

Contribution de la cytogénétique à l'étude de la génotoxicité des HAP

Fléchère Fortin^{1,3,4}, Claude Viau² et Nicole Lemieux^{1,3,4}

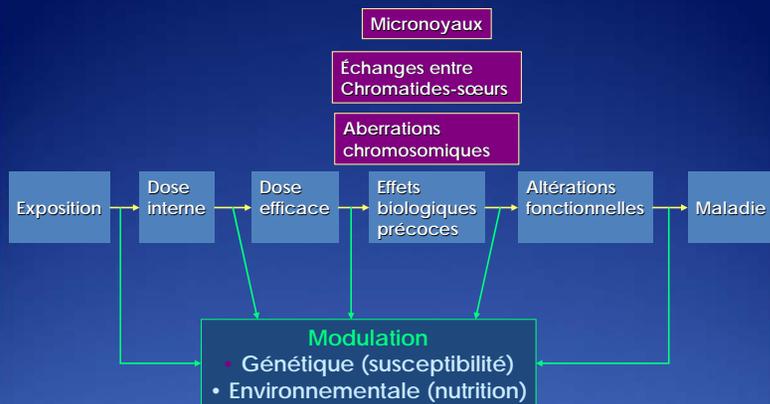
- ¹ Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal.
- ² Chaire d'analyse et de gestion des risques toxicologiques, département de santé environnementale et santé au travail, Université de Montréal.
- ³ Département de pathologie, CHU Sainte-Justine.
- ⁴ Centre de recherche, CHU Sainte-Justine.

Plan de la présentation

- **Introduction**
 - Continuum exposition-maladie et cytogénétique
- **Aberrations chromosomiques**
- **Échanges entre chromatides-sœurs**
- **Micronoyaux sanguins**
 - Mécanismes de formation
 - Caractéristiques de l'exposition menant à leur augmentation
- **Études in vitro chez l'humain utilisant le BaP comme modèle**
- **Perspectives**
 - Signification biologique
 - Suivi des populations exposées

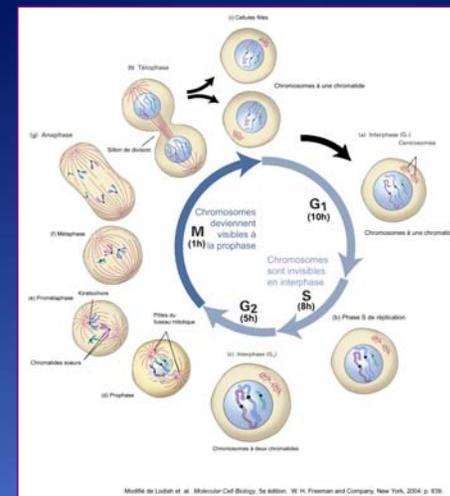
Colloque HAP 2008

Continuum exposition-maladie



Colloque HAP 2008

Le cycle cellulaire somatique



Modifié de Lodish et al. Molecular Cell Biology, 5e édition. W. H. Freeman and Company, New York, 2004, p. 378.

Colloque HAP 2008

Aberrations chromosomiques (ABR)

- **Aberrations évaluées:**
 - De nombre (aneugène)
 - De structure (clastogène)
 - Stables
 - translocations, insertions, délétions...
 - Instables
 - gaps, cassures
 - **Anomalies de structure induites peuvent être:**
 - chromatidiennes - exposition en phase S ou G₂,
 - chromosomiques - exposition en phases G₀ ou G₁ mais aussi pendant la phase de synthèse.



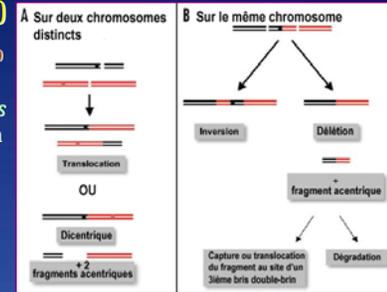
Cassure et Gap chromatidien

Cassure chromosomique

Colloque HAP 2008

Formation des aberrations chromosomiques (ABR)

- **Bris double-brin à l'ADN (BDB)**
 - Formés et réparés en phase G₀ ou G₁ du cycle cellulaire
 - réparation par *non homologous end-joining* (NHEJ) - tendance à erreur) ou par appariement d'ADN simple-brin (SSA)
 - Translocation, inversion, anneau, insertion, dicentrique, délétion
 - Si BSB pas réparés en G₁...
 - Réparation en phase S
 - Point de contrôle G₁/S
 - Cassures chromosomiques



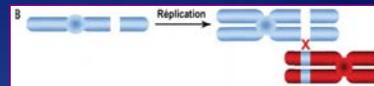
Modifié de: Delacôte et Lopez (2008) Cell Cycle 7:33-38



Colloque HAP 2008

Formation des aberrations chromosomiques (suite)

- **Bris double-brin à l'ADN (BDB)**
 - Présents en G₁ et réparés en phase S
 - Réparation par recombinaison homologue
 - Mais, la chromatide-sœur a aussi un BSB...
 - Utilisation de séquences homologues ailleurs dans le génome
 - Évènement tumorigène possible
 - Réparés en phase G₂
 - Si BSB pas réparés...
 - Cassures chromatidiennes
 - Délétions lorsque le fragment acentrique est perdu



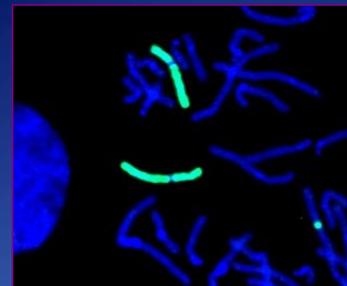
Modifié de: Delacôte et Lopez (2008) Cell Cycle 7:33-38



Colloque HAP 2008

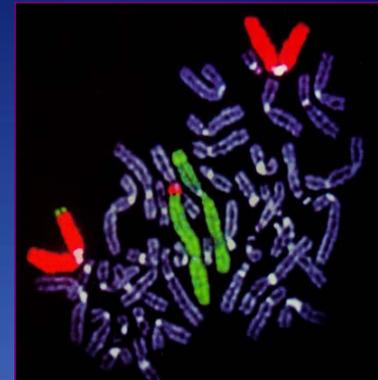
Aberrations chromosomiques stables visualisées par hybridation *in-situ* en fluorescence avec des peintures chromosomiques

Insertion du chromosome 11 dans le chromosome 2



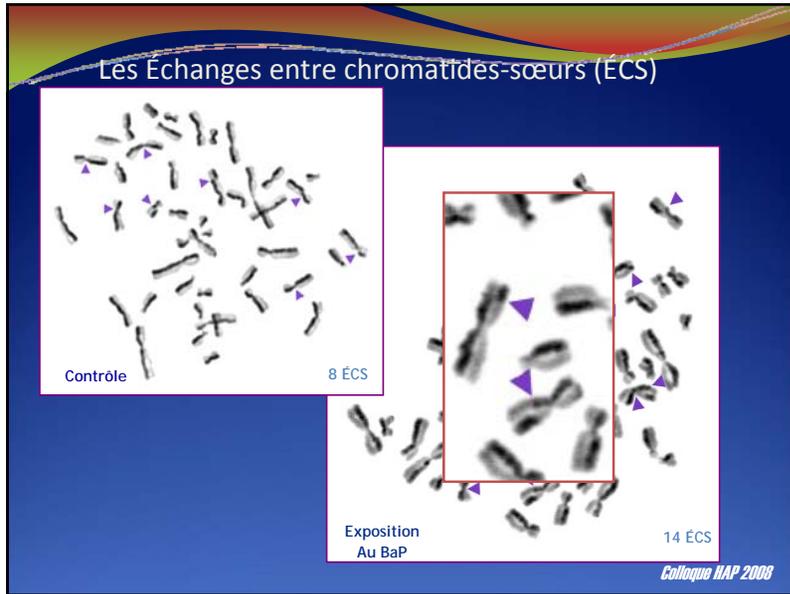
<http://gjccontario.tripod.com/>

Translocation entre les chromosomes 1 et 2



Connor and Ferguson-Smith (1997). Essential medical genetics. Fifth edition. p.86.

