

2 m 11. 2751. 7

11305059

6014

Université de Montréal

**Évaluation de la génotoxicité du chrome et du cadmium chez l'humain par la technique de marquage terminal *in situ* en microscopie électronique (EM-ISEL)**

par

François Depault

Département de pathologie et de biologie cellulaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maître ès science (M.Sc.)

Août, 1999

©François Depault, 1999



3 m 11. 2 551. 7

W  
4  
U58

2000

V.014

L'Université de Montréal

Techniques de marquage terminal in situ en microscopie électronique (EM-ISEI)  
Évaluation de la génotoxicité du chrome et du cadmium chez les lymphocytes humains

par

François Piquet

Département de pathologie et de biologie cellulaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de  
Maîtrise en science (M.Sc.)

Année 1997

Émile Piquet, 1997



Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Évaluation de la génotoxicité du chrome et du cadmium chez l'humain par la technique de marquage terminal *in situ* en microscopie électronique (EM-ISEL)**

présenté par :

François Depault

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Marcel Cadotte, président rapporteur

Nicole Lemieux, directrice de recherche

Saroj Chakrabarti, co-directeur de recherche

L'Hocine Yahia , membre du jury

Mémoire accepté le : 15 novembre 1999

## SOMMAIRE

Le chrome est considéré comme un carcinogène puissant tandis que le cadmium est considéré comme un carcinogène potentiel. De nombreux décès imputables au cancer sont rapportés chez des travailleurs des industries du chrome et du cadmium. Les mécanismes cancérigènes de ces métaux ne sont pas complètement élucidés. On soupçonne cependant que les dommages à l'ADN seraient en partie responsables de la carcinogenèse métallique. Durant les dernières décennies, de nombreux tests *in vitro* furent développés pour quantifier les dommages à l'ADN. La génotoxicité des composés du chrome et du cadmium est maintenant confirmée dans plus d'une centaine de tests à court terme. Récemment, un nouveau test de génotoxicité fut développé, il s'agit de l'essai "*in situ* end-labeling" en microscopie électronique (EM-ISEL). Cette méthode permet à la fois de visualiser et de quantifier les bris simple-brin directement sur les noyaux en interphase et les chromosomes en métaphase.

L'objectif premier de ce projet est d'étudier la génotoxicité potentielle du chromate de potassium ( $K_2CrO_4$ ) et du chlorure de cadmium ( $CdCl_2$ ) par le nouvel essai EM-ISEL. Pour ce faire, nous avons appliqué cette méthode sur des chromosomes provenant de lymphocytes sanguins humains traités avec différentes concentrations de Cr(VI) et de Cd(II) sous des conditions d'exposition à court terme (2h). À notre connaissance, aucune étude n'a encore testé la génotoxicité du chrome

et du cadmium à l'aide de la méthode EM-ISEL. Le second objectif de cette étude est de valider la technique EM-ISEL comme nouvel outil d'évaluation de la génotoxicité. Nous avons donc comparé les résultats de la technique EM-ISEL à ceux obtenus avec le test standard des échanges entre chromatides sœurs (ECS). Finalement, nous avons évalué l'effet du chrome et du cadmium sur l'index mitotique et la vitesse du cycle cellulaire.

Nos résultats démontrent que le chrome et le cadmium sont d'importants agents clastogènes. Comparés au contrôle négatif, ces deux métaux entraînent une augmentation significative des bris simple-brin dans la chromatine nucléaire et chromosomique à des concentrations légèrement cytotoxiques. Par contre, le cadmium n'induit aucune augmentation des ECSs alors que le chrome provoque un accroissement significatif des échanges. Finalement, ces deux métaux réduisent l'index mitotique et ralentissent le cycle cellulaire. Dans l'ensemble, le chrome se montre plus génotoxique que le cadmium.

Cette étude démontre clairement la génotoxicité du chrome et du cadmium et apporte des informations utiles concernant l'effet des métaux sur la santé humaine. De plus, nos travaux confirment la technique EM-ISEL comme un outil efficace pour la détection des agents clastogènes. Comparée au test des échanges entre chromatides sœurs, la technique EM-ISEL fait preuve d'une plus grande sensibilité. La simplicité et l'efficacité de l'essai EM-ISEL mérite de l'envisager comme nouvel outil de routine en génotoxicité.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>SOMMAIRE</b>	<b>iii</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>viii</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS</b>	<b>xi</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>xiii</b>
<b>CHAPITRE I: INTRODUCTION GÉNÉRALE</b>	<b>1</b>
1. Préambule sur la génotoxicité et la carcinogenèse des métaux	2
2. Informations utiles sur le chrome et le cadmium	4
2.1 Identité, propriétés, production et usages du chrome	4
2.2 Identité, propriétés, production et usages du cadmium	6
2.3 Effets sur l'environnement	7
2.4 Expositions occupationnelles	8
3. La génotoxicité des métaux	9
3.1 Principales interactions des ions métalliques avec l'ADN	9
3.2 Rôle des radicaux libres dans la génotoxicité des métaux	10
3.3 Effets génotoxiques des composés du chrome	13
3.3.1 Les valences du chrome	13
3.3.2 Mécanismes génotoxiques du Cr(VI)	15
3.3.3 Conclusion sur la génotoxicité du chrome	18

3.4 Effets génotoxiques des composés du cadmium	19
3.4.1 La génotoxicité du Cd(II)	19
3.4.2 Le cadmium provoque des dommages oxydatifs	20
3.4.3 Le cadmium interfère avec la réparation de l'ADN	20
3.4.4 Le cadmium affecte la réplication de l'ADN	21
3.4.5 Le cadmium augmente l'expression d'enzymes	21
3.4.6 Le cadmium modifie les signaux intracellulaires	22
3.4.7 Conclusion sur la génotoxicité du Cd(II)	22
4. Évaluation de la génotoxicité des métaux	24
4.1 Les tests de génotoxicité <i>in vitro</i>	24
4.2 Les techniques de détection des bris simple-brin	25
5. Objectifs du présent travail	27
<b>CHAPITRE II: LES TECHNIQUES DE GÉNOTOXICITÉ EMPLOYÉES DANS CE TRAVAIL</b>	<b>29</b>
1. Les techniques de marquage terminal <i>in situ</i>	30
1.1 La détection des cellules en apoptose	30
1.2 Description de la technique EM-ISEL	31
2. La technique des échanges entre chromatides sœurs (ECS)	33
<b>Figures citées dans le chapitre I et II</b>	<b>35</b>
<b>CHAPITRE III: ARTICLE</b>	<b>40</b>
"Genotoxic effects of chromium(VI) and cadmium(II) in human peripheral blood lymphocytes measured by electron microscopy <i>in situ</i> end-labeling (EM-ISEL) and sister chromatid exchanges (SCE)".	

"Abstract"	42
1. "Introduction"	43
2. "Materials and methods"	45
3. "Results"	49
4. "Discussion"	52
"Acknowledgments"	56
"References"	57
<b>"Legend to figures"</b>	<b>62</b>
<b>CHAPITRE IV: DISCUSSION GÉNÉRALE</b>	<b>69</b>
1. Test de cytotoxicité	72
2. Tests de génotoxicité	74
2.1 Détection des bris simple-brin par EM-ISEL	74
2.2 Échanges entre chromatides sœurs (ECS)	79
2.3 Index mitotique et ralentissement du cycle cellulaire	82
2.4 Décondensation des chromosomes	83
<b>CHAPITRE V: CONCLUSION GÉNÉRALE</b>	<b>85</b>
<b>Figures citées dans la discussion générale</b>	<b>88</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE</b>	<b>91</b>



## LISTE DES TABLEAUX

### Chapitre III

- Tableau I.** Densité des bris simple-brin (nombre de particules par  $\mu\text{m}^2$ ) par EM-ISEL dans la chromatine nucléaire de lymphocytes humains, après deux heures d'exposition à différents traitements (Tableau 1 du manuscrit). 63
- Tableau II.** Densité des bris simple-brin (nombre de particules par  $\mu\text{m}^2$ ) par EM-ISEL dans la chromatine chromosomique de lymphocytes humains, après deux heures d'exposition à différents traitements (Tableau 2 du manuscrit). 64
- Tableau III.** Évaluation de la fréquence des échanges entre chromatides sœurs, de l'index mitotique et de la vitesse du cycle cellulaire dans des lymphocytes humains après deux heures d'exposition au chromate de potassium au chlorure de cadmium (Tableau 3 du manuscrit). 65

## LISTE DES FIGURES

### Chapitre I et II

- Figure 1.** Mécanisme génotoxique du chrome(VI). 36
- Figure 2.** Représentation schématique de la technique EM-ISEL. 37
- Figure 3.** Représentation schématique de la technique EM-ISEL (suite). 38
- Figure 4.** Représentation schématique de la technique des échanges entre chromatides sœurs. 39

### Chapitre III

- Figure 1.** Effet de différentes concentrations de chromate de potassium et de chlorure de cadmium sur la survie de lymphocytes sanguins humains après deux heures d'exposition (Figure 1 du manuscrit). 66
- Figure 2.** Noyaux interphasiques de lymphocytes humains exposés à différents traitements et marqués à l'EM-ISEL (Figure 2 du manuscrit). 67
- Figure 3.** Chromosomes métaphasiques de lymphocytes humains exposés à différents traitements et marqués à l'EM-ISEL (Figure 3 du manuscrit). 68

## **Chapitre IV**

- Figure 1.** Technique des échanges entre chromatides sœurs, visualisation des ECSs sur des lymphocytes en culture. 89
- Figure 2.** Décondensation des chromosomes provoquée par le cadmium. 90

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOVA	"Analysis of variance"
BrdU	5-bromo-2'-déoxyuridine
Cd(II)	ion cadmium de valence II
CdCl <sub>2</sub>	Chlorure de cadmium
Cr(III)	ion chrome de valence III
Cr(VI)	ion chrome de valence VI
DNA	"Deoxyribonucleic acid"
dTTP	Désoxythymidine triphosphate
ECS	Échanges entre chromatides sœurs
EM	"Electron microscopy"
EM-ISEL	"Electron microscopy <i>in situ</i> end-labeling"
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'hydrogène
IGPs	"Immunogold particles"
ISEL	" <i>In situ</i> end-labeling"
K <sub>2</sub> CrO <sub>4</sub>	Chromate de potassium
mM	Millimolaire
MMS	Méthyle méthanesulfonate
MT	Métallothionéine
O <sub>2</sub>	Dioxygène

$O_2^-$	Radical superoxyde
$OH^-$	ion hydroxyde
$\cdot OH$	Radical hydroxyle
$\mu M$	Micromolaire
$\mu M^2$	Micromètre carré
UV	Ultraviolet
SCE	"Sister Chromatid Exchange"
SD	"Standard Deviation"
SSBs	"Single-Stranded Breaks"
TdT	"Terminal deoxynucleotidyl transferase"
TUNEL	"TdT-mediated bio-dUTP nick end-labeling"

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier ma directrice de recherche le Dre Nicole Lemieux pour m'avoir accepté au sein de son laboratoire de cytogénétique moléculaire. Je voudrais également remercier mon codirecteur le Dr Saroj Chakrabarti et son assistant de recherche Monsieur Chengiang Bai pour leurs précieux conseils. Je suis particulièrement reconnaissant envers notre technicienne Fléchère Fortin et Monsieur Michel Assad pour leur appui technique. Une pensée spéciale pour mes collègues étudiants Monsieur Martin Desgroseilliers et Madame France Léveillé. Je tiens à remercier Monsieur Jean Léveillé pour l'excellence de son travail photographique et le Dre Claude-Lise Richer pour la révision de l'article. J'aimerais exprimer ma reconnaissance envers Madame Ksénia Dupuis ainsi que Monsieur Michel Lauzon pour leur assistance en microscopie électronique. Je tiens à remercier le Département de pathologie de l'hôpital Ste-Justine et particulièrement le Dr Pierre Russo pour l'utilisation du microscope électronique. Je voudrais également remercier les Drs Laurent Descarries et Kenneth Watkins qui m'ont permis d'utiliser leurs systèmes informatiques. Enfin, je souhaiterais exprimer ma gratitude envers Madame Patricia Ciesla, secrétaire du Département de pathologie et de biologie cellulaire, pour sa générosité et sa patience.

Pour terminer, je désirerais remercier le président du jury, le Dr Marcel Cadotte, ainsi que le Dr L'Hocine Yahia pour l'intérêt qu'ils ont manifesté à ce travail.

**À ma mère Lucie**

**et mon frère Patrice...**

## **CHAPITRE I**

### **INTRODUCTION GÉNÉRALE**



## 1. PRÉAMBULE SUR LA GÉNOTOXICITÉ ET LA CARCINOGENÈSE DES MÉTAUX

Plusieurs métaux comme le nickel, le chrome et l'arsenic sont considérés comme des carcinogènes puissants chez l'humain (IARC, 1980, 1990). D'autres métaux comme le cadmium sont considérés comme des carcinogènes potentiels (IARC, 1993). Pourtant les métaux demeurent ignorés des revues et des livres de carcinogenèse (Furst, 1987; Waalkes et coll., 1992). La raison de cette inattention est surprenante, mais provient très probablement de la perception que nous avons des métaux. Comme les métaux sont des molécules simples, nous sommes portés à penser que leurs mécanismes d'action sont également simples (Waalkes et coll., 1992). Néanmoins ceci semble très loin de la vérité. En fait, les métaux possèdent beaucoup d'affinités pour l'ADN, les protéines et d'autres macromolécules et exercent une multitude d'interactions, seuls ou en synergie, à tous les niveaux du métabolisme cellulaire (Beyersmann et Hartwig, 1994). Cependant, aucun mécanisme clair n'est ressorti de la carcinogenèse métallique (Waalkes et coll., 1992).

Plusieurs recherches mentionnent que les ions métalliques produisent différents dommages à l'ADN (Beyersmann et Hartwig, 1994). Ces dommages peuvent être significatifs dans l'étiologie des cancers en causant directement des mutations, en aidant la promotion et la transformation des cellules mutées et en changeant l'expression des gènes impliqués dans le cancer (Diplock, 1997). Dans

notre étude, nous nous proposons d'éclaircir les effets génotoxiques du chrome et du cadmium chez l'humain afin de mieux comprendre les mécanismes carcinogènes de ces métaux. L'introduction de ce mémoire traite de la problématique du chrome et du cadmium dans notre société, des interactions des ions métalliques avec l'ADN, du rôle des radicaux libres dans la génotoxicité des métaux, des mécanismes génotoxiques du chrome et du cadmium et des méthodes employées pour détecter les bris de l'ADN.

## 2. INFORMATIONS UTILES SUR LE CHROME ET LE CADMIUM AFIN D'ÉVALUER LEUR GÉNOTOXICITÉ

Un métal se définit comme un corps simple, doué d'un éclat particulier (éclat métallique), bon conducteur de la chaleur et de l'électricité et formant par combinaison avec l'oxygène, des oxydes basiques (Fergusson, 1990). Dans cette étude, nous nous attarderons à deux métaux en particulier : le chrome et le cadmium. Ces deux métaux, reconnus comme étant potentiellement génotoxiques, permettent de tester l'efficacité d'une nouvelle méthode d'évaluation de la génotoxicité soit, l'essai EM-ISEL.

### 2.1 Identité, propriétés, production et usages du chrome

Identifié par Vauquelin en 1798, le chrome est un métal blanc bleuté qui fait partie du groupe VIB du tableau périodique (IARC, 1990). Comme il est situé au centre du tableau périodique, le chrome est un élément de transition. La plupart des éléments de transition admettent plusieurs degrés d'oxydation. Ceci implique qu'ils peuvent échanger ou mettre en commun un nombre variable d'électrons avec d'autres éléments (Halliwell et Gutteridge, 1985). Le chrome possède neuf degrés d'oxydation différents, de (-II) à (VI) (Shupack, 1991). Dans tous ces degrés d'oxydation, les ions du chrome sont colorés. Le chrome tire d'ailleurs son nom de cette propriété : *chroma* veut dire couleur en grec (Nriagu, 1988).

On utilise communément le chrome dans plusieurs applications domestiques et industrielles (IPCS, 1988; IARC, 1990; Environnement Canada, 1994a):

- Très dur et très résistant à la corrosion, le chrome forme une couche protectrice idéale. Une bonne partie du chrome est utilisée en couche mince comme recouvrement sur le fer et les autres métaux.
- Le chrome métallique entre dans la fabrication de nombreux alliages dont il améliore les qualités mécaniques. Certains types d'aciers inoxydables contiennent près de 36 % de chrome.
- Le chromate de potassium mélangé à un sel de plomb, donne le jaune de chrome, très employé en peinture.
- Le chrome entre dans la fabrication de nombreux produits comme le papier, la céramique, les produits de nettoyage, les engrais, les pesticides, etc.
- On utilise couramment le chrome au sein de nombreux procédés comme la photographie, la coloration du verre, la teinte des tissus, le tannage du cuir, la préservation du bois, etc.

Les sources naturelles de chrome ne sont pas nombreuses. Le Canada ne produit pas de minerai de chrome mais en importe environ 85 000 tonnes par année (Environnement Canada, 1994a). Celui-ci provient principalement des mines d'Afrique du sud, de la Russie, de l'Albanie, de la Finlande et de la Turquie (IARC,

1990). Le chrome est extrait de divers minerais dont la chromite ( $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ ), qui est un mélange de fer, de chrome et d'oxygène (Shupack, 1991).

## **2.2 Identité, propriétés, production et usages du cadmium**

Le cadmium est un métal blanc malléable et ductile, qui fait partie du groupe IIB du tableau périodique (Jacobson et Turner, 1980). Découvert en 1817, le cadmium est un élément relativement rare, non essentiel, qui s'avère toxique pour plusieurs organismes (IPCS, 1992). Le cadmium est lui aussi un élément de transition. À l'état naturel, le cadmium peut se présenter sous deux degrés différents d'oxydation, le Cd(I) et le Cd(II). La forme Cd(I) est cependant instable et possède une très courte durée de vie (Cohen et coll., 1990; Fergusson, 1990). Le Canada est le 4<sup>e</sup> producteur et l'un des plus grands exportateurs de cadmium au monde (Environnement Canada, 1994b). Dans l'environnement, le cadmium est étroitement associé au zinc et au plomb. Voilà pourquoi aucune mine n'est consacrée exclusivement au cadmium : le cadmium est un sous-produit précieux de la raffinerie du zinc et du plomb (Degraeve, 1981; Waalkes et coll., 1992).

À l'échelle mondiale, il y a cinq grands domaines d'utilisation du cadmium : les piles Ni-Cd (qui représentent près de 50 % de la consommation mondiale de cadmium), les enduits (20%), les pigments (18%), les stabilisants dans les plastiques et les produits synthétiques (6%) et les alliages (6%) (Environnement Canada, 1994b). Le cadmium possède de nombreux avantages, notamment d'être résistant à la

rouille et à la chaleur. Mais l'utilisation de ce métal est aujourd'hui limitée, plusieurs pays ont légiféré sur son utilisation en préférant utiliser d'autres alternatives moins toxiques (IARC, 1993).

### **2.3 Effets sur l'environnement**

Comme nous venons de le voir, l'industrie minière extrait, concentre et purifie le chrome et le cadmium pour répondre à divers usages tant domestiques, qu'industriels. Malheureusement, ces métaux finissent souvent par être rejetés dans l'environnement. Durant les dernières décennies, diverses sources anthropiques ont fait augmenter les concentrations de chrome et de cadmium dans l'atmosphère, l'eau, le sol et les sédiments (Landolph, 1990). Cette contamination provient principalement des activités minières, des raffineries, des fonderies, de la combustion des carburants fossiles, des activités agricoles et des sites d'enfouissement et d'incinération (IPCS, 1988; Waalkes et Oberdorster, 1990). Présents en grandes quantités dans l'environnement, le chrome et le cadmium peuvent menacer la santé humaine (Environnement Canada, 1994a, 1994b). Dans la population, l'ingestion d'aliments est la principale source d'absorption de chrome et de cadmium. En effet, la plupart des aliments consommés au Canada en renferment des quantités traces. (Environnement Canada, 1994a, 1994b). La consommation de cigarettes accroît également de beaucoup la dose journalière de ces métaux. Chaque cigarette contient environ 0,147 µg de chrome et 2 µg de cadmium (Kazantzis, 1987; IARC, 1990).

## 2.4 Expositions occupationnelles

En ce qui concerne l'environnement, on ne peut parler de contamination sévère car les quantités absorbées demeurent minimales. Cependant, des problèmes sérieux surviennent chez les travailleurs des industries du chrome et du cadmium. Ces travailleurs sont fréquemment en contact avec de la poussière composée de fines particules de chrome ou de cadmium pouvant être facilement inhalées (IPCS, 1988, 1992; Environnement Canada, 1994a, 1994b; IARC 1990, 1993). L'absorption du chrome ou du cadmium par inhalation (40 à 50% du chrome ou du cadmium inhalé est absorbé par les poumons) est beaucoup plus efficace que par ingestion (5 à 10% du chrome ou du cadmium ingéré est absorbé par le tube digestif) (Waalkes et coll., 1992; Environnement Canada, 1994a). De fortes quantités de métaux sont donc absorbées au niveau des poumons et transportées par le sang vers les autres parties du corps (Vercruyse, 1984). Le chrome et le cadmium s'accumulent alors dans divers organes et deviennent très toxiques. La majeure partie du chrome est retenue par les poumons, on observe aussi d'importantes accumulations au niveau de la rate, du foie et de la moelle épinière (IARC, 1990). Pour sa part, le cadmium s'accumule dans les reins, le foie, les muscles et les poumons (Degraeve, 1981; Kazantzis, 1987). Ces métaux peuvent causer divers cancers, notamment le cancer du poumon (IPCS, 1988, 1992; Environnement Canada, 1994a, 1994b; IARC 1990, 1993).

