

Biomarqueurs de génotoxicité en lien avec l'exposition aux HAP chez des femmes ménopausées de la région de Québec

PIERRE AYOTTE^{1,2}, KABIL AL-SABTI², ABDELHAFID LAIDAOUI¹,
NATHALIE OUELLET¹, MARC SINOTTE³, JACQUES BRISSON³,
SYLVIE BÉRUBÉ³, DÁRIA PEREG¹, ÉRIC DEWAILLY¹

¹Unité de recherche en santé publique, Centre de recherche du Centre Hospitalier Universitaire de Québec – CHUQ, Québec, QC, Canada G1V 2M2

²Laboratoire des biomarqueurs, Direction de la toxicologie humaine, Institut national de santé publique du Québec, Québec, QC, Canada G1V 5B3

³Unité de recherche en santé des populations (URESP), Centre Hospitalier Affilié Universitaire de Québec, QC, Canada G1S 4L8. Adresse de courriel : pierre.ayotte@inspq.qc.ca

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques, de la
recherche à la prévention
Colloque francophone international

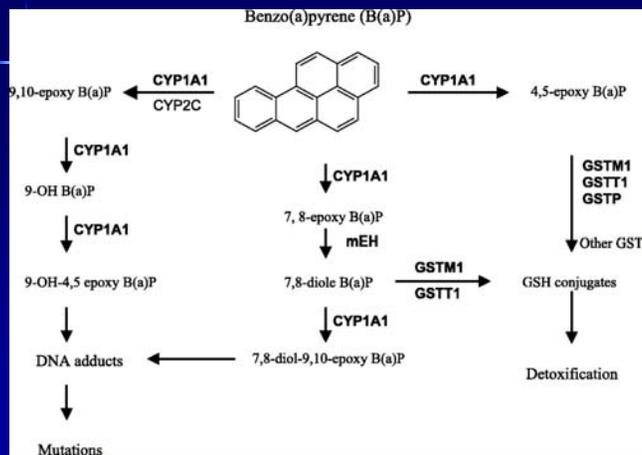
3 et 4 septembre 2008, Montréal, Québec



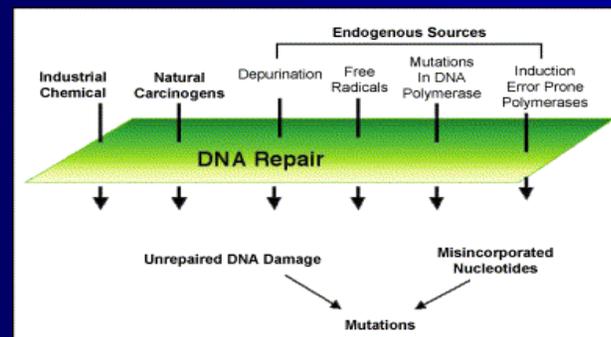
Hydrocarbures aromatiques polycycliques

- Substances générées par la **combustion incomplète** de la matière organique
- Les principales sources d'exposition sont la **consommation de viandes grillées**, la fumée de cigarette, l'air en milieu urbain
- Le **benzo(a)pyrène** est un cancérigène puissant chez l'animal

Voies de biotransformation du B(a)P



Réparation du dommage à l'ADN



Wogan et al., Sem Cancer Biol 2004;14:473

HAP et cancer du sein

- Étude cas-témoin à Long-Island, NY
- Quantité d'adduits HAP-ADN dans l'ADN de lymphocytes
- Résultats équivoques

Table 2 Adjusted ORs for breast cancer and 95% CIs in relation to PAH-DNA adduct levels, Long Island Breast Cancer Study Project, 1996–1997

