établir si le ROS de la fumée de cigarette favorise le processus cancérigène par la contribution au métabolisme de BP-7,8-diol ayant pour résultat une augmentation de la formation de la BPDE-dg critique de poumon ; (iii) un filtre contenant un extrait des radicaux libres de cigarette pour diminuer de manière significative la formation de BPDE-dg ; et (iv)

l'utilisation dudit filtre pour diminuer de manière significative la fonction de l'adduct BPDE-dg.

7. Exemples

Produits chimiques. La protéinase K (EC 3.4.21.64, de *Tritirachium album*) a été achetée de Sigma (St Louis, MO), la RNase TI (EC 3.1.21.3. de *Aspergillus oryzae*) et la RNase (mélange hétérogène sans DNase des ribonucléases du pancréas bovin) ont été obtenus de Boehringer Mannheim (Mannheim, Allemagne). Le salin tamponné aux phosphates (PBS) a contenu 3,0 mM de KCl, 1,5 mM de KH_2HPO_4 , 140 mM de NaCl, 8,0 mM de Na_2HPO_4 , (pH 7,4), l'eau classe CLHP, MeOH, éther et éthanol pour la spectroscopie de E. Merck, Darmstadt, Allemagne. Si non autrement indiqués, les autres produits chimiques ont été achetés de Sigma (L'île d'Abeau Chesnes, France), Boehringer Ingelheim (Heidelberg, Allemagne) et Boehringer Mannheim (Mannheim, Allemagne). Tous les standard de métabolite de BP ont été obtenues à partir de National Cancer Institute, Chemical Carcinogen Reference Standard Repository, Midwest Research Institute (Kansas City, MO).

Appareil. La chromatographie liquide sous haute pression (CLHP) a été effectuée avec des systèmes à haute pression isocratique de Hewlett-Packard et des systèmes de gradient (Waldborn, Allemagne) équipés d'un détecteur de fluorescence de Shimadzu Rf-10AXL lié à un intégrateur de Hewlett-Packard.

Préparation de la solution de fumée de cigarette/PBS (CSS). La production de la fumée a été effectuée selon Pryor et al. sans filtre de Cambridge. Essentiellement la même méthode de collecte de fumée a été utilisée plus tôt par Nakayama et al. La fumée provenant de brûler une cigarette de 8 cm (Marlboro) pendant 3,8 minutes avec l'aide d'un producteur de vide constant d'une pompe à eau a été bouillonnée à travers 10 ml de la solution de saline tamponnée aux phosphates (PBS) qui emprisonne les produits chimiques en phase gazeuse et le goudron de la fumée de cigarette. Comme il n'y avait aucun composé de goudron insoluble dans l'eau présent sur les parois des bouteilles de lavage, une majeure partie des composés hydrosolubles de la fumée d'une seule cigarette a été contenue dans 10 ml de solution de PBS. Ce soluté appelé la solution de fumée de cigarette (CSS) a été mis à réagir immédiatement avec l'ADN exogène ou ajouté aux cellules MCF-7 dans la culture en présence du benzo(a)pyrène ou son métabolite proche (+)-BaP-7, 8-diol. Différentes dilutions de CSS ont été utilisées (voir ci-dessous).

Intégration d'un extrait de poudre de romarin dans le filtre de cigarette. Le filtre de la cigarette conventionnelle a été enlevé et 40 mg d'un extrait de poudre de romarin, a été introduit dans l'endroit sans filtre près de la cigarette elle-même. Après cette opération, le filtre a été réinstallé. L'effet de ce filtre a été évalué par la spectrométrie de masse. Brièvement la fumée de cigarette a été bouillonnée dans une solution organique contenant 3.3.5,5-tétraméthyl-1-pyrroline-*N*-oxyde (TMPO) un adduct de piège de rotation. La quantité d'adduct radical d'hydroxyle a été alors mesurée en utilisant la chromatographie liquide, la spectrométrie de masse. Dans on a observé dans les conditions de fumée utilisées une diminution de 30% du radical d'hydroxyle.

Réaction de l'ADN exogène avec (+)-BP-7,8-Diol en présence de la solution diluée de la fumée de cigarette (CSS). 2 ml d'ADN de thymus de veau (3 mg/ml) ont été ajoutés à 5 ml dilués 20 fois de CSS et mis à réagir pendant 2 heures à la température ambiante avec (+)-BP-7,8-diol (concentration finale de 3,6 μM) selon la réaction suivante :

ADN + [(+)-BP-7,8-diol]+CSS ---> (-)-anti-BPDE-N²-dG

Le niveau résultant de l'adduct (-)-anti BPDE-dg a été mesuré (voir ci-dessous). Comme témoin une expérience sans CSS a été effectuée.

Conditions de culture et de traitement des cellules. La lignée de cellules de carcinome mammaire humaine MCF-7 a été développée dans des fioles de culture cellulaire de 150 cm² dans un volume total de 20 ml du milieu essentiel minimal E-MEM complété avec 10% de FCS, 15 mm du tampon Hepes, et des antibiotiques (200 unités/ml de pénicilline, 200 µg/ml de streptomycine et 25 µg/ml d'ampicilline). Les cellules ont été maintenues et traitées à 37°C en atmosphère d'air de 5% Co₂/ 95%.