### **3. LA GÉNOTOXICITÉ DES MÉTAUX**

#### **3.1 Principales interactions des ions métalliques avec l'ADN**

Comme nous venons de le voir, les métaux comme le chrome et le cadmium sont transportés par le sang jusqu'au milieu extracellulaire. Le taux d'entrée d'un métal dans la cellule dépend de son état physico-chimique, de sa période d'exposition et de sa concentration extracellulaire (Dillon et coll., 1998). Après avoir traversé la membrane cellulaire et nucléaire, les métaux peuvent causer divers dommages au génome. Chaque métal possède des mécanismes d'actions spécifiques qui vont provoquer plusieurs types de dommages. Voici les principales interactions des ions métalliques avec l'ADN:

- Les ions métalliques peuvent se lier directement à l'ADN et modifier sa conformation. Ceci a pour effet d'augmenter ou de diminuer l'expression génique, d'affecter la réparation et de réduire la fidélité de réplication de l'ADN (Waalkes et coll., 1992).
- Plusieurs ions métalliques sont capables de catalyser la formation de dérivés réactifs de l'oxygène qui vont endommager l'ADN par la formation de bases oxydées et la production de bris simple et double-brin (Beyersmann et Hartwig, 1994).
- Plusieurs métaux peuvent se lier aux protéines et inhiber des enzymes responsables de la réparation et de la réplication de l'ADN (Snyder, 1990).



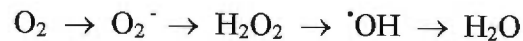
- Finalement, certains ions métalliques interfèrent avec la signalisation intracellulaire et l'expression de l'information génétique. Ces métaux peuvent ainsi activer des proto-oncogènes, inactiver des anti-oncogènes et augmenter la prolifération cellulaire (Beyersmann et Hartwig, 1994).

### **3.2 Rôle des radicaux libres dans la génotoxicité des métaux**

Avant de poursuivre sur les mécanismes génotoxiques du chrome et du cadmium, nous allons nous attarder un instant sur la biologie des radicaux libres. Les radicaux libres et plus particulièrement les dérivés réactifs de l'oxygène, occupent une place importante dans la génotoxicité des métaux. Plusieurs métaux interagissent avec les radicaux libres présents dans la cellule pour en produire d'autres encore plus dangereux. Ces métaux perturbent alors de façon importante l'homéostasie redox intracellulaire (Morel et Barouki, 1998).

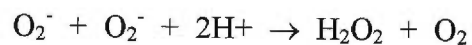
Les radicaux libres sont des molécules instables qui possèdent un ou plusieurs électrons non-pairés et un fort potentiel oxydant (Diplock, 1997). De par sa configuration électronique, l'oxygène moléculaire ou dioxygène ( $O_2$ ) est avide d'électrons (Feher et coll., 1987). Les organismes qui vivent dans des conditions aérobiques font donc face au paradoxe de l'oxygène : ils en ont besoin pour vivre mais celui-ci peut leur être néfaste s'il est en quantité excessive ou inadéquatement métabolisé. C'est dans les mitochondries qu'est réduit 95% de l'oxygène consommé par la cellule (Moslen, 1994). Dans le processus de respiration, le dioxygène est

progressivement transformé en eau par la chaîne de transport mitochondriale d'électrons (Davies, 1995) :

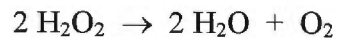


La réduction tétravalente du dioxygène en eau est considérée comme un processus sûr. Malheureusement, cette réduction s'avère quelques fois incomplète et conduit à la formation d'intermédiaires réactifs (Davies, 1995). Ainsi, le radical superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) et le très réactif radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ) sont couramment produits par le processus aérobique (Feher et coll., 1987).

Les organismes aérobiques ont développé une panoplie de mécanismes pour se protéger des effets toxiques des radicaux libres. La première ligne de défense consiste à isoler les molécules capables de réagir avec l'oxygène (Ryan et Aust, 1992). La seconde ligne de défense est composée d'enzymes qui neutralisent les radicaux libres en réagissant avec eux. Par exemple, le radical superoxyde est transformé en  $\text{O}_2$  et  $\text{H}_2\text{O}_2$  sous l'action de la superoxyde dismutase (Halliwell et Gutteridge, 1985):



Le peroxyde d'hydrogène est ensuite transformé en eau par la catalase (Ryan et Aust, 1992) :



De petites molécules non enzymatiques comme les vitamines peuvent également piéger les radicaux libres avant qu'ils ne puissent interagir avec leurs cibles cellulaires (Draper et Bettger, 1994). Bref, les réactions incluant les radicaux libres surviennent dans des conditions rigoureusement contrôlées (Littlefield et Hass, 1995).

Dans un monde parfait, cette histoire se terminerait ici. Malheureusement, certains dérivés oxygénés échappent aux agents antioxydants. L'étendue des dommages oxydatifs dépend alors de la quantité et de la nature des radicaux libres produits. Le radical hydroxyle peut attaquer directement les constituants cellulaires tandis que le peroxyde d'hydrogène et le radical superoxyde peuvent interagir avec les métaux dans les réactions de Fenton ou de Haber-Weiss (voir section 3.3.2) (Boiteux et Radicella, 1998; Tullius, 1989). Ces réactions provoquent des «stress oxydants» qui perturbent l'homéostasie redox et endommagent les organites (Morel et Barouki, 1998). Les radicaux libres induisent une variété de lésions sur le génome : des cassures simple et double-brin, des échanges entre chromatides sœurs, des pontages ADN-ADN, ADN-protéines et des modifications de bases azotées (Davies, 1995). Les bases oxydées comme la 8-hydroxyguanine sont mutagéniques et causeraient divers cancers (Ryan et Aust, 1992).

Pour terminer, les membranes cellulaires composées de phospholipides sont particulièrement sensibles aux attaques des radicaux libres. Ces derniers entraînent

une oxydation, un clivage et un raccourcissement des chaînes de carbone des acides gras polyinsaturés (Cheeseman, 1993). Il en résulte souvent une perte de perméabilité de la membrane plasmique (Moslen, 1994). Ce phénomène qui se nomme "peroxydation des lipides" est l'un des dommages les plus invoqués dans la toxicité des métaux. (Moslen, 1994).

### **3.3 Effets génotoxiques des composés du chrome**

#### **3.3.1 Les valences du chrome**

La cytotoxicité et la génotoxicité des composés du chrome dépendent principalement de leur valence. En milieu naturel, seuls le chrome trivalent et le chrome hexavalent sont communs (Fan et Harding-Barlow, 1987). La forme trivalente est de loin la plus courante. Le Cr(III) n'est pas physiologiquement dangereux, il serait même indispensable aux mammifères car il joue un rôle essentiel dans le métabolisme du glucose et des lipides (Shupack, 1991; Ducros, 1991). La membrane plasmique est imperméable aux ions trivalents du chrome, les quantités de Cr(III) qui pénètrent la cellule sont donc infimes. Ce phénomène explique en grande partie la non-toxicité du Cr(III) autant *in vivo* qu'*in vitro* (Bagchi et coll., 1997). En général, les composés trivalents s'avèrent non génotoxiques dans les cellules humaines et animales (De flora et coll., 1990). Cependant, des études récentes ont démontré que contrairement au Cr(VI), le Cr(III) peut se lier directement à l'ADN et former des pontages ADN-protéines et ADN-Cr (McCarty, 1997). Ces liaisons

peuvent provoquer une baisse de fidélité dans la réplication de l'ADN et promouvoir l'apparition de mutations (Snow, 1994). Comme une partie du Cr(VI) est réduite par la cellule en Cr(III), plusieurs auteurs suspectent que le Cr(III) soit en partie responsable de l'activité mutagénique du Cr(VI) (McCarty, 1997).

Pour sa part, le chrome(VI) retrouvé dans la nature provient principalement des industries (IPCS, 1990). Les composés hexavalents sont responsables des effets toxiques associés au chrome et sont à l'origine de la plupart des intoxications aiguës ou chroniques (Baruthio, 1991). Le taux de Cr(VI) entrant dans la cellule est beaucoup plus élevé que celui du Cr(III) (Dillon et coll., 1998). Contrairement au chrome trivalent, le chrome hexavalent traverse facilement la membrane plasmique à l'aide des transporteurs sulfate/phosphate (McCarty, 1997). L'entrée massive de chromates et de dichromates cause de nombreux préjudices aux cellules. Les composés hexavalents ont régulièrement donné des résultats positifs lors de plusieurs essais de génotoxicité (*in vivo* et *in vitro*) chez les mammifères et dans d'autres systèmes en provoquant : des lésions de l'ADN (formation de bases oxydées et de bris simple-brin), des mutations, des échanges entre chromatides sœurs, des aberrations chromosomiques, de l'aneuploïdie, des transformations cellulaires, etc. (De Flora et coll., 1990). Comme nous allons le voir, le Cr(VI) n'agit pas directement sur l'ADN mais indirectement par la formation de radicaux libres. Pour prouver cette hypothèse, plusieurs auteurs ont montré que l'ajout d'agents antioxydants dans le milieu de culture annule complètement la formation des dommages à l'ADN (Snyder, 1988; Sugiyama, 1991, 1992).

### 3.3.2 Mécanismes génotoxiques du Cr(VI)

#### La réduction du Cr(VI) et la réaction de Fenton

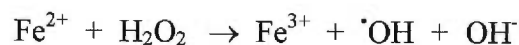
Le mécanisme suivant est le plus connu et le mieux accepté des mécanismes génotoxiques du chrome (Figure 1, chapitre I). On peut sommairement le diviser en deux étapes :

- 1) La réduction progressive du Cr(VI) en Cr(III)
- 2) Réaction de Fenton et production de radicaux libres

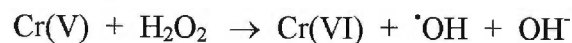
La réduction du chrome hexavalent est fondamentale et explique en grande partie la génotoxicité du chrome (O'Brien et Kortenkamp, 1994). Dans la cellule, une variété de donneurs d'électrons et d'enzymes intracellulaires tente de réduire le chrome hexavalent sous sa forme trivalente stable (De Flora et Wetterhahn, 1989). Cette réduction métabolique s'effectue principalement dans le cytoplasme (>50%), le noyau (25%) et les mitochondries (6%) (Sugden et Wetterhahn, 1997). Le Cr(VI) est généralement réduit en Cr(V) par le glutathion ou l'ascorbate, les deux plus importants agents réducteurs au sein de la cellule (Jones et coll., 1991; Stearns et coll., 1994). Le Cr(V) est la forme carcinogène ultime des composés du chrome, c'est lui qui interagit avec le peroxyde d'hydrogène dans la réaction de Fenton et amène la production de radicaux libres (Shi et Dalal, 1990a, 1990b, 1994). Le Cr(V) qui n'est

pas en contact avec le peroxyde d'hydrogène est progressivement réduit en Cr(IV) et en Cr(III) par les agents réducteurs.

La réaction de Fenton est connue depuis longtemps. En 1894, Fenton observe pour la première fois qu'une mixture de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et de sels de fer(II) réagit fortement avec plusieurs molécules organiques (Halliwell et Gutteridge, 1985) :



La réaction de Fenton se résume à la décomposition du peroxyde d'hydrogène en un radical hydroxyle ( $\cdot\text{OH}$ ) et un ion hydroxyde ( $\text{OH}^-$ ). La quantité d'ions métalliques requise pour catalyser cette réaction est infime (Diplock, 1997). Plusieurs autres métaux dont le chrome(V), peuvent également catalyser la réaction de Fenton :

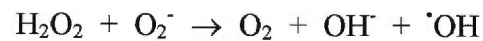


La réactivité de cette réaction est due à la formation de radicaux hydroxyles. Le radical hydroxyle est l'un des radicaux libres les plus dangereux. Il attaque directement la molécule d'ADN et provoque des bris simple-brin en arrachant un atome d'hydrogène au sucre déoxyribose (Snyder, 1990). L'extrême réactivité du radical hydroxyle implique qu'il possède une très courte durée de vie et qu'il réagisse immédiatement près de son lieu de formation (Diplock, 1997). Pour être

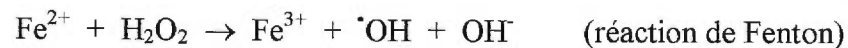
génétoxicques, les radicaux hydroxyles doivent donc être générés près de l'ADN (Diplock, 1997).

### La réaction de Haber et Weiss

Une autre réaction postulée par F. Haber et J. Weiss en 1934 possède une importance particulière dans la génotoxicité des métaux (Aisen et coll., 1990). L'interaction du radical superoxyde ( $O_2^-$ ) et du peroxyde d'hydrogène amène la formation d'un radical hydroxyle suivant l'équation suivante :

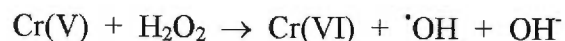
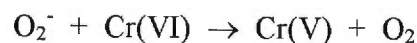


Cette réaction est cependant trop lente pour produire un nombre important de radicaux hydroxyles sous des conditions physiologiques normales. Mais en présence de concentrations traces d'un métal de transition, l'amplitude de cette réaction est grandement augmentée (Feher et coll., 1987):





Le Cr(VI) serait en mesure de catalyser le cycle d'Haber-Weiss en présence du radical superoxyde ( $O_2^-$ ) :



Des études récentes mentionnent que le mécanisme de Haber-Weiss pourrait avoir un rôle significatif dans la génotoxicité du chrome (Shi et Dalal, 1992). Cette hypothèse est cependant contestée par plusieurs auteurs qui soutiennent que l'ascorbate et le glutathion (beaucoup plus abondants que le radical superoxyde) sont des candidats plus probables dans la réduction du Cr(VI) (Meneghini et Martins, 1993). Néanmoins, le mécanisme d'Haber-Weiss pourrait avoir une importance particulière dans certains types de cellules. Par exemple, les leucocytes tuent les organismes envahisseurs par une série de réactions oxydatives où la production de  $O_2^-$  s'avère élevée (Shi et Dalal, 1992; Moslen, 1994; Diplock, 1997).

### ***3.3.3 Conclusion sur la génotoxicité du chrome***

Sans contredit, le chrome hexavalent est dommageable pour l'ADN. Les effets et les mécanismes génotoxiques du Cr(VI) sont bien documentés. La génotoxicité des composés du chrome est maintenant confirmée dans plus d'une centaine de tests à court terme (Fan et Harding-Barlow, 1987; De Flora et coll., 1990).

### **3.4 Effets génotoxiques des composés du cadmium**

#### **3.4.1 *La génotoxicité du Cd(II)***

Le Cd(II) est généralement considéré comme étant faiblement clastogène et mutagène (Beyersmann et Hechtenberg, 1997). De fortes concentrations de Cd(II) (souvent cytotoxiques) semblent requises pour altérer la structure de l'ADN, induire des cassures simple et double-brin, causer des aberrations chromosomiques et induire la peroxydation des lipides (Beyersmann et Hechtenberg, 1997). Dans les bactéries, le Cd(II) ne semble pas mutagénique et dans les cellules de mammifères, les effets du Cd(II) sont habituellement faibles (Hartwig, 1994).

Cependant, les mécanismes génotoxiques et carcinogènes du cadmium sont peu connus. Les paragraphes qui suivent présentent les hypothèses les plus récentes pour expliquer les propriétés génotoxiques de ce métal. Plusieurs études suggèrent que le cadmium puisse inhiber ou altérer l'activité d'enzymes associées à l'ADN en entrant en compétition avec des métaux essentiels au niveau des sites de liaisons enzymatiques (Ochi et coll., 1987). En formant des liens stables et irréversibles au niveau de ces sites, le cadmium bloquerait l'accès aux métaux essentiels et entraînerait des changements fonctionnels et structuraux qui perturberaient les fonctions normales des enzymes (Ochi et coll., 1987).

### **3.4.2 *Le cadmium peut promouvoir des dommages oxydatifs***

De plus en plus d'évidences suggèrent que les dommages provoqués par le cadmium soient causés par les radicaux libres (Ochi et coll., 1983; Snyder, 1988). À fortes doses, le Cd(II) provoque des dommages oxydatifs comme la formation de bases oxydées et de bris simple-brin (Mikhailova et coll., 1997). Par surcroît, l'ajout d'agents antioxydants dans le milieu de culture inhibe les effets du cadmium (Ochi et Ohsawa, 1985; Sugiyama, 1994). Comme le cadmium est incapable de catalyser la réaction de Fenton et de Haber-Weiss, plusieurs auteurs suggèrent que le cadmium puisse augmenter les dommages oxydatifs causés à l'ADN en inhibant l'activité d'enzymes reliés à la détoxification des dérivés de l'oxygène comme la catalase ou l'ascorbate (Beyersmann et Hartwig, 1994; Ochi et coll., 1987; Dally et Hartwig, 1997). Mikhailova et coll. (1997) rapporte que 50  $\mu$ M de Cd(II) suffisent pour affecter l'activité de ces enzymes dans les lymphocytes humains *in vitro*.

### **3.4.3 *Le cadmium interfère avec la réparation de l'ADN***

Le Cd(II) est comutagénique; il augmente la génotoxicité d'autres agents en perturbant les mécanismes de réparation de l'ADN (Hartwig, 1994). Par exemple, le Cd(II) est en mesure d'inhiber la réparation des bases oxydées et des bris simple-brin induits par la lumière visible et les rayons UV dans les cellules humaines (Beyersmann et Hartwig, 1994; Dally et Hartwig, 1997). Nocentini (1987) a démontré que l'ajout de zinc empêche le cadmium d'altérer les mécanismes de

réparation de l'ADN. Depuis, plusieurs auteurs suggèrent que le cadmium puisse inactiver les enzymes de réparation de l'ADN en entrant en compétition avec des métaux essentiels qui agissent comme cofacteurs (Dally et Hartwig, 1997). Beaucoup d'enzymes de réparation de l'ADN dépendent du zinc pour leurs activités (Coogan et coll., 1992).

#### ***3.4.4 Le cadmium affecte la réplication de l'ADN***

Le cadmium peut également nuire à la réplication de l'ADN. De faibles concentrations de cadmium (environ 40  $\mu\text{M}$ ) suffisent pour augmenter la fréquence des erreurs lors de la réplication (Beyersmann et Hartwig, 1994). Le cadmium entrerait en compétition avec le magnésium (intimement associé aux activités de l'ADN polymérase) et provoquerait une mauvaise incorporation des nucléotides lors de la réplication (Littlefield et coll., 1994). Littlefield et coll. (1994) ont démontré que l'ajout de magnésium prévient les effets génotoxiques du cadmium.

#### ***3.4.5 Le cadmium augmente l'expression d'enzymes de protection***

À des concentrations infimes (quelques  $\mu\text{M}$ ), le cadmium induit la synthèse de protéines comme la métallothionéine (MT) (Beyersmann et Hechtenberg, 1997). Cette protéine de faible poids moléculaire se retrouve dans plusieurs cellules, notamment celles du foie et des reins (IPCS, 1992). Les niveaux de MT augmentent significativement chez les animaux exposés au cadmium (Jacobson et Turner, 1980).

Chez les mammifères, la MT semble protéger la cellule des effets toxiques du cadmium. En effet, associé à cette protéine, le cadmium devient inerte et non toxique pour la cellule (Shiraishi et coll., 1995). Néanmoins, des études récentes ont démontré que l'induction de la MT par le cadmium possède aussi certains effets nocifs. Une augmentation prononcée du niveau de MT provoquerait la production de radicaux libres et affecterait l'homéostasie intracellulaire du zinc (Müller et coll., 1991; Oetken et Beyersmann, 1991; Beyersmann et Hechtenberg, 1997).

#### ***3.4.6 Le cadmium modifie les signaux intracellulaires***

Finalement, les ions du cadmium provoquent des effets prononcés sur les signaux intracellulaires incluant ceux qui régissent l'expression génique (Beyersmann et Hechtenberg, 1997). Le cadmium peut stimuler la synthèse de l'ADN et augmenter l'expression de certains proto-oncogènes (Beyersmann et coll., 1991; Beyersmann et Hechtenberg, 1997).

#### ***3.4.7 Conclusion sur la génotoxicité du Cd(II)***

Même si la génotoxicité du cadmium n'est pas aussi sévère et évidente que celle du chrome, le cadmium semble provoquer divers dommages à l'ADN. Les mécanismes génotoxiques du cadmium sont encore peu connus et tout reste à faire dans ce domaine. Longtemps délaissé aux profits de métaux clairement génotoxiques

comme le chrome et le nickel, les recherches sur le cadmium se sont multipliées ces dernières années.

## 4. ÉVALUATION DE LA GÉNOTOXICITÉ DES MÉTAUX

### 4.1 Les tests de génotoxicité *in vitro*

De nombreux tests *in vitro* ont été développés pour mettre en évidence et quantifier les dommages à l'ADN. D'une façon générale, ces tests sont simples, rapides et peu coûteux. Par surcroît, leurs usages contribuent à réduire le sacrifice d'animaux de laboratoire (ISO, 1992). Aujourd'hui, l'utilisation des tests *in vitro* est une étape indispensable au sein des études de génotoxicité. C'est en confrontant les résultats de plusieurs catégories de tests *in vivo* et *in vitro* que l'on peut conclure à la génotoxicité d'un produit (Marzin, 1986).

Les tests *in vitro* chez les eucaryotes peuvent être divisés en trois grands types : 1) les **tests de mutations géniques** qui vont mettre en évidence une mutation au niveau d'un gène (comme par exemple le test de mutation ponctuelle sur culture de cellules), 2) les **tests de mutations chromosomiques** qui mettent en évidence une altération de la structure des chromosomes ou une altération du nombre de chromosomes (comme le test des micronoyaux) et 3) les **tests d'altération primaire et de réparation de l'ADN** qui mettent en évidence les premiers signes d'altération de l'ADN et la mise en œuvre des mécanismes de réparation (comme le test de réparation non programmée de l'ADN et le test des échanges entre chromatides sœurs (ECS)) (Marzin, 1986). Toutes les méthodes d'évaluation de la

généotoxicité ne sont pas équivalentes, voilà pourquoi certains organismes comme l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO) présentent les méthodes les plus acceptables et les mieux standardisées. En cytogénétique, l'ISO a approuvé l'usage du test des micronoyaux et des ECSs (ISO, 1992). Dans cette étude, nous nous concentrerons sur la détection des bris simple-brin et des ECSs.