Quantile of PAH-DNA adduct level per 10 ⁸ nucleotides (range)	Cases (n)	Controls (n)	Age-adjusted ORs (95% CI)	Multivariate-adjusted ORs ^a (95% CI)
Quantile 1 (nondetects)	148	134	1.00	1.00
Quantile 2 (0 to ≤7.7237)	105	72	1.31 (0.89–1.92)	1.45 (0.97–2.17)
Quantile 3 (>7.7237 to ≤14.4212)	112	73	1.36 (0.93–1.98)	1.48 (0.99–2.21)
Quantile 4 (>14.4212 to ≤21.9357)	88	73	1.09 (0.74–1.62)	1.01 (0.67–1.52)
Quantile 5 (>21.9357)	122	72	1.51 (1.04–2.20)	1.49 (1.00–2.21)

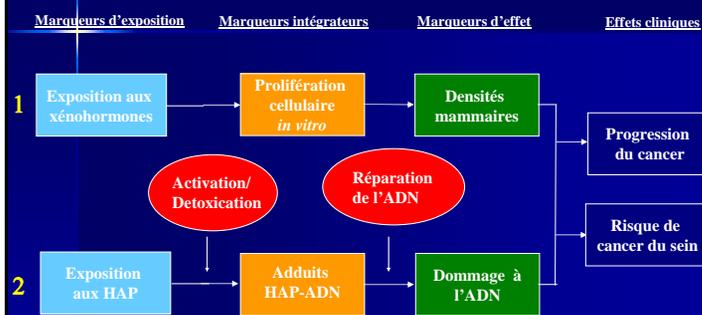
^a Adjusted for age at reference date (continuous), race, history of infertility problems, season of blood donation, religion, parity (continuous), total months of lactation (continuous), BMI at age 20 (continuous), first-degree family history of breast cancer, age at first birth (centered, continuous).

Gammon et al. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2002;11(8):677-85.

Étude pilote

- Projet de recherche financé par l'ACRCS: Xéno-hormones et cancer du sein
 - Recrutement de **110 femmes ménopausées** – prélèvement sanguin et questionnaire
 - Chimie analytique ~ 150 substances analysées dans le plasma
 - Activité proliférative d'extraits de plasma sur des cellules tumorales du sein en culture
 - Densités mammaires mesurées à la mammographie

Schéma de l'étude épidémiologique moléculaire



La promotion (1) et l'initiation (2) de la carcinogenèse doivent être pris en compte dans une même étude

VOLET GÉNOTOXIQUE*

- Questions de recherche:
 - L'exposition aux HAP par la consommation de viandes grillées est-elle reliée à un dommage génétique?
 - Est-ce que la délétion GSTM1 est un facteur de susceptibilité à ce dommage?

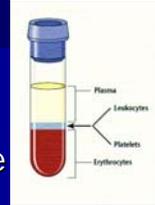
* Financé par le Canadian Cancer Etiology Research Network

MÉTHODES

- Questionnaire alimentaire pour quantifier la consommation de **viandes grillées/fumées**
- Échantillon sanguin frais pour la culture des lymphocytes
 - Test des **micronoyaux** (cellules binuclées)
 - Test d'**aberrations chromosomiques**

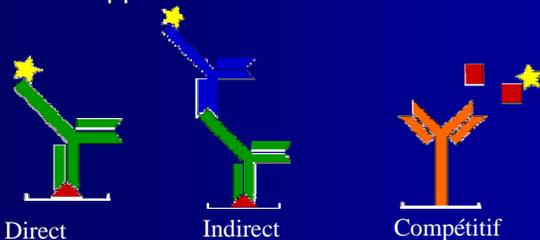
MÉTHODES

- Échantillon sanguin sur EDTA
- **Isolation des lymphocytes** et congélation dans l'azote liquide
 - Extraction de l'ADN
 - Dosage des **adduits HAP-ADN** par ELISA compétitif
 - Génotypage de la **délétion GSTM1**
 - **Test des comètes** sur lymphocytes décongelés



Dosage de composés chimiques par ELISA

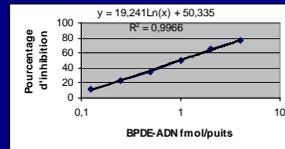
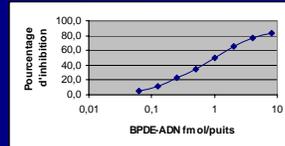
- Développement d'ELISA maison