Après que les cellules MCF-7 aient couvert 90% de la superficie des flacons, (2 ou 3 jours après s'être dédoublé d'une culture confluente), le milieu a été remplacé par 20 ml de milieu frais contenant 10% de sérum. Vingt quatre heures plus tard, les cellules à proche confluence par exemple plus de 90% des cellules dans la phase de G0/G1 ont été traitées avec DMSO seul ou avec le carcinogène (voir ci-dessous) dissous en DMSO et la fumée de cigarette/PBS (CSS voir ci-dessus). La concentration finale de DMSO n'a pas dépassé 0,1% du volume total d'incubation. Des échantillons témoins inclus dans chaque ensemble d'incubation ont été traités avec DMSO seul.

a) *Traitement des cellules MCF-7 avec (+)-BP-7, 8-Diol et la fumée de cigarette.* Les cellules ont été traitées pendant 2 heures avec (+)-BP-7,8-diol (0,2 µM) seulement ou en présence de différentes dilutions de CSS. Le (+)-BaP-7, 8-diol a été activé par ROO° produit de la CS et de la cellule CYP pour former (-)-anti-BPDE-dg et (+)-syn-BPDE-dg respectivement. Leurs niveaux ont été mesurés par la formation de BP-furanne I-1 et BP-furanne II-2 (voir ci-dessous et la figure 3).

b) *Expérience d'exposition Temps/Dose avec BP.* Pour caractériser l'exposition Temps/Dose au niveau de BP et de BPDE-dg, les cellules (10x10⁶ cellules/flacon de 150 cm², volume total de 20 ml) ont été traités avec le milieu contenant une concentration finale de 1,25, 2,5 et 5,0 µM chacun pendant 6, 12, 18 et 24 heures (point de deux flacons/dose/temps). L'adduct BPDE-dg formé dans les cellules augmente linéairement de manière dépendante de la dose et du temps comme a été montré également par d'autres (30). Sur la base des résultats obtenus nous choisissons 2,5 µM en tant que concentration de travail pour BP.

c) *Traitement des cellules MCF-7 avec BP et la fumée de cigarette.* Pour voir l'effet de la concentration en CS, l'expérience A du schéma n° 1 a été effectuée avec différentes dilutions de CSS (1:79 ; 1:39 ; 1:19 ; 1:9 vol/vol). Sur la base des résultats obtenus à partir de cette expérience je choisis la dilution 1:19 (vol/vol) de la CS en tant que concentration de travail. Ainsi, les cellules (voir ci-dessus la "culture et le traitement de cellules") ont été traitées avec le BP (2,5 µM) et la CSS (dilution 1:19 vol/vol) selon le schéma 1 (voir la figure 6 - schéma 1).

Tous les ensembles d'incubation ont été répétés 2 ou 3 fois avec des échantillons doubles. A la fin du traitement, les cellules ont été examinées au microscope pour les changements morphologiques, puis cultivées par trypsinisation avec 0,05% de trypsine-EDTA (0,05% de trypsine, 0,14 M de NaCl, 3 mM de KCl, 0,1 M de Na₂HPO₄, 1,5 mM de K₂HPO₄, 0,5 mM d'EDTA). Après addition d'un volume égal du milieu contenant 10% de FCS, les cellules ont été centrifugées à 1000 g, lavées trois fois avec PBS, et le granule de cellules a été alors

stocké congelé à -20°C. LA viabilité des cellules traitées avec le BP et la fumée de cigarette ou (+)-BP-7, 8-diol et la fumée de cigarette était d'approximativement 90% à l'heure de la moisson comme déterminée par une analyse d'exclusion de trypan bleu. Les doses utilisées n'ont présenté aucune cytotoxicité comme mesurée par l'analyse d'activité de déshydrogénase de lactate (kit ELISA, Boehringer, Mannheim).

Préparation et hydrolyse de l'ADN. L'isolation de l'ADN dans des granules des cellules MCF-7 a été effectué par traitement avec de la RNase, la protéinase K, le procédé de relargation (31) et le chloroforme. Brièvement, les granules de cellules ont été resuspendus en une solution tampon d'EDTA- sulfate dodécylque de sodium (SDS) [10 mm de tampon Tris, 1 mm de Na₂EDTA, 1% de SDS (pds/v), pH 8] incubés pendant 1 h à 37°C avec de la RNase T1 (2000 U/ml) et la RNase A (sans DNase ; 100 µg/ml) sur un dispositif trembleur (100 t/min). Puis la protéinase K (300 µg/ml) a été ajoutée et l'incubation a continué durant la nuit à 37°C. Après la digestion, 6M de NaCl ont été ajoutés pour avoir la concentration finale de 1M suivis d'une centrifugation à 10000 g. L'ADN dans le surnagent a été précipité avec 2 vol.d'éthanol, lavé avec 70%, 100% d'éthanol, éther, séché et dissous dans 10 mm de tampon Tris. Encore, KNase A (100 µg/ml) et RNase T1 (2000 U/ml) ont été ajoutés et la solution incubée à 37°C pendant 1 h. suivis de la protéinase K (100 µg/ml) pendant encore 2 heures à 37°C. La solution était extraite une fois avec du chloroforme, centrifugée et la solution a été faite à NaCl 1M. L'ADN a été précipitée avec 2 vol.d'éthanol froid.

La partie d'ADN à hydrolyser a été rincée par 100% d'éthanol pour enlever les BP-furannes non lié. L'ADN, exempt de BP-furannes non liés, a été dissoute dans l'eau et la concentration en ADN a été déterminée par A₂₆₀ nm. La pureté a été établie par les rapports à A₂₆₀/A₂₈₀ et à A₂₆₀/A₂₃₀. la quantité de l'ADN pour l'analyse a été hydrolysée comme décrit précédemment par incubation à 90°C pendant 4 heures dans une concentration finale de 0,1 N HCl. Ceci libère les furannes (figure 3) d'adducts BPDE-ADN avec une récupération > 90%. Le volume de l'hydrolysate pour l'injection a été fait à 700 µl contenant 5 à 10 µg d'ADN.