#### **4.2 Les techniques de détection des bris simple-brin**

La brisure d'un brin de l'ADN se traduit généralement par la rupture du lien phosphodiester qui unit deux nucléotides. C'est le type de dommage le plus couramment provoqué par les agents physiques et chimiques (Snyder, 1990). McGrath et Williams (1966) furent les premiers à quantifier les cassures de l'ADN dans les systèmes cellulaires avec la technique de "sédimentation sur gradient de sucrose alcalin". Depuis, plusieurs autres méthodes furent développées : l'élution alcaline, la dénaturation alcaline, la filtration sur membrane de nitrocellulose, etc. Toutes ces méthodes analysent le comportement hydrodynamique de la molécule d'ADN afin d'en déterminer le poids et d'en déduire la fréquence des bris (Leroy et coll., 1996; Gabelova et coll., 1997).

Il existe également des méthodes enzymatiques pour détecter les cassures de l'ADN. Ces réactions utilisent des enzymes qui réagissent spécifiquement avec les extrémités terminales situées aux abords des lésions. Dans cette étude, pour quantifier les bris simple-brin provoqués par le chrome et le cadmium dans les lymphocytes



humains, nous avons employé la technique de marquage terminal *in situ* en microscopie électronique ("Electron microscopy *in situ* end-labeling" ou EM-ISEL). Cette technique récemment mise au point est présentement en cours de validation. Aucune autre équipe ne s'est servie de l'essai EM-ISEL pour évaluer la génotoxicité des métaux. En plus de disposer de la définition de la microscopie électronique, cette technique permet de préserver la structure de la chromatine et de quantifier directement sur les chromosomes ou les noyaux, les bris simple-brin induits par les agents toxiques. On peut ainsi déterminer les régions ou les locis chromosomiques les plus atteints (Fernandez et coll., 1993).

## 5. OBJECTIFS DU PRÉSENT TRAVAIL

Comme nous venons de le constater, plusieurs laboratoires de cytogénétique et de génétique moléculaire se sont intéressés à la génotoxicité des métaux. Jusqu'à maintenant, plusieurs équipes ont obtenu des résultats suffisamment convaincants pour clarifier les effets des différents métaux, suggérer certains mécanismes génotoxiques et avancer des hypothèses pouvant en partie expliquer la carcinogenèse métallique. Cependant, l'état actuel des connaissances dans ce domaine est limité et plusieurs questions demeurent sans réponse.

Le but principal de ce travail est d'apporter de nouvelles connaissances sur la génotoxicité du chrome et du cadmium sur les lymphocytes humains à l'aide du nouvel essai EM-ISEL. Cette étude permettra de mieux comprendre les mécanismes carcinogènes du chrome et du cadmium et éventuellement d'évaluer le niveau de risque des personnes exposées à ces métaux. Cette étude possède également comme objectif de valider un nouveau test (EM-ISEL) qui pourrait devenir un outil intéressant afin d'évaluer l'impact des substances toxiques sur la santé humaine. En cytogénétique, mise à part la technique des échanges entre chromatides sœurs et le test des micronoyaux, les essais quantitatifs *in vitro* destinés à mesurer les dommages de l'ADN sont pratiquement inexistantes.

Pour atteindre nos objectifs, nous avons fait appel à diverses techniques afin d'évaluer la toxicité du chrome et du cadmium. Nous avons premièrement utilisé un test de viabilité (le test d'exclusion au bleu de Trypan) pour évaluer la cytotoxicité du chrome et du cadmium et pour déterminer les concentrations optimales à employer au cours des tests de génotoxicité. Par la suite, nous avons utilisé deux tests de génotoxicité : 1) l'essai EM-ISEL, pour détecter les bris simple-brin induits dans l'ADN chromosomique et nucléaire et 2) le test standard des échanges entre chromatides sœurs, pour quantifier l'augmentation des ECSs et valider les résultats obtenus avec la technique EM-ISEL. Finalement comme information complémentaire, nous avons évalué l'effet du chrome et du cadmium sur l'index mitotique et la vitesse du cycle cellulaire.

#### Présentation des chapitres:

Le chapitre suivant fournit des informations sur les techniques utilisées dans ce travail. L'article du mémoire nous montre les résultats obtenus avec le chrome et le cadmium et discute des implications de ces résultats. La discussion reprend les principaux éléments de l'article et approfondit certains points importants. Finalement, la conclusion met en relief les apports de cette recherche et discute de certaines questions importantes qui restent à élucider.

## **CHAPITRE II**

# **LES TECHNIQUES DE GÉNOTOXICITÉ EMPLOYÉES DANS CE TRAVAIL**

Étant donné que les techniques employées dans ce travail ne sont décrites que très succinctement dans l'article, ce chapitre fournit des détails supplémentaires permettant de bien comprendre l'impact de ces méthodes.

## **1. LES TECHNIQUES DE MARQUAGE TERMINAL *IN SITU***

### **1.1 La détection des cellules en apoptose**

Pour commencer, nous devons signaler une fonction importante des techniques de marquage terminal *in situ* : la détection des cellules en apoptose. Même si notre travail ne s'intéresse pas à l'apoptose proprement dite, il est incontestable que les recherches effectuées dans ce domaine ont permis d'améliorer grandement les premières techniques de marquage terminal *in situ* apparues en 1988 (Migheli et coll., 1994).

Deux principaux types de changements morphologiques accompagnant la dégénérescence cellulaire furent récemment distingués : la nécrose et l'apoptose (Oppenheim, 1991; Eastman, 1993). Contrairement à la nécrose où les cellules sont passivement tuées par un agent externe, l'apoptose est un événement actif qui est génétiquement programmé (Migheli et coll., 1995). Malheureusement, l'apoptose est difficilement détectable lors d'un examen histologique de routine. Cependant, un événement caractéristique de l'apoptose (absent durant la nécrose) facilite grandement l'identification de ces cellules : le clivage de l'ADN en fragments

d'environ 200 paires de bases par des endonucléases (Wijsman et coll., 1993). Ce processus s'observe durant les premiers stades apoptotiques et ce, bien avant que l'on puisse détecter les changements morphologiques avec les techniques de marquages classiques (Migheli et coll., 1994). Des techniques enzymatiques furent récemment développées pour détecter cette fragmentation de l'ADN (Fujita et coll., 1997). Les deux principales sont :

- La technique "*in situ* end-labeling" (ISEL) originellement décrite par Wijsman et coll. (1993), dans laquelle l'incorporation des nucléotides marqués est réalisée par l'ADN polymérase.
- La technique "TdT-mediated dUTP-biotin nick end-labelling" (TUNEL) initialement décrite par Gavrieli et coll. (1992), dans laquelle l'incorporation des nucléotides est effectuée par la terminal déoxynucléotidyl transférase (TdT).

La technique TUNEL possède une procédure pratiquement identique à la technique ISEL. Dans ce travail, nous avons privilégié la méthode ISEL car elle détecte des changements plus subtils de génotoxicité et occasionne beaucoup moins de marquages non spécifiques (Migheli et coll., 1994; Fujita et coll., 1997).

## **1.2 Description de la technique EM-ISEL**

La technique de marquage terminal *in situ* en microscopie électronique (EM-ISEL) permet de quantifier les dommages à l'ADN causés par des agents toxiques.

Cette méthode fut mise au point par Gosalvez et coll. (1993) à partir des techniques de marquage terminal conventionnelles. L'EM-ISEL fut par la suite modifiée dans notre laboratoire par Assad et coll. (1999).

Premièrement, nous avons mis en contact des lymphocytes humains en culture avec du Cr(VI) et du Cd(II) pour produire des lésions sur l'ADN. Nous avons ensuite récolté les noyaux et les chromosomes endommagés et nous les avons étalés sur des lames. Deuxièmement, nous avons procédé à la détection des bris simple-brin tel que décrit par Assad et coll. (1997). Nous avons effectué une amplification des bris à l'aide de l'enzyme exonucléase III qui catalyse l'hydrolyse séquentielle des nucléotides de l'ADN dans le sens 3' → 5' à partir d'une extrémité 3' OH libre (Figure 2, chapitre II). Par la suite, nous avons réalisé une incorporation de nucléotides à l'aide d'un kit de marquage (Amersham, Oakville, Canada) dont le dTTP a été remplacé par le bio-11-dUTP-biotinylé. L'incorporation de nucléotides au sein de la molécule d'ADN est effectuée par le fragment de Klénow (un fragment de l'ADN polymérase) qui possède une activité polymérasique dans le sens 5' → 3' (Figure 3, chapitre II). Les séquences polymérisées incluant le dUTP biotinylé sont ensuite détectées par de la streptavidine marquée à l'or colloïdal. Finalement, l'ADN est transféré sur des grilles de nickel et observé en microscopie électronique à transmission (Messier et coll., 1996). Le nombre de particules d'or par  $\mu\text{m}^2$  est compté sur les noyaux en interphase et les chromosomes en métaphase à l'aide du programme informatique "NIH image" (Inoki et coll., 1997).

## 2. LA TECHNIQUE DES ÉCHANGES ENTRE CHROMATIDES SŒURS (ECS)

Comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre précédent, toutes les méthodes d'évaluation de la génotoxicité ne sont pas équivalentes. Pour déterminer la sensibilité du nouveau test EM-ISEL, nous avons comparé nos résultats à ceux obtenus avec le test standard des ECSs. En cytogénétique, le test des ECSs semble être la méthode la plus sensible pour détecter une altération de l'ADN provoquée par des métaux (Lin et coll., 1994).

---

Les ECSs sont une manifestation cytologique de la recombinaison des sites homologues dans un même chromosome. Le mécanisme d'induction des ECSs n'est pas encore connu, mais il semble nécessaire que la cellule traverse une phase de synthèse (Wolff, 1982). Certains chercheurs suggèrent que les ECSs puissent être causées par un processus de réparation associé à la réplication de l'ADN (Heddle, 1982). Il a été démontré que la fréquence des ECSs est augmentée lorsque les cellules sont en contact avec des produits chimiques. Les doses nécessaires pour provoquer un accroissement du nombre d'échanges sont inférieures à celles normalement nécessaires pour induire n'importe quels types d'aberrations chromosomiques (Wolff, 1982). Voilà pourquoi cette méthode est rapidement devenue un indicateur très utilisé pour détecter les effets des agents physico-chimiques sur l'ADN.



Afin de visualiser les ECSs, les chromosomes métaphasiques doivent être traités de telle sorte que chaque chromatide soit différente l'une de l'autre. Cette méthode implique la substitution de la thymidine normale de l'ADN par une molécule analogue : le bromodéoxyuridine (BrdU) (Perry et Wolff, 1974). Les cellules sont incubées en présence de BrdU au cours de deux cycles de réplication. Comme la réplication est semi-conservatrice, après un premier cycle d'incorporation, chaque chromatide est composée d'un brin substitué et d'un brin normal. Après un deuxième cycle d'incorporation, une chromatide possède deux brins substitués alors que l'autre chromatide ne possède qu'un brin substitué. On procède ensuite à la coloration des chromosomes par le Giemsa. La chromatide avec un brin substitué devient foncée alors que la chromatide bi-substituée demeure pâle. On voit alors apparaître des chromosomes arlequins qui permettent de mettre en évidence les ECSs (Figure 4, chapitre II).

## FIGURES CITÉES DANS LE CHAPITRE I et II

- Figure 1. Mécanisme génotoxique du chrome hexavalent (Sugiyama, 1991). Le chrome(VI) après avoir pénétré la cellule est progressivement réduit en Cr(V), Cr(IV) et Cr(III) par les agents réducteurs intracellulaires. Cette réduction entraîne la production de radicaux hydroxyles qui endommagent l'ADN, causent des mutations et donnent le cancer.
- Figure 2. Représentation schématique de la technique EM-ISEL. a) Bris simple-brin. b) Amplification *in situ* des bris simple-brin par l'enzyme exonucléase III qui catalyse l'hydrolyse séquentielle des nucléotides de l'ADN dans le sens 3' → 5' à partir d'une extrémité 3' OH libre.
- Figure 3. Représentation schématique de la technique EM-ISEL (suite). a) Hybridation aléatoire d'oligonucléotides par le fragment de Klénow qui possède une activité polymérasique dans le sens 5' → 3'. b) Incorporation de dUTP biotinylé et détection à l'aide d'anticorps couplés à l'or colloïdal.
- Figure 4. Représentation schématique de la technique des échanges entre chromatides sœurs. Après un premier cycle d'incorporation, chaque chromatide est composée d'un brin substitué et d'un brin normal. Après un deuxième cycle d'incorporation, une chromatide possède deux brins substitués alors que l'autre chromatide ne possède qu'un brin substitué. Après la coloration des chromosomes au Giemsa, les chromatides avec un brin substitué deviennent foncées alors que les chromatides bi-substituées demeurent pâles.

Figure 1

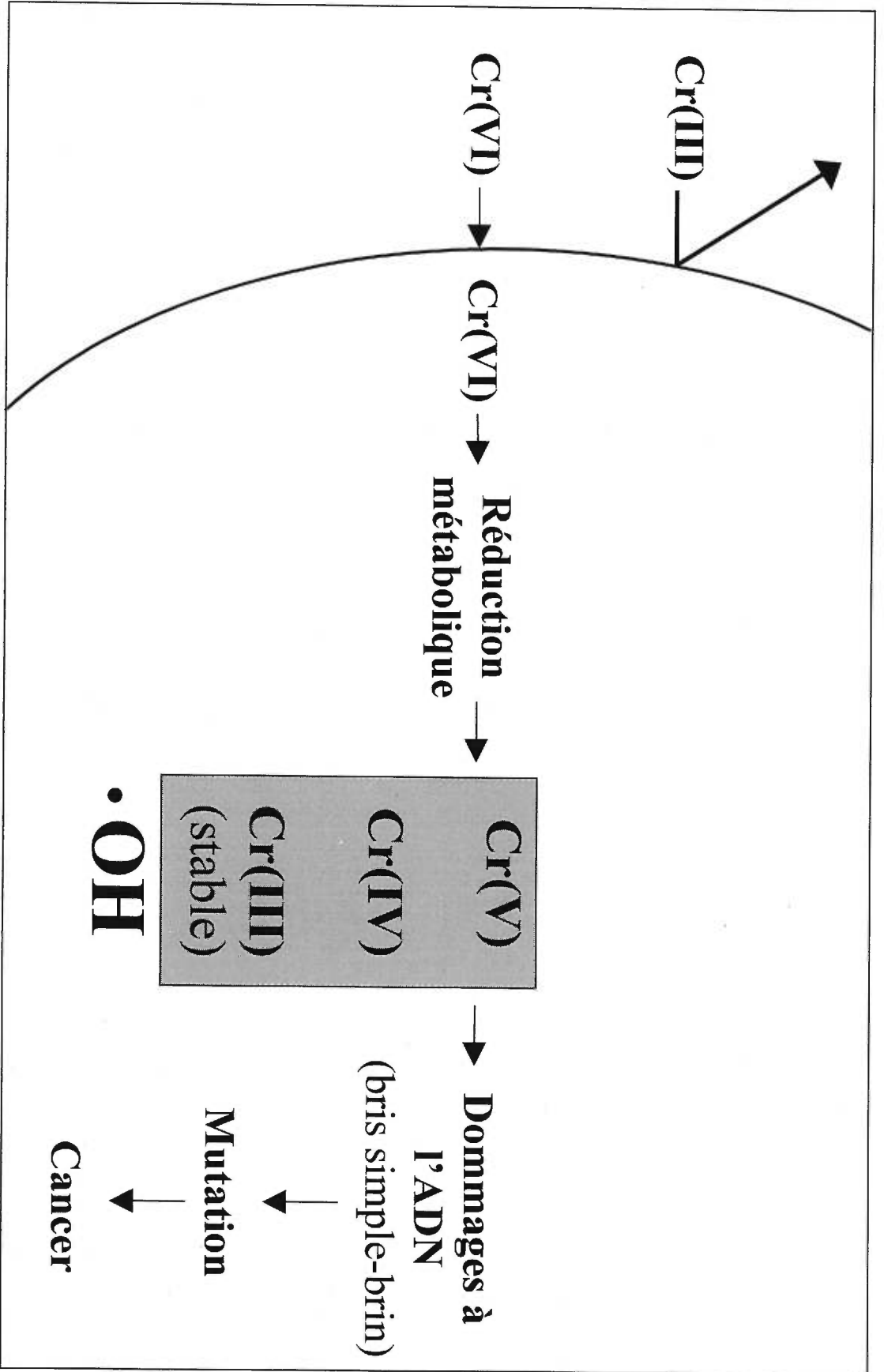
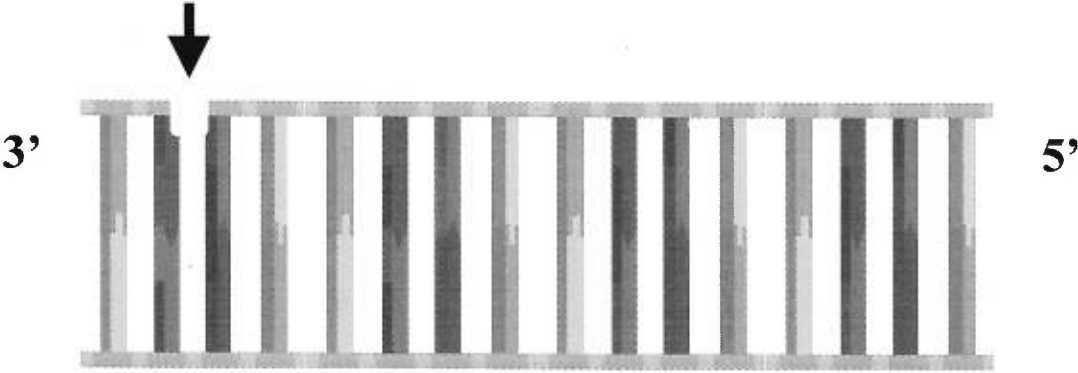


Figure 2

a)



b)

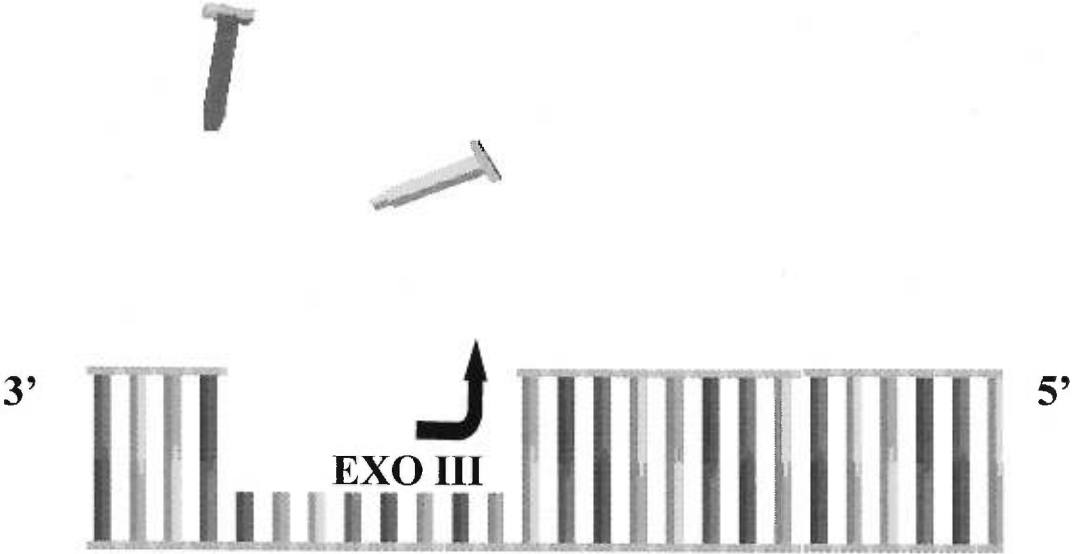
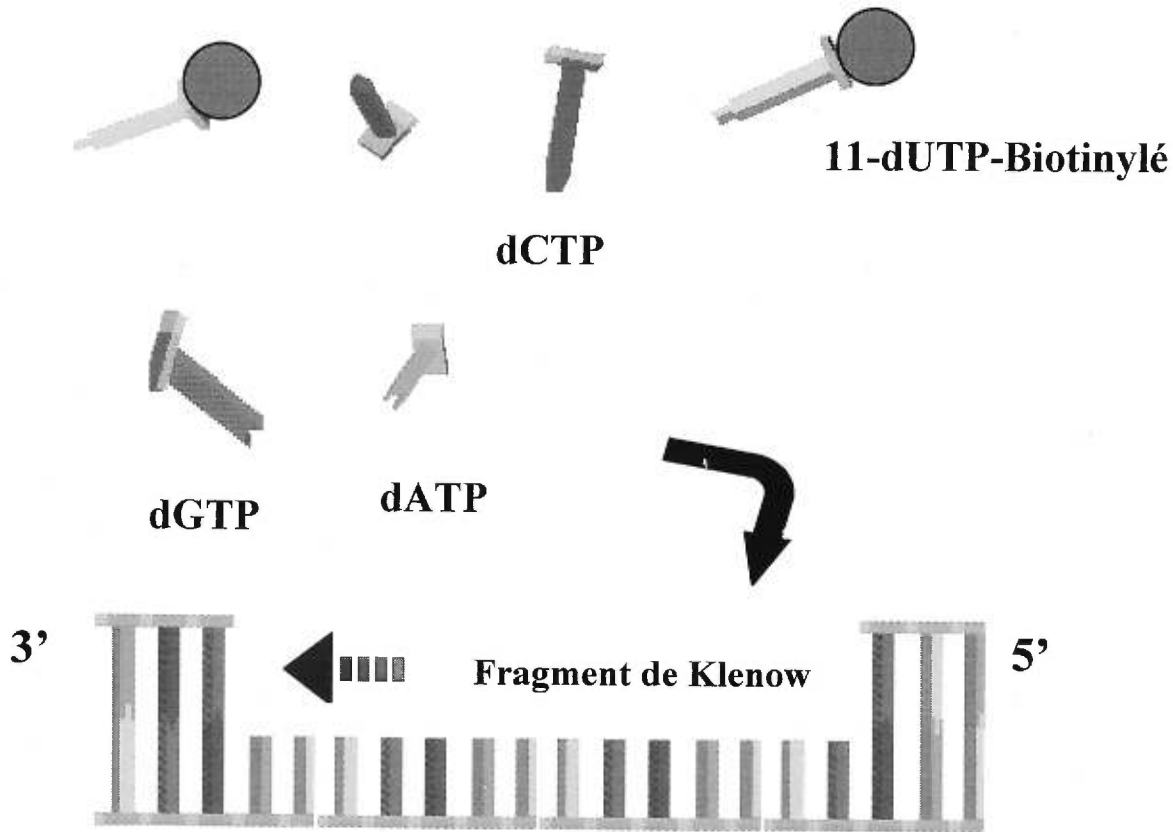


