

Évaluation quantitative des adduits à l'ADN dans des cellules endobuccales par immunofluorescence et de la mutagenicité urinaire par le test d'Ames : deux tests biologiques pour mesurer l'exposition professionnelle aux HAP.



ANNA NIKOYAN, MICHEL DE MEO, IRENE SARI-MINODIER,
CAROLE DI GIORGIO, ALAIN BOTTA.

Laboratoire de Biogénotoxicologie et Mutagenèse Environnementale (EA 1784, FR ECCOREV), facultés de
Médecine et de Pharmacie, 27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 05, France
Courriel : michel.de-meo@univmed.fr

BIOMARQUEURS

> 1. EXPOSITION

- ☞ METABOLITES URINAIRES: 1-OHP, 3-OHBP
- ☞ MUTAGENICITE URINAIRE: TEST D'AMES
- ☞ ADDUITS A L'ADN

> 2. EFFET

- ☞ MICRONOYAUX
- ☞ ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES

> 3. SUSCEPTIBILITE GENETIQUE

- ☞ ENZYMES DE BIOTRANSFORMATION
- ☞ ENZYMES DE REPARATION

EXEMPLE : ETUDE CINETIQUE SUR 48H

12 Salariés d'une cokerie et 1 volontaire

- > B[a]P et PY atmosphériques sur 2 jours consécutifs (CRAM Sud Est)
- > 1-OHP et 3-OHBP urinaires sur 48h (INRS, Vandoeuvre, France)
- > Mutagenicité urinaire sur 48h
- > Adduits BPDE-ADN sur 2 jours consécutifs

PERSONNEL EXPOSE

Ref	Age ans	Alcool g/jour	Tabac Nb paq/an	Poste occupé
62	60	0	NF	Volontaire sain
63	51	40	F, 273	Machiniste défourneur
64	24	0	F, 146	Machiniste enfourneur
65	52	0	NF	Contremaître
66	51	20	NF	Technicien
67	24	0	F, 146	Machiniste, guide coke
68	55	0	NF	Régleur de fours
70	30	0	NF	Chef d'équipe
71	40	0	F, 365	Maçon fumiste
72	21	0	F, 37	Mécanicien
73	23	0	F, 365	Régleur de fours
74	29	0	NF	Luteur
75	23	0	NF	Nettoyeur industriel

PERSONNEL EXPOSE

Ref	Poste occupé	Protections
62	Volontaire sain	VG, L
63	Machiniste défourneur	VM, M, L
64	Machiniste enfourneur	VM, M
65	Contremaître	M, L
66	Technicien	M, G, L
67	Machiniste, guide coke	M, L
68	Régleur de fours	M, L
70	Chef d'équipe	VG, G, C, B, L
71	Maçon fumiste	VG, G
72	Mécanicien	VG, M, G, C
73	Régleur de fours	VG, M, G, C, L
74	Luteur	VG, M, G, C, L
75	Nettoyeur industriel	VG, M, G, C, L

VG : ventilation générale ; VM : ventilation mécanique ; M : masque ; G : gants ; C : combinaison ; B : bottes ; L : lunettes.

1. Pyr et BaP atmosphériques

Ref	Poste occupé	Jour	Pyr µg/m ³	BaP µg/m ³	BaP/VLE
62	Volontaire sain	1	4,866	1,755	11,8
63	Machiniste défourneur	2	0,650	0,208	1,4
64	Machiniste enfourneur	2	4,290	1,960	13,1
65	Contremaître	2	2,010	1,070	7,1
66	Technicien	1	0,190	0,024	0,2
67	Machiniste, guide coke	2	1,080	0,530	3,5
68	Régleur de fours	1	3,100	1,390	9,3
70	Chef d'équipe	2	12,500	5,165	34,4
71	Maçon fumiste	2	1,990	0,719	4,8
72	Mécanicien	1	24,400	20,293	135,3
73	Régleur de fours	1	176,000	98,100	654,0
74	Luteur	1	78,000	41,238	274,0
75	Nettoyeur industriel	1	16,600	7,650	51,0