Déterminations du niveau de l'adduct BPDE-N²-dg. Les niveaux d'adduct ont été déterminées par CLHP-FD comme précédemment décrit [32, 33] en utilisant r-7, c-9, t-8, t-10-tétrahydroxy-7, 8, 9, 10 tetrahydrobenzo(a)pyrène (BP-furanne II-1) comme standard interne [34]. L'hydrolysate a été chargé sur un module de pré colonne de latex (HD-Allemagne) contenant 5 µm de matériau de phase inverse C₁₈ (Nucleosil 100) équilibré avec 10% de MeOH et lavé pendant 20 minutes avec 12 ml de MeOH de 10%. Plus tard, la pré-colonne a été commutée par une soupape à trois voies de Valco Instruments pour s'écouler sur 4,6 mm x 25 cm 5 µm C₁₈ colonne analytique phase inverse (Nucleosil 100) (Alltech GmbH, Unterhaching, Allemagne). Les produits obtenus par l'hydrolyse ont été élués avec le gradient suivant de MeOH/H₂O : 50%, 0 à 17 minutes ; 50 à 60%, 17 à 32 minutes ; 60%, 32 à 42 minutes ; 60 à 100%, 42 à 57 minutes. Les temps de conservation des furannes de BP étaient : de BP-furanne 1-1 (trans-anti-BP-furanne) (35,2 min) ; BP-furanne II-1 (trans-syn-BP-furanne), standard interne (36,9 min) ; BP-furanne II-2 (cis-syrc-BP-furanne) (42,3 min). La fluorescence a été évaluée à une longueur d'onde d'excitation de 344 nm et à la longueur d'onde d'émission de 398 nm. Comme je n'ai pas détecté la formation du BP-furanne II-1 dans l'analyse séparée des échantillons MCF-7, je l'ai utilisé comme standard interne (2 pg ajouté à chaque analyse CLHP) pour la vérification du temps de conservation relatif. La limite de détection était de 0,5 pg de BP-furanne I-1 et de BP-furanne II-1. Le niveau de chaque BP-furanne a été déterminé en utilisant une courbe standard produite à partir de la zone de pic de fluorescence du standard BP-furanne authentique analysée juste avant l'analyse des échantillons MCF-7. Le BP-furanne-I-1 détecté est dérivé après hydrolyse de l'adduct (+)-

anti-BPDE-ADN. L'hydrolyse (-)-anti-BPDE-dg mène à la formation du BP-furanne 1-2, qui cependant est instable et est converti en BP-furanne 1-1 (figure 3) (38). Ainsi, le niveau du (-)-anti-BPDE-dg formé a été mesuré par la quantité de BP-furanne 1-1 trouvé sur des analyses de CLHP. Sur la base de la constatation que BPDE réagissant avec l'ADN produit principalement le BPDE-n²-dG (7), j'ai supposé que le niveau de BP-furanne-1-1 correspond à ceci de BPDE-n²-dG. Le niveau de BPDE lié à l'ADN de MCF-7 a été mesuré en reproductions. Le niveau d'adduct a été calculé à partir de l'équation 1 pmol/mg d'ADN /3,125 = 1 adduct par 10⁶ nucléotides. Les analyses de CLHP étaient quantitativement reproductibles, et la variabilité entre les deux analyses était inférieure à 5%.

Le mécanisme de la mutagenèse par BP est défini suffisamment bien et utilisé comme "signature moléculaire" pour établir la nature causale entre les événements génétiques particuliers à l'étude des tumeurs et l'exposition cancérigène ("le pistolet de tabagisme"). La "signature moléculaire de BP" a une implication principale pour indiquer exactement la fumée de tabac comme cause de cancer de poumon humain, et pour l'élaboration des stratégies spécifiques pour réduire au minimum le tabagisme, ou introduire des mesures préventives. Les agents spécifiques utilisés dans le chimioprévention du cancer semblent agir en empêchant des lésions carcinoènes à l'ADN, à la mutagenèse, à la promotion de tumeur et/ou à la progression des tumeurs.

J'ai exploré le rôle relatif de la CS sur la métabolisation de BP-7,8-diol à BPDE capable de former l'adduct stable d'ADN dans les cellules humaines. De nombreuses études ont démontré que les adducts PAH-ADN stables peuvent mener à des mutations par l'incorporation erronée des nucléotides ou leurs suppression. La CS est un aérosol d'une composition chimique complexe contenant des composés organiques et inorganiques, dont 4800 ont été identifiés jusqu'ici. La phase de vapeur et la phase particulaire de la fumée sont connues posséder des radicaux libres. Alors que les radicaux de phase gazeuse sont généralement de courte durée, les radicaux dans la phase particulaire sont relativement stables et se composent d'un complexe d'hydroquinone, semiquinone, quinone, ce complexe est un système redox actif capable de réduire l'oxygène moléculaire pour produire un superoxyde, menant par la suite aux radicaux de peroxyde et d'hydroxyle d'hydrogène. En outre, au moins 60 carcinogènes différents de la CS ont été impliqués dans le déclenchement et la promotion des tumeurs ; l'agent carcinogène le plus efficace contenu dans la CS est le BP et NNK (4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone).