Figure 3

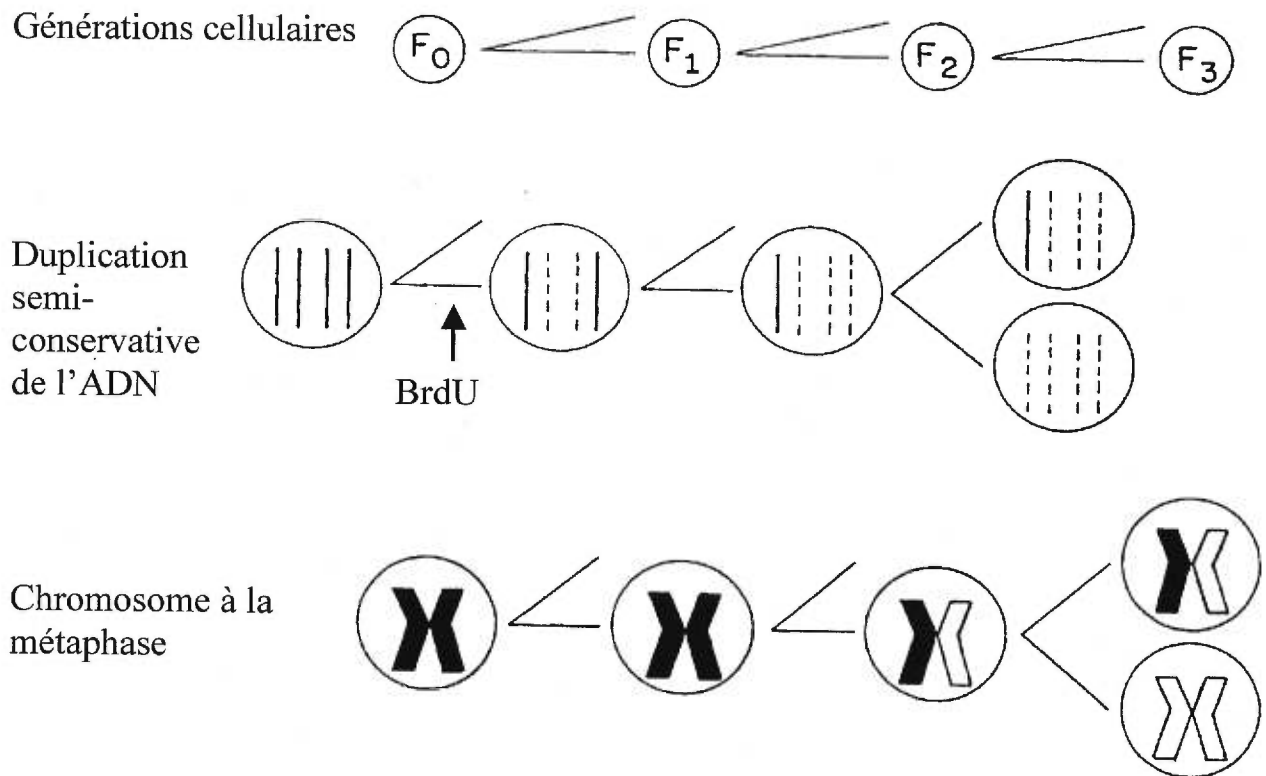
a)



b)



Figure 4



### **CHAPITRE III**

#### **ARTICLE**

**Effets génotoxiques du chrome(VI) et du cadmium(II) sur les lymphocytes sanguins humains par la méthode de marquage terminal *in situ* en microscopie électronique (EM-ISEL) et la technique des échanges entre chromatides sœurs (ECS)**

**"Genotoxic effects of chromium(VI) and cadmium(II) in human peripheral blood lymphocytes measured by electron microscopy *in situ* end-labeling (EM-ISEL) and sister chromatid exchanges (SCE) "**

**(Article soumis pour publication dans Mutation Research)**

**Genotoxic effects of chromium(VI) and cadmium(II) in human blood lymphocytes measured by electron microscopy *in situ* end-labeling (EM-ISEL) and sister chromatid exchanges (SCE)**

**François Depault <sup>a</sup>, Michel Assad <sup>a,b</sup>, Saroj Chakrabarti <sup>c</sup>, Nicole Lemieux <sup>a,\*</sup>**


<sup>a</sup>Département de pathologie et biologie cellulaire, Faculté de médecine, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

<sup>b</sup>Groupe de Recherche en Biomécanique/Biomatériaux, École Polytechnique de Montréal, C.P. 6079, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3A7, Canada

<sup>c</sup>Département du travail et d'hygiène du milieu, Faculté de médecine, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

**\*Correspondence Address:** Nicole Lemieux

Département de pathologie et biologie cellulaire,  
Faculté de médecine,  
Université de Montréal,  
C.P. 6128, Succ. Centre-ville,  
Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada.  
Tel. : (514) 343-6309; Fax : (514) 343-5755;





**Abstract**

Chromium(VI) and cadmium(II) compounds are toxic and carcinogenic to humans and laboratory animals. In the present investigation, human peripheral blood lymphocytes were exposed *in vitro* to potassium chromate ( $K_2CrO_4$ ) and cadmium chloride ( $CdCl_2$ ) for 2 h. The inductions of cytotoxic effects using the Trypan Blue exclusion test and, secondly, of genotoxic effects using both the electron microscopy *in situ* end-labeling (EM-ISEL) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test were investigated. Cytotoxicity testing was performed in order to test the cellular viability and select the correct concentrations of Cr(VI) and Cd(II) to be used for the genotoxic assays. EM-ISEL was used to assess DNA single-strand breaks (SSBs) induced by Cr(VI) and Cd(II). The standard SCE test was performed in order to validate the results of EM-ISEL and determine the sensitivity of the EM-ISEL method. The results demonstrated that Cr(VI) is 10 times more cytotoxic than Cd(II). The quantification of DNA SSBs by EM-ISEL clearly showed that both chromium and cadmium are powerful clastogenic agents at concentrations slightly cytotoxic. Indeed, these metal compounds induced a significant increase of breaks at both chromosomal and nuclear DNA levels. Moreover, Cr(VI) provoked a strong increase of the SCE frequency while cadmium failed to do so. In addition, these two metal salts induced a decrease in both the mitotic and proliferative indexes. Thus, this study has clearly demonstrated the genotoxicity of Cr(VI) and Cd(II) as well as the EM-ISEL assay to detect such clastogenic agents most efficiently.

*Keywords:* Chromium; Cadmium; DNA strand breaks; *In situ* end-labeling

## 1. Introduction

There are several *in vitro* methods to determine the clastogenic effects of a substance. DNA strand breaks caused by chemical agents are usually detected by alkaline sucrose gradient centrifugation [1] or the alkaline elution method [2]; however, both techniques require chromatin denaturation. In cytogenetics, chromosome aberrations, SCEs and micronuclei formation can be detected [3], but no cytogenetic test can specifically quantify the DNA breaks on chromosomes. Recently, Gosalvez et al. [4] developed the electron microscopy *in situ* end-labeling (EM-ISEL) assay, a new enzymatic reaction for the detection of DNA single-strand breaks (SSBs). This technique preserves the chromatin structure and allows a direct localization and quantification of DNA SSBs in both metaphase chromosomes and interphase nuclei at the electron microscopy (EM) level [5]. In the past, EM-ISEL has not been used extensively in the assessment of genotoxicity. Fernandez et al. [5] used this technique for the detection of DNA breaks in hydrogen peroxide-treated cells. In our laboratory, Assad et al. [6] have adapted this method to measure biomaterial-induced genotoxicity *in vitro*.

In this investigation, we have studied two metals that were found to be genotoxic and carcinogenic according to other methods [7,8]. Chromium and

cadmium are present in food, water and the environment, but high exposure occurs most frequently from breathing contaminated air in the workplace of chromium or cadmium industries [7,8]. Each of these metals exhibits specific genotoxic damages. Chromium causes a variety of DNA lesions such as DNA strand breaks, sister chromatid exchanges and mutations [9]. The oxidation state is the most important parameter for chromium toxicity. Cr(VI) can easily gain entry to cells via the sulphate transport protein, while Cr(III) is only poorly taken up by the cells [10,11]. Inside the cells, Cr(VI) is reduced by cellular reductants through reactive intermediates such as Cr(V) and Cr(IV), to the most stable Cr(III) state [10,11]. Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) normally present in cells reacts with Cr(V) and leads to the formation of a hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ) via the Fenton reaction [12,13]. Formation of hydroxyl radicals seems to be the major cause of Cr(VI) genotoxicity [14]. On the other hand, the cadmium have an electrovalence of 2 as the only stable form [15]. The cadmium(II) seems to be a weak mutagen and clastogen. It generally requires a high dose level to produce genotoxic effects [16]. The mechanism of cadmium genotoxicity remain unclear. Available evidence suggests that DNA damage is the result of free radical generation; free radical scavengers and antioxidants are indeed useful in protecting against cadmium-induced toxicity [17-19]. Cadmium would be unable to generate free radical directly, however, it would disrupt cellular defence systems against free radicals by reacting with enzymes detoxifying these reactive oxygen species [20]. Other studies suggest that cadmium can interfere with DNA repair processes and enhance the toxicity of other agents [21,22].

To our knowledge, no study has used the EM-ISEL assay to evaluate the *in vitro* genotoxicity of chromium and cadmium. The main goal of this work was therefore to study the genotoxic effects of Cr(VI) and Cd(II) on human lymphocytes using this new technique. Our second objective was to validate the EM-ISEL as a new tool for the assessment of genotoxicity. In order to determine the sensitivity of this method, the data of each metal obtained by the EM-ISEL were compared with those obtained using the standard SCE test. To optimize the concentrations of chromium and cadmium for genotoxicity assays, cytotoxicity of these metals was also evaluated. Finally, inhibition of cell-cycle kinetics due to these metals was investigated.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Chemicals*

Cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$ ; Aldrich, Milwaukee, WI) and potassium chromate ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ; Aldrich, Milwaukee, WI) were dissolved in distilled water at 10 mM (stock solution), sterilized by filtration, stored at 4°C, and diluted to appropriate concentrations immediately before use in final medium. For each treatment, negative controls were prepared by omitting metal dissolution. In the EM-ISEL assay, methyl methanesulfonate (MMS; Aldrich, Milwaukee, WI) was added as a positive control.

## 2.2. Cells

Human peripheral blood was collected into sodium-heparinized vacuotainers from a healthy nonsmoking 24-year-old adult male volunteer without any apparent disease.

## 2.3. Cytotoxicity testing

Isolation of lymphocytes from whole blood was done in Ficoll solution (Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Canada) as described by Fotino et al. [23]. The lymphocytes ( $1 \times 10^6$  cells / ml) were then cultured at 37°C in 2.45 ml aliquots of RPMI-1640 medium (Life Technologies, Grand Island, NY) supplemented with 10% fetal calf serum (Life Technologies, Grand Island, NY), 0.1% gentamycin (Shering, Montreal, Canada), 1% glutamine (Mediatech, Herndon, VA) and 1% phytohemagglutinin (Murex Diagnostics, Dartford, England). After 70 h of incubation, the cells were treated for 2 h with colcemid (0.1 µg/ml; Life Technologies, Grand Island, NY) and 0.05 ml of either chromium (12.5 to 250 µM) or cadmium (125 to 2500 µM). After treatment, cytotoxicity was immediately measured via the Trypan Blue exclusion test. The percentage of viability (number of viable cells  $\times$  100 / total number of cells) was determined by using an hemocytometer.

## *2.4. Genotoxicity testing*

### *2.4.1. Culture conditions and treatments*

To initiate blood cultures, aliquots of 0.3 ml of human blood were added to 4.6 ml supplemented RPMI 1640 medium and incubated at 37°C for 72 h as already described by Lemieux et al. [24]. Then, metal salts (0.1 ml) were added for two hours after 46 h (150 µM Cr and 100 or 125 µM Cd) for the SCE test or 70 h (50 or 150 µM Cr, 125 or 250 µM Cd, and 500 µM MMS) for the EM-ISEL. For SCE test, cells needed to be cultured for two rounds of DNA replication with 5-bromodeoxyuridine (BrdU; Roche Diagnostics, Laval, Canada) after the toxic treatment. To maintain the same exposure time as for the EM-ISEL assay, the cells were washed three times with RPMI (to remove the metal salts), and then reincubated for two division cycles (24 h) with fresh medium containing 10 µg/ml of BrdU. In both tests, most cells were arrested at metaphase by using colcemid (0.1 µg/ml) two hours before harvesting.

### *2.4.2. Harvesting and slide preparation*

Cells were centrifuged and resuspended in KCl (0.075M; Sigma Chemical Co., Mississauga, Canada) at 37°C for 15 min and fixed three times in absolute methanol glacial acetic acid (3:1 v/v; Fisher Scientific, Ottawa, Canada). Finally, chromosomes and nuclei were spread on cold slides.

#### 2.4.3. Electron microscopy *in situ* end-labeling (EM-ISEL)

DNA SSBs were detected using the electron microscopy *in situ* end-labeling assay according to Assad et al. [6]. The slides were incubated for 30 min at 37°C in a moist chamber with 100 units of *E. coli* exonuclease III. *In situ* end-labeling was carried out using 25 µl of labeling mix per slide, containing 24 µM dATP, dCTP, dGTP, 40 µM biotin-11-dUTP and 1 unit of Klenow fragments at 37°C for 75 min. Incorporated biotin-11-dUTP was detected immunocytochemically by successive incubations (at 37°C, 45 min each) with: rabbit anti-biotin antibodies (RAB), biotinylated goat anti-rabbit antibodies, another RAB incubation and finally, anti-rabbit IgG-colloidal gold complexes of 10 nm particles. Finally, slide-selected areas were transferred to electron microscopy nickel grids following Messier et al. [25]. Chromosomes and nuclei were observed with a Philips EM208 transmission electron microscope (Philips Electron Optics, Eindhoven, the Netherlands) at a magnification of 20 000×. Labeling density was evaluated by counting the number of immunogold particles (IGPs) per µm<sup>2</sup> of chromatin in 10 chromosomes and 10 nuclei per treatment. Gold counts were performed on a Macintosh computer by using the public domain NIH Image program (written by Wayne Rasband at the U.S. National Institutes of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>).

#### 2.4.4. Analysis of SCEs, cell-cycle delay and mitotic index

The Fluorescence plus Giemsa (FPG) technique was used for chromosome staining and visualization of sister chromatid exchanges [26]. The SCE count was made on 50 metaphases per treatment. Estimation of cell-cycle delay was obtained by evaluating the percentage of mitoses in first, second and third rounds of replication on 100 metaphases per treatment. Proliferative index was calculated by using the formula:  $(M1 + 2M2 + 3M3)/M_{total}$ . Finally, the mitotic index of the lymphocytes was determined on 1000 cells per treatment.

#### 2.5. Statistics

Viability results were statistically evaluated by the Bonferroni analysis of variance. EM-ISEL data were subjected to analysis of variance (ANOVA), and Tukey-Kramer multiple comparison tests were used as post-*hoc* analyses. Finally, SCE data analyses was performed by using the Student's *t* test.

### 3. Results

#### 3.1. Cytotoxicity

The concentration-dependent effects of potassium chromate and cadmium chloride on viability of human peripheral blood lymphocyte are presented in Fig. 1. This helped us to select the concentrations of Cr(VI) and Cd(II) with corresponding



viability between 85 and 100% to be used for the genotoxic assays. Cr(VI) seemed to be 10 times more cytotoxic than Cd(II). Indeed, a significant decrease in viability was observed at chromium concentrations equal to or greater than 25  $\mu\text{M}$ , whereas no significant cytotoxic response could be detected due to cadmium concentration less than 250  $\mu\text{M}$  (Fig. 1). Nevertheless, cell survival decreased rapidly to 85% of control at higher concentrations : 200  $\mu\text{M}$  and 2000  $\mu\text{M}$  for chromium and cadmium respectively. The optimum concentrations of Cr(VI) and Cd(II) for the genotoxic assays were therefore fixed at 150  $\mu\text{M}$  (or less) and 1500  $\mu\text{M}$  (or less) respectively, taking into account their respective variations in standard deviations.

### 3.2. *Clastogenic effects by EM-ISEL*

The effects of a 2 h exposure to either MMS, potassium chromate ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$ ) or cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$ ) on the induction of DNA SSBs in human lymphocytes interphase nuclei are shown in Table 1. The negative control showed a low number of immunogold particles per  $\mu\text{m}^2$  of chromatin (mean IGPs = 75, Fig. 2a). The Tukey-Kramer test revealed significant differences in the number of IGPs between the negative control and all other treatments (Fig. 2) : MMS 500  $\mu\text{M}$  (mean IGPs = 220), Cr 50  $\mu\text{M}$  (mean IGPs = 190), Cr 150  $\mu\text{M}$  (mean IGPs = 296), Cd 125  $\mu\text{M}$  (mean IGPs = 184) and Cd 250  $\mu\text{M}$  (mean IGPs = 417).

Table 2 presents the results of DNA breakage in human lymphocytes metaphase chromosomes. The negative control exhibited only a few gold particles

(mean IGPs = 138, Fig. 3a). However, significant differences were observed between the negative control and all other treatments (Fig. 3) : MMS 500  $\mu\text{M}$  (mean IGPs = 314), Cr 50  $\mu\text{M}$  (mean IGPs = 274), Cr 150  $\mu\text{M}$  (mean IGPs = 611), Cd 125  $\mu\text{M}$  (mean IGPs = 279) and Cd 250  $\mu\text{M}$  (mean IGPs = 519). As compared with interphase nuclei, metaphase chromosome breaks seemed to be generally more abundant. Nevertheless, a pronounced concentration-dependent effect was observed for chromium and cadmium regardless of chromatin type. Finally, no cadmium results were available at concentrations higher than 250  $\mu\text{M}$  since the cadmium affects the structure of metaphase chromosomes.

### *3.3. Sister chromatid exchanges (SCEs), cell-cycle kinetics and mitotic index*

The effects of chromium and cadmium on the induction of SCEs in cultured human blood lymphocytes are presented in Table 3. The increase in SCEs produced by 150  $\mu\text{M}$  of Cr(VI) was highly significant compared with that of control : a 2-fold increase in the SCE frequency was observed. However, there was no significant difference in the SCE number after treatment with Cd(II). For the SCE test, it was required to adjust the concentration of cadmium to 125  $\mu\text{M}$  because at higher concentrations ( $\geq 150 \mu\text{M}$ ) very few mitoses were found intact and SCEs could not be scored.

To study the effects of chromium and cadmium exposure on lymphocyte cell-cycle kinetics, the metaphases in the first, second and third generation were differentiated on the basis of their staining properties (Table 3). The two metals produced a delay in the cell cycle as reflected by an increased frequency of cells in the 1st generation, and a parallel reduction of cells in 2nd- and 3rd-generation metaphases. The resulting proliferative index indicates that the proliferation of human lymphocytes exposed to chromium (150  $\mu\text{M}$ ) and cadmium (125  $\mu\text{M}$ ) was strongly inhibited (Table 3). Finally, the mitotic index in the presence of chromium and cadmium dropped from 8.9 % (negative control) to 3 % and to 1.4 % respectively.

#### **4. Discussion**

Very few *in vitro* tests directly localize DNA damage on chromosomes and nuclei at the EM level. As previously reported by Assad et al. [27], the EM-ISEL assay seems efficient to detect metal-induced DNA SSBs. It allowed us to test the genotoxic effects of cadmium and chromium compared to MMS which has been used extensively as a model for the DNA SSBs induction [28]. In our experiment, addition of cadmium chloride (125 and 250  $\mu\text{M}$ ) significantly caused the formation of DNA breaks in both metaphase chromosomes and interphase nuclei of human lymphocytes. In the literature, however, results concerning the clastogenic effect of cadmium are contradictory. Cadmium is generally considered as a weak clastogen which generates DNA strand breaks only after treatment at high cytotoxic concentrations [16]. For example, Hartman and Speit [29] reported no increase of DNA breaks in human

lymphocytes at concentrations of cadmium below 500  $\mu\text{M}$  after a 2 h exposure time. In contrast, other studies reported an increase of DNA breakage at low, non-cytotoxic concentrations of cadmium. For instance, Lopez-Ortal et al. [30] observed a significant increase of DNA SSBs in the alkaline single cell gel electrophoresis assay with human fetal hepatic cells treated with only 0.01  $\mu\text{M}$  of cadmium after a 3 h treatment. Besides, Mikhailova et al. [31] reported an increase of DNA breaks in human lymphoblastoid cells at cadmium concentrations between 5 and 50  $\mu\text{M}$  after a 4 h exposure period. An interesting study by Shiraishi et al. [32] have demonstrated that discordant results as mentioned above may arise due to variable levels of metallothionein (MT) recovered in the different cell types. After a short-term exposure (2 h), they observed a significant increase of DNA SSBs in a rat testicular Leydig cell line (R2C) after treatment with 25 and 50  $\mu\text{M}$  of  $\text{CdCl}_2$  [32]. However, their previous studies [33,34] only detected a significant increase of DNA breaks at  $\text{CdCl}_2$  concentrations higher than 250  $\mu\text{M}$  in cells derived from rat hepatocytes (TRL-1215) after a 2 h exposure time. The authors demonstrated that R2C cells show a minimal expression of the MT gene as opposed to TRL-1215 cells, which show an active expression of the MT gene.