VLE (BaP) : valeur limite d'exposition 0,15 µg/m³
Méthode : HPLC/FD

2. 1-OHPyr et 3-OHBaP urinaires

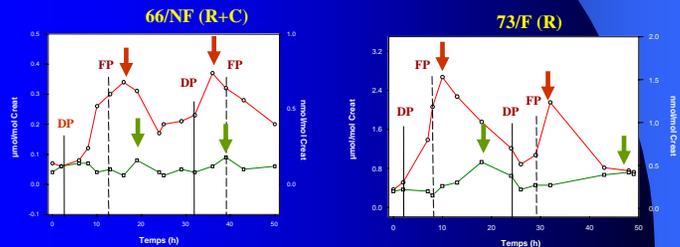
Pour la plupart des individus :

1-OHPyr et 3-OHBaP : deux pics

1-OHPyr : 13h ± 2 et 35h ± 3
: 5h après FP

3-OHBaP : 17h ± 3,5 et 41h ± 3,9
: 10-11 h après FP

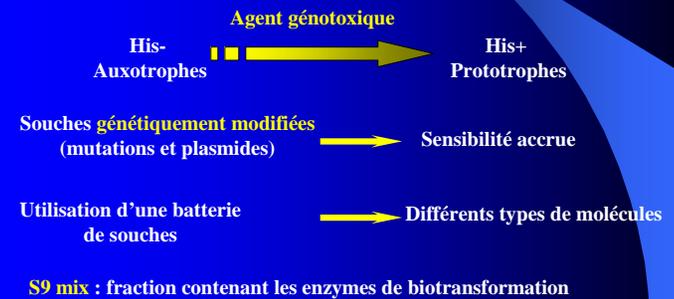
IBE : 2,3 µmol/mol C (1-OHPyr) et 0,35 nmol/mol C (3-OHBaP)



3. Test d'Ames sur urines

3.1. Principe

Agents génotoxiques provoquent des lésions sur l'ADN. Celles-ci s'expriment comme des mutations réverses chez des souches bactériennes hypersensibles (*Salmonella typhimurium*).



3. Test d'Ames sur urines

3.2. Extraction des mutagènes

- Prélèvements d'urines des salariés exposés pendant la période de travail (T=0h, 7h, 12h et 24h)
- Extraction sur colonnes et concentration des mutagènes urinaires



Extraction sur XAD-2 (acétone)



Evaporateur



Mutagènes concentrés

TEST D'AMES

3. Test d'Ames sur urines

3.3. Problèmes

Test utile lorsque les agents génotoxiques :

1. Sont dans des mélanges complexes
2. Sont inconnus



1. Sensibilité trop faible (méthode standard)
 2. Manque de spécificité (souches spécialisées)
 3. Variation individuelle (polymorphisme génétique)
 4. Impossibilité d'évaluer des expositions cumulatives
 5. Résultats contradictoires pour des expositions aux HAPs
5. Urines mutagènes : signification biologique inconnue



Remplacé par des techniques analytiques

3. Test d'Ames sur urines

3.3. Technique utilisée

MICROMETHODE (De Méo et al., 1996)



3. Test d'Ames sur urines

3.4. Souches utilisées

Mélanges complexes : HAP, NA et AA (nitrosamines non détectées)

Métabolisation
(HAP & AA)

Adduits (lésions) et mutations par :
-décalage du cadre de lecture (3 cycles et plus)
- Mutations ponctuelles (1 ou deux cycles)

Batterie utilisée : TA98 + S9 Mix
TA 100 + S9 Mix

3. Test d'Ames sur urines

3.4. Souches utilisées

Combinaison de deux souches :