Effet de la fumée de cigarette sur (+)-anti-BPDE-dg en utilisant un système sans cellules concomitant avec l'adduction de l'ADN. Pour élucider le mécanisme de formation de BPDE-dg dépendant de l'oxygène actif produit de la fumée de cigarette, j'ai recherché cet adduct dans le système in vitro sans cellules pour concomitant avec l'adduction de l'ADN. La solution de CSS contenant les radicaux de fumée de cigarette et de goudron de phase gazeuse a été immédiatement mise à réagir avec l'ADN en présence de (+)-BP-7, 8-diol (voir le protocole ci-dessus). Les résultats de cette expérience prouvent que la CS peut oxyder (+)-BP-7, 8-diol en (-)-anti-BPDE qui alternativement forme l'adduct (-)-anti-BPDE-dg. La quantité de (-)-anti-BPDE-dg a augmenté linéairement et la dose conséquemment (voir la fig. 2).

Il a été précédemment constaté que de grandes quantités d'oxygène actif telles que H₂O₂ et O₂⁻ ont été produites de la fumée de cigarette après avoir emprisonné la fumée dans PBS. Cet oxygène actif produit de la fumée de cigarette pourrait être responsable de la formation observée de (-)-anti-BPDE-dg. Pour vérifier ceci, j'ai vérifié l'effet de la catalase et de la dismutase de superoxyde (SOD) sur (-)-anti-BPDE-dg produit, et ai constaté que les deux

enzymes ont empêché la formation de l'adduct. La catalase inactivée n'a présenté aucun effet (tableau 1). De ces résultats que j'ai conclu que la fumée de cigarette peut oxyder (+)-BP-7, 8-diol, formant de ce fait (-)-anti-BPDE-dg, et qu'une telle capacité peut être expliquée principalement par l'action de l'oxygène produite de la fumée de cigarette.

Effet de la fumée de cigarette sur l'adduct (-)-anti-BPDE-dG formé dans les cellules MCF-7 traitées avec (+)-BP-7, 8-diol. Deux des voies indépendantes ont été démontrées comme participant au métabolisme de BP-7,8-diol à BPDE (figure 3). Le métabolisme dépendant du cytochrome p450 de l'énantiomère (+)- mène préférentiellement à (+)-syn-BPDE alors que la voie impliquant des protéines contenant de l'hème conjointement à des peroxydes (par exemple le peroxyde de lipide) résulte préférentiellement en (-)-anti-BPDE. d'autre part, (-)-BP-7, 8-diol peut être métabolisé par des voies et résulte en la formation de (+)-anti-BPDE, la forme finale de BP, et (-)- syn-BPDE. Les différentes voies peuvent être distinguées par analyse de CLHP puisque les furannes dérivés de l'anti- et du syn-BPDE respectivement sont clairement séparés dans mes conditions.

Pour étudier plus le rôle de l'époxydation dépendante la fumée de cigarette du (+)-BP-7, 8-diol menant à la formation de (-)-anti-BPDE qui forme avec l'ADN l'adduct (-)-anti-BPDE-dg, la lignée des de cellules mammaire humaine MCF-7 a été utilisée. La raison pour de laquelle j'avais utilisé les cellules MCF-7 pour voir l'effet de la fumée de cigarette ROS sur l'activation de (+)-BP-7, diol 8 était que ces cellules ont peu d'activité de peroxydase. Les cellules ont été traitées avec (+)-BP-7, 8-diol, un capteur stéréochimique qui peut distinguer les adducts constitués par les voies dépendantes de ROS et des CYPs (figure 3). Deux pics distincts ont été observés sur les chromatogrammes correspondant à BP-furanne I et BP-furanne II dérivé de (-)-anti-BPDE-dg et (+)-syn-BPDE-dg respectivement (réfs. 32 à 34). La fumée de cigarette augmentait linéairement et la dose conséquemment la formation dépendante de ROS de (-)-anti-BPDE-dg (figure 4a) et diminuait la formation dépendante des CYPs de l'adduct (+)-syn-BPDE-dg mesuré par la formation de BP-furanne II. Cette diminution est également dépendante de la dose et l'inverse des adducts d'ADN augmentaient linéairement avec la concentration de la fumée de cigarette (4b). L'effet inhibiteur de la CS sur la formation de (+)-syn-BPDE-dg dépendante des CYPs et la l'augmentation de la formation de l'adduct (-)-anti-BPDE-dg confirment le rôle de l'oxygène produit de la fumée de cigarette dans la formation de l'adduct (-)-anti-BPDE-dg.

D'autres études ont prouvé que l'activité induite par les CYPs a été altérée par le défi oxydant. Le mécanisme sous-tendant un tel phénomène a pu être un une régulation descendante du gène du cytochrome P4501A1. Avoir peu d'activité de peroxydase peut mener les cellules MCF dans des conditions "d'effort" à des lésions graves d'ADN et à la capacité réduite de réparation. En conséquence ceci peut causer une augmentation des adducts BPBE-ADN indépendamment de l'activation de BP-7,8-diol.

Effet de la fumée de cigarette sur l'adduct BPDE-dg formé dans les cellules traitées avec BP. Les études précédentes avec des cultures des cellules MCF-7 ont indiqué que ces cellules possèdent une activité P4501B1 et P4501A1 induisibles. La présence de la rotation métabolique catalysée de P450 du BP et l'absence de l'activité discernable de peroxydase dans les cellules MCF-7 ont permis l'évaluation du rôle des radicaux de l'oxygène de fumée de cigarette sur l'activation de BP dans les cultures de cellules humaines. Les cellules MCF-7 ont une activité enzymatique élevée de CYP1A1 pour l'activation métabolique de BP menant à la formation de (-)-BP-7, 8-diol et par conséquent (+)-anti-BPDE-dg (figure 1). Le niveau de la formation de l'adduct à 6 heures était considérablement plus bas que celui observé après 12 et

24 heures d'exposition. Après le traitement avec 2,5 μM de BP pendant 6 heures, approximativement 2000 pg par mg d'ADN ont été formés, alors que plus de 11000 pg et plus de 20000 pg d'adducts par mg d'ADN étaient présents après 12 heures et 24 heures respectivement (l'essai de Wilcoxon Rank Sum donne $p=0,0022$).