Potassium chromate (50 and 150  $\mu\text{M}$ ) is also able to significantly increase DNA breakage in human lymphocytes. These results agree with many previous studies reviewed by De Flora et al. [9] demonstrating that hexavalent chromium induced DNA SSBs at micromolar concentrations in different systems. In the present

study, chromium appears more clastogenic than cadmium. Indeed, chromium at a concentration of 150  $\mu\text{M}$  is significantly more clastogenic than cadmium 125  $\mu\text{M}$  for both metaphase and interphase chromatin. Snyder [18] has also demonstrated that chromium(VI) produces more DNA breaks than cadmium in human fibroblasts after a 2 h exposure time. Similarly, we have shown that Cr(VI) induces cytotoxicity at much lower concentrations than Cd(II) in human lymphocytes. It is probably related to the fact that human cells seem relatively resistant to cadmium. For example, cadmium seems to be 13-fold less cytotoxic for the human skin fibroblasts than for the rat embryonic fibroblasts according to Lin et al. [35]. Finally, all the treatments have demonstrated a lower EM-ISEL labeling in nuclei compared to chromosomes. As already postulated by Assad et al. [6], the lower compaction present in nuclei may result in a lower density of DNA damage per  $\mu\text{m}^2$  of chromatin compared to the metaphase chromosomes.

Our results have also shown that potassium chromate increases the frequency of SCEs. These results are in concordance with several other studies that have reported positive induction SCEs results with Cr(VI) in both human and animal cells [36-38]. In contrast, cadmium chloride failed to induce a significant increase of SCEs at 125  $\mu\text{M}$  as observed in this study. After having removed metal salts and treated the cells 24 h with BrdU, higher concentrations of cadmium were toxic and prevented cell proliferation. These results agree with that of Hartmann and Speit [29] who also could not find any significant difference in the SCE inducing effect on human

lymphocytes after a 2 or 24 h exposure to cadmium sulphate at concentrations between 50 and 200  $\mu\text{M}$ . Similarly, other reported studies were also unable to show any elevated SCE levels in Chinese hamster cell lines [39,40]. In contrast, Han et al. [41] observed an increase of SCEs in human lymphocytes with cadmium concentrations between 5 and 50  $\mu\text{M}$  after treatment for the last 48 h. Also, Lin et al. [42] reported a significant increase of SCEs in Chinese hamster ovary cells due to cadmium. An interesting observation from Saplakoglu and Iscan [43] is the induction of SCEs by cadmium chloride in human lymphocytes which varied according to the phase of the cell cycle. Indeed, when cadmium was administered at the  $G_0$  phase, they observed no increase in the SCE frequency, however, when cadmium was administered at the early S phase, they observed a significant increase of SCEs. This could explain the contradictory results obtained with cadmium reported in the literature.

The EM-ISEL assay seems to be a more appropriate method than the SCE test to detect genotoxic agents. Indeed, chromium at a 150  $\mu\text{M}$  concentration provokes a drastic increase in DNA breaks (about 5 times) in metaphase chromosomes, whereas the increase in the SCEs is more modest (about twice as much) compared to that of the negative control. Similarly, in the presence of 125  $\mu\text{M}$  of cadmium the SCE test does not show any increase in frequency, while the EM-ISEL test shows a strong increase of DNA breaks. However, the new EM-ISEL assay involves some prerequisites. The structure of chromosomes must stay intact and mitotic index must

be high, especially for EM. Unfortunately, chromium and cadmium reduce the mitotic index and slow down the cellular cycle (Table 3). Moreover, at concentrations higher than 250  $\mu\text{M}$ , the cadmium affects the structure of chromosomes. The latter appeared decondensed and the labeling counts became extremely difficult. Some studies indicate that Cd(II) ions bind to nucleic acids and cause structural destabilisation of the DNA molecule [15,16], but no study has precisely referred to a potential change in chromosome structure. We hypothesize that cadmium can bind to chromosomal proteins and disturb their functions, such as the attachment of chromatid loops within the chromosome.

The present data indicate that Cr(VI) and Cd(II) can induce DNA SSBs in metaphase and interphase chromatids and that these can be scored using the new EM-ISEL assay. On the other hand, Cd(II) is not capable of inducing SCEs as opposed to Cr(VI) under the experimental conditions used. This study brings some complementary information on the genotoxicity of Cr(VI) and Cd(II) and allows the validation of a new technique to quantify metal genotoxicity. However, further investigations are necessary to document cadmium genotoxicity which even today is controversial and poorly understood.

### **Acknowledgments**

The authors would like to thank the Pathology Department (Hôpital Ste-Justine, Montréal) for use of their EM facilities. They also want to thank Dr. C.L.

Richer and S. Bérubé for carefully reading this manuscript, F. Fortin for her competent technical assistance, as well as J. Léveillé for his excellent photographic work.

## References

- [1] R.A. McGrath, R.W. Williams. Reconstruction *in vivo* of irradiated *E. coli* DNA; the rejoining of broken pieces, *Nature*, 212 (1966) 534-535.
- [2] K.W. Kohn, R. Grimek-Ewig. Alkaline elution analysis, a new approach to the study of DNA single-strand interruptions in cells, *Cancer Res.*, 33 (1973) 1849-1853.
- [3] R.H. Lin, C.H. Lee, W.K. Chen, S.Y. Lin-Shiau. Studies on cytotoxic and genotoxic effects of cadmium nitrate and lead nitrate in Chinese hamster ovary cells, *Environ. Mol. Mutagen.*, 23 (1994) 143-149.
- [4] J. Gosalvez, C. Lopez-Fernandez, C. Garcia de la Vega, R. Mezzanotte, J.L. Fernandez, V. Goyanes. Selective digestion of mouse chromosomes with restriction endonucleases. Oligonucleotide priming of single-stranded DNA produced with exonuclease, *Genome*, 36 (1993) 230-234.
- [5] J.L. Fernandez, J. Gosalvez, V.J. Goyanes. Detection of DNA strand breaks induced by hydroxyl radicals in nuclear and chromosomal chromatin by electron microscopy, *Cytobios*, 73 (1993) 189-195.
- [6] M. Assad, C.H. Rivard, L.H. Yahia, N. Lemieux. Comparative *in vitro* biocompatibility of nickel-titanium, pure nickel, pure titanium, and stainless steel: genotoxicity and atomic absorption evaluation, *Biomed. Mater. Eng.*, 9 (1999) 1-12.
- [7] IARC. Chromium, Nickel and Welding, in: IARC, *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans* Vol. 49, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1990, pp. 49-256.



- [8] IARC. Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry, in: IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to humans Vol. 58, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 1993, pp. 41-117.
- [9] S. De Flora, M. Bagnasco, D. Serra, P. Zanicchi. Genotoxicity of chromium compounds, A review, *Mutation Res.*, 238 (1990) 99-172.
- [10] K.W. Jennette. Chromate metabolism in liver microsomes, *Biol. Trace Elem. Res.*, 1 (1979) 55-62.
- [11] S. De Flora, K.E. Wetterhahn. Mechanisms of chromium metabolism and genotoxicity, *Life Chem. Rep.*, 7 (1989) 169-244.
- [12] J. Aiyar, H.J. Berkovits, R.A. Floyd, K.E. Wetterhahn. Reaction of chromium(VI) with hydrogen peroxide in the presence of glutathione: reactive intermediates and resulting DNA damage, *Chem. Res. Toxicol.*, 3 (1990) 595-603.
- [13] X. Shi, N.S. Dalal. Evidence for a Fenton-type mechanism for the generation of  $\cdot\text{OH}$  radicals in the reduction of Cr(VI) in cellular media, *Arch. Biochem. Biophys.*, 281 (1990) 90-95.
- [14] A. Kortenkamp, Z. Ozolins, D. Beyersmann, P. O'Brien. Generation of PM2 DNA breaks in the course of reduction of chromium(VI) by glutathione, *Mutation Res.*, 216 (1989) 19-26.
- [15] K.B. Jacobson, J.E. Turner. The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids, *Toxicology*, 16 (1980) 1-37.
- [16] D. Beyersmann, S. Hechtenberg. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in Mammalian cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 144 (1997) 247-261.
- [17] T. Ochi, T. Ishiguro, M. Ohsawa. Participation of active oxygen species in the induction of DNA single-strand scissions by cadmium chloride in cultured Chinese hamster cells, *Mutation Res.*, 122 (1983) 169-175.

- [18] R.D. Snyder. Role of active oxygen species in metal-induced DNA strand breakage in human diploid fibroblasts, *Mutation Res.*, 193 (1988) 237-246.
- [19] M. Sugiyama. Role of cellular antioxidants in metal-induced damage, *Cell Biol. Toxicol.*, 10 (1994) 1-22.
- [20] K.S. Kasprzak. Possible role of oxidation damage in metal-induced carcinogenesis, *Cancer Invest.*, 13 (1995) 411-430.
- [21] A. Hartwig. Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: a review, *Environ. Health Perspect.*, 102 (1994) 45-50.
- [22] H. Dally, A. Hartwig. Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel (II) and cadmium (II) in mammalian cells, *Carcinogenesis*, 18 (1997) 1021-1026.
- [23] M. Fotino, E.J. Merson, F.H. Allen. Micromethod for rapid separation of lymphocytes from peripheral blood, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 1 (1971) 131-133.
- [24] N. Lemieux, R. Drouin, C.L. Richer. High-resolution dynamic and morphological G-bandings (GBG and GTG); comparative study, *Hum. Genet.*, 85 (1990) 261-266.
- [25] P.E. Messier, P. Jean, C.L. Richer. Easy transfer of selected mitoses from light to electron microscopy, *Cyto-genet. Cell Genet.*, 43 (1986) 207-210.
- [26] P. Perry, S. Wolff. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids, *Nature*, 258 (1974) 121-125.
- [27] M. Assad, L.H. Yahia, C.H. Rivard, N. Lemieux. *In vitro* biocompatibility assessment of a Nickel-Titanium alloy using electron microscopy *in situ* end-labeling (EM-ISEL), *J. Biomed. Mater. Res.*, 41 (1998) 154-161.
- [28] M. Boerrigter, E. Mullaart, J. Vijg. Induction and disappearance of DNA strand breaks in human peripheral blood lymphocytes and fibroblasts treated with methyl methanesulfonate, *Exp. Cell Res.*, 192 (1991) 61-66.

- [29] A. Hartmann, G. Speit. Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cell gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test, *Environ. Mol. Mutagen.*, 23 (1994) 299-305.
- [30] P. Lopez-Ortal, V. Souka, L. Bucio, E. Gonzalez, M.C. Gutierrez-Ruiz. DNA damage produced by cadmium in a human fetal hepatic cell line, *Mutation Res.*, 439 (1999) 301-306.
- [31] M.V. Mikhailova, N.A. Littlefield, B.S. Hass, L.A. Poirier, M.W. Chou. Cadmium-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation, DNA strand breaks and antioxidant enzyme activities in lymphoblastoid cells, *Cancer Lett.*, 115 (1997) 141-148.
- [32] N. Shiraishi, J.F. Hochadel, T.P. Coogan, J. Koropatnick, P. Waalkes. Sensitivity to cadmium-induced genotoxicity in rat testicular cells is associated with minimal expression of the metallothionein gene, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 130 (1995) 229-236.
- [33] T.P. Coogan, R.M. Bare, M.P. Waalkes. Cadmium-induced DNA strand damage in cultured liver cells : reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 113 (1992) 227-233.
- [34] T.P. Coogan, R.M. Bare, E.J. Bjornson, M.P. Waalkes. Enhanced metallothionein gene expression is associated with protection against cadmium-induced genotoxicity in cultured rat liver cells, *J. Toxicol. Environ. Health*, 41 (1994) 233-245.
- [35] C.J. Lin, K.H. Wu, F.H. Yem, T.C. Lee. Differential cytotoxicity of cadmium to rat embryonic fibroblasts and human skin fibroblasts, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 133 (1995) 20-26.
- [36] A.G. Levis, F. Majone. Cytotoxic and clastogenic effects of soluble and insoluble compounds containing hexavalent and trivalent chromium, *Br. J. Cancer*, 44 (1981) 219-235.
- [37] M. Stella, A. Montaldi, R. Rossi, G. Rossi, A.G. Levis. Clastogenic effects of chromium on human lymphocytes in vitro and in vivo, *Mutation Res.*, 101 (1982) 151-164.

- [38] V. Bianchi, L. Celotti, G. Lanfranchi, F. Majone, G. Marin, A. Montaldi, G. Sponza, G. Tamino, P. Venier, A. Zantedeschi, A.G. Levis. Genetic effects of chromium compounds, *Mutation Res.*, 117 (1983) 279-300.
- [39] L.L. Deaven, E.W. Campbell. Factors effecting the induction of chromosomal aberrations by cadmium in Chinese hamster cells, *Cyto-genet. Cell Genet.*, 26 (1980) 251-260.
- [40] H. Ohno, F. Hanaoka, M. Yamada. Inducibility of sister chromatid exchanges by heavy metal ions, *Mutation Res.*, 104 (1982) 141-145.
- [41] C. Han, G. Wu, Y. Yin, M. Shen. Inhibition by germanium oxide of the mutagenicity of cadmium chloride in various genotoxicity assays, *Food Chem. Toxicol.*, 30 (1992) 521-524.
- [42] R.H. Lin, C.H. Lee, W.K. Chen, S.Y. Lin-Shiau. Studies on cytotoxic and genotoxic effects of cadmium nitrate and lead nitrate in chinese hamster ovary cells, *Environ. Mol. Mutagen.*, 23 (1994) 143-149.
- [43] U. Saplakoglu, M. Iscan. Sister chromatid exchanges in human lymphocytes treated in vitro with cadmium in G(0) and S phase of their cell cycles, *Mutation Res.*, 23 (1998) 299-305.

**Legend to figures**

- Figure 1. Dose-response curve of (a) potassium chromate and (b) cadmium chloride cytotoxicity assayed by Trypan blue exclusion test in human lymphocytes after 2 hours of exposure. Each value is the mean  $\pm$  SD of three separate experiments. \*p < 0.05 compared with negative control.
- Figure 2. Electron microscopy *in situ* end-labeling of lymphocyte interphase nuclei : (a) untreated, (b) MMS-treated, (c) 250  $\mu$ M Cd-treated, (d) 150  $\mu$ M Cr-treated.
- Figure 3. Electron microscopy *in situ* end-labeling of lymphocyte metaphase chromosomes : (a) untreated, (b) MMS-treated, (c) 250  $\mu$ M Cd-treated, (d) 150  $\mu$ M Cr-treated.

TABLE 1

LABELING DENSITY FOR DNA STRAND BREAKS (NUMBER OF IMMUNOGOLD PARTICLES PER  $\mu\text{m}^2 \pm \text{SD}$ ) BY EM-ISEL IN HUMAN LYMPHOCYTE NUCLEAR CHROMATIN

Treatment	Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Particles (per $\mu\text{m}^2$ ) <sup>a</sup>	SD
Negative control <sup>b</sup>	-	93	9
Positive control <sup>c</sup>	500	200*	14
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$	50	190*	14
	150	296*	15
$\text{CdCl}_2$	125	184*	13
	250	417*	16

<sup>a</sup> Particles were scored on 10 nuclei per treatment.

<sup>b</sup> Negative control was composed of supplemented RPMI 1640 medium and colcemid.

<sup>c</sup> Positive control was done by adding methyl methanesulfonate.

\*  $p < 0.001$  versus control.

TABLE 2

LABELING DENSITY FOR DNA STRAND BREAKS (NUMBER OF IMMUNOGOLD PARTICLES PER  $\mu\text{m}^2 \pm \text{SD}$ ) BY EM-ISEL IN HUMAN LYMPHOCYTE METAPHASIC CHROMOSOMES

Treatment	Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Particles (per $\mu\text{m}^2$ ) <sup>a</sup>	SD
Negative control <sup>b</sup>	-	138	15
Positive control <sup>c</sup>	500	314*	24
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_4$	50	274*	18
	150	651*	36
$\text{CdCl}_2$	125	279*	22
	250	519*	25

<sup>a</sup> Particles were scored on 10 chromosomes of different metaphases.

<sup>b</sup> Negative control was composed of supplemented RPMI 1640 medium and colcemid.

<sup>c</sup> Positive control was done by adding methyl methanesulfonate.

\*  $p < 0.001$  versus control.

TABLE 3

## INDUCTION OF SISTER CHROMATID EXCHANGES AND EVALUATION OF CELL-CYCLE KINETICS IN HUMAN LYMPHOCYTES

Treatment	Conc. (μM)	M <sub>1</sub> %	M <sub>2</sub> %	M <sub>3</sub> %	Proliferation Index <sup>a</sup>	SCEs per metaphase <sup>b</sup>	Mitotic index <sup>c</sup> %
Negative control <sup>d</sup>	-	25	69	6	1.81	7.7 ± 1.9	8.9
K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	150	66	34	0	1.34	18.6 ± 4.3*	3.0
CdCl <sub>2</sub>	100	46	54	0	1.54	7.5 ± 1.8	6.0
	125	54	43	3	1.49	6.3 ± 2.5	1.4

<sup>a</sup> Evaluated on 100 metaphases.

<sup>b</sup> SCEs were scored on 50 metaphases per treatment.

<sup>c</sup> Evaluated on 1000 cells.

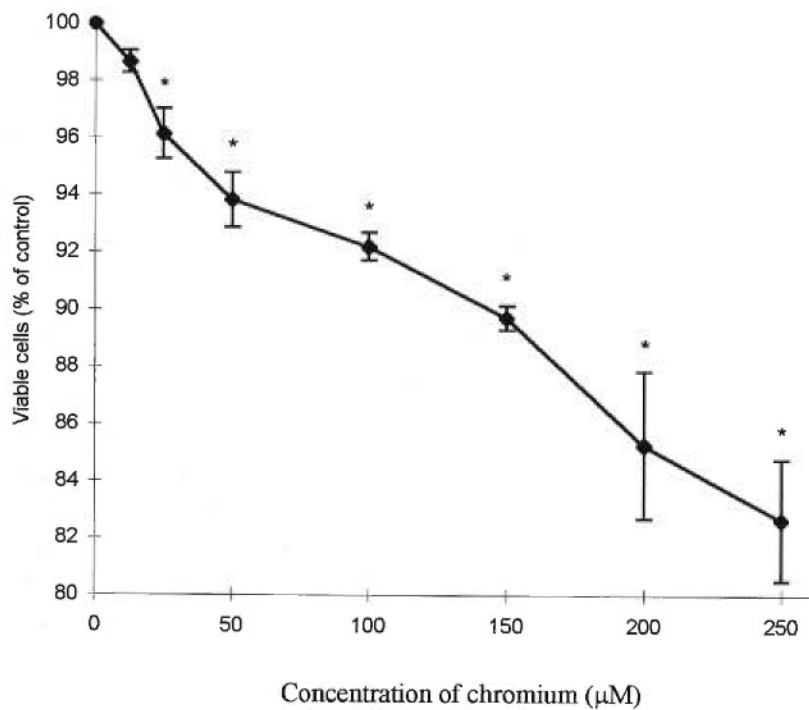
<sup>d</sup> Negative control was composed of supplemented RPMI 1640 medium, BrdU and colcemid.

\* p < 0.05 versus control.