Colloque HAP 2008



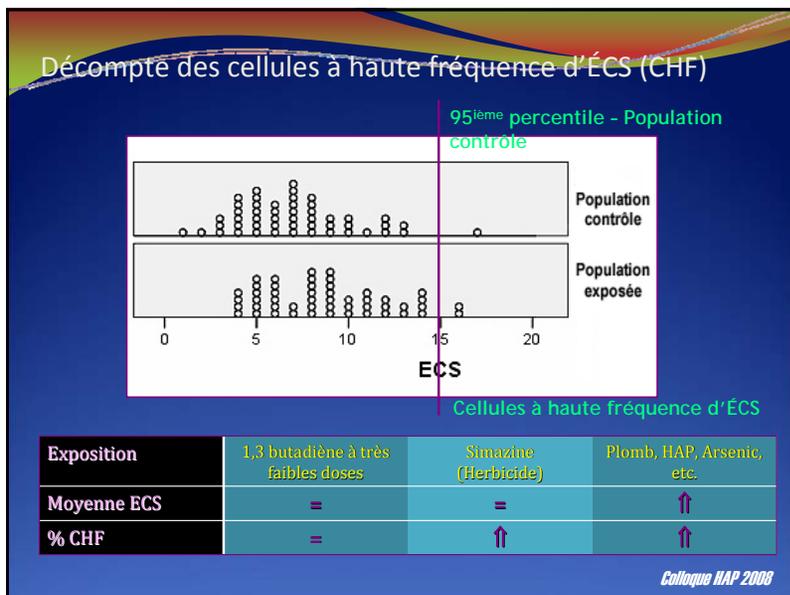
Formation des échanges entre chromatides-sœurs (ÉCS)

- Les ÉCS se forment suite à un arrêt de la fourche de réplication en phase S.
 - Adduits BPDE-ADN
 - Bases modifiées
 - Bris simple-brin à l'ADN
 - Bris double-brin à l'ADN
- Il doit y avoir réparation par recombinaison homologue pour poursuivre la réplication.
 - Des erreurs peuvent parfois se produire...

Conversion génétique

ÉCS 1/1000

Colloque HAP 2008



Formation des micronoyaux (MN)

- Sont formés durant la division cellulaire
 - Chromosome entier ou fragment chromosomique retardé à l'anaphase
- L'ADN des MN est actif (réplication et transcription)
- Au niveau cellulaire, leur formation implique:
 - Une non-réparation de bris double-brin entraînant la formation d'un fragment chromosomique
 - Un dysfonctionnement de l'appareil mitotique, des kinétochores
- Avenir du MN est incertain...
 - Demeurer inchangé
 - Réintégrer le noyau
 - Se perdre

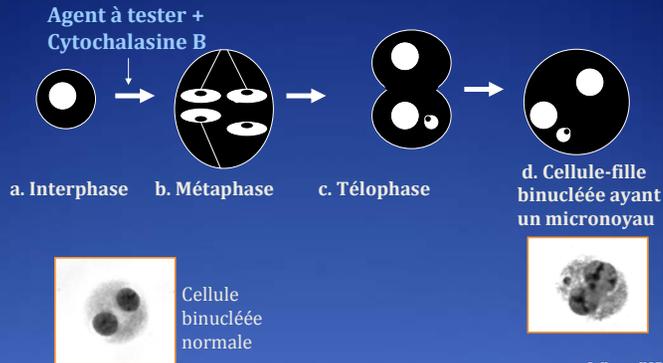
MN formation

Fenech (2007), Nat Protocols 2 : 1084-1104

Colloque HAP 2008

Le test des micronoyaux par la technique CBMN

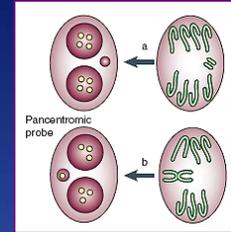
- **Cytochalasine B ajoutée à la culture cellulaire pour bloquer la cytokinèse**
 - **Cellule binucléée = une division cellulaire après l'exposition**



Colloque HAP 2008

Test CBMN couplé à la FISH (sonde centromérique)

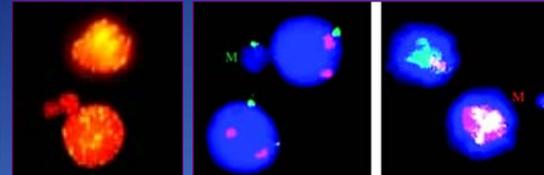
- **Permet de faire la distinction entre:**
 - Produits clastogènes (cassures chromosomiques)
 - Produits aneugènes (chromosomes « entiers », contenant un centromère)
- **Comparaison entre groupes contrôlé et exposé**