Les cellules ont été traitées pendant 12 et 18 heures avec le BP pour induire la formation de (-)-BP-7,8 diol pour lequel est un substrat pour ROS. La confirmation indirecte pour la préférentielle formation de (-)-BP-7, 8-diol est l'absence de BP-furanne II dérivé du syn-BPDE sur les analyses de CLHP dont le précurseur est (+)-BP-7, 8-diol (figure 3). Les cellules ont été alors exposées pendant 2 heures avec la CSS de la fumée de cigarette ainsi que le BP. Les analyses de CLHP présentent l'exposition qu'il y a seulement un pic sur les chromatogrammes qui correspondent au BP-furanne I dérivé de (+)-anti-BPDE-dg. La différence entre les cellules traitées avec la CSS et celles non traitées (des témoins) est présentée sur la figure 5. Comme mentionné ci-dessus, la lignée des cellules utilisée dans cette étude a maintenu les possibilités pour abaisser l'expression de CYP1A1 après un défi oxydant par la CS. La suppression du cytochrome P450 abaisse vraisemblablement l'activation du BP à (-)-BP-7, 8-diol et (+)-anti-BPDE. Ainsi la différence accrue par la CS est due au plus grand métabolisme du (-)-BaP-7,8 diol par ROS. L'essai de Wilcoxon Rank Sum donne $p = 0,0022$ pour les cellules traitées avec de la CS contre des témoins pendant 14 heures et 20 heures respectivement. Les lésions récemment dramatiques par BP de l'ADN se produisent dans les cellules épithéliales bronchiques humaines formant l'adduct BPDE-dg qui pourrait être considéré comme "critique" pour le déclenchement des cellules épithéliales bronchiques humaines du cancer de poumon. Ainsi, l'espèce active de l'oxygène produite dans la fumée de cigarette pourrait jouer un rôle important dans la formation de cet adduct "critique" dans les cellules épithéliales bronchiques (figure 1).

Effet du filtre contenant de l'extrait de romarin sur la formation de l'adduct BPDE-dg.

L'herbe et l'huile de romarin (*Rosmarinus officinalis Labiatae*) sont généralement utilisés comme épice et aromatisants dans la transformation des produits alimentaires pour sa saveur souhaitable et activité antioxydante élevée. L'application topique de l'extrait de romarin, du carnosol ou de l'acide ursolique à la peau de souris a empêché l'attache covalente du benzo(a)pyrène à l'ADN épidermique, le déclenchement de tumeur par le 7,12-diméthylbenz(a)anthracene (DMBA), la promotion de tumeur induite par TPA, l'activité de décarboxylase d'ornitine et l'inflammation. Il s'est avéré que les extraits du romarin sont efficaces non seulement dans la phase de promotion mais également dans la phase de déclenchement. Les extraits de romarin, l'acide carnosique et le carnosol inhibent fortement l'enzyme de la phase I, l'activités de CYP 450 et induisent l'expression de l'enzyme de la phase II, de la S-transférase de glutathion (GST) et les activités de réductase de quinone. Le carnosol inhibe la production de l'oxyde nitrique (NO) dans les macrophages activés. La propriété antioxydante a été désignée comme base mécaniste de leurs effets protecteurs.

Dans le but d'enlever les radicaux libres et l'espèce réactive de l'oxygène dans la fumée de cigarette, un peu de poudre de romarin a été intégré dans un filtre standard (voir les matériaux). La diminution des radicaux libres dans le condensat induit par les filtres intégrant un extrait de romarin a été estimée par la quantification de la teneur hydroxyl dans les radicaux de la CSS avec un piège de rotation (TMPO) en utilisant LC-ESI-MS/MS. Dans les conditions de fumée de cigarette utilisées, une diminution de 30% du radical d'hydroxyle a été observée. En raison de l'efficacité de ce filtre pour réduire le niveau des radicaux libres dans la fumée de cigarette, par rapport à un filtre standard comparable de Marlboro sans adduct, j'ai

comparé l'effet de la CS passée par ce filtre par rapport au filtre standard sur la formation de BPDE-dg en utilisant les cellules MCF-7.

Les résultats présentés dans la figure 6 ont été obtenus quand les cellules MCF-7 ont été traitées avec le BP. Deux groupes d'expériences ont été effectuées (A et B). Les cellules ont été traitées avec le BP pendant 12 et 18 heures respectivement suivi de la CSS des deux filtres pendant encore 2 heures ainsi que le BP (schéma 1). Pour évaluer l'augmentation dépendante des CYPs de l'adduct pendant ces 2 dernières heures, deux témoins pour chaque groupe ont été effectuées : 12 et 14 heures pour le groupe A, 18 et 20 heures pour le groupe B. La CSS du filtre standard double le niveau de liaison obtenu pendant 14 et 20 heures.