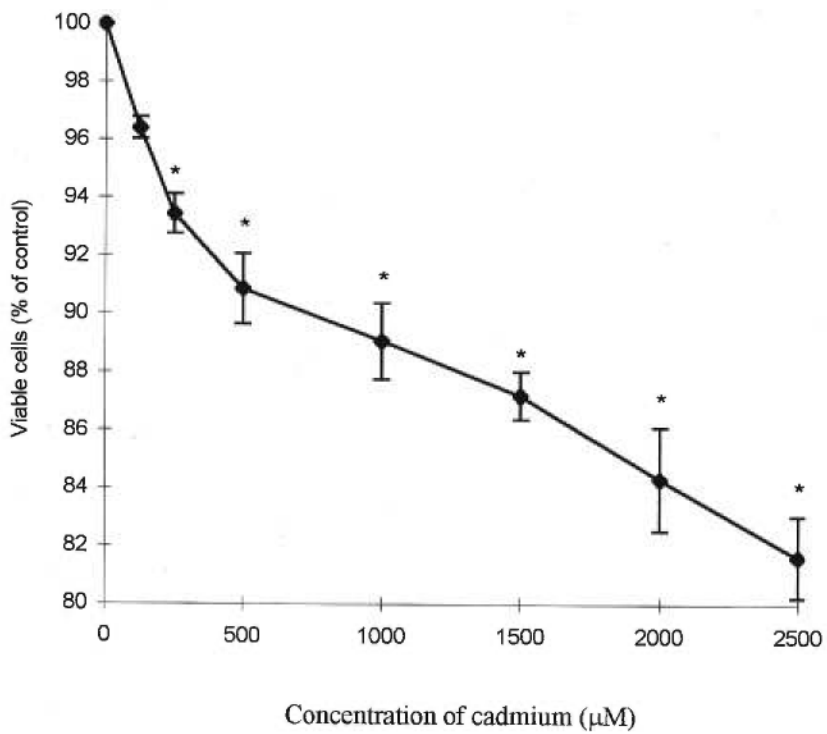


Figure 1

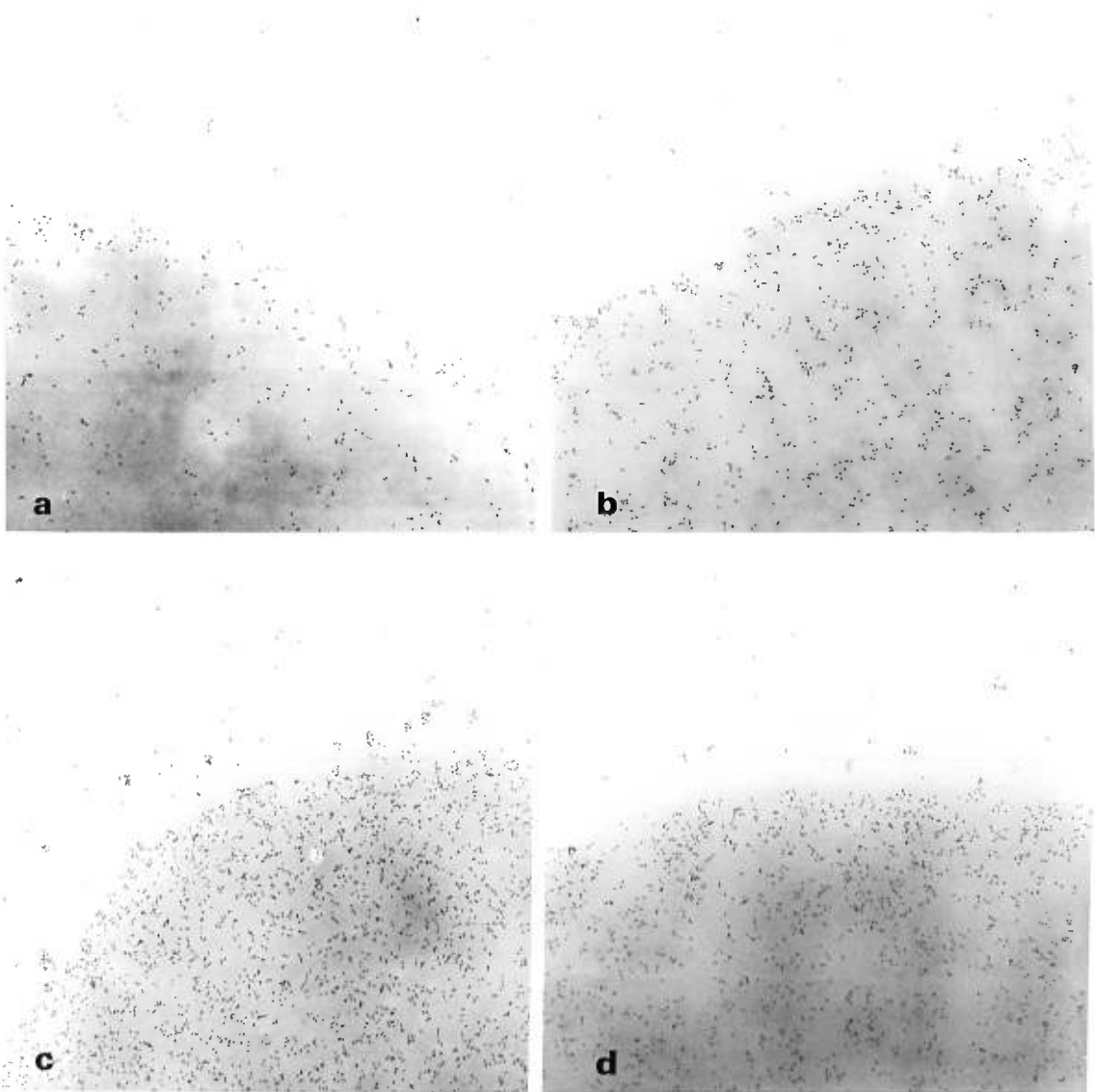
A



B

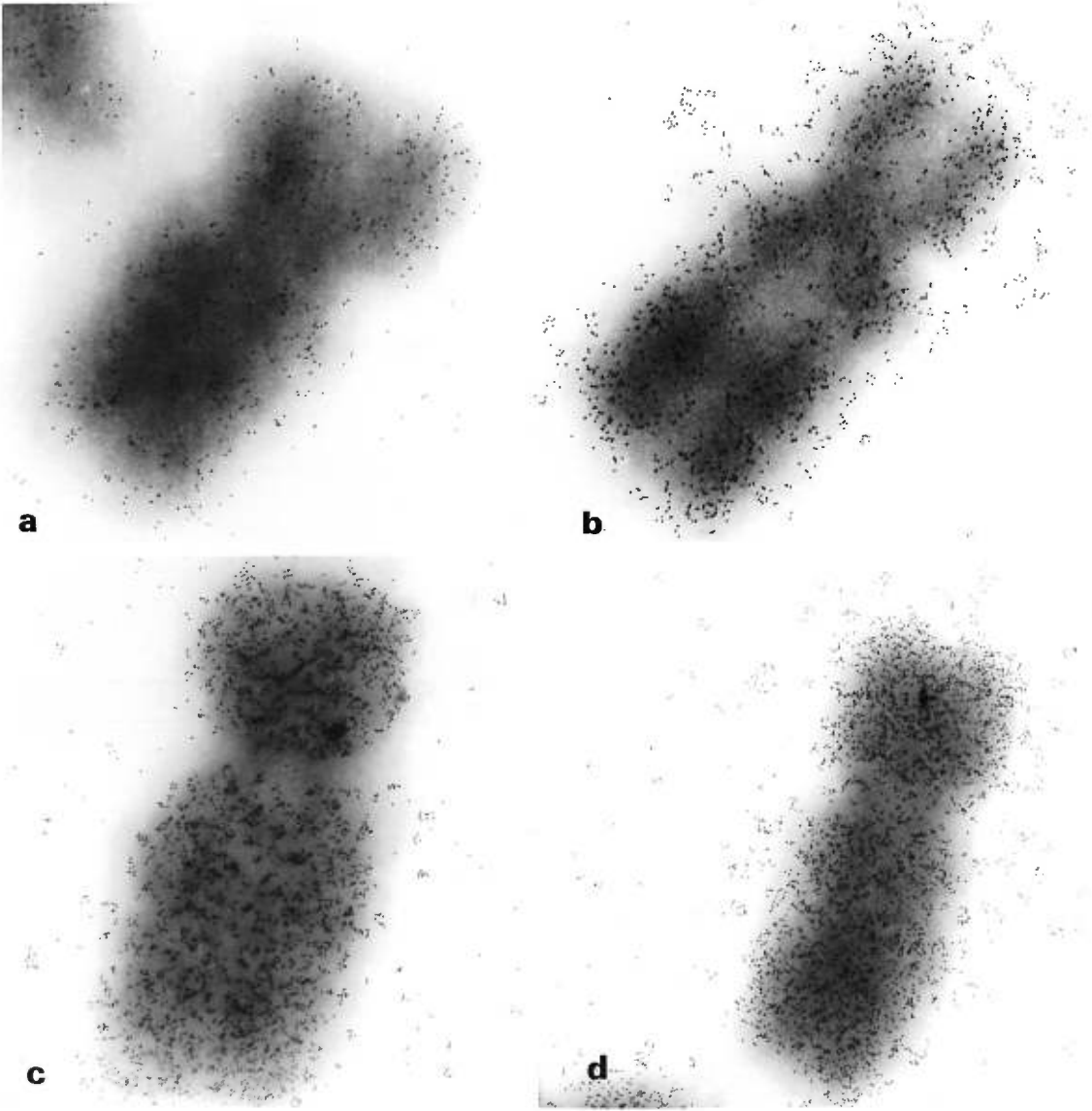


**Figure 2**



1 $\mu$ m

**Figure 3**



**1μm**

---

## **CHAPITRE IV**

### **DISCUSSION GÉNÉRALE**

Avant de parler de nos résultats, nous allons aborder deux questions fréquemment soulevées par nos travaux. Premièrement, pourquoi avons-nous utilisé des lymphocytes sanguins? Le but ultime de nos recherches est d'employer l'essai EM-ISEL sur des cellules humaines provenant de personnes exposées aux métaux. En cytogénétique, les cellules les plus accessibles et les plus utilisées sont les lymphocytes et les fibroblastes (Dutrillaux et Couturier, 1981). Comme il est plus facile d'obtenir une prise de sang qu'un échantillon de peau, nous avons décidé de mettre au point la technique EM-ISEL directement sur des lymphocytes sanguins. Le prélèvement et l'ensemencement de quelques millilitres de sang permettent d'obtenir un bon nombre de cellules en division. De plus, *in vivo*, les lymphocytes sanguins sont fréquemment en contact avec les métaux qui sont transportés dans le sang par les cellules nucléées à travers tous les tissus (Enger et coll., 1983).

Deuxièmement, est-ce que les concentrations de chrome et de cadmium employées dans cette recherche sont équivalentes aux concentrations retrouvées dans l'environnement? Pour produire des effets génotoxiques à court terme, il est nécessaire d'exposer les cellules à de fortes concentrations de métaux (exposition aiguë). Par conséquent, les doses de chrome et de cadmium utilisées dans cette étude sont supérieures à celles généralement retrouvées dans l'environnement ou dans le corps humain. Par exemple, le niveau de cadmium dans le sang ne dépasse guère les 3  $\mu\text{M}$  même chez les individus très exposés (Enger et coll., 1983). Dans un avenir rapproché, nous projetons de tester la génotoxicité de ces deux métaux à plus long terme (exposition chronique). Les lymphocytes en culture peuvent être exposés aux

agents toxiques durant une plus grande période de temps à des concentrations équivalentes à celles retrouvées *in vivo* (Hayes, 1982).

Comme mentionné précédemment, le but de ce mémoire est d'aider à clarifier la génotoxicité du chrome et du cadmium dans les lymphocytes humains et de valider l'essai EM-ISEL comme nouvel outil de détection des agents génotoxiques. Assad et coll. (1999) ont précédemment évalué dans notre laboratoire la génotoxicité du nickel-titane, du titane pur, du nickel pur et de l'acier inoxydable par EM-ISEL. Notre étude présente l'originalité d'utiliser le chrome et le cadmium sous forme de sels métalliques qui, contrairement aux poudres de métal employées par Assad et coll., permettent le calcul exact des concentrations utilisées et offre la possibilité d'observer des effets de dose-réponses. De plus, cette étude compare la sensibilité de la nouvelle technique EM-ISEL avec le test standard des échanges entre chromatides sœurs dans des conditions semi-physiologiques semblables. Finalement, nous avons évalué la viabilité des lymphocytes ce qui nous permet de corréler les effets cytotoxiques du chrome et du cadmium aux effets génotoxiques.

## **1. TEST DE CYTOTOXICITÉ**

Pour commencer, nous avons évalué la cytotoxicité du chrome et du cadmium dans le but de déterminer les concentrations optimales à employer pour les tests de génotoxicité. Les mécanismes cytotoxiques des métaux sont peu connus (Steffensen et coll., 1994). Plusieurs métaux exerceraient leurs effets cytotoxiques en endommageant les membranes cellulaires (Sorensen et coll., 1985; Steffensen et coll., 1994).

Nos résultats démontrent que le chrome est 10 fois plus cytotoxique que le cadmium dans les lymphocytes humains après 2 h d'exposition. En effet, on observe une diminution significative de la viabilité des lymphocytes à des concentrations de chrome égales ou supérieures à 25  $\mu\text{M}$ , tandis qu'aucune diminution de la viabilité n'est observée à des concentrations de cadmium inférieures à 250  $\mu\text{M}$  (Figure 1, chapitre III). Ces résultats corroborent ceux de Snyder (1988) qui indiquent que le Cr(VI) est plus cytotoxique que le Cd(II) après 1 h d'exposition dans des fibroblastes humains. Comparé au chrome, de fortes concentrations de cadmium (de l'ordre du millimolaire) furent nécessaires pour induire la mortalité de nos cellules. Deux hypothèses peuvent expliquer la faible cytotoxicité du cadmium. Premièrement, les lymphocytes ont été exposés au cadmium durant un court laps de temps (2 h). Steffensen et coll. (1994) mentionnent que le cadmium doit être en présence des lymphocytes humains durant au moins 17 h avant d'exercer ses effets cytotoxiques. Deuxièmement, les cellules humaines sont beaucoup moins sensibles au cadmium que les cellules animales. Par exemple, le cadmium est 13 fois moins cytotoxique dans les lymphocytes humains que dans les lymphocytes de rats (Lin et coll., 1995). La raison de cet écart vient du fait que les cellules de rats accumulent 12 fois plus de cadmium dans leurs noyaux. Ces fortes quantités de cadmium provoqueraient la mort des cellules par un dérèglement des fonctions nucléaires (Lin et coll., 1995). Ce phénomène pourrait expliquer pourquoi certains auteurs comme Sugiyama et coll. (1993) constatent au contraire que le cadmium est plus cytotoxique que le chrome dans des cellules animales après 1 h d'exposition.



## 2. TESTS DE GÉNOTOXICITÉ

### 2.1 Détection des bris simple-brin par EM-ISEL

Par la suite, nous avons détecté les bris simple-brin de l'ADN à l'aide du nouvel essai EM-ISEL. Dans le contrôle négatif, la densité des bris dans les noyaux en interphase (75 particules par  $\mu\text{m}^2$ ) et les chromosomes en métaphase (138 particules par  $\mu\text{m}^2$ ) est relativement faible (Tableau 1 et 2, chapitre III). Ce marquage provient probablement des manipulations physico-chimiques ou des cassures spontanées généralement retrouvées dans les cellules vivantes (Fernandez et coll., 1993). Comparativement au contrôle négatif, les cellules exposées durant deux heures à 500  $\mu\text{M}$  de méthyle méthanesulfonate (MMS) montrent un accroissement significatif des bris dans les noyaux en interphase (220 particules par  $\mu\text{m}^2$ ) et les chromosomes en métaphase (314 particules par  $\mu\text{m}^2$ ). Le MMS est un produit chimique employé depuis de nombreuses années pour l'étude des dommages alkylants et des bris simple-brin dans l'ADN (Boerrigter et coll., 1991). Ces résultats attestent que l'essai EM-ISEL est une méthode efficace pour détecter les cassures provoquées par les agents toxiques. Ceci nous permet maintenant d'évaluer la clastogénéicité du chrome et du cadmium.

Nos résultats démontrent qu'une exposition de deux heures au chromate de potassium ou Cr(VI) à des doses légèrement cytotoxiques, provoque dans les

lymphocytes humains une augmentation significative des cassures comparativement au contrôle négatif. En effet, l'ajout de 50  $\mu\text{M}$  de chrome induit un accroissement important des bris dans les noyaux en interphase (190 particules par  $\mu\text{m}^2$ ) et les chromosomes en métaphase (274 particules par  $\mu\text{m}^2$ ). De plus, l'effet du chrome augmente en fonction de la dose utilisée : l'addition de 150  $\mu\text{M}$  de chrome provoque un accroissement des bris significativement différent du chrome 50  $\mu\text{M}$ , dans les noyaux en interphase (296 particules par  $\mu\text{m}^2$ ) et les chromosomes en métaphase (651 particules par  $\mu\text{m}^2$ ). Le chrome est sans contredit un métal très étudié pour ses effets génotoxiques (De Flora et coll., 1990). De nombreuses recherches témoignent du puissant potentiel clastogène du chrome hexavalent (Revu par De Flora et coll., 1990). Dans la plupart de ces études, de faibles concentrations de chrome (1 à 15  $\mu\text{M}$ ) sont suffisantes pour induire une augmentation des bris (De Flora et coll., 1990). Dans l'ensemble, aux concentrations employées dans ce travail, l'EM-ISEL détecte les cassures de l'ADN à des concentrations de chrome comparables à celles employées dans les autres tests.

Pour ce qui est du chlorure de cadmium ou Cd(II), nos résultats indiquent qu'il provoque lui aussi à des doses non cytotoxiques ou légèrement cytotoxiques, une augmentation significative des cassures dans les lymphocytes humains. L'ajout de 125  $\mu\text{M}$  de cadmium entraîne un accroissement significatif des bris dans les noyaux en interphase (184 particules par  $\mu\text{m}^2$ ) et les chromosomes en métaphase (279 particules par  $\mu\text{m}^2$ ). L'effet du cadmium augmente également selon la dose utilisée :

l'addition de 250  $\mu\text{M}$  de cadmium provoque une augmentation des bris significativement différente du cadmium 125  $\mu\text{M}$ , dans les noyaux en interphase (417 particules par  $\mu\text{m}^2$ ) et les chromosomes en métaphase (519 particules par  $\mu\text{m}^2$ ). Dans la littérature, les résultats concernant les propriétés clastogéniques du cadmium sont inconsistants et contradictoires. Beyersmann et Hechtenberg (1997) soutiennent que le cadmium est faiblement clastogène et nécessite des concentrations élevées et cytotoxiques pour induire des bris. Plusieurs études *in vitro* viennent corroborer cette affirmation. Par exemple, Hartmann et Speit (1994) n'observent aucune augmentation des cassures de l'ADN dans les lymphocytes humains à des concentrations de cadmium inférieures à 500  $\mu\text{M}$  après 2 h d'exposition. De même, Coogan et coll. (1992, 1994) est incapable de provoquer des bris dans des cellules de rats à des doses de cadmium inférieures à 250  $\mu\text{M}$  après 2 h d'exposition. À l'opposé, d'autres études signalent une augmentation importante des cassures de l'ADN dans des cellules en culture exposées à des concentrations de cadmium très faibles et non cytotoxiques. Par exemple, Lopez-Ortal et coll. (1999) observent un accroissement significatif des bris de l'ADN dans des cellules humaines hépatiques traitées avec seulement 0,01  $\mu\text{M}$  de cadmium après 3 h d'exposition. De même, Mikhailova et coll. (1997) notent une augmentation significative des cassures de l'ADN dans des lymphocytes humains exposés à des doses de cadmium variant entre 5 et 50  $\mu\text{M}$  après 4 h d'exposition. Finalement, Shiraishi et coll. (1995) observent une augmentation significative des cassures de l'ADN dans des cellules de rats exposées à des concentrations de cadmium variant entre 25 et 50  $\mu\text{M}$  après 2 h d'exposition.

Nos résultats semblent se situer à mi-chemin entre ces deux groupes. Nous obtenons de fortes augmentations des cassures de l'ADN à des concentrations de cadmium très peu cytotoxiques. Des études supplémentaires seraient nécessaires pour identifier la source des divergences concernant la clastogénéicité du cadmium. La sensibilité des différentes méthodes de détection des bris de l'ADN est probablement en cause. D'autres évidences suggèrent que les différents niveaux de métallothionéine retrouvés dans les divers types de cellules puissent entraîner des résultats contradictoires. Par exemple, Shiraishi et coll. (1995) ont démontré que les cellules de rat qui expriment faiblement la métallothionéine sont 10 fois plus sensibles aux effets clastogènes du cadmium que les cellules de rat qui l'expriment normalement.

Le but premier de ce projet n'est pas de comparer la génotoxicité du chrome et du cadmium, mais bien de vérifier si ces deux métaux (possédant des mécanismes génotoxiques différents) sont en mesure d'induire des bris détectables par la technique EM-ISEL. Il demeure cependant intéressant de faire quelques comparaisons. Dans l'ensemble, le chrome semble plus clastogène que le cadmium. Par exemple, l'ajout de 150  $\mu\text{M}$  de chrome provoque une augmentation des cassures largement supérieure à celle provoquée par l'addition de 125  $\mu\text{M}$  de cadmium dans la chromatine nucléaire et chromosomique (Tableau 1 et 2, chapitre III). Snyder (1988) a comparé la clastogénéicité de six métaux dans des fibroblastes humains suite à une exposition de 2 h. Le chrome(VI) arrive premier, loin devant le sélénium, le cadmium, le zinc, le magnésium et le manganèse.

La technique EM-ISEL permet également d'observer les bris simple-brin de l'ADN à différents moments durant le cycle cellulaire. Dans l'ensemble des traitements, les cassures simple-brin sont plus abondantes dans les chromosomes en métaphase que dans les noyaux en interphase (Tableau 1 et 2, Chapitre III). Deux hypothèses peuvent expliquer ces résultats. Premièrement, le degré de compaction de la chromatine métaphasique est plus élevé que celui de la chromatine interphasique; il est alors normal de retrouver une plus grande densité de bris par  $\mu\text{m}^2$  dans les chromosomes en métaphase (Assad et coll., 1999). Deuxièmement, il est également possible qu'à certains moments du cycle cellulaire (durant la mitose par exemple), la cellule soit plus sensible aux dommages induits à l'ADN.

Enfin, un des principaux avantages de l'essai EM-ISEL est de permettre une visualisation des bris simple-brin directement sur la chromatine nucléaire et chromosomique. En général, les cassures sont réparties de façon uniforme sur la surface des noyaux et des chromosomes. Cependant, comme certains auteurs l'ont préalablement rapporté, les chromosomes montrent peu de marquage au niveau de la région centromérique (Figure 2, chapitre III). Fernandez et coll. (1993) suggèrent qu'une grande compaction de la chromatine puisse limiter l'accès des agents toxiques près de l'ADN et empêcher la formation des cassures. Ils suggèrent également que cette grande compaction puisse entraver la détection des bris en diminuant l'accès aux enzymes et aux anticorps employés dans l'essai EM-ISEL.

## 2.2 Échanges entre chromatides sœurs (ECSs)

Nous avons ensuite employé le test standard des ECSs pour valider les résultats obtenus avec l'EM-ISEL. Nos résultats montrent que l'ajout de 150  $\mu\text{M}$  de chrome (18.6 échanges par métaphase) provoque une augmentation significative des échanges dans les lymphocytes humains comparativement au contrôle (7.7 échanges par métaphase) (Tableau 3, chapitre III; figure 1, chapitre IV). Nos résultats concordent avec ceux de la littérature qui indiquent que le Cr(VI) a la capacité d'accroître fortement la fréquence des ECSs à des concentrations très faibles dans différents types de cellules (Levis et Majone, 1979, 1981; Gainaldi et coll., 1982; Stella et coll., 1982; Bianchi et coll., 1983; Sen et Costa, 1986). À l'inverse, nos résultats ne montrent aucune augmentation des ECSs dans les lymphocytes exposés à 125  $\mu\text{M}$  de cadmium (6.3 échanges par métaphase). Dans la littérature, les résultats concernant l'induction des ECSs par le cadmium sont contradictoires. Plusieurs études ne rapportent aucune augmentation des ECSs dans des cellules humaines et animales. Par exemple, Hartmann et Speit (1994) n'observent aucun accroissement des échanges dans les lymphocytes humains à des concentrations de cadmium variant entre 50 et 200  $\mu\text{M}$  et ce, après différents temps d'exposition (2 et 24 h). De même, Deaven et Campbell (1980) ainsi que Onho et coll. (1982) n'observent aucun accroissement des ECSs dans des cellules de hamster exposées au cadmium. À l'opposé, Han et coll. (1992) rapportent un accroissement significatif des échanges dans les lymphocytes humains à des concentrations de cadmium variant entre 5 et 50  $\mu\text{M}$  après 48 h d'exposition. De plus, Lin et coll. (1994) observent un accroissement

significatif des ECSs dans des cellules de hamster à des doses variant entre 300 et 3000  $\mu\text{M}$  après 2 h d'exposition. Une étude récente de Saplakoglu et Iscan (1998) révèle que l'induction des ECSs par le cadmium peut varier selon le stade d'exposition des cellules durant le cycle cellulaire. Lorsque des lymphocytes humains sont exposés au cadmium durant la phase  $G_0$ , aucune augmentation des ECSs n'est observée, par contre, lorsque les cellules sont exposées au cadmium durant la phase S, ces auteurs constatent une forte augmentation des ECSs. Ce phénomène pourrait expliquer en partie les résultats contradictoires obtenus avec le cadmium.

Comparée au test des ECSs, l'EM-ISEL semble être une méthode plus sensible pour détecter les agents génotoxiques. Le test des ECSs ne présente aucune augmentation en présence de 125  $\mu\text{M}$  de cadmium tandis que l'EM-ISEL montre une forte augmentation des bris simple-brin pour une même concentration. De plus, comparativement au contrôle négatif, l'ajout de 150  $\mu\text{M}$  de chrome provoque une augmentation drastique des cassures dans les chromosomes en métaphase (environ 5 fois), alors que l'augmentation des ECSs demeure beaucoup plus modeste (environ 2 fois).

Dans le test des ECSs, il nous a été très difficile d'employer des concentrations de cadmium supérieures à 125  $\mu\text{M}$ . Des concentrations plus élevées ont considérablement ralenti la prolifération cellulaire. Les équipes de Hartmann et Speit (1994) et de Saplakoglu et Iscan (1998) ont également été confronté au même problème. Pourtant, nous avons obtenu un nombre suffisant de mitoses avec 125 et

250  $\mu\text{M}$  de cadmium dans l'essai EM-ISEL. De plus, notre test de cytotoxicité fait préalablement avait révélé une faible mortalité des lymphocytes à des concentrations de cadmium variant entre 125 et 2500  $\mu\text{M}$ . Contrairement à ces deux tests, la méthode des ECSs requiert que les cellules soient en présence de BrdU durant deux cycles cellulaires consécutifs (24h) après l'ajout de l'agent toxique. Pour conserver le même temps d'exposition que dans les tests précédents, les cellules ont été exposées au cadmium pendant 2 h, lavées (pour se débarrasser des métaux) et remises en culture pendant 24 h dans un milieu contenant du BrdU. Malheureusement, à des concentrations supérieures à 125  $\mu\text{M}$  de cadmium, un bon nombre de cellules étaient mortes après 24 h. Ces résultats suggèrent que le cadmium prend un certain temps pour exercer ses effets toxiques après avoir pénétré la cellule. Des expériences présentement en cours dans notre laboratoire tentent de prouver cette hypothèse. Ces expériences consistent à exposer les cellules à différentes concentrations de cadmium (variant entre 5 et 500  $\mu\text{M}$ ) durant 2 h, à les laver et à les remettre en culture pour évaluer leur viabilité après différents temps de culture (6, 12, 24 et 48 h). Des tubes témoins (sans exposition préalable des cellules) sont également faits en parallèle. Des résultats préliminaires révèlent que, contrairement aux cellules témoins, la viabilité des lymphocytes préalablement exposés au cadmium diminue fortement et ce, graduellement en fonction du temps écoulé (résultats non montrés). Ces résultats pourraient expliquer pourquoi le cadmium montre une faible cytotoxicité dans notre test de viabilité après seulement 2 h d'exposition et pourquoi il est très difficile d'utiliser des concentrations au-dessus de 125  $\mu\text{M}$  pour la technique des ECSs.



### 2.3 Index mitotique et ralentissement du cycle cellulaire

Finalemment, comme information complémentaire, nous avons évalué l'effet du chrome et du cadmium sur l'index mitotique. Pour le contrôle négatif, nous avons dénombré 89 mitoses pour 1000 cellules, ce qui nous donne un index mitotique de 8.9 % (Tableau 3, chapitre III). L'addition de chrome et de cadmium durant 2 h réduit de façon importante le nombre de cellules en métaphase. En présence de 150  $\mu\text{M}$  de chrome, l'index mitotique descend à 3 % et en présence de 125  $\mu\text{M}$  de cadmium, l'index mitotique chute à 1.4 %. Cette baisse de l'index mitotique rend plus difficile l'application des techniques de génotoxicité qui requièrent un bon nombre de cellules en métaphase.

Nous avons également évalué l'effet du chrome et du cadmium sur la vitesse du cycle cellulaire. Pour ce faire, nous avons calculé le pourcentage de cellules ayant complété un, deux ou trois cycles de réplication. Contrairement au contrôle négatif, l'ajout de chrome et de cadmium provoque un ralentissement du cycle cellulaire qui se traduit par une augmentation des lymphocytes de la première génération et par une réduction des lymphocytes de la deuxième et de la troisième génération (Tableau III, chapitre III). Dans la littérature, plusieurs études signalent que le chrome et le cadmium ralentissent la croissance des cellules (Levis et Majone, 1979; Stella et coll., 1982; Bakke et coll., 1986; Hartmann et Speit, 1994; Saplakoglu et Iscan, 1998). Une étude récente de Xu et coll. (1996) suggère que le chrome ralenti le cycle cellulaire par

la formation de pontages ADN-ADN qui inhiberait la réplication et bloquerait spécifiquement la progression des cellules en phase S.

## **2.4 Décondensation des chromosomes**

La décondensation des chromosomes est l'un des résultats les plus intéressants et les plus inattendus de cette recherche. Exposés à des concentrations élevées de cadmium, les chromosomes métaphasiques se décondensent et s'associent entre eux. Par contre, les noyaux en interphase semblent intacts.

En effet, lorsque les lymphocytes sont exposés à 250  $\mu\text{M}$  de cadmium pendant 2 h, on observe des mitoses avec des chromosomes faiblement décondensés. À des concentrations supérieures (500, 1000, 1500, 2000  $\mu\text{M}$ ), les chromosomes sont de plus en plus décondensés pour être complètement défaits et associés entre eux à une concentration de 2500  $\mu\text{M}$  (Figure 2, chapitre IV). À notre connaissance, aucun article n'a fait état d'une décondensation des chromosomes provoquée par le cadmium. Ceci n'a rien d'étonnant, les laboratoires qui emploient des préparations chromosomiques pour étudier la génotoxicité des métaux sont plutôt rares. Néanmoins, un article de Jacobson et Turner (1980) indique que le cadmium peut réagir avec les bases azotées et former des complexes déstabilisants qui perturbent les liens hydrogènes de la double hélice d'ADN. De même, un article plus récent de Beyersmann et Hechtenberg (1997) mentionne que le cadmium peut se lier directement aux acides nucléiques et provoquer des changements de conformation de

l'ADN à des concentrations de 1mM et plus. Cependant, ceci n'explique qu'en partie la décondensation importante des chromosomes car même si le cadmium perturbe l'organisation de la molécule d'ADN, cette dernière est maintenue en place par les protéines de structure des chromosomes. Nous suggérons que le cadmium puisse adhérer aux protéines de structure des chromosomes et interférer avec leurs fonctions normales. Le cadmium interagirait possiblement avec les protéines non histones des MARs (Matrix Attached Regions) ou des SARs (Scaffold Attached Regions) responsables de l'attachement des boucles de chromatine dans le chromosome (Gasser et Laemmli, 1987). Il est également possible que le cadmium inhibe l'action d'enzymes comme la topoisomérase II qui permet la condensation de la chromatine par son action de torsion (Gasser et Laemmli, 1987). En terminant, il est important de noter que la décondensation des chromosomes peut sûrement avoir une influence sur la mortalité des cellules en les empêchant de compléter normalement la mitose.

## **CHAPITRE V**

### **CONCLUSION GÉNÉRALE**

Le développement technologique a donné une importance considérable au chrome et au cadmium. Malheureusement, au fur et à mesure du développement des applications pour ces deux métaux, leurs effets sur la santé se sont précisés (Vercruyse, 1984). Ce travail nous a permis de mettre en évidence le pouvoir génotoxique du chrome et du cadmium par l'essai EM-ISEL. Cette nouvelle technique d'immunocytochimie à l'or colloïdal nous a permis de localiser et de quantifier (grâce au programme "NIH Image") les dommages simple-brin induits à l'ADN par le chrome et le cadmium en culture de cellules. Ces deux métaux ont induit une augmentation significative des bris dans l'ADN chromosomique et nucléaire de lymphocytes humains. Nos résultats confirment donc le potentiel clastogène du chrome et du cadmium et nous apporte des informations utiles concernant l'effet de ces métaux sur la santé humaine. Notre étude démontre également l'efficacité de la technique EM-ISEL dans la détection des agents génotoxiques. Comparée au test standard des ECSs, la technique EM-ISEL semble faire preuve d'une plus grande sensibilité. Par rapport aux autres techniques de détection des bris simple-brin, l'EM-ISEL ne nécessite aucune dénaturation de la chromatine ce qui permet de quantifier les cassures de l'ADN directement sur les noyaux en interphase et les chromosomes en métaphase. Par surcroît, cette technique possède un marquage hautement spécifique et peut s'appliquer sur des tissus frais ou archivés. L'EM-ISEL semble donc avoir un avenir prometteur comme nouvel outil de détection des agents génotoxiques.

Ce projet ouvre la voie à plusieurs autres avenues de recherche. Il serait intéressant d'utiliser d'autres concentrations de chrome et de cadmium afin d'établir une courbe doses / effets. Il serait également intéressant d'employer d'autres concentrations de cadmium afin d'étudier plus à fond ce phénomène de décondensation des chromosomes. Finalement, comme la culture des cellules ne tient pas compte de la biodisponibilité, de la transformation métabolique et de la toxicité systémique des métaux observées *in vivo* (Marzin, 1986), il serait pertinent d'appliquer l'EM-ISEL sur : 1) des cellules provenant d'animaux de laboratoire ayant préalablement absorbé des métaux et 2) sur des lymphocytes sanguins provenant de personnes exposées à des métaux en milieu de travail.

Pour conclure, la carcinogenèse métallique est un phénomène complexe et peu connu dans lequel les dommages génotoxiques sont pressentis comme étant des éléments clés (Snyder, 1988). Encore aujourd'hui, on ne peut dire si l'action carcinogène des métaux se fait de manière directe (par une attaque de l'ADN structural) ou de manière indirecte (par une perturbation des enzymes de réparation, de synthèse ou de réplication de l'ADN). On suppose cependant qu'une ou plusieurs de ces actions peuvent provoquer des mutations qui vont conduire à l'activation d'oncogènes et à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur (Ryan et Aust, 1992). Comme ce ne sont pas tous les dommages à l'ADN qui sont impliqués dans le développement des cancers, il serait maintenant important de clarifier le rôle de chacun de ces mécanismes dans le modèle général de la carcinogenèse métallique (Waalkes et coll., 1992).

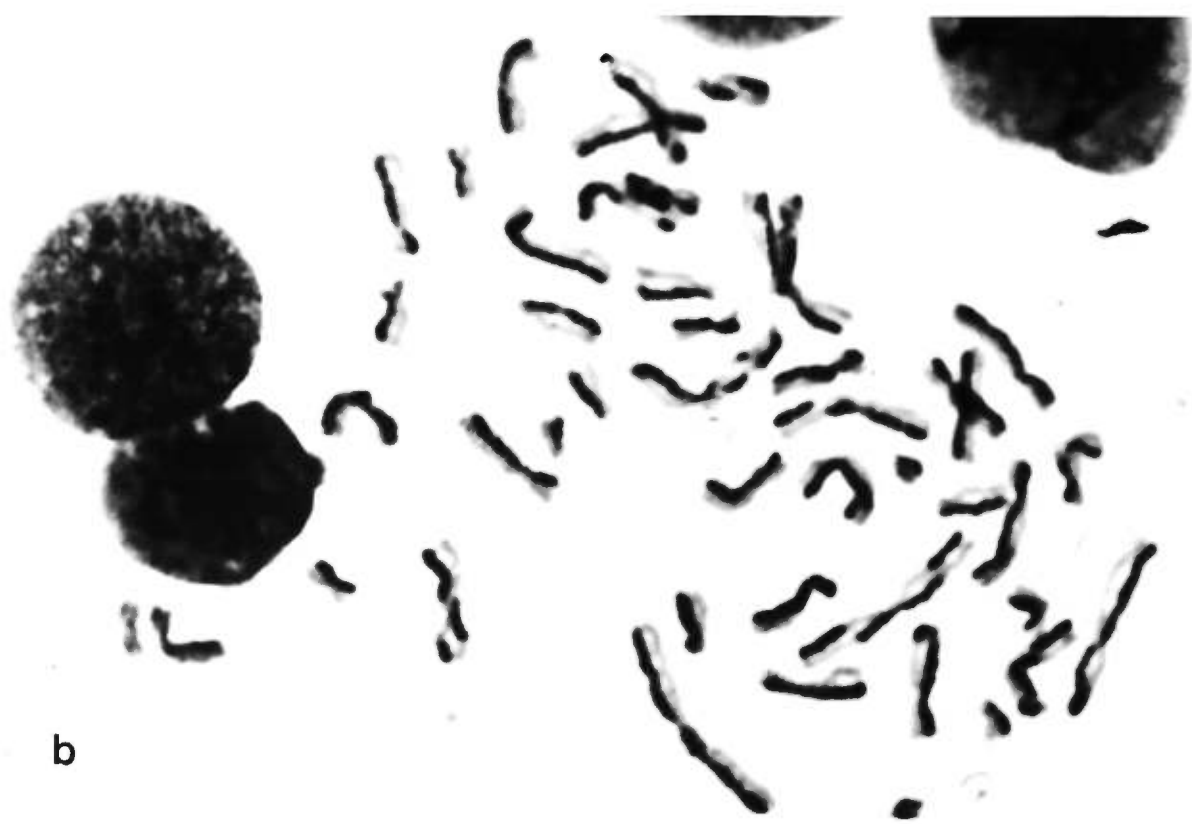
**FIGURES CITÉES DANS LA DISCUSSION GÉNÉRALE****(CHAPITRE IV)**

- Figure 1. Échanges entre chromatides sœurs sur des chromosomes métaphasiques humains en microscopie photonique (grossissement : 1500×). a) Mitose non exposé aux métaux et ayant en moyenne  $7.7 \pm 1.9$  échanges par métaphase. b) Mitose exposé à 150  $\mu\text{M}$  de chromate de potassium et ayant en moyenne  $18.6 \pm 4.3$  échanges par métaphase.
- Figure 2. Décondensation des chromosomes métaphasiques humains provoquée par le cadmium en microscopie photonique. a) Mitose non exposé aux métaux (grossissement : 1500×). b) Mitose exposé à 2500  $\mu\text{M}$  de chlorure de cadmium et montrant des chromosomes fortement décondensés (grossissement : 1750×).

Figure 1



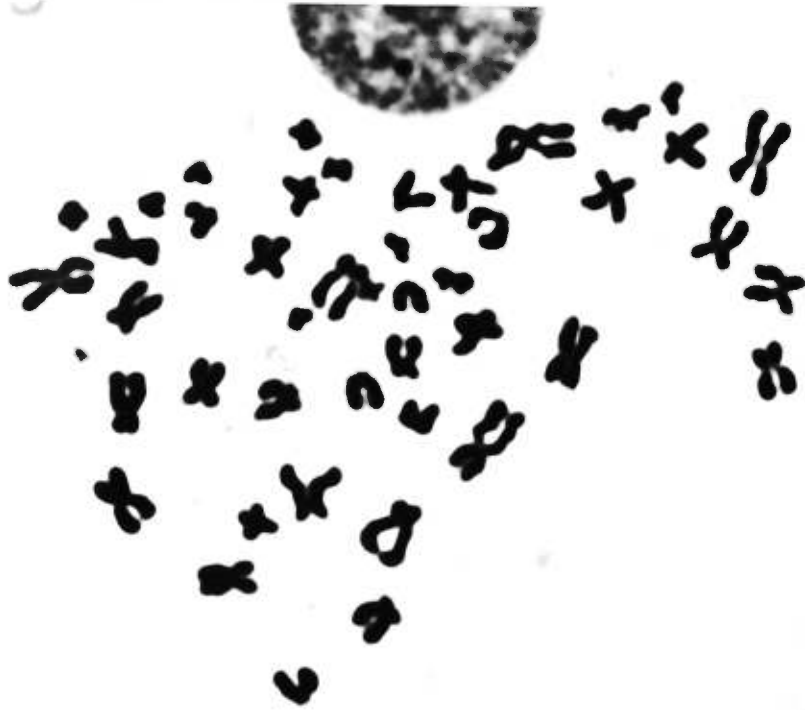
a



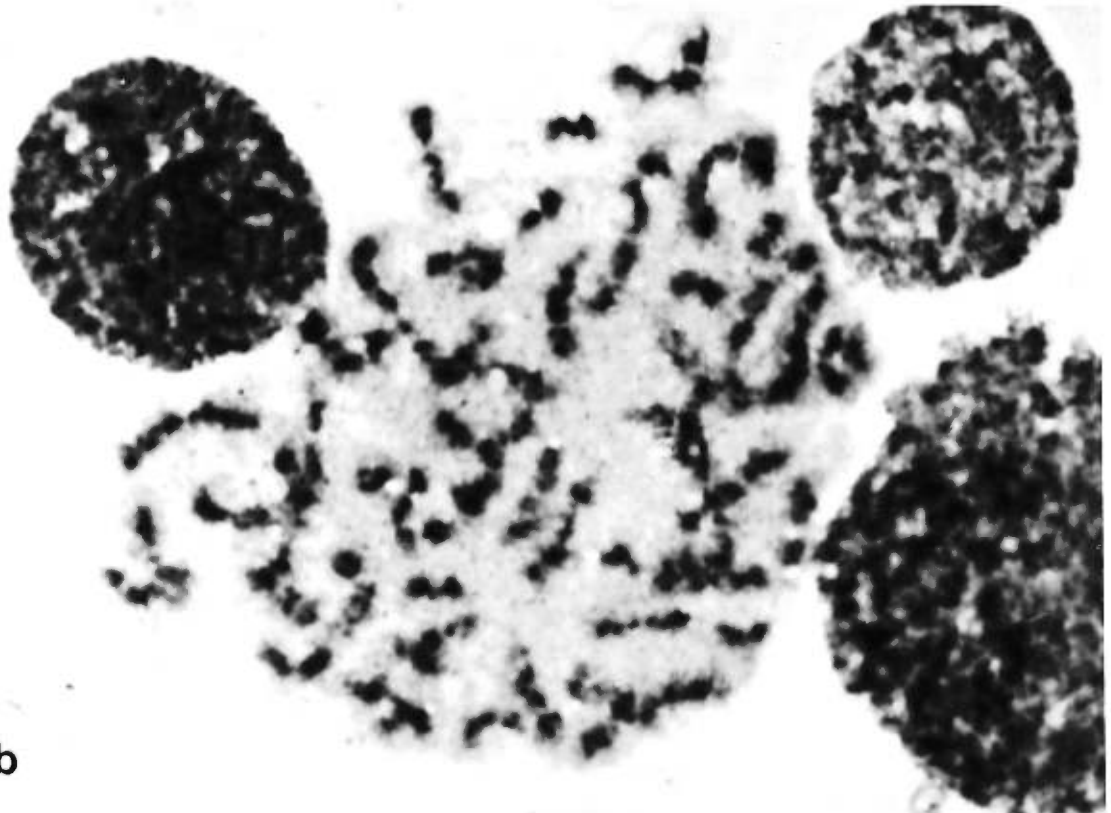
b



Figure 2



a



b

## **BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE**

- AISEN, P., COHEN, G. et J.O. KANG. 1990. Iron toxicosis. Dans : International review of experimental pathology, volume 31, transition metal toxicity. Éditeurs : G.W. Richter et K. Solez. Academic Press Inc., Toronto, 1-46.
- ASSAD, M., RIVARD, C.H., YAHIA, L.H. et N. LEMIEUX. 1999. Comparative *in vitro* biocompatibility of nickel-titanium, pure nickel, pure titanium, and stainless steel: genotoxicity and atomic absorption evaluation. Biomed. Mater. Eng., 9 : 1-12.
- BAGCHI, D., VUCHETICH, P.J., BAGCHI, M., HASSOUN, E.A., TRAN, M.X., TANG, L. et S.J. STOHS. 1997. Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate (chromium VI) and cadmium chloride (cadmium II) to rats. Free Radicals Biol. Med., 22 : 471-478.
- BAKKE, O., JAKOBSEN, K. et B.E. KRISTEN. 1984. Concentration-dependant effects of potassium dichromate on the cell cycle. Cytometry, 5 : 482-486.
- BARUTHIO, F. 1991. Toxicologie des éléments trace essentiels. Dans : Les oligoéléments en médecine et biologie. Éditeur : P. Chappuis. Lavoisier TEC & DOC, Paris, 213-310.
- BEYERSMANN, D. et A. HARTWIG. 1994. Genotoxic effects of metals compounds. Arch. Toxicol. Suppl., 16 : 192-198.
- BEYERSMANN, D. et S. HECHTENBERG. 1997. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. Toxicol. Appl. Pharmacol., 144 : 247-261.
- BEYERSMANN, D., HECHTENBERG, S., BLOCK, C. et H. KIRCHHERR. 1991. Interactions of cadmium with cellular transduction. Dans : Metal compounds in environment and life. Éditeurs : E. Merian et W. Haerdi. Sci. Technol. Lett., Northwood, 187-192.
- BOERRIGTER, M.E.T.I., MULLAART, E. et J. VIJG. 1991. Induction and disappearance of DNA strand breaks in human peripheral blood lymphocytes and fibroblasts treated with methyl methanesulfonate. Exp. Cell Res., 192 : 61-66.

- BOITEUX, S. et J.P. RADICELLA. 1998. Réparation de l'ADN et cancer; les gènes de réparation des bases oxydées dans l'ADN sont-ils des gènes suppresseurs de tumeurs? *Med. Sci.*, 14 : 310-313.
- BIANCHI, V., CELOTTI, L., LANFRANCHI, G., MAJONE, F., MARIN, G., MONTALDI, A., SPONZA, G., TAMINO, G., VENIER, P., ZANTEDESHI, A. et A.G. LEVIS. 1983. Genetic effects of chromium compounds. *Mutation Res.*, 117 : 279-300.
- CHEESEMAN, K.H. 1993. Lipid peroxidation and cancer. Dans : *DNA and free radicals*. Éditeurs : B. Halliwell et O.I. Auroma. Ellis Horwood Limited, Toronto, 110-144.
- COHEN, M., LATTA, D., COOGAN, T. et M. COSTA. 1990. Mechanisms of metal carcinogenesis : the reactions of metals with nucleic acids. Dans : *Biological effects of heavy metals, Vol II, Metal carcinogenesis*. Éditeur : E.C. Foulkes. CRC Press, Boston, 19-75.
- COOGAN, T.P., BARE, R.M. et M.P. WAALKES. 1992. Cadmium-induced DNA strand damage in cultured liver cells : reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 113 : 227-233.
- COOGAN, T.P., BARE, R.M., BJORNSON, E.J. et M.P. WAALKES. 1994. Enhanced metallothionein gene expression is associated with protection against cadmium-induced genotoxicity in cultured rat liver cells. *J. Toxicol. Environ. Health*, 41 : 233-245.
- DALLY, H. et A. HARTWIG. 1997. Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel (II) and cadmium (II) in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 18 : 1021-1026.
- DAVIES, K. 1995. Oxidative stress : the paradox of aerobic life. Dans : *Biochemical society symposium no. 61; Free radicals and oxydative stress ; environment, drugs and food additives*. Éditeurs: C. Rice-Evans, B. Halliwell et G.G. Lunt. Portland Press, London, 1-31.
- DEAVEN, L.L. et E.W. CAMPBELL. 1980. Factors effecting the induction of chromosomal aberrations by cadmium in Chinese hamster cells. *Cyto-genet. Cell Genet.*, 26 : 251-260.

- DE FLORA, S. et K.E. WETTERHAHN. 1989. Mechanisms of chromium metabolism and genotoxicity. *Life Chem. Rep.*, 7 : 169-244.
- DE FLORA, S., BAGNASCO, M., SERRA, D. et P. ZANACCHI. 1990. Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutation Res.*, 238 : 99-172.
- DEGRAEVE, N. 1981. Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. *Mutation Res.*, 86 : 115-135.
- DIPLOCK, A. 1997. Will the "good fairies" please prove to us that vitamin E lessens human degenerative disease? *Free Rad. Res.*, 27 : 551-532.
- DUCROS, V. 1991. Le chrome. Dans : *Les oligoéléments en médecine et biologie*. Éditeur : P. Chappuis. Lavoisier TEC & DOC, Paris, 499-522.
- DILLON, C.T., LAY, P.A., BONIN, A.M., CHOLEWA, M., LEGGE, G.J.F., COLLINS, T.J. et K.L. KOSTKA. 1998. Permeability, cytotoxicity, and genotoxicity of chromium (V) and chromium (VI) complexes in V79 Chinese hamster lung cells. *Chem. Res. Toxicol.*, 11 : 119-129.
- DRAPER, H.H. et W.J. BETTGER. 1994. Role of nutrients in the cause and prevention of oxygen radical pathology. Dans : *Advances in experimental medicine and biology*, Vol 366; Free radicals in diagnostic medicine. Éditeur: D. Armstrong. Plenum Press, New-York, 269-289.
- DUTRILLAUX, B. et J. COUTURIER. 1981. La pratique de l'analyse chromosomique. Masson, Paris. pp 86.
- EASTMAN, A. 1993. Apoptosis : a product of programmed and unprogrammed cell death. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 121 : 160-164.
- ENGER, M.D., HILDEBRAND, C.E. et C.C. STEWART. 1983. Cd<sup>2+</sup> responses of cultured human blood cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 69 : 214-224.
- ENVIRONNEMENT CANADA. 1994a. Loi canadienne sur la protection de l'environnement: liste des substances d'intérêt prioritaire, rapport

d'évaluation: Le chrome et ses composés. Gouvernement du Canada, Environnement Canada, Santé Canada. pp 65.

ENVIRONNEMENT CANADA. 1994b. Loi canadienne sur la protection de l'environnement: liste des substances d'intérêt prioritaire, rapport d'évaluation: Le cadmium et ses composés. Gouvernement du Canada, Environnement Canada, Santé Canada. pp 106.

FAN, A.M. et I. HARDING-BARLOW. 1987. Chromium. Dans: Genotoxic and carcinogenic metals; environmental and occupational occurrence and exposure. Éditeurs: L. Fishbein, A. Furst et M.A. Mehlman. Princeton Scientific Publishing, Princeton, 87-125.

FEHER, J., CSOMOS, G. et A. VERECKEI. 1987. Free radical reactions in medicine. Springer-Verlag, New York. pp199.

FERNANDEZ, J.L., GOSALVEZ, J. et V.J. GOYANES. 1993. Detection of DNA strand breaks induced by hydroxyl radicals in nuclear and chromosomal chromatin by electron microscopy. *Cytobios*, 73 : 189-195.

FERGUSON, J.E. 1990. The heavy elements : chemistry, environmental impact and health effects. Pergamon Press, New-York. pp 614.

FUJITA, K., OHYAMA, H. et T. YAMADA. 1997. Quantitative comparaison of *in situ* methods for detecting apoptosis induced by X-ray irradiation in mouse thymus. *Histochem. J.*, 29 : 823-830.

FURST, A. 1987. Toward mechanisms of metal carcinogenesis. Dans: Genotoxic and carcinogenic metals; environmental and occupational occurrence and exposure. Éditeurs: L. Fishbein, A. Furst et M.A. Mehlman. Princeton Scientific Publishing, Princeton, 295-327.

GABELOVA, A., SLAMENOVA, D., RUZEKOVA, L., FARKASOVA, T. et E. HORVATHOVA. 1997. Measurement of DNA strand breakage and DNA repair induced with hydrogen peroxide using single cell gel electrophoresis, alkaline DNA unwinding and alkaline elution of DNA. *Neoplasma*, 44 : 380-388.

- GAINALDI, G., COLELLA, C.M., PIRAS, A. et T. MARIANI. 1982. Thioguanine resistance, ouabain resistance and sister chromatid exchanges in V/79AP4 Chinese hamster cells treated with potassium dichromate. *Chem. Biol. Interact.*, 42 : 45-51.
- GASSER, S.M. et U.K. LAEMMLI. 1987. A glimpse at chromosomal order. *Trends Genet.*, 3 : 16-21.
- GAVRIELI, Y., SHERMAN, Y. et S.A. BEN-SASSON. 1992. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, 119 : 493-501.
- GOSALVEZ, J., LOPEZ-FERNANDEZ, C., GARCIA DE LA VEGA, C., MEZZANOTTE, R., FERNANDEZ, J.L. et V. GOYANES. 1993. Selective digestion of mouse chromosomes with restriction endonucleases. Oligonucleotide priming of single-stranded DNA produced with exonuclease. *Genome*, 36 : 230-234.
- HALLIWELL, B. et J. GUTTERIDGE. 1985. Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford. pp 346.
- HAN, C., WU, G., YIN, Y. et M. SHEN. 1992. Inhibition by germanium oxide of the mutagenicity of cadmium chloride in various genotoxicity assays. *Food Chem. Toxicol.*, 30 : 521-524.
- HARTWIG, A. 1994. Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity : a review. *Environ. Health Perspect.*, 102 : 45-50.
- HARTMANN, A. et G. SPEIT. 1994. Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cell gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. *Environ. Mol. Mutagen.*, 23 : 299-305.
- HAYES, A.W. Editor. 1982. Principles and methods of toxicology. Raven Press, New-York. pp 750.
- HEDDLE, J.A. Editor. 1982. New Horizons in Genetic Toxicology. Academic Press, New-York. pp 250.

- INOKI, C., YAMASHITA, H., UEKI, K., KUMAGAI, K., FUKUDA, Y., NINOMIYA, E., NAKAMURA, K., HAYASHI, R., UEKI, M. et Y. OTSUKI. 1997. Image analysis and ultrastructure detection of DNA strand breaks in human endometrium by in situ end-labeling techniques. *J. Histotech.*, 20 : 321-328.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR CANCER RESEARCH. 1980. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, some metals and metal compounds. IARC Scientific Publications, Lyon, Vol 23. pp 438.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. 1990. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, chromium, nickel and welding. IARC Scientific Publications, Lyon, Vol 49. pp 677.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. 1993. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry. IARC Scientific Publications, Lyon, Vol 58. pp 444.
- INTERNATIONAL PROGRAM ON CHEMICAL SAFETY. 1988. Environmental health criteria 61, chromium. World Health Organization, Genève. pp 197.
- INTERNATIONAL PROGRAM ON CHEMICAL SAFETY. 1992. Environmental health criteria 134, cadmium. World Health Organization, Genève. pp 280.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDISATION. 1992. Biological evaluation of medical devices-#10993-3 : Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity. ISO, Geneva, 1-8.
- JACOBSON, K.B. et J.E. TURNER. 1980. The interaction of cadmium and certain other metal ions with proteins and nucleic acids. *Toxicology*, 16 : 1-37.
- JONES, P., KORTENKAMP, A., O'BRIEN, P., WANG, G. et G. YANG. 1991. Evidence for the generation of hydroxyl radicals from chromium(V) intermediate isolated from the reaction of chromate with glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.*, 286 : 652-655.



- KAZANTZIS, G. 1987. Cadmium. Dans: Genotoxic and carcinogenic metals; environmental and occupational occurrence and exposure. Éditeurs: L. Fishbein, A. Furst et M.A. Mehlman. Princeton Scientific Publishing, Princeton, 127-143.
- LANDOLPH, J.R. 1990. Neoplastic transformation of mammalian cells by carcinogenic metal compounds : cellular and molecular mechanisms. Dans : Biological effects of heavy metals, Vol II, metal carcinogenesis. Éditeur : E.C. Foulkes. CRC Press, Boston, 1-18.
- LEROY, T., VAN HUMMELEN, P., ANARD, D., CASTELAIN, P., KIRSCH-VOLDERS, M., LAUWERYS, R. et D. LISON. 1996. Evaluation of three methods for the detection of DNA single-strand breaks in human lymphocytes: alkaline elution, nick-translation, and single-cell gel electrophoresis. *J. Toxicol. Environ. Health*, 47 : 409-422.
- LEVIS, A.G. et F. MAJONE. 1979. Cytotoxic and clastogenic effects of soluble chromium compounds on mammalian cell cultures. *Br. J. Cancer*, 40 : 523-533.
- LEVIS, A.G. et F. MAJONE. 1981. Cytotoxic and clastogenic effects of soluble and insoluble compounds containing hexavalent and trivalent chromium. *Br. J. Cancer*, 44 : 219-235.
- LIN, R.H., LEE, C.H., CHEN, W.K. et S.Y. LIN-SHIAU. Studies on cytotoxic and genotoxic effects of cadmium nitrate and lead nitrate in chinese hamster ovary cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 23 : 143-149.
- LIN, C.J., WU, K.H., YEM, F.H. et T.C. LEE. 1995. Differential cytotoxicity of cadmium to rat embryonic fibroblasts and human skin fibroblasts. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 133 : 20-26.
- LITTLEFIELD, N.A. et B. HASS. 1995. Damage to DNA by cadmium or nickel in the presence of ascorbate. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 25 : 485-492.
- LITTLEFIELD, N.A., HASS, B.S., JAMES, S.J. et L.A. POIRIER. 1994. Protective effects of magnesium on DNA strand breaks induced by nickel or cadmium. *Cell Biol. Toxicol.*, 10 : 127-135.

- LOPEZ-ORTAL, P., SOUKA, V., BUCIO, L., GONSALEZ, E. et M.C. GUTIERREZ-RUIZ. 1999. DNA damage produced by cadmium in a human fetal hepatic cell line. *Mutation Res.*, 439 : 301-306.
- MARZIN, D. 1986. Théorie et pratique des tests de toxicologie génétique. Tests sur eucaryotes. *Ann. Biol. Clin.*, 44 : 656-661.
- McCARTY, M.F. 1997. Subtoxic intracellular trivalent chromium is not mutagenic : implications for safety of chromium supplementation. *Med. Hypotheses*, 48 : 263-269.
- McGRATH, R.A. et R.W. WILLIAMS. 1966. Reconstruction in vivo of irradiated *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid; the rejoining of broken pieces. *Nature*, 212 : 534-535.
- MENEGHINI, R. et E.L. MARTINS. 1993. Hydrogen peroxide and DNA damage. Dans : *DNA and free radicals*. Éditeurs : B. Halliwell et O.I. Auroma. Ellis Horwood Limited, Toronto, 83-93.
- MESSIER, P.E., JEAN, P. et C.L. RICHER. 1986. Easy transfer of selected mitoses from light to electron microscopy. *Cyto-genet. Cell Genet.*, 43 : 207-210.
- MIGHELI, A., CAVALLA, P., MARINO, S. et D. SCHIFFER. 1994. A study of apoptosis in normal and pathologic nervous tissue after *in situ* end-labeling of DNA strand breaks. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 53 : 606-616.
- MIGHELI, A., ATTANASIO, A. et D. SCHIFFER. 1995. Ultrastructural detection of DNA strand breaks in apoptotic neural cells by *in situ* end-labelling techniques. *J. Pathol.*, 176 : 27-35.
- MIKHAILOVA, M.V., LITTLEFIELD, N.A., HASS, B.S., POIRIER, L.A. et M.W. CHOU. 1997. Cadmium-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation, DNA strand breaks and antioxidant enzyme activities in lymphoblastoid cells. *Cancer Lett.*, 115 : 141-148.
- MOSLEN, M.T. 1994. Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis. Dans : *Advances in experimental medicine and biology*, vol.

- 366; Free radicals in diagnostic medicine. Éditeur: D. Armstrong. Plenum Press, New-York, 17-27.
- MOREL, Y. et R. BAROUKI. 1998. Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. *Med. Sci.*, 14 : 713-721.
- MULLER, T., SCHUCKELT, R. et L. JAENICKE. 1991. Cadmium/zinc-metallothionein induces DNA strand breaks *in vitro*. *Arch. Toxicol.*, 65 : 20-26.
- NOCENTINI, S. 1987. Inhibition of DNA replication and repair by cadmium in mammalian cells. Protective interaction of zinc. *Nucleic Acid Res.*, 15 : 4211-4225.
- NRIAGU, J.O. 1988. Historical perspectives. Dans : Chromium in the natural and human environments. Éditeurs : J.O. Nriagu et E. Nieboer. John Wiley & Sons, Toronto, 1-19.
- O'BRIEN, P. et A. KORTENKAMP. 1994. Chemical models important in understanding the ways in which chromate can damage DNA. *Environ. Health Perspect.*, 102 : 3-10.
- OCHI, T., ISHIGURO, T. et M. OHSAWA. 1983. Participation of active oxygen species in the induction of DNA single-strand scissions by cadmium chloride in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Res.*, 122 : 169-175.
- OCHI, T. et M. OHSAWA. 1985. Participation of active oxygen species in the induction of chromosomal aberrations by cadmium chloride in cultured Chinese hamster cells. *Mutation Res.*, 143 : 137-142.
- OCHI, T., TAKAHASHI, K. et M. OHSAWA. 1987. Indirect evidence for the induction of a prooxidant state by cadmium chloride in cultured mammalian cells and a possible mechanism for the induction. *Mutation Res.*, 180 : 257-266.
- OETKEN, G. et D. BEYERSMANN, 1991. Metallothionein or cadmium and GSH-induce single strand breaks in isolated DNA. Dans : Metal compounds in

environment and life. Éditeurs : E. Merian et W. Haerdi. Science and Technology Letters, Northwood, 287-292.

OHNO, H., HANAOKA, F. et M. YAMADA. 1982. Inducibility of sister chromatid exchanges by heavy metal ions. *Mutation Res.*, 104 : 141-145.

OPPENHEIM, R.M. 1991. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, 14 : 453-501.

PERRY, P. et S. WOLFF. 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 258 : 121-125.

RYAN, T.P. et S.D. AUST. 1992. The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Crit. Rev. Toxicol.*, 22 : 119-141.

SAPLAKOGLU, U. et M. ISCAN. 1998. Sister chromatid exchanges in human lymphocytes treated in vitro with cadmium in G(0) and S phase of their cell cycles. *Mutation Res.*, 23 : 299-305.

SEN, P. et M. COSTA. 1986. Incidence and localization of sister chromatid exchanges induced by nickel and chromium compounds. *Carcinogenesis*, 7 : 1527-1533.

SHI, X. et N.S. DALAL. 1990a. Evidence for a Fenton-type mechanism for the generation of  $\cdot\text{OH}$  radicals in the reduction of Cr(VI) in cellular media. *Arch. Biochem. Biophys.*, 281 : 90-95.

SHI, X. et N.S. DALAL. 1990b. On the hydroxyl radical formation in the reaction between hydrogen peroxide and biologically generated chromium(V) species. *Arch. Biochem. Biophys.*, 277 : 342-350.

SHI, X. et N.S. DALAL. 1992. The role of superoxide radical in chromium(VI)-generated hydroxyl radical : the Cr(VI) Haber-Weiss cycle. *Arch. Biochem. Biophys.*, 292 : 323-327.

- SHI, X. et N.S. DALAL. 1994. Generation of hydroxyl radical by chromate in biologically relevant systems : role of Cr(V) complexes versus tetraperoxochromate(V). *Environ. Health Perspect.*, 102 : 231-236.
- SHIRAISHI, N., HOCHADEL, J.F., COOGAN, T.P., KOROPATNICK, J. et P. WAALKES. 1995. Sensitivity to cadmium-induced genotoxicity in rat testicular cells is associated with minimal expression of the metallothionein gene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 130 : 229-236.
- SHUPACK, S.I. 1991. The chemistry of chromium and some resulting analytical problems. *Environ. Health Perspect.*, 92 : 7-11.
- SNOW, E.T. 1994. Effects of chromium on DNA replication *in vitro*. *Environ. Health Perspect.*, 102 : 41-44.
- SNYDER, R.D. 1988. Role of active oxygen species in metal-induced DNA strand breakage in human diploid fibroblasts. *Mutation Res.*, 193 : 237-246.
- SNYDER, R.D. 1990. Modulation of DNA repair by metals. Dans : *Biological effects of heavy metals, Vol II, metal carcinogenesis*. Éditeur : E.C. Foulkes. CRC Press, Boston, 77-93.
- SORENSEN, E.M.B., ACOSTA, D. et D.G. NEALON. 1985. Effects of cadmium and calcium on the fluidity of plasma membranes. *Toxicol. Lett.*, 25 : 319-326.
- STEARNS, D.M., COURTNEY, K.D., GIANGRANDE, P.H., PHIEFFER, L.S. et K.E. WETTERHAHN. 1994. Chromium(VI) reduction by ascorbate : role of reactive intermediates in DNA damage *in vitro*. *Environ. Health Perspect.*, 102 : 21-25.
- STEFFENSON, I.L., MESNA, O.J., ANDRUCHOW, E., NAMORK, E., HYLLAND, K. et R.A. ANDERSEN. 1994. Cytotoxicity and Accumulation of Hg, Ag, Cd, Cu, Pb and Zn in human peripheral T and B lymphocytes and monocytes *in vitro*. *Gen. Pharmacol.*, 25 : 1621-1633.

- STELLA, M., MONTALDI, A., ROSSI, R., ROSSI, G. et A.G. LEVIS. 1982. Clastogenic effects of chromium on human lymphocytes in vitro and in vivo. *Mutation Res.*, 101 : 151-164.
- SUGDEN, K.D. et K.E. WETTERHAHN. 1997. Direct and hydrogen peroxide-induced chromium (V) oxidation of deoxyribose in single-stranded and double-stranded calf thymus DNA. *Chem. Res. Toxicol.*, 10 : 1397-1406.
- SUGIYAMA, M. 1991. Effects of vitamins on chromium(VI)-induced damage. *Environ. Health Perspect.*, 92 : 63-70.
- SUGIYAMA, M. 1992. Role of physiological antioxidants in chromium(VI) induced cellular injury. *Free Radical Biol. Med.*, 12 : 397-407.
- SUGIYAMA, M., TZUZUKI, K. et N. HARAMAKI. 1993. DNA single-strand breaks and cytotoxicity induced by sodium chromate(VI) in hydrogen peroxide-resistant cell lines. *Mutation Res.*, 299 : 95-102.
- SUGIYAMA, M. 1994. Role of cellular antioxidants in metal-induced damage. *Cell Biol. Toxicol.*, 10 : 1-22.
- TULLIUS, T.D. 1989. Metals and molecular biology. Dans : *Metal-DNA chemistry*. Éditeur : T.D. Thomas. American Chemical Society, Washington, 1-23.
- VERCRUYSSSE, A. 1984. Metals in human toxicology. Dans : *Hazardous metals in human toxicology*. Éditeur : A. Vercruyssen. Elsevier, New-York, 3-16.
- WAALKES, M.P. et G. OBERDORSTER. 1990. Cadmium carcinogenesis. Dans : *Biological effects of heavy metals, Vol II, metal carcinogenesis*. Éditeur : E.C. Foulkes. CRC Press, Boston, 129-157.
- WAALKES, M.P., COOGAN, T.P. et R.A. BARTER. 1992. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. *Crit. Rev. Toxicol.*, 22 : 175-201.

- WIJSMAN, J.H., JONKER, R.R., KEIJZER, R., VAN DE VELDE, C.J.H. et C.J. CORNELISSE. 1993. A new method to detect apoptosis in paraffin sections : *in situ* end-labelling of fragmented DNA. J. Histochem. Cytochem., 41 : 7-12.
- WOLFF, S. Editor. 1982. Sister Chromatid Exchange. John Wiley & Sons, New-York. pp 306.
- XU, J., BUBLEY, G.J., DETRICK, B., BLANKENSHIP, L.J. et S.T. PATIERNO. 1996. Chromium(VI) treatment of normal human lung cells results in guanine-specific DNA polymerase arrest, DNA-DNA cross-links and S-phase blockade of cell cycle. Carcinogenesis, 17 : 1511-1517.