Fenech (2007). Nat Protocols 2 : 1084-1104

Cen-: clastogène

Cen+: aneugène

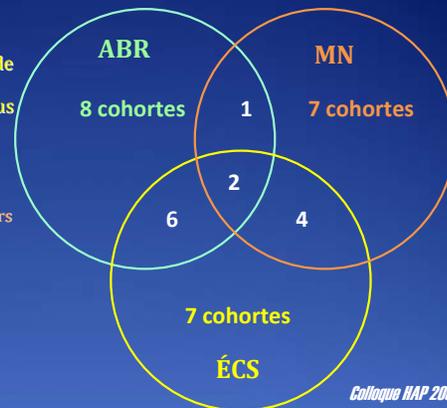


Wodja et al, (2007). Mutagenesis 22:195-200.

Colloque HAP 2008

Études de populations exposées aux HAP

- **50 études publiées entre 1983 et 2008**
 - 35 études présentent une augmentation significative d'un paramètre cytogénétique
- Four à coke - 13
- Pavage - 4
- Travaillant avec des cendres de charbon - 3
- Policiers / chauffeurs d'autobus - 3
- Mine de charbon - 2
- Autre - 5
 - Aéroports
 - École de réparation de moteurs au diesel
 - Usine de fertilisants au phosphate
 - Traitement pour psoriasis
- **Air pollué - 6**
 - Silésie (Pologne)
 - Air ambiant
 - Habitant près usine - four à coke



Colloque HAP 2008

Caractéristiques des expositions: augmentation ABR

- **17 cohortes**
 - 9 occupationnelles, 8 environnementales
- **[BaP]air:**
 - 0,45 ng/m³ chez les mères (enceintes)
 - nouveau-nés présentent ABR
 - 0,58% vs 0,11 à 0,2% (mères fumeuses)
 - 0,4 ng/m³ : enfants présentent ABR
- **Policiers affectés à la circulation présentant ABR**
 - [BaP]air: 1,8 ng/m³
 - [c-HAP]air: 9,07 ng/m³
- **ABR détectés par FISH plus sensible que méthode conventionnelle dans 2 cohortes exposées à l'air pollué**
- **Niveau d'ABR retourne à la normale 2,5 à 3 mois après une exposition forte**
 - Policiers: hiver vs printemps
 - Traitement du psoriasis

Colloque HAP 2008

Caractéristiques des expositions: augmentation ÉCS

- **19 cohortes**
 - 16 occupationnelles, 3 environnementales (Silésie)
- **[BaP] air**
 - varie entre 0,96 ng/m³ et 3,96 µg/m³
- **[HaP] totaux ou [c-HAP]**
 - varie entre 0,415 et 23,7 g/m³
- **1-OH-Pyrène urinaire:**
 - 0,78µMol/Mol créatinine et plus
 - 2 BEI proposées pour éviter augmentation significative des ÉCS ou du pourcentage de CHF
 - 1µMol/Mol créatinine (Siwinska et coll. 2004)
 - 2,7µg/g créatinine (ou 1,4µMol/Mol créatinine) (Buchet et coll. 1995)
- **2 groupes ont modifié leurs procédés au travail et ont vu chuter le niveau d'ÉCS (et ABR ou MN) au niveau normal**

Colloque HAP 2008

Caractéristiques des expositions: augmentation MN

- **15 cohortes**
 - 13 occupationnelles et 2 environnementales
- **[BaP]air**
 - Varie entre 50 ng/m³ et 3,96 µg/m³
- **[HAP] totaux et [C-HAP] mesurés dans une seule étude**
- **1-OH-Pyrène urinaire:**
 - 0,78 à 12 µMol/Mol créatinine
 - Traitement du psoriasis avec huile de goudron brut
 - 12,58 µMol/Mol créatinine (après premier traitement)
 - 9,26 µMol/Mol créatinine (un jour après dernier traitement)
- **2 études effectuées avec des travailleurs de four à coke montre que les plus exposés ont une diminution significative des MN**
 - Réparation accrue ou mode de génotoxicité a changé?