Cependant, le filtre de romarin inhibe fortement l'augmentation obtenue par le filtre standard, plus de 70% dans les deux groupes (figure 6). Le filtre modifié extrait ROS et diminue par conséquent l'activation de (-)-BP-7, 8-diol (figure 3). Hormis la réduction des radicaux libres, la poudre de romarin peut avoir également d'autres mécanismes pour réduire la formation de BPDE-dg.

L'utilisation de l'extrait entier de romarin ($6 \mu\text{g.ml}^{-1}$) inhibent également la formation de CYP1A1 et l'activité de l'adduct d'ADN par 80% après 6 heures d'incubation conjointe avec le $1,5 \mu\text{M}$ de BP dans les cellules épithéliales bronchiques humaines (BEAS-2B). Ainsi, l'utilisation des filtres qui diminuent la quantité des radicaux libres pour réduire la formation de l'adduct de genèse de tumeurs critiques est un avantage significatif pour les fumeurs.

Mon filtre cigarette inventif au romarin est donc un candidat prometteur pour des programmes chimiopréventifs dans le but de réduire BPDE-dg dans les cellules épithéliales bronchiques.

Il est à comprendre que la description ci-dessus de la présente invention est susceptible à de divers modifications, changements et adaptations, et ceux-ci sont prévus comme étant compris au sens et à la portée des équivalents des revendications annexées. La modification la plus évidente, par exemple, est l'utilisation de divers matériaux de gel comme composition électroresponsive de matière.

On verra ainsi que les objets déterminés ci-dessus, parmi ceux rendus évidents à partir de la description précédente, sont efficacement atteints et, puisque certains changements peuvent être faits à l'effet de réaliser la méthode ci-dessus (procédé) sans s'écarter de l'esprit et de la portée de l'invention, il est prévu que toute la matière contenue dans la description ci-dessus sera interprétée comme d'illustration et non pas dans un sens restrictif.

Il est également à comprendre que les revendications suivantes sont prévues couvrir tous les dispositifs génériques et spécifiques de l'invention ci-dessus décrite et toutes les déclarations de la portée de l'invention entre lesquelles, en tant question de langage, peuvent être dits comme tombant.

REVENDICATION

Ce qui est revendiqué est :

1. Un procédé pour réduire les adducts benzo(a)pyrène diol époxyde-dg (BPDE-dg) du poumon humain résultant de la fumée de cigarette produite en fumant une cigarette ayant un filtre, ledit procédé comportant les étapes de passer la fumée de cigarette à travers un filtre, lequel filtre est imbibé par un extrait d'une plante de la famille de Labiatae dans lequel ledit extrait comporte des composés de polyphénols ou leurs dérivés.
2. Le procédé selon la revendication 1, dans lequel la plante est le romarin.
3. Le procédé selon la revendication 1 dans lequel l'extrait est produit par l'extraction avec un solvant alcoolique ou un solvant alcoolique aqueux.
4. Un procédé pour réduire les adducts benzo(a)pyrène diol époxyde-dg (BPDE-dg) du poumon humain résultant de la fumée de cigarette produite en fumant une cigarette ayant un filtre, ledit procédé comportant les étapes de passer la fumée de cigarette à travers un filtre, lequel filtre est imbibé par un mélange comportant au moins un composé de polyphénol ou son dérivé.
5. Le procédé selon la revendication 4, dans lequel le mélange comporte au moins un composé de polyphénol ou un dérivé de celui-ci choisi dans le groupe se composant du carnosol, du rosraanol, de l'acide romarinique, et l'acide carnosique.
6. Le procédé selon la revendication 5, dans lequel le mélange comporte le carnosol, l'acide carnosique, l'acide romarinique, et le rosemanol.
7. Le procédé selon la revendication 6, dans lequel le mélange comporte le carnosol ou l'acide carnosique.
8. Le procédé selon la revendication 7, dans lequel le filtre comporte de 0,5 g à 0,1 mg au moins d'un composé de polyphénol ou son dérivé.
9. Le procédé selon la revendication 7, dans lequel le filtre comporte 0,01 g au moins d'un composé de polyphénol ou de son dérivé.
10. Le procédé selon la revendication 7, dans lequel l'au moins un polyphénol ou son dérivé est couplé à un porteur polymère ou est dans une matrice de microcapsule ou est ajouté aux fibres d'un filtre.