Légende : = puit, = anticorps, = antigène, = enzyme

ELISA COMPÉTITIF BPDE-DNA

fmol/puits	ug DNA/puits	fmol/ug ADN	adults/10E9 nucl
8	10	0,8	264
4	10	0,4	132
2	10	0,2	66
1	10	0,1	33
0,5	10	0,05	16,5
0,25	10	0,025	8,25
0,125	10	0,0125	4,12
0,0625	10	0,00625	2,06



TEST DES COMÈTES - CASSURES DES BRINS D'ADN

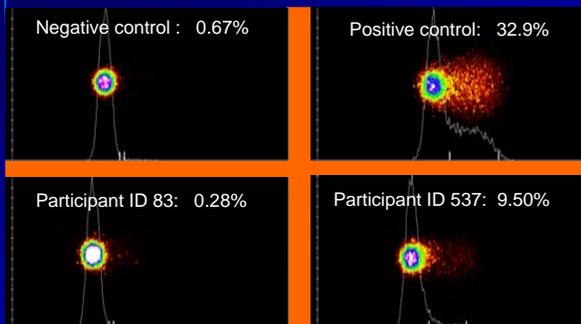
ADN non-fragmenté



ADN fragmenté

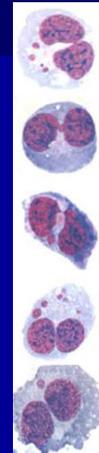


TEST DES COMÈTES

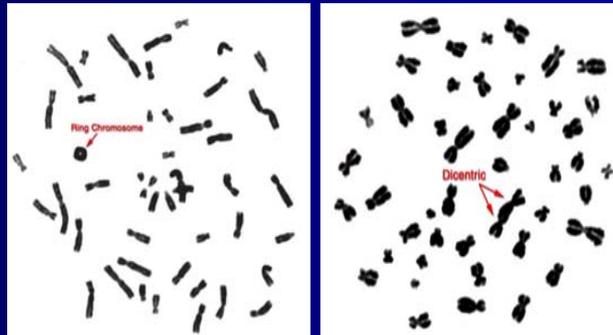


TEST DES MICRONOYAUX

- Lymphocytes dont la **division est bloquée** par l'ajout de **cytochalasine B** (Cytokinesis-blocked micronuclei test - Fenech and Morley, 1985)
- Des **parties de chromosomes** sont exclues des noyaux durant la division cellulaire
- Les micronoyaux sont comptés dans les lymphocytes ayant **complété la division nucléaire**
- Nombre de **cellules micronucléées (CMN)** par 1000 **cellules binucléées**



ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES



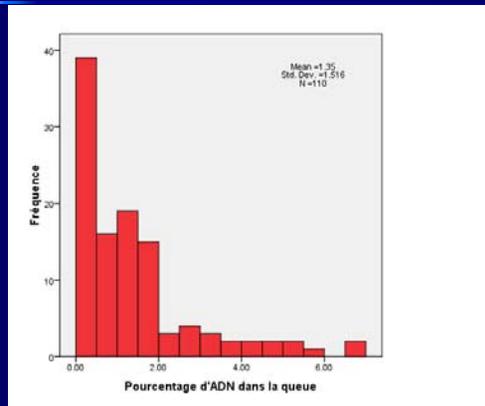
RÉSULTATS-CARACTÉRISTIQUES DES 110 PARTICIPANTES

Caractéristiques	N (%)	Moyenne	ET	Gamme
Âge (années)		58.3	5.6	48-76
Poids (Kg)		68.7	14.0	44.8-133.0
Taille(cm)		160	5.2	146-172
IMC (Kg/m ²)		27.0	5.4	17.2-51.3
Parité		1.9	1.4	0-5
Consommation d'alcool (no./jour)		0.46	0.56	0-3
Consommation de viandes grillées (g/jour)		25.2	30.6	0-110.0
Tabagisme				
Actuel	8 (7.3)			
Déjà fumé	54 (49.1)			
Jamais	48 (43.6)			