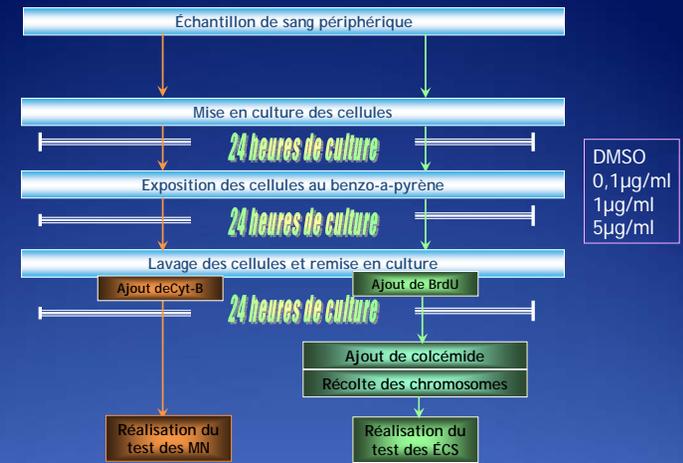
Colloque HAP 2008

Effets cytogénotoxiques *in vitro* chez l'humain: brève revue de la littérature

[BaP] µg/ml	Durée exposition (h)	Résultats	Référence
15 à 150	28	pas d'augmentation des MN	Elhajouji et coll. 1994
1 à 50	48	↑ABR dès 1 µg/ml ↑ÉCS dès 10 µg/ml	Salama et coll. 2001
1,25	24 et 48	↑ABR ↑ ÉCS	Güven et coll. 2006
Jusqu'à 1,25	51	↑ ÉCS dès 0,125 µg/ml	Wiencke et coll. 1990
Jusqu'à 10	64	↑MN dès 0,5 µg/ml ↑ÉCS dès 2,5 µg/ml	Warszawsky et coll. 1995

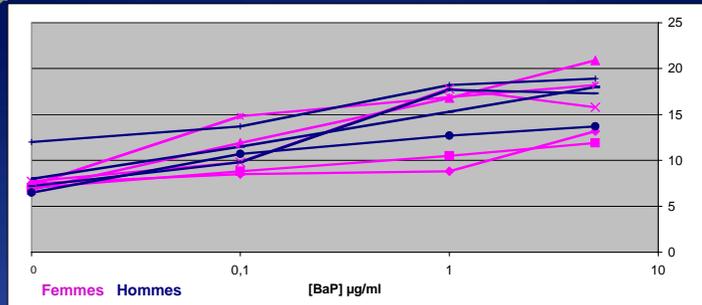
Colloque HAP 2008

Méthodologie



Colloque HAP 2008

ÉCS - Résultats



- Augmentation significative de la fréquence des ÉCS en fonction de la concentration de BaP ($r=0,616$, $p < 0,05$)
- Pas de différence homme - femme ($p=0,598$)
- Augmentation significative de la fréquence des ÉCS à $[BaP] = 0,1 \mu\text{g/ml}$
 - 7/9 sujets ($p < 0,001$)

Colloque HAP 2008

ECS – Cellules à haute fréquence (CHF)

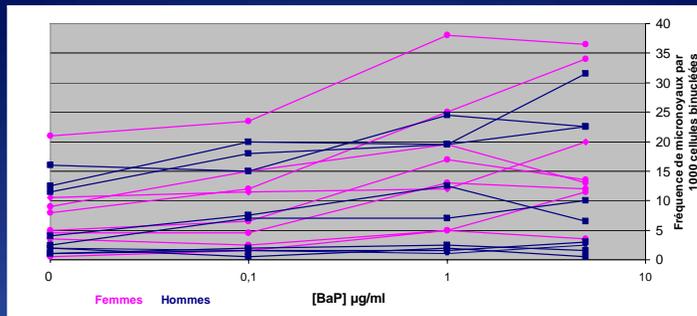
- 2 sujets ne montrent pas d'augmentation significative des ÉCS à $[BaP] 0,1 \mu\text{g/ml}$.

Sujets	XY2	XX1
ÉCS / 95 ^{ème} percentile	≥ 20	≥ 14
Contrôle -	4%	4%
$[BaP] 0,1 \mu\text{g/ml}$	10%	8%

- % CHF augmente de 2 fois ou plus chez les 2 sujets.
 - Effet génotoxique précoce?