TA 98 + S9 Mix

YG1041 ± S9 Mix

YG1041 = TA98 (pYG233): nitroréductase et *O*-acétyltransférase

Produit	Sensibilité des souches		
	TA 98+S9 mix	YG1041+S9 mix	YG1041-S9 mix
HAP	sensible	peu sensible	insensible !
AA	sensible	très sensible	insensible !
NA	sensible	très sensible	très sensible

HAP: hydrocarbures aromatiques polycycliques; AA : amines aromatiques; NA : nitroaromatiques

1 - Mutagénicité sur TA98+S9 Mix : AA>NA>HAP (1000:100:1)

2 - YG1041 et HAP: - fréquence de réversion plus élevée que celle de TA98
- fréquences induites aux HAP moins élevées que celles de TA98

3. Test d'Ames sur urines

3.4. Souches utilisées

Exemples de profils d'activités sur deux types de mélanges complexes
Extraits de fumée de cigarettes (EC) et d'urine de fumeur (UF)

Mélange	Mutagénicité (rev/mg goudron ou rev/mg creat)			Produits
	TA 98+S9 mix	YG1041+S9 mix	YG1041-S9 mix	
EC1	8000	30571	746	AA, NA
EC2	6781	35607	1171	AA, NA
EC3	6685	43582	1769	AA, NA
UF1	226	542	0	AA
UF2	54	336	0	AA

F1: 44 ans, 30 cig/jour

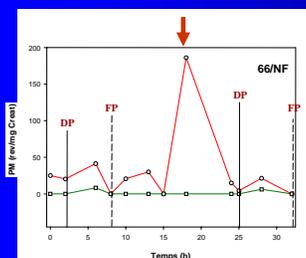
F2: 54 ans, 20 cig/jour

Où sont les HAP?

3. Test d'Ames sur urines

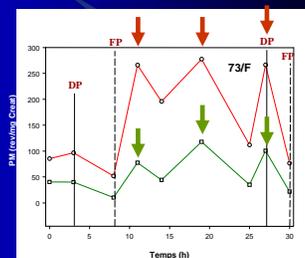
3.5. Mutagénicité urinaire: Etude Cinétique sur 48 h

- Nombre de pics varie pour chaque salarié
- Temps d'apparition différents



YG1041 + S9 Mix et TA98 + S9 Mix

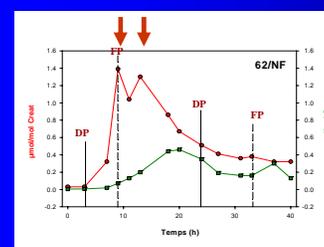
N°66 : 1 pic à 18h
AA origine professionnelle



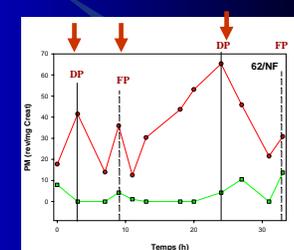
N°73: 3 pics à 11h, 19h et 27h
11h: AA environnement (tabac)
19h et 27h: NA professionnel?

3. Test d'Ames sur urines

3.5. Mutagénicité urinaire: Etude Cinétique sur 48 h Volontaire



1-OHPyY : 2 pics
3-OHBAp : pas de pic significatif



YG1041 + S9 Mix : 3 pics
TA98 + S9 Mix : pas de pic significatif
Pour les 3 pics pas d'activité sur YG1041 - S9 Mix
AA seulement, origine ?