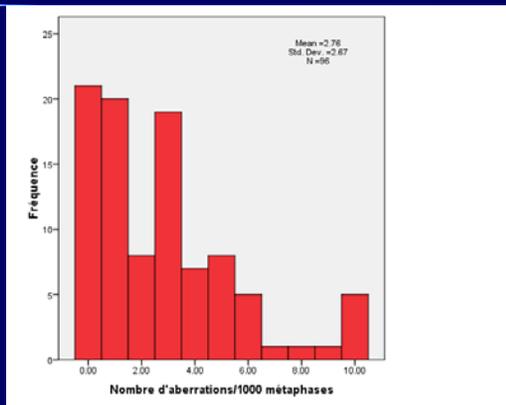
ADUITS BPDE-ADN

- Non-délectable chez toutes les participantes
- Limite de détection ~ 5 adduits/10⁹ nucléotides

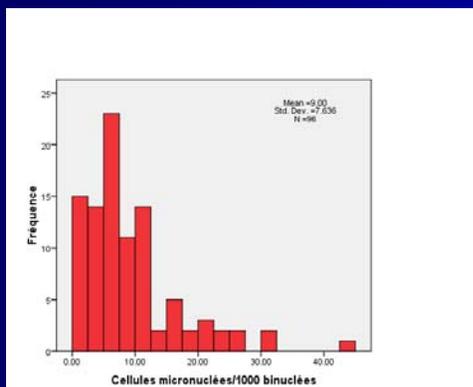
TEST DES COMÈTES (%ADN queue)



ABERRATIONS CHROMOSOMIQUE (n/1000 cellules en métaphase)



TEST DES MICRONOYAUX (N CELLULES MICRONUCLÉES/1000 CELLULES BINUCLÉES)

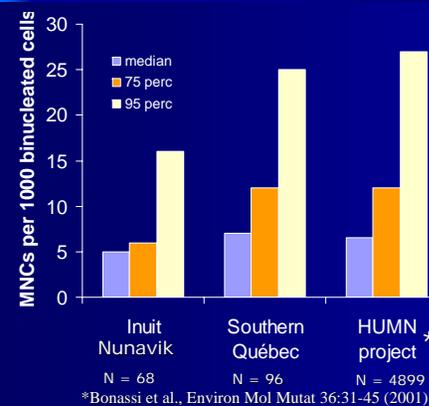


CONSOMMATION VIANDE GRILLÉE VS PARAMÈTRES GÉNOTOXIQUES

Corrélations						
			Viandes grillées	CMN	AC	%ADN
r de Spearman	Consommation de viandes grillées	Coefficient de corrélation	1.000	.041	.140	-.012
		Sig. (2-tailed)		.701	.190	.906
		N	104	90	90	104
	CMN	Coefficient de corrélation	.041	1.000	.707**	-.046
		Sig. (2-tailed)	.701		.000	.657
		N	90	96	96	96
	AC	Coefficient de corrélation	.140	.707**	1.000	-.053
		Sig. (2-tailed)	.190	.000		.607
		N	90	96	96	96
	%ADN	Coefficient de corrélation	-.012	-.046	-.053	1.000
		Sig. (2-tailed)	.906	.657	.607	
		N	104	96	96	110

** p < 0,01

TEST DES MICRONOYAUX – DONNÉES COMPARATIVES



DÉLÉTION GSTM1 VS DOMMAGE GÉNÉTIQUE

	GSTM1 déletion	GSTM1 (1 ou 2 allèles)	Valeur p**
ACs	3 (1 -5)*	1 (0 - 2)	0,11
CMN	7 (3 -11)	6 (2,5 - 9,5)	0,54
% ADN	0,8 (0,3 - 2,2)	1,2 (0,1 - 1,5)	0,57

* Médiane (25° - 75° percentile); ** U Mann-Whitney

CONCLUSION

- Dans ce groupe de femmes en **bonne santé**, l'exposition aux **HAP** par l'alimentation **semble insuffisante** pour induire une quantité d'adduits HAP-ADN détectable ou un quelconque **dommage génétique**