Figure 1

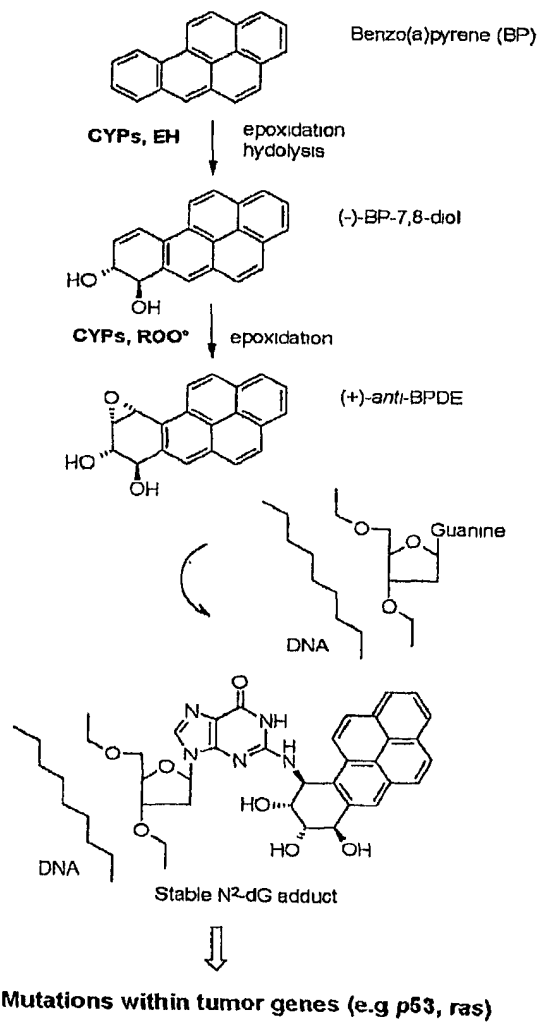


Figure 2

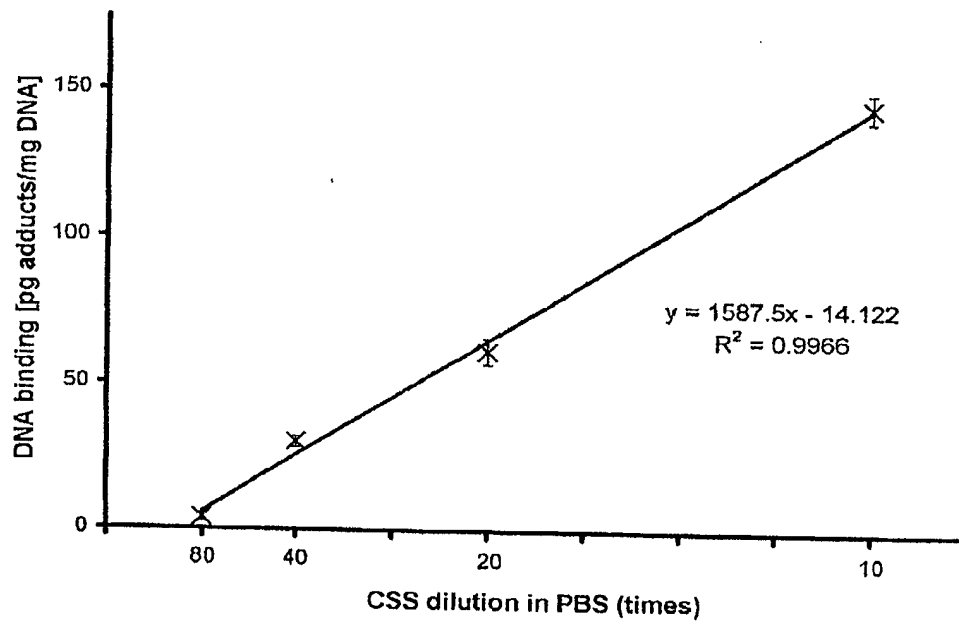


Figure 3

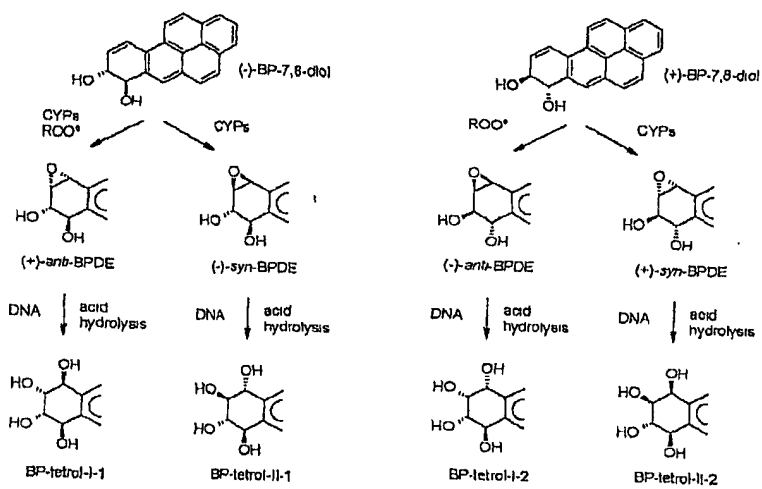


Figure 4 Upper

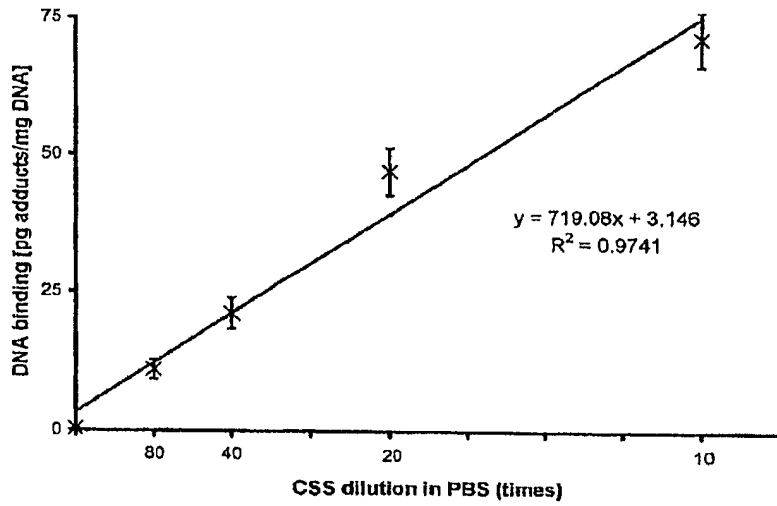


Figure 4 (b)

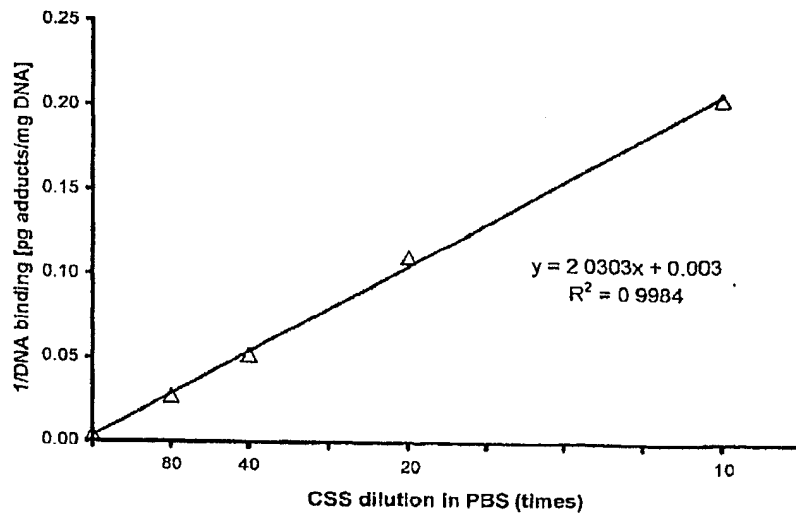


Figure 5

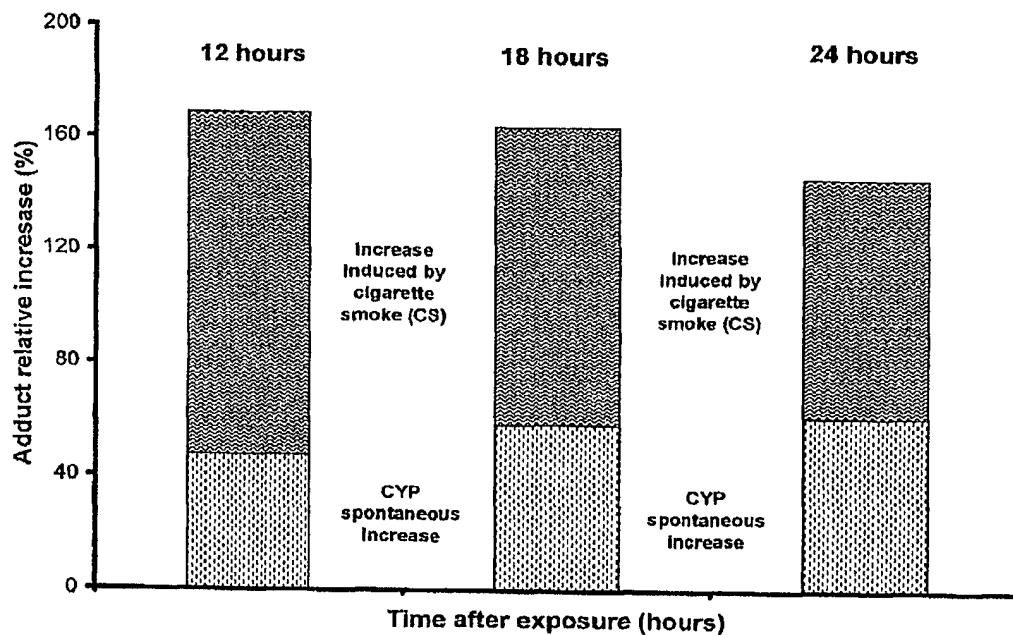


Figure 6

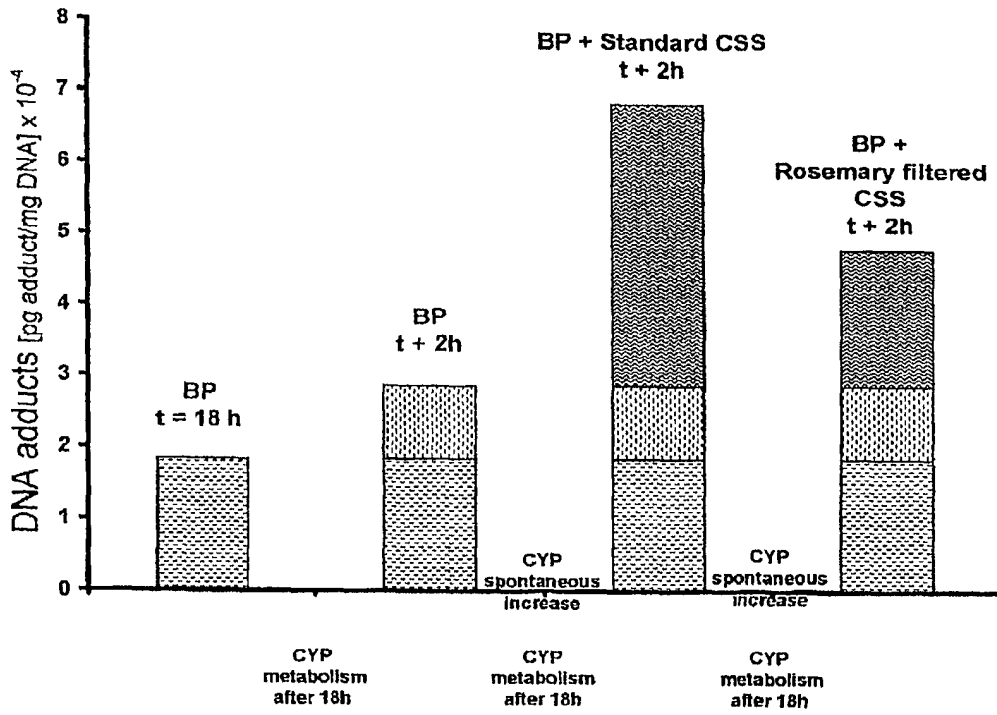


Figure 6 - Scheme 1

