

Université de Montréal

**Évaluation de la fréquence des micronoyaux et du potentiel
clastogène et/ou aneugène du benzo-a-pyrène suite à une
exposition *in vitro* des lymphocytes humains**

par

Thi Cam Van PHAM

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en Sciences biomédicales, option générale

Avril 2011

© Thi Cam Van PHAM, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Évaluation de la fréquence des micronoyaux et du potentiel
clastogène et/ou aneugène du benzo-a-pyrène suite à une
exposition *in vitro* des lymphocytes humains**

présenté par :

Thi Cam Van PHAM

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dre Maria Leiza Vitale, Présidente-rapporteur

Dre Nicole Lemieux, Directrice de recherche

Dr Pierre Ayotte, Membre du jury

Résumé

Le benzo-a-pyrène (BaP) est un cancérigène reconnu pour l'homme, contaminant présent dans notre environnement. Il cause des dommages à l'ADN que nous avons mesurés dans les lymphocytes exposés à de faibles concentrations de BaP, provenant de 20 jeunes volontaires non fumeurs et en santé. Suite à l'exposition, la fréquence des micronoyaux (MN) augmente significativement et décrit une courbe dose-réponse non linéaire, suggérant le déclenchement du processus de détoxification et la réparation de l'ADN. Des différences entre les individus et entre les sexes sont présentes dans la réponse génotoxique produite par le BaP.

Le test des aberrations chromosomiques montre que le pourcentage de chromosomes cassés augmente significativement dans les cellules exposées au BaP. Combinés avec l'augmentation de la fréquence des MN, nos résultats confirment l'effet clastogène du BaP déjà rapporté dans la littérature. L'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) des MN avec une sonde pancentromérique est aussi utilisée pour établir leur mécanisme de formation. La FISH révèle que la majorité des MN formés après une exposition au BaP contient un centromère et plus, ce qui est significativement différent de la condition non exposée. Plus précisément, dans nos conditions expérimentales, les MN induits par le BaP contiennent surtout trois centromères et plus, indiquant également la présence d'un effet aneugène.

L'effet clastogène du BaP est relié à son rôle d'initiateur dans la cancérogenèse, alors que l'effet aneugène le relierait à l'étape de progression. Ces résultats sont importants puisque l'exposition aux composés de la classe du BaP est de longue durée (cigarette, air pollué).

Mots-clés : génotoxicité; aberrations chromosomiques; hybridation *in situ* en fluorescence (FISH); sonde pancentromérique; centromères; courbe dose-réponse non linéaire; différence interindividuelle; différence intersexe; progression; cancer

Abstract

Benzo-a-pyrene (BaP) is a known human carcinogen, contaminating all spheres of our environment. In human cells, BaP can induce various genotoxic effects on DNA, such as micronuclei (MNs) and chromosomal aberrations (CAs). MNs and CAs are measured in human lymphocytes *in vitro* exposed to low BaP concentrations, taken from 20 young healthy non-smoking subjects. Following BaP exposure, MN frequency increases significantly and shows a non-linear dose-response curve, suggesting the induction of detoxification process and/or DNA repair. Also, interindividual and sex differences in BaP-induced genotoxic damages are present.

CA test shows that chromosome breaks increase significantly in cells exposed to BaP even at low concentrations. Combined to the observed MN frequency increase, our results confirm the clastogenic properties of BaP, as already reported in literature. In addition, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) on MN using a pancentromeric probe is done to assess MN content. FISH reveals that most BaP-induced MNs contain centromeres, and specifically three or more centromeres. This difference is significant when compared to the unexposed condition, and suggest presence of an aneugenic effect.

Clastogenic effect of BaP is associated with initiation step of carcinogenesis, while the aneugenic effect would link it with cancer progression. These results could be particularly important because exposure to BaP and other member of its chemical class usually last for decades (smoking, air pollution, etc.), and need to be confirm in future studies.

Keywords : genotoxicity; chromosome aberrations; fluorescence *in situ* hybridization (FISH); pancentromeric probe; centromeres; non-linear dose-response curve; interindividual differences; sex differences; progression; cancer.

Table des matières

Résumé.....	v
<i>Abstract</i>	vii
Liste des tableaux.....	xv
Liste des figures	xviii
Sigles et abréviations	xxii
Remerciements	xxxii
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1. LA SANTÉ ENVIRONNEMENTALE ET LA GÉNÉTIQUE.....	3
1.1.1 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).....	4
1.1.1.1 Les HAP dans l'environnement de vie et professionnel	4
1.1.1.2 La toxicité des HAP	6
1.1.1.3 La biotransformation des HAP.....	8
1.1.1.4 La formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et des adduits.....	12
1.1.1.5 Les dommages à l'ADN et les mécanismes de réparation	12
1.1.2 La génétique et la génotoxicologie.....	22
1.1.2.1 La génétique et la cytogénétique.....	22
1.1.2.1.1 L'hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (la FISH).....	23
1.1.2.1.2 Les avantages et les limites de la FISH.....	24
1.1.2.2 La génotoxicologie.....	25
1.1.2.3 Les tests de génotoxicité	27