3. Test d'Ames sur urines

3.6. Conclusions

1. Difficulté à détecter des HAP dans les mélanges complexes (HAP sont les moins mutagènes)
2. Pas de corrélation avec les métabolites urinaires et les HAP atmosphériques (particules atmosphériques?)
3. Différenciation des AA et des NA d'origine environnementale et professionnelle possible avec la combinaison de souches

4. Mesures des adduits à l'ADN

Quantification des adduits, dans tissus cibles ou cellules individuelles: approche couramment utilisée pour évaluer exposition aux HAP (Poirier et al., 2000)

Techniques analytiques (HPLC, GC/MS)
 Post marquage au ^{32}P
 Techniques immunologiques (ELISA, immunohistochimie, chimioluminescence)

Limitations :

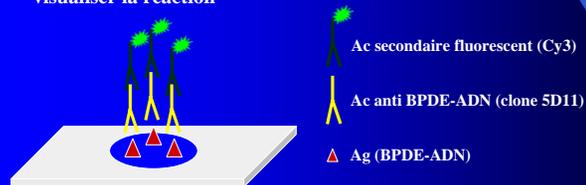
- 1 – Méthodes complexes
- 2 – Détection des adduits dépend des capacités réparatrices des cellules
- 3 – Dans les cellules cancéreuses : sous estimation des taux d'adduits

4. Mesures des adduits à l'ADN

4.1. Immunocytochimie : Principe

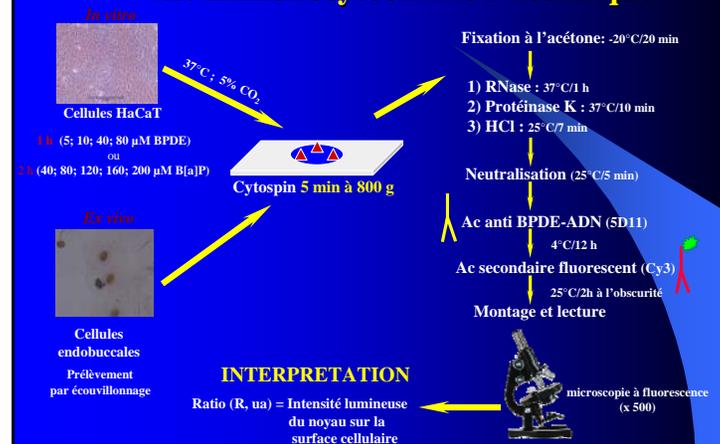
PRINCIPE : Technique de fluorescence (Santella et al., 1999)

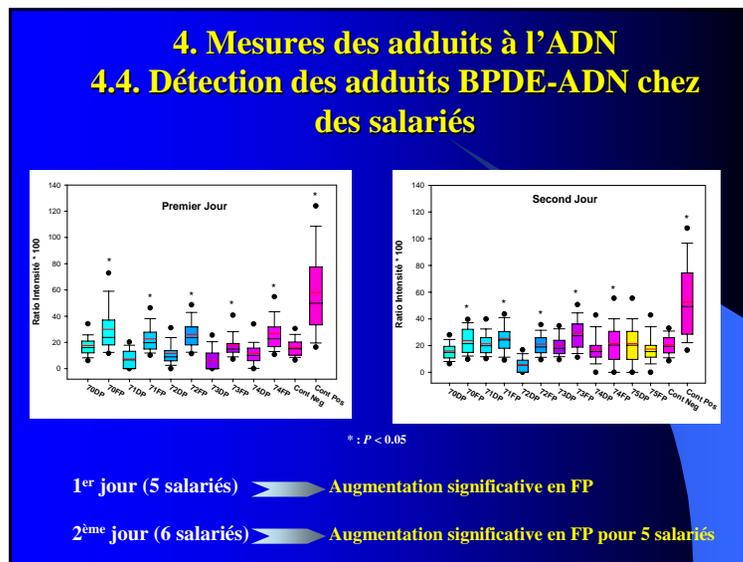
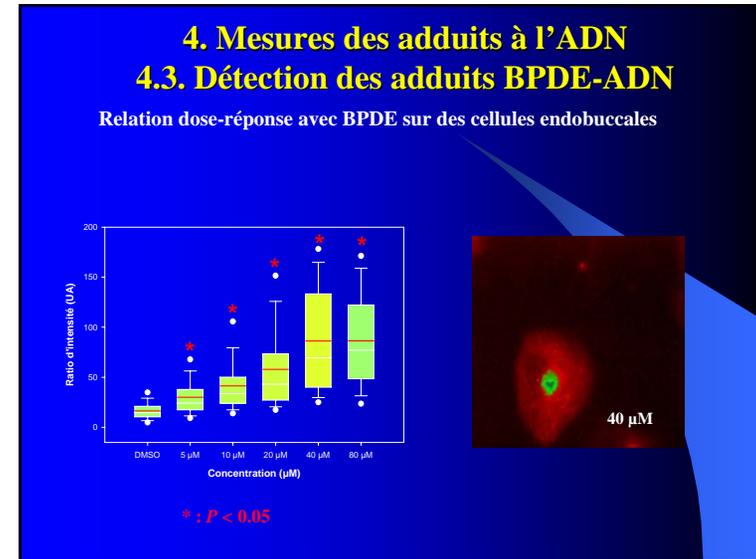
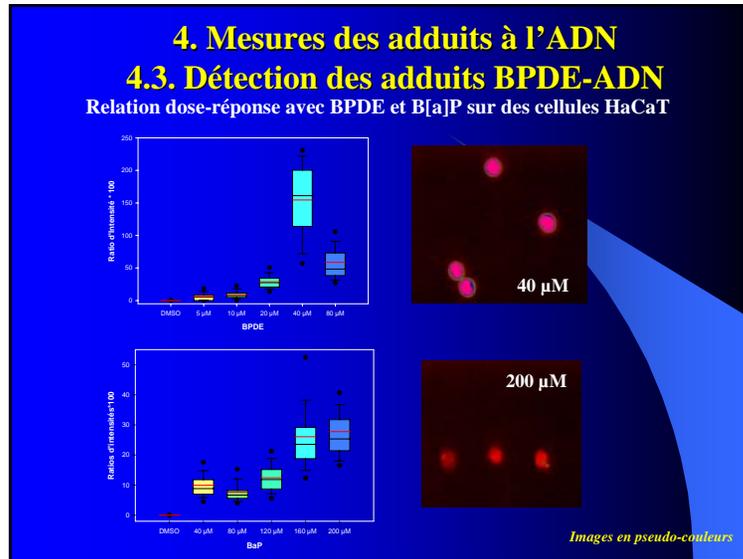
- Permet de localiser des Ag dans les tissus, cellules, etc...
- Le réactif principal est un Ac dirigé contre l'Ag à marquer
- Les fluorochromes fixés directement sur l'Ac secondaire permettent de visualiser la réaction



4. Mesures des adduits à l'ADN

4.2. Immunocytochimie : Technique





- ### 4. Mesures des adduits à l'ADN
- #### 4.5. Conclusions
1. Mesure d'une exposition aux HAP par inhalation
 2. Détection spécifique des adduits BPDE-ADN
 3. Prélèvement non invasif, technique facile à mettre en œuvre et interprétation relativement simple: applicable à des études à grande échelle
 4. Les taux d'adduits varient en fonction des taux de B[a]P atmosphériques, des protections respiratoires, des capacités de métabolisation et de réparation des adduits à l'ADN
 5. Nécessité d'utiliser d'autres anticorps spécifiques anti-métabolites des HAP

5. Conclusions générales

1. Mesures des adduits BPDE-ADN dans cellules endobuccales: nécessité des études de validation
2. Test d'Ames sur les urines: difficulté à évaluer une exposition à des HAP mais la mutagénicité urinaire reflète une exposition à des mélanges complexes. Nécessité d'identifier ces mutagènes
3. **Doit-on évaluer uniquement une exposition à des HAP lorsque les individus sont généralement professionnellement exposés à des mélanges complexes?**

REMERCIEMENTS



À

Les membres d'EA 1784 :
Anna Nikoyan, Irène Sari-Minodier, Carole Di Giorgio, Alain Botta,
Thierry Orsière

Dr Vladimir ZABALOUEFF