Colloque HAP 2008

MN - résultats



- Augmentation progressive de la fréquence des MN en fonction de la concentration de BaP ($r=0,309$, $p=0,067$)
- Pas de différence homme - femme ($p=0,508$)
- Augmentation significative de la fréquence des MN à $[BaP] = 1$ et $5 \mu\text{g/ml}$
 - 1 sujet ($p < 0,05$)

Colloque HAP 2008

Discussion – ÉCS et MN

- Échanges entre chromatides-sœurs
 - L'utilisation de basses concentrations de BaP met en évidence la variabilité présente entre les individus.
 - Les études précédentes ne montraient pas cette variabilité.
 - % CHF pourrait être un paramètre plus sensible en cas d'exposition faible au BaP.
 - % CHF augmente à $[BaP] 0,1 \mu\text{g/ml}$ lorsque la moyenne des ÉCS n'augmente pas.
 - % CHF était utilisé seulement pour des expositions *in vivo*.
- Micronoyaux
 - Les basses concentrations de BaP révèlent une sensibilité plus faible du test des MN, en comparaison au test des ÉCS.
 - Contradiction avec Warshawsky (1995)
 - Exposition de 64 heures vs 24 heures

Colloque HAP 2008

Relation entre les adduits et les ÉCS

- **Adduits retirés par excision des nucléotides (NER)**
- **ÉCS produits lors de la réparation par recombinaison homologue (HRR)**
 - HRR ne retire pas les adduits
- **Test des ÉCS *in vivo***
 - Mesure de la persistance des adduits à l'ADN dans l'organisme?
 - Mesure de l'intégrité, de la capacité de réparation par recombinaison homologue?
 - Association avec augmentation du risque de cancer?

Colloque HAP 2008

Augmentation de la fréquence d'ÉCS vs risque de cancer ou maladie

- **ÉCS augmentés patients vs sujets contrôles.**
 - **recto-colite hémorragique** (Cottliar et coll. 2000)
 - **carcinome de la prostate** (Dhillon et Dhillon, 1998).
 - **lymphome de Hodgkin** (Strom et coll. 1998).
 - Relation avec cancer secondaire
- **Patients ayant un cancer du sein héréditaire vs apparentés sains vs sujets contrôles** (Roy et coll. 2000).
 - ECS augmentés > ECS apparentés >>> ECS contrôles
 - Le **risque de développer un cancer du sein** chez des sujets ayant une **histoire familiale positive** pourrait se refléter dans le **niveau d'ÉCS observés** dans leurs lymphocytes.

Colloque HAP 2008

Risque de cancer et ABR ou MN

- **Individus présentant un niveau d'ABR ou de MN élevé, ont un risque accru de développer un cancer durant leur vie**
- **Aberrations chromosomiques** (Norppa et coll. 2006)
 - Biomarqueur de cancer, spécialement hématologique
 - Généralement indépendant du statut d'exposition
 - Refléterait autant l'exposition que la susceptibilité
- **Micronoyaux sanguins** (Bonassi et coll. 2007)
 - Biomarqueur de cancer, spécialement de la vessie, des reins et gastro-intestinal
 - Indépendant de l'exposition
 - Corrélation mécanistique et expérimentale forte entre les ABR et les MN

Colloque HAP 2008

Conclusion

- Ces biomarqueurs doivent être évalués au niveau d'un groupe, non d'un individu.
- L'utilisation du pourcentage de cellules à haute fréquence, lors du test des ÉCS, le rend plus sensible aux effets subtils.
- L'utilisation de la cytogénétique moléculaire, combinée aux tests des micronoyaux et des aberrations chromosomiques:
 - Les rend plus sensibles
 - Permet de comprendre les mécanismes à la base de leur génotoxicité
- **La recherche doit se poursuivre, tant *in vivo* qu'*in vitro*, afin de comprendre, pour mieux prévenir!**



<http://www.genetix.com/enxhtml/product.aspx?pid=34>

Colloque HAP 2008

Remerciements

- Laboratoire de Cytogénétique moléculaire, Université de Montréal
- Département de pathologie, CHU Sainte-Justine
- Chaire d'analyse et de gestion des risques toxicologiques, département de santé environnementale et santé au travail
- Institut National de Santé Publique du Québec
- FRSQ

Des questions ?