1.1.2.3.1 Les biomarqueurs.....	29
1.1.2.4 Les effets clastogène et aneugène.....	33
1.1.2.5 Les études <i>in vivo</i> et <i>in vitro</i>	38
1.1.2.6 Les cellules utilisées en génotoxicologie pour les études <i>in vitro</i>	39
1.2. LE BENZO-A-PYRÈNE (BaP)	41
1.2.1 Les sources d'exposition au BaP.....	41
1.2.2 Le métabolisme du BaP et son mode d'activation dans la cellule.....	42
1.2.3 L'induction de la cancérogenèse du BaP.....	47
1.2.3.1 La formation des adduits par le BPDE.....	48
1.2.3.2 La formation des adduits par le radical cation du BaP	49
1.2.3.3 La formation des adduits par les quinones.....	50
1.2.3.4 Les propriétés clastogéniques du BaP.....	50
1.2.3.5 Les principales étapes de la cancérogenèse du BaP.....	51
1.3. LES MICRONOYAUX SANGUINS (MN)	54
1.3.1 La nature et l'origine.....	54
1.3.2 Le mécanisme de formation.....	55
1.3.2.1 La formation de fragments chromosomiques acentriques	55
1.3.2.2 La formation de MN constitués de chromosomes entiers ou partiels	56
1.3.2.3 La distinction par FISH entre les effets clastogène et aneugène en utilisant les MN.....	57
1.3.3 Le devenir des MN après leur formation.....	58
1.3.4 Le devenir des cellules comportant des micronoyaux	59
1.3.5 Les facteurs de variation de la fréquence des MN	60
1.3.5.1 L'effet de l'âge.....	61

1.3.5.2 L'effet du genre	62
1.3.5.2.1 La perte du chromosome X chez la femme	62
1.3.5.2.2 La perte du chromosome Y chez l'homme	63
1.3.6 Le développement du test des MN.....	64
1.3.6.1 Les lymphocytes sanguins : un choix préférentiel	65
1.3.6.2 Les avantages et limites du test des MN	66
1.4. LES MICRONOYAUX REPRÉSENTENT QUEL TYPE DE BIOMARQUEUR?	67
1.4.1 Le continuum Exposition-Maladie.....	67
1.4.2 Les MN : un biomarqueur de prédiction.....	69
1.4.3 Le test des MN et l'étude de la génotoxicité du BaP.....	70
1.5. LES HYPOTHÈSES DE RECHERCHE.....	72
CHAPITRE 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES	75
2.1 LA PRÉPARATION DES SOLUTIONS DE BAP	77
2.2 LES SUJETS SÉLECTIONNÉS	77
2.3 L'OBTENTION DES MN DANS LES CELLULES BINUCLÉÉES	78
2.3.1 La culture.....	78
2.3.2 L'exposition au BaP.....	79
2.3.3 Le blocage de la cytocinèse.....	79
2.3.4 La récolte.....	80
2.3.5 Un résumé des différentes étapes du test des MN.....	80
2.4 LE DÉCOMPTE DES MN ET LES CRITÈRES DE SÉLECTION.....	82
2.4.1 L'index de division nucléaire.....	84

2.5 LA DÉTECTION PAR FISH DU CONTENU DES MN	84
2.5.1 Les étapes préliminaires.....	84
2.5.2 La préparation du matériel pour la FISH.....	85
2.5.2.1 La préparation des lames de MN sanguins:	85
2.5.2.2 La préparation de la sonde	85
2.5.2.3 L'hybridation <i>in situ</i> proprement dite et les lavages post-hybridation	85
2.5.2.4 La coloration des lames et l'analyse de l'effet clastogène et/ou aneugène.	86
2.6 LA DÉTECTION DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES	88
2.7 LES TESTS STATISTIQUES	90
2.7.1 Le devis de l'étude.....	90
2.7.2 Les tests statistiques retenus.....	90
2.7.2.1 L'ANOVA pour mesures répétées.....	90
2.7.2.2 Le test des rangs signés de Wilcoxon	91
2.7.2.3 Le test z de deux proportions indépendantes	91
2.7.2.4 Le rapport de cote	92
2.7.2.5 La régression linéaire	92
2.7.3 La fréquence des MN dans les cellules binucléées.....	93
2.7.4 La relation dose-réponse.....	93
2.7.5 La différence existant entre les individus.....	94
2.7.6 La mise en évidence des propriétés clastogéniques et/ou aneugéniques du BaP.....	94
2.7.6.1 Le contenu des MN par FISH	94
2.7.6.2 Le test des AC	95

CHAPITRE 3 RÉSULTATS	97
3.1 L'ANALYSE DES MN SUITE À UNE EXPOSITION AU BaP	99
3.1.1 L'effet cytostatique du BaP	99
3.1.2 La fréquence des MN, des cellules micronucléées et le nombre de MN par cellule	99
3.2 LA RELATION DOSE-RÉPONSE AU BaP	102
3.2.1 Les indicateurs conventionnels du test des MN : la fréquence des MN et la fréquence des cellules micronucléées	102
3.2.2 Le troisième indicateur : le nombre de MN par cellule micronucléée	105
3.2.2.1 Le rapport de cote (RC)	105
3.3 LA VARIABILITÉ INTERINDIVIDUELLE	106
3.4 LES DIFFÉRENCES ENTRE LES HOMMES ET LES FEMMES	108
3.5 LES PROPRIÉTÉS CLASTOGÉNIQUES ET ANEUGÉNIQUES DU BaP	109
3.5.1 L'analyse des signaux centromériques dans les MN par la FISH	109
3.6 L'ANALYSE DES AC	115
 CHAPITRE 4 DISCUSSION	 117
4.1 LE BaP CAUSE UN EFFET CYTOSTATIQUE	119
4.2 LE BaP CAUSE DES EFFETS GÉNOTOXIQUES MESURABLES À FAIBLES CONCENTRATIONS	120
4.3 L'EXPOSITION AU BaP MONTRE UNE RELATION DOSE-RÉPONSE NON-LINÉAIRE	121
4.3.1 L'intensité de la réponse génotoxique diminue à de plus hautes concentrations	121

4.3.2. Le calcul du rapport de cote : une façon plus appropriée d'analyser le nombre de MN par cellule micronucléée ?	124
4.4 UNE IMPORTANTE VARIABILITÉ INTERINDIVIDUELLE EXISTE DANS LA RÉPONSE GÉNOTOXIQUE CAUSÉE PAR LE BaP.....	127
4.5 L'UTILISATION DE TRÈS FAIBLES CONCENTRATIONS DE BaP PERMET DE VOIR LA DIFFÉRENCE ENTRE LES SEXES.....	130
4.6 LES EFFETS DU BaP SUGGÈRENT QU'IL POSSÈDE À LA FOIS DES PROPRIÉTÉS CLASTOGÉNIQUE ET ANEUGÉNIQUE	132
4.6.1 Les mécanismes sous-jacents à la formation de MN contenant des centromères	135
4.6.2 L'utilité des autres types de sondes en FISH, pour comprendre les mécanismes à la base des effets aneugènes	136
CHAPITRE 5 CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	141
Bibliographie	149
ANNEXE I.....	xxxv
ANNEXE II.....	xxxvii
ANNEXE III.....	xxxix
ANNEXE IV	xli
ANNEXE V.....	xlii
ANNEXE VI.....	xliii
ANNEXE VII.....	liii
ANNEXE VIII	liv

Liste des tableaux

Tableau I : Liste des 15 HAP cancérigènes et leur classement en groupe cancérigène.	7
Tableau II: Les différents types de lésions de l'ADN et leurs mécanismes de réparation..	13
Tableau III: Liste de quelques agents chimiques ayant un effet clastogène.	34
Tableau IV: Liste de quelques agents chimiques ayant un effet aneugène.	36
Tableau V : Études antérieures de l'exposition du BaP avec le test des MN.	71
Tableau VI : Index de division nucléaire calculé chez six témoins pour les différentes conditions d'exposition.	99
Tableau VII : Compilation des résultats chez les 20 sujets à l'étude pour les trois indicateurs choisis.	101
Tableau VIII : Résultats de l'analyse des MN dans les lymphocytes humains exposés <i>in vitro</i> au BaP, présentés pour le groupe entier et par sexe.	103
Tableau IX: Rapports de cote (RC) pour le nombre de cellules contenant deux MN et plus, en comparaison avec le nombre de cellules contenant un seul MN, présentés pour les quatre concentrations de BaP testées.	105
Tableau X : Étude de la sensibilité des sujets aux effets génotoxiques du BaP, sur la base des réponses génotoxiques observées lors de l'évaluation de la fréquence des MN.	108
Tableau XI: Résultats de l'analyse du contenu des MN par FISH avec une sonde pancentromérique, présentés par sexe et pour le groupe entier.	111
Tableau XII : Nombre de MN analysés dans chaque catégorie de signal FISH et leur contribution relative à la somme des signaux répertoriés.	113

Tableau XIII: Résultats de l'analyse des AC dans les lymphocytes humains exposés <i>in vitro</i> au BaP, présentés pour le groupe entier.	115
Tableau XIV: Revue des études ayant évalué l'effet de l'âge et du sexe sur la fréquence basale des MN.....	131
Tableau XV: La fréquence des deux types d'aneuploïdie des chromosomes 7 et 9 observée chez des travailleurs d'une raffinerie de pétrole exposés au benzène. ...	137
Tableau XVI : Compilation des données brutes de l'analyse des MN pour les différentes conditions d'exposition au BaP chez les sujets féminins sur un total de 2000 cellules par sujet.....	xxxv
Tableau XVII : Compilation des données brutes de l'analyse des MN pour les différentes conditions d'exposition au BaP chez les sujets masculins pour un total de 2000 cellules par sujet.....	xxxvii
Tableau XVIII : Test non paramétrique des rangs signés de Wilcoxon pour la comparaison de la fréquence de MN en fonction de la concentration de BaP par rapport au contrôle pour les deux sexes et le groupe entier.....	xxxix
Tableau XIX : Test non paramétrique des rangs signés de Wilcoxon pour la comparaison de la fréquence des cellules micronucléées (‰) en fonction de la concentration de BaP.	xl
Tableau XX : Test non paramétrique des rangs signés de Wilcoxon pour la comparaison du nombre de MN par micronucléée en fonction de la concentration de BaP.	xl
Tableau XXI : Nombre de MN répertoriés dans chaque catégorie, présentés pour chacun des sujets de l'étude et pour les deux conditions testées.....	xli
Tableau XXII : Test des proportions pour la catégorie MN C+ effectué pour les deux sexes et le groupe entier.....	xlii
Tableau XXIII : Test des proportions pour la catégorie MN C ₃₊ effectué pour les deux sexes et le groupe entier.....	xlii

Liste des figures

Figure 1 : Les différentes structures nécessaires à la bioactivation des HAP..	9
Figure 2 : Voie générale de biotransformation des HAP..	11
Figure 3 : Mécanisme de réparation du brin d'ADN par excision de base (BER)..	14
Figure 4 : Schéma simplifié montrant le mécanisme de réparation de l'ADN par excision de nucléotides (NER)..	16
Figure 5 : Mécanisme de réparation de l'ADN par synthèse translésionnelle (TLS)..	17
Figure 6 : Schéma simplifié montrant la réparation d'un bris double-brin à l'ADN par recombinaison non homologue (NHEJ) et par recombinaison homologue (HRR)..	19
Figure 7 : Le déplacement de coupure (<i>nick-translation</i>), catalysé par l'ADN polymérase I et ressoudé par la ligase..	20
Figure 8 : La réparation de l'ADN par MMR..	21
Figure 9 : Les objectifs de la toxicologie génétique ..	25
Figure 10 : Les objectifs de la toxicogénétique ..	26
Figure 11 : Les deux types de cassures pouvant se trouver dans l'ADN..	32
Figure 12 : Différentes anomalies chromosomiques de structure..	35
Figure 13 : Schéma général des étapes de la biotransformation du BaP ..	43
Figure 14 : Voies métaboliques du BaP débutant dans la phase I de la biotransformation ..	45
Figure 15 : Mécanisme d'action du BaP dans la cellule ..	46
Figure 16 : Formation des quatre principaux adduits à l'ADN par le BPDE ..	48

Figure 17 : Les principales étapes de la cancérogenèse, depuis l'exposition jusqu'à la généralisation d'un cancer	53
Figure 18 : L'influence des facteurs de variation sur la formation de MN.....	61
Figure 19 : Le continuum Exposition-Maladie.....	68
Figure 20 : Schéma résumant les différentes étapes de l'analyse de la fréquence des MN dans les lymphocytes sanguins humains.	81
Figure 21 : Une cellule binucléée respectant les critères de sélection	82
Figure 22 : Une cellule binucléée contenant un MN	83
Figure 23 : Schéma représentant le mécanisme de formation des MN dû à un effet clastogène et/ou aneugène.....	87
Figure 24 : Quelques exemples d'aberrations chromosomiques.	89
Figure 25 : Cellules binucléées contenant des MN.....	100
Figure 26 : Courbes dose-réponse des trois indicateurs du test des MN, en fonction de la concentration de BaP chez les deux sexes et le groupe entier..	104
Figure 27 : Graphique de la fréquence de MN (%) en fonction de la concentration de BaP chez les 20 sujets.	107
Figure 28: Analyse par FISH avec une sonde pancentromérique, du contenu des MN.. ..	109
Figure 29: Histogramme illustrant les pourcentages de MN avec centromères (C+) et sans centromère (C-), pour les deux conditions étudiées de BaP.	111
Figure 30 : Histogramme illustrant les pourcentages de MN ayant 1 ou 2 centromères (C ₁₋₂ +) et ayant 3 centromères et plus (C ₃₊ +), pour les deux conditions étudiées de BaP.....	112
Figure 31 : Graphique illustrant la contribution relative à la somme des signaux FISH répertoriés, de chaque catégorie de signaux FISH, pour les deux conditions d'exposition au BaP étudiées.....	114

Figure 32 : Illustration des types d'aneuploidies distinguées par la FISH avec deux sondes centromériques spécifiques de deux chromosomes, en orange et en vert.	138
---	-----

Sigles et abréviations

A	Adénosine
AC	Aberration chromosomique.
ADN	Acide désoxyribonucléique.
ADN-PK	Protéine kinase dépendante de l'ADN, une enzyme-clé de la religature des cassures double-brin de l'ADN.
ADP	Adénosine diphosphate.
AhR	<i>Aryl hydrocarbon receptor</i> , récepteur des hydrocarbures aromatiques.
AKR	<i>Aldo keto reductase</i> , réductase aldo-kéto.
Alu I	<i>Arthrobacter luteus I</i> , endonucléase de restriction d'origine bactérienne de type I, capable de couper l'ADN double-brin et son site de restriction est AG/CT.
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> , test de l'analyse de la variance, un des tests fondamentaux de la statistique.
ARN	Acide ribonucléique.
ARNT	<i>Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i> , facteur de translocation nucléaire du récepteur des hydrocarbures aromatiques.
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i> , protéine mutée codée par le gène <i>ATM</i> de l'ataxie télangiectasie, un désordre génétique rare qui affecte le système nerveux, le système immunitaire et autres systèmes du corps humain.
ATP	Adénosine triphosphate.
ATR	<i>Ataxia telangiectasia rad3-related</i> , protéine codée par le gène <i>ATR</i> de l'ataxie télangiectasie et connexes Rad3.
BaP	Benzo-a-pyrène.
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i> , chromosome bactérien artificiel.
BCR-Abl	<i>Breakpoint cluster region – Abelson murine leukemia viral oncogene</i> , protéine de fusion possédant une activité tyrosine kinase constitutive interagissant avec de nombreuses voies de signalisation intracellulaires.
BDB	Bris double-brin.
BER	<i>Base excision repair</i> , réparation par excision de base.
BPDE	Benzo-a-pyrène-7,8-diol-9,10-époxyde.

BRCA1	<i>Breast cancer 1</i> , protéine codée par le gène <i>BRCA1</i> de cancer du sein n°1, localisé sur le bras long du chromosome 17, impliquée dans la réparation des dommages de l'ADN tout en ayant d'autres fonctions.
BRCA2	<i>Breast cancer 2</i> , protéine codée par le gène <i>BRCA2</i> localisé sur le bras long du chromosome 13, impliquée dans la réparation des bris double-brin de l'ADN.
BrdU	Bromodéoxyuridine.
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , albumine de sérum bovine.
BSB	Bris simple-brin.
<i>BUB1B</i>	<i>Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta</i> , gène responsable du point de contrôle mitotique.
CAS	<i>Chemical abstract services</i> , services d'enregistrement et d'information des substances chimiques.
CBMN	<i>Cytokinesis-block Micronucleus</i> , test de micronoyau couplé avec le blocage de la cytotécine.
CENP	<i>Centromere protein</i> , protéine centromérique.
CERFM	Comité d'Éthique de la recherche de la Faculté de médecine.
CHL	<i>Chinese hamster lung</i> , poumon de hamster chinois.
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i> , ovaire de hamster chinois.
CIRC	Centre international de recherche sur le cancer (voir IARC).
COL	Colchicine.
CSA	<i>Cockayne syndrom A</i> , syndrome de Cockayne A.
CSB	<i>Cockayne syndrom B</i> , syndrome de Cockayne B
CYP1	Cytochrome P450 de la famille 1.
CYP1A1	Cytochrome P450 de la famille 1, sous-famille A, polypeptide 1.
CYP1A2	Cytochrome P450 de la famille 1, sous-famille A, polypeptide 2.
CYP1B1	Cytochrome P450 de la famille 1, sous-famille B, polypeptide 1.
Cyt B	Cytochalasine B.
dA	Désoxyadénosine.
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole.
DB-a,1-P	Dibenzo-a,1-pyrène.
dC	Désoxycytidine.
dG	Désoxyguanosine.
DMBA	Diméthyl-benzo-a-anthracène.

DMSO	Diméthylsulfonate.
dNTPs	Déoxyribonucléotides triphosphates.
dTTP	Désoxy-thymidine triphosphate, une des deux pyrimidines nucléotidiques utilisées dans la synthèse de l'ADN.
dUMP	2'-déoxyuracile-5'-monophosphate.
ÉCS	Échange entre chromatides-sœurs.
ECVAM	<i>European centre for the validation of alternative methods</i> , centre européen pour la validation des méthodes alternatives.
EPA	<i>Environmental protection agency</i> , agence de protection environnementale.
EPC	<i>Epithelioma papulosum ciprini</i> , lignée de cellules permanentes dérivées de tumeur épithéliale de carpe <i>Cyprinus carpio L.</i>
ERCC1	<i>Excision repair cross complementing 1</i> , protéine de réparation par excision complémentaire croisée.
ERO	Espèces réactives de l'oxygène.
EU	<i>European union</i> , union européenne.
FEN1	<i>Flap endonuclease 1</i> , enzyme qui enlève le fragment surplombant le brin d'ADN.
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> , facteur de croissance fibroblastique.
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i> , hybridation <i>in situ</i> en fluorescence.
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i> , isothiocyanate de fluorescéine.
G	Guanine.
g	Gramme.
γH2AX	<i>Gamma Histone 2AX</i> , variant de l'histone humaine phosphorylée sur la sérine 139, ayant un rôle important dans la réparation de l'ADN.
GG-NER	<i>Global genome-nucleotid excision repair</i> , réparation par excision des nucléotides indépendamment de la localisation des lésions de l'ADN dans le génome.
GST	Glutathion-S-transférase.
GTP	Guanosine triphosphate.
GUM	<i>Gesellschaft für Umweltmutationsforschung</i> , groupe allemand faisant partie de la <i>Environmental Mutagen Society</i> , travaillant sur les agents mutagènes se trouvant dans l'environnement.
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique.
HepG2	<i>Human hepatocellular carcinoma cell line</i> , lignée cellulaire de l'hépatocarcinome.

HBSS	<i>Hank's buffered salt solution</i> , solution saline équilibrée de Hank.
HRR	<i>Homologous recombination repair</i> , réparation par recombinaison homologue.
Hsp90	<i>Heat shock protein 90</i> , protéine de choc thermique 90.
HUMN	<i>Human Micronuclei project</i> , projet de collaboration internationale sur l'étude des micronoyaux humains.
IARC	<i>International agency for research in cancer</i> , centre international de recherche sur le cancer (voir CIRC).
IC	Intervalle de confiance.
IDN	Index de division nucléaire.
IL ₂	Interleukine 2.
INSPQ	Institut national de santé publique du Québec.
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma</i> , oncogène situé sur le bras court du chromosome 12, codant pour une protéine p21ras de la famille des GTPases (enzymes hydrolases) (voir GTP).
Ku70	Acronyme désignant un antigène (Ku) reconnu par les anticorps produits par certains patients atteints d'une maladie auto-immune. Le chiffre 70 indique la masse approximative de la protéine en kilodaltons. La protéine Ku70 a des fonctions comme la protection de la cellule contre l'apoptose, l'association avec la protéine Ku80 (voir Ku80) pour la réparation des cassures double-brin de l'ADN et l'entretien des télomères.
Ku80	Même protéine que Ku70 mais plus grosse avec une masse de 80 kilodaltons.
LNCaP	<i>Lymph node carcinoma of the prostate</i> , lignée de cellules cancéreuses dérivées du noeud de lympho de la prostate.
M	Mole.
mEH	<i>Microsomial epoxide hydrolase</i> , époxyde hydrolase microsomiale.
µg	Microgramme.
mg	Milligramme.
mL	Millilitre.
MLH	<i>MutL Homolog</i> , homologue des protéines MutL impliqué dans la réparation des mésappariements de l'ADN.
µM	Micromole.
MMR	<i>Mismatch repair</i> , réparation des mésappariements de l'ADN.
MMS	Méthyl méthanesulfonate.

MN	Micronoyau.
Mre11	<i>Meiotic recombination defective 11</i> , protéine multifonctionnelle codée par le gène de même nom, ayant une activité d'exonucléase et constituant le complexe MRN (voir MRN).
MRN	Complexe formé par trois protéines : Mre11 (voir Mre11), Rad50 (voir Rad50) et Nbs1 (voir Nbs1) qui interviennent dans trois processus importants : la recombinaison homologue, la réparation des cassures double-brin et l'entretien des télomères.
MSH	<i>MutS Homolog</i> , homologue des protéines MutS impliqué dans la réparation des mésappariements de l'ADN et la réparation dans la voie de TC-NER (voir TC-NER).
MTHFR	Méthylène tétrahydrofolate réductase, impliquée dans le métabolisme des folates.
MTRR	<i>Methionine synthase reductase</i> , méthionine synthase, impliquée dans le métabolisme des folates.
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogénase.
Nbs1	<i>Nijmegen breakage syndrom 1</i> , protéine codée par le gène de même nom, gène muté chez les personnes atteintes d'un syndrome dont les manifestations ressemblent à celles de l'ataxie-télangiectasie consistant essentiellement à des bris chromosomiques. Cette protéine fait partie du complexe MRN (voir MRN).
NER	<i>Nucleotide excision repair</i> , réparation par excision de nucléotides.
ng	Nanogramme.
NHEJ	<i>Non homologous end joining</i> , ligature des extrémités sans avoir besoin de modèle homologue.
NQO1	<i>NAD(P)H : quinone oxidoreductase</i> , gène de la famille de NAD(P)H déshydrogénase (quinone) (voir NADPH).
OCDE	Organisation pour la coopération et le développement économique.
OECD	<i>Organization for economic co-operation and development</i> (voir OCDE).
OFSP	Office fédéral de la santé publique.
8-OH-dG	8-oxo-désoxyguanosine.
OMS	Organisation mondiale de la santé.
PARP	Protéine poly ADP-ribose polymérase (voir ADP).
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , tampon phosphate salin.
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i> , antigène de prolifération nucléaire de la cellule.

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , réaction de polymérisation en chaîne.
PHA	Phytohémagglutinine.
PMS 2	Endonucléase codée par le gène <i>Postmeiotic segregation 2</i> et jouant un rôle dans la réparation par MMR (voir MMR).
Pol II	Polymérase II.
Pol β	Polymérase β .
Pol δ/ϵ	Polymérase δ et/ou ϵ .
PPi	Pyrophosphate.
PPD	P-phénylène diamine.
PVP	Polyvinylpyrrolidone.
Rad50	<i>Radiation sensitive 50</i> , protéine codée par le gène de même nom et faisant partie du complexe MRN (voir MRN).
RC	Rapport de cote
Rev1	Protéine de la réplication virale.
RF	<i>Relative frequency</i> , fréquence relative.
RFC	<i>Replication factor C</i> , facteur de réplication C.
RNase	Ribonucléase.
RPA	<i>Replication protein A</i> , protéine de réplication A.
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> , acronyme donné au milieu de culture développé par Moore dans l'institut <i>Roswell Park Memorial</i> .
SCGE	<i>Single cell gel electrophoresis</i> , électrophorèse en gel cellulaire simple.
SDS	Sulfate de dodécyl sodium.
SSC	<i>Saline sodium citrate</i> , saline tampon de citrate de sodium.
SULT	Sulfotransférase.
SVF	Sérum de veau fœtal.
T	Thymine.
TC-NER	<i>Transcription coupled-nucleotid excision repair</i> , réparation par excision de nucléotides des lésions au niveau des régions transcrites de l'ADN.
TFIIH	<i>Transcription factor II-H</i> , facteur de transcription II-H.
TLS	<i>Translesion synthesis</i> , synthèse translésionnelle.
TP53	<i>Tumor protein 53</i> , gène suppresseur de tumeur impliqué dans le développement de nombreux cancers humains.

UDP	Uridine diphosphate.
UGT	UDP-glucuronyl transférase (voir UDP).
US EPA	<i>United States environmental protection agency</i> , agence de protection de l'environnement des Etats-Unis.
UV	Ultra-violet.
VEMP	Valeur d'exposition moyenne pondérée pour un quart de travail de 8 h/40 h par semaine à une substance chimique présente dans l'air inhalé par le travailleur.
XAB2	<i>XPA-binding protein 2</i> , protéine impliquée dans la réparation de l'ADN par TC-NER (voir TC-NER).
XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i> , classe de maladies récessives autosomales où il y a dégénération de la peau et des yeux sous la lumière du soleil. La protéine XP est codée par des gènes <i>XP</i> dont sept sont impliqués dans le processus de réparation de l'ADN (<i>XPA</i> , <i>XPB</i> , <i>XPC</i> , <i>XPD</i> , <i>XPE</i> , <i>XPF</i> , <i>XPG</i>).
XPA	Protéine codée par le gène <i>XPA</i> .
XPB	Hélicase codée par le gène <i>XPB</i> .
XPD	Hélicase codée par le gène <i>XPD</i> .
XPF	Endonucléase codée par le gène <i>XPF</i> .
XPG	Protéine formant un complexe avec la protéine ERCC1 dans la réparation de l'ADN par excision complémentaire croisée (voir ERCC1).
YAC	<i>Yeast artificial chromosome</i> , chromosome de levure artificiel.

*À Tuan, Antoine et Annie qui m'ont donné un
but dans la vie et qui m'ont encouragée à
reprendre mes études interrompues dans ma
jeunesse.*

Remerciements

Ce mémoire a mis trois longues années à paraître après tant d'efforts et de persévérance. Il résulte de la contribution et de la pertinence des conseils de nombreuses personnes, dont toute lacune reste mienne.

En tout premier lieu, je tiens à remercier le Docteur Nicole Lemieux, professeure au département de pathologie et biologie cellulaire de l'Université de Montréal, directrice du laboratoire de cytogénétique moléculaire et directrice de mon projet de recherche. Son initiative et son encadrement ont grandement contribué à l'aboutissement de mes travaux. J'ai la chance de travailler dans son laboratoire avec une équipe composée de personnes exceptionnelles et brillantes, toujours prêtes à se dévouer pour la réussite des projets de tous.

Je voudrais adresser mes remerciements au Docteur Maria Leiza Vitale, professeure agrégée au département de pathologie et biologie cellulaire de l'Université de Montréal et au Docteur Pierre Ayotte, professeur de la Direction de la Toxicologie Humaine-Institut National de Santé Publique du Québec (INSPQ) et chercheur dans l'Axe de Recherche en santé des populations et environnementale au Centre de Recherche Universitaire de Laval, qui ont accepté de devenir, respectivement, présidente-rapporteur et examinateur-externe de mon mémoire.

Mes remerciements vont aussi au Docteur Yvette Bonvalot, biostatisticienne et épidémiologiste, spécialiste en évaluation des risques toxicologiques à Santé Canada, pour son ingéniosité à faire parler les chiffres, qui m'a permis de mieux comprendre le vaste monde des statistiques.

Je remercie chaleureusement Madame Fléchère Fortin, collègue, étudiante au doctorat dans le laboratoire du Docteur Nicole Lemieux, pour ses conseils, son aide précieuse et ses encouragements. C'est le pilier sur lequel je peux m'appuyer dans mes moments de découragement, car elle a su dénouer toutes mes embûches techniques et morales. Les mots ne peuvent pas exprimer toute ma gratitude envers cette personne exceptionnelle.

Je souhaite aussi remercier vivement Madame Mélanie Beaulieu Bergeron, collègue, étudiante au doctorat du même laboratoire, pour son aide dans tout ce qui est technique, tant dans les expérimentations que dans l'informatique. Elle a su par sa gentillesse me mener jusqu'au bout de mes problèmes et régler toutes les difficultés que j'ai pu rencontrer durant mes expériences moléculaires et, aussi, avec mon ordinateur.

Je remercie aussi toutes les secrétaires du département de pathologie et biologie cellulaire de l'Université de Montréal, en particulier Mesdames Marielle Chèvrefils, Suzane Girard et Claire Longpré qui sont d'une patience d'ange face à ma lenteur à effectuer les travaux d'impression et à régler mes problèmes administratifs.

Mes remerciements vont aussi à Madame Christiane Malo, professeure et directrice du programme de sciences biomédicales au 1^{er} cycle, à tout le personnel, professeurs, chercheurs et étudiants, qui m'ont si bien accueillie dans le département et, tout particulièrement, à Madame Chantal Martel qui est toujours prête à recueillir le sang des volontaires de ce projet avec son sourire et sa bonne humeur.

Je n'oublie pas de remercier infiniment mes nombreux volontaires, qui ont grandement contribué à la réalisation de mon projet, grâce à leur consentement et à leur don de sang. Ce sont les principaux acteurs de ce projet. Ils ont joué des rôles nobles pour l'avancement de la recherche et, sans eux, cette étude n'aurait jamais pu se réaliser.

Enfin, je voudrais remercier mon mari et mes deux enfants qui m'ont si bien soutenue pendant toutes ces années d'étude. Grâce à eux, j'ai pu concrétiser le rêve resté bien ancré au fond de mon cœur, malgré tous les obstacles rencontrés sur les chemins de ma vie.



CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1. LA SANTÉ ENVIRONNEMENTALE ET LA GÉNÉTIQUE

La notion de santé environnementale est apparue dans les années 1980 suite au développement des sciences environnementales, de l'éco-toxicologie et de l'étude des risques sanitaires, et des études d'impact sur les milieux de vie. L'être humain, comme toute forme de vie terrestre, est la manifestation de l'équilibre entre les influences génétiques et environnementales. Heureusement, l'homme est de plus en plus sensible à la question de sa santé, en interaction avec son milieu de vie, où il peut être exposé à divers contaminants et polluants. Ceux-ci peuvent provenir aussi bien des phénomènes naturels, comme par exemple les éruptions volcaniques et les feux de forêts, que des activités anthropiques.

On qualifie de contaminant une substance dont la concentration mesurée à un moment précis est plus grande que celle de l'environnement normal. La plus grande concentration peut être due à une cause naturelle ou anthropique. Un polluant, par contre, est une substance en concentration plus grande que la normale en raison uniquement des activités anthropiques, tout en causant des problèmes directs ou indirects à l'environnement [Olivier, 2007]. Ces problèmes peuvent être liés à la dissémination de produits toxiques ou au rejet de matériaux non biodégradables. Avec les progrès technologiques, les problèmes de pollution proviennent en grande partie des installations minières ou métallurgiques, et sont causés par la production d'énergie à l'aide de combustibles fossiles. Les premières pollutions atmosphériques (le smog londonien par exemple) ont commencé avec l'utilisation de la houille comme combustible. Bien que l'usage du charbon soit maintenant très restreint en Amérique du Nord, certains pays en Europe centrale, ainsi que la Chine, utilisent encore ce combustible pour la production d'énergie, polluant l'atmosphère de manière considérable. De plus, la pollution industrielle mène à la pollution chimique par la circulation dans la biosphère d'innombrables composés minéraux ou organiques avec une toxicité souvent élevée. Ces agents polluants, comme par exemple les dioxines, les dérivés du pétrole, etc., sont rejetés, dispersés dans le milieu naturel, se retrouvant dans l'air, le sol et l'eau, contribuant ainsi à la contamination de nombreux écosystèmes [Olivier, 2007]. Ainsi, ces contaminants environnementaux causent de plus en plus de problèmes de santé humaine, allant des maladies chroniques comme l'asthme, les maladies vasculaires, cérébrovasculaires et rénales, l'emphysème, aux retards de développement et aux cancers (poumons, reins, etc.)

[CSST, 2003 ; Nantel et *al*, 2003]. Dans toutes ces maladies, l'hérédité et la génétique jouent également un rôle.

Par ailleurs, l'exposition des travailleurs aux substances génotoxiques est en liaison avec le type de produit manufacturé ou aux agents et procédés nécessaires à la fabrication du produit fini, eux-mêmes étant des composés chimiquement réactionnels (électrophiles) capables de réagir avec d'autres molécules ou substrats, et par conséquent, pouvant réagir également avec les macromolécules biologiques comme les protéines et l'ADN [Kirsch-Volders et *al*, 2002a]. L'industrie pétrolière, nucléaire, le milieu pharmaceutique et hospitalier ainsi que l'industrie du caoutchouc et autres, sont quelques exemples d'exposition aux agents génotoxiques dans le milieu professionnel.

Pour comprendre les effets de ces substances sur le génome, plusieurs approches combinant la génétique et la toxicologie se sont développées au cours des années. Elles demandent des compétences multidisciplinaires, dans le but de traduire les données scientifiques en moyens efficaces de protection et de prévention pour la santé des travailleurs et de la population en général [Kirsch-Volders et *al*, 2002a]. Parmi les substances toxiques, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) se retrouvent de manière ubiquitaire dans les milieux environnementaux et industriels. Ils sont de plus en plus étudiés dans le but d'établir des stratégies pour développer des biomarqueurs efficaces d'exposition et d'effet dans la surveillance biologique des populations et de détecter le plus rapidement possible les effets néfastes dus à l'exposition à ces agents potentiellement cancérogènes.

1.1.1 Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

1.1.1.1 Les HAP dans l'environnement de vie et professionnel

Dans l'environnement général, les sources d'émission des HAP sont d'origine naturelle (feux de forêts, volcans) ou anthropique et toujours sous forme de mélanges complexes constitués d'une centaine de composés différents. Les HAP se retrouvent aussi bien dans le milieu de vie (chauffage au bois ou au charbon, consommation de tabac, émission de gaz d'échappement des véhicules, aliments grillés ou fumés, etc.) que dans

l'environnement professionnel (industries utilisant les dérivés de la houille : cokerie, production d'électrodes et d'électrolyse d'aluminium, fonderie de fer et d'acier [Maître, 2008] et goudronnage des routes). La population est exposée en zone urbaine à des niveaux de HAP variant entre 0,05 et 1 ng/m³ d'air en été, pouvant grimper jusqu'à cinq fois plus en hiver [Prevedouros et *al*, 2004]. La pollution de l'air à l'intérieur des maisons par la combustion du bois de chauffage peut atteindre 70 ng de HAP par m³ d'air [Viau et *al*, 2000]. C'est surtout dans l'alimentation que de forts taux de HAP, de l'ordre de 165 ng/g, sont constatés. Ils dépendent du processus de préparation, c'est-à-dire que toute cuisson demandant une très haute température, comme le barbecue, le grill commercial, la friture à la poêle et les rôtissoires à température élevée, favorise le développement des HAP, dont certains sont des cancérigènes reconnus [Viau, 2008b]. Les végétaux contiennent aussi des quantités non négligeables de HAP (de l'ordre de 25 ng/g) dues à l'absorption des HAP particuliers de l'atmosphère qui se concentrent sur les feuilles [Phillips, 1999]. Enfin, il ne faut pas oublier que le tabagisme est aussi une des voies d'exposition importante aux HAP et qu'il est la cause de certaines maladies comme l'insuffisance respiratoire, le cancer du poumon et les maladies cérébrovasculaires. Tous les HAP rejetés dans l'atmosphère parcourent une certaine distance avant de retomber au sol, entraînés par les pluies, pour rejoindre les cours d'eau ; comme ils sont hydrophobes et lipophiles, ils s'adsorbent sur les particules en suspension et s'accumulent dans les sédiments [Olivier, 2007].

Dans le milieu professionnel, tous les procédés qui chauffent à haute température le coke, le goudron, le brai de goudron et les asphaltes, génèrent de grandes quantités de HAP [Olivier, 2007]. Ces produits proviennent des résidus de raffinage du pétrole et servent de liant dans le bitume routier, mélangés à des granulats de taille variable. Ils peuvent aussi servir de base de peinture à pulvériser et de produit d'étanchéité dans le bâtiment. Comme l'asphalte est un mélange complexe de nombreux hydrocarbures lourds à l'état solide, il doit être amolli par l'ajout de fluidifiant ou par chauffage, ce qui génère beaucoup de fumées à l'origine d'expositions professionnelles et de pollution de l'environnement [Weiss et *al*, 2004]. Tout cela constitue un important risque de cancer selon le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) [IARC, 2007]. Par ailleurs, le procédé « Söderberg » utilisé dans le secteur de l'aluminerie produit beaucoup de pollution environnementale par les HAP. Ce procédé consiste en l'utilisation d'électrodes de carbone tenues ensemble par des

goudrons contenant énormément de HAP. Par électrolyse, ces électrodes deviennent très chaudes et dégagent beaucoup de HAP, qui vont contaminer l'air dans le milieu de travail et aussi l'air extérieur. Actuellement, au Québec, seule l'usine de Beauharnois utilise encore le procédé « Söderberg », malgré les vives protestations de la population. Bien que l'exposition à ces polluants soit en décroissance dans les pays industrialisés, l'étude et l'analyse des risques permettent une meilleure prévention pour des populations encore exposées à ces produits [Viau, 2008b] comme en Chine et certains pays de l'Europe de l'Est.

1.1.1.2 La toxicité des HAP

Les HAP sont des composés de plus en plus étudiés à cause de l'incidence des cancers qu'ils provoquent. Ils sont ajoutés à la liste des polluants prioritaires par l'Agence de Protection de l'Environnement des États-Unis (US EPA), par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), par l'Union Européenne (EU) et par le CIRC. Les HAP sont des substances organiques constituées d'atomes de carbone et d'hydrogène, dont la structure moléculaire comprend au moins deux cycles (ou anneaux) accolés de benzène. Le benzène est lui-même constitué de six atomes de carbone formant un cycle. Les HAP sont classés selon le nombre de cycles, en HAP légers (jusqu'à trois cycles) et en HAP lourds (quatre cycles et plus) et ont des caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques très différentes. Ils se forment durant la décomposition thermique des molécules organiques et leur recombinaison subséquente [Haritash et Kaushik, 2009]. Une combustion incomplète à température élevée (500 à 800°C) ou un rejet de matériel organique à basse température (100 à 300°C) pendant une longue période de temps, mène à la production de HAP. Ne se dégradant pas facilement dans des conditions naturelles, ils seraient peut-être les premiers cancérigènes environnementaux connus [Haritash et Kaushik, 2009]. La majorité des HAP sont issus de la combustion incomplète de matières organiques comme le charbon, le mazout, le bois, le tabac, etc. Ils sont générés sous forme de gaz alors que les particules de suie, qui sont des mélanges de noir de carbone non brûlé, sