

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}

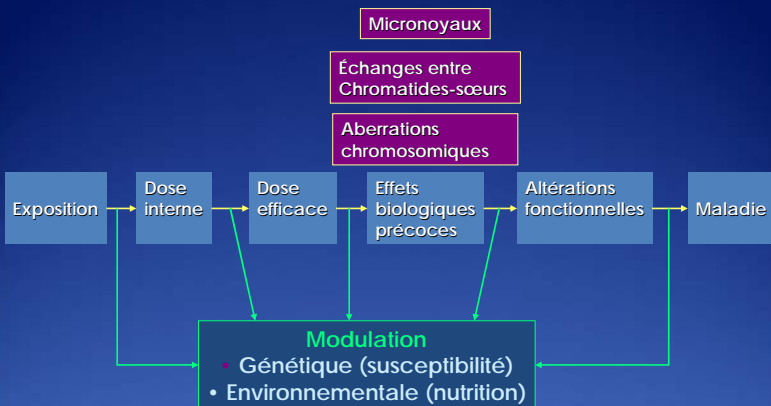
- ¹ Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal.
- ² Chaire d'analyse et de gestion des risques toxicologiques, département de santé environnementale et santé au travail, Université de Montréal.
- ³ Département de pathologie, CHU Sainte-Justine.
- ⁴ Centre de recherche, CHU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

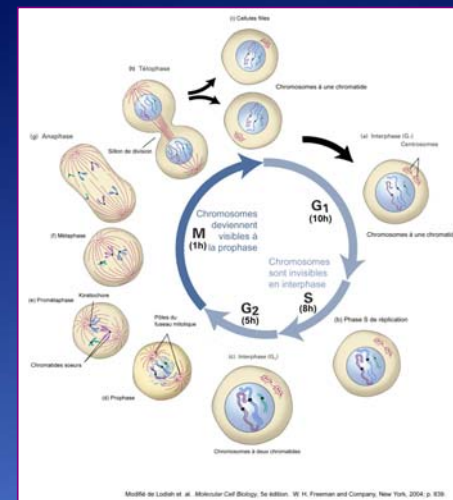
Colloque HAP 2008

Continuum exposition-maladie



Colloque HAP 2008

Le cycle cellulaire somatique



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.



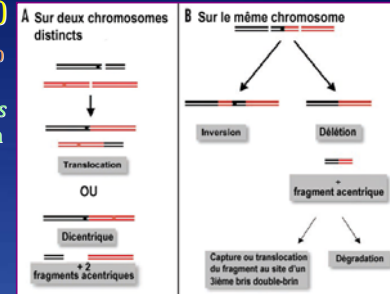
Cassure et Gap chromatidien

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



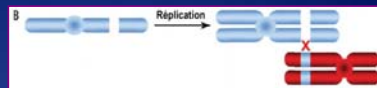
Modifié de: Delacôte et Lopez (2008) Cell Cycle 7:33-38



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



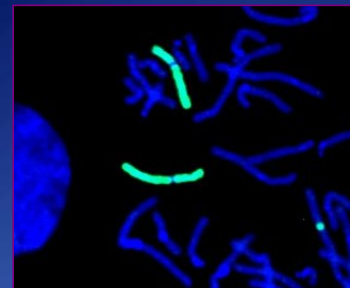
Modifié de: Delacôte et Lopez (2008) Cell Cycle 7:33-38



Colloque HAP 2008

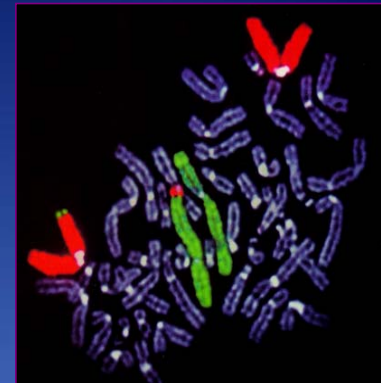
Aberrations chromosomiques stables visualisées par hybridation *in-situ* en fluorescence avec des peintures chromosomiques

Insertion du chromosome 11 dans le chromosome 2



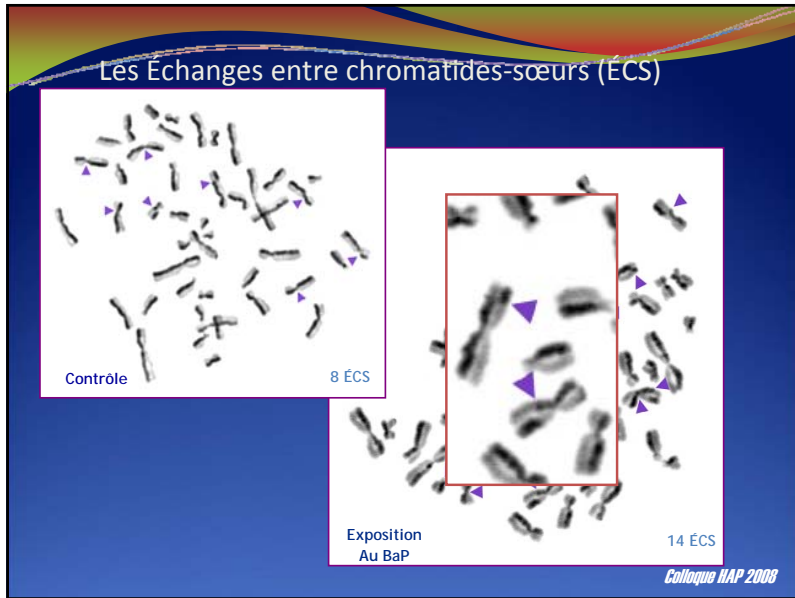
<http://gjccontario.tripod.com/>

Translocation entre les chromosomes 1 et 2



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

Colloque HAP 2008



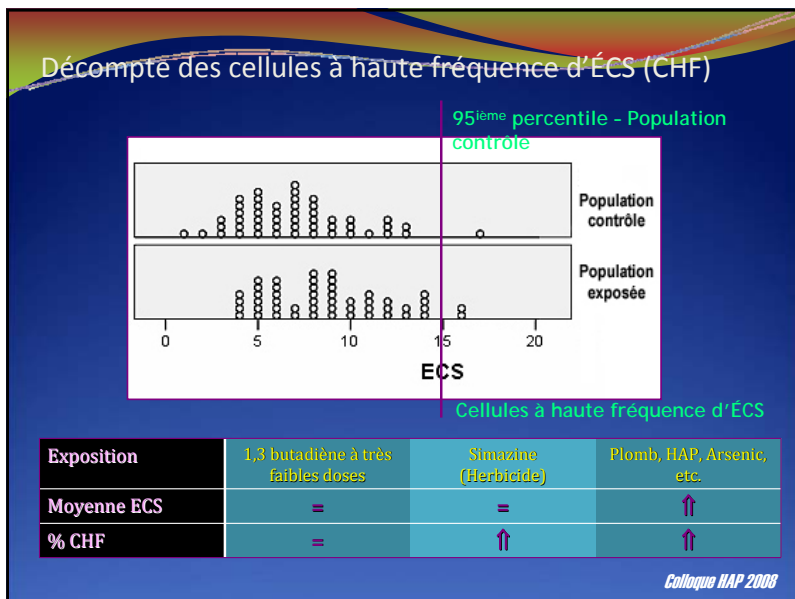
Formation des échanges entre chromatides-sœurs (ÉCS)

- 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

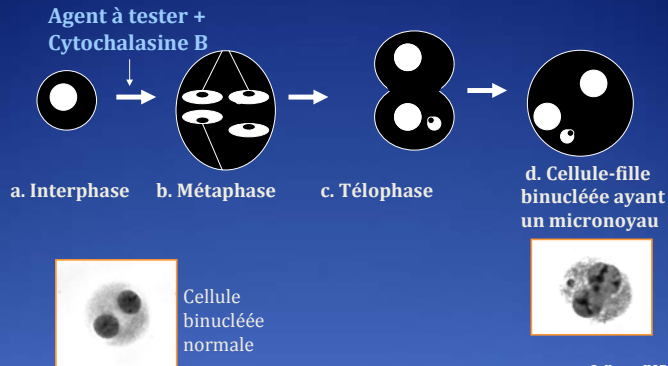
MN formation

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

Colloque HAP 2008

Le test des micronoyaux par la technique CBMN

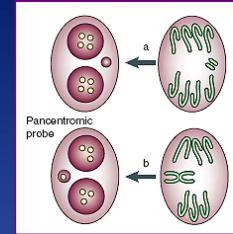
- **Cytochalasine B ajoutée à la culture cellulaire pour bloquer la cytokinèse**
 - **Cellule binucléée = une division cellulaire après l'exposition**



Colloque HAP 2008

Test CBMN couplé à la FISH (sonde centromérique)

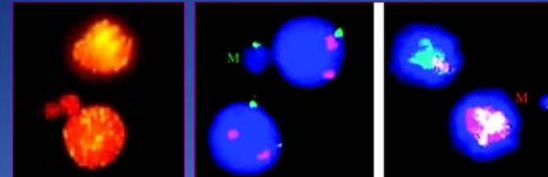
- **Permet de faire la distinction entre:**
 - Produits clastogènes (cassures chromosomiques)
 - Produits aneugènes (chromosomes « entiers », contenant un centromère)
- **Comparaison entre groupes contrôlé et exposé**



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

Cen-: clastogène

Cen+: aneugène

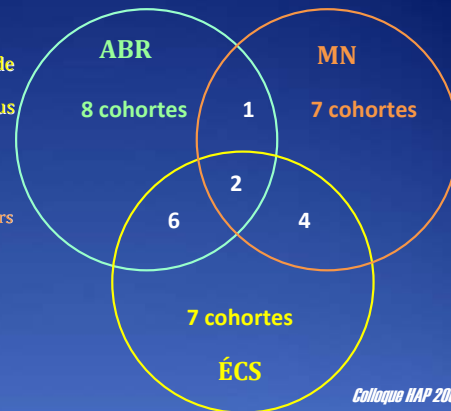


Wodja et al. (2007). Mutagenesis 22:195-200.

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?

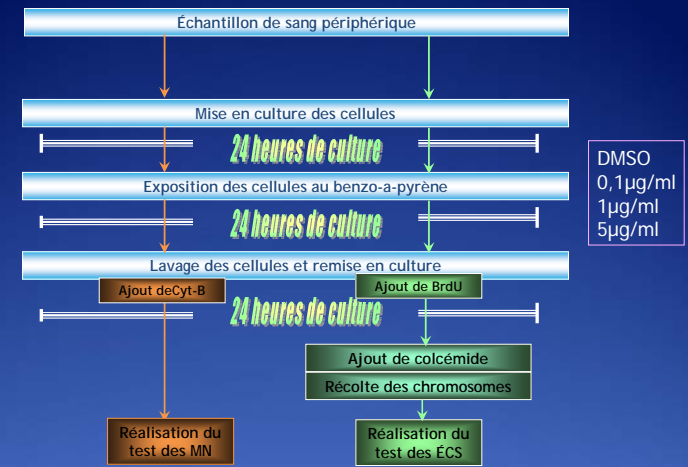
Colloque HAP 2008

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	Warslawsky et coll. 1995

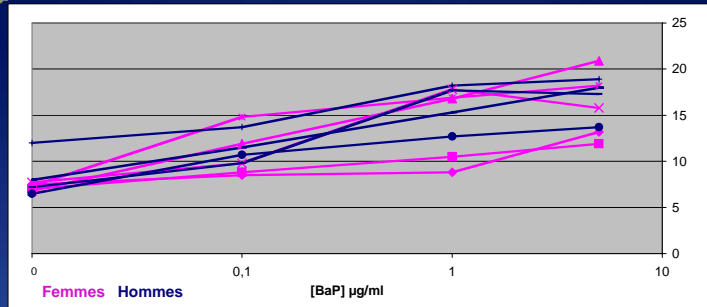
Colloque HAP 2008

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)

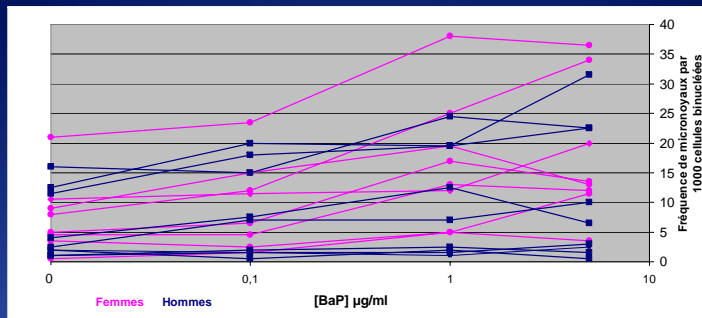
- 2 sujets ne montrent pas d'augmentation significative des ÉCS à $[BaP] 0,1 \mu\text{g/ml}$.

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

- **ECS 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 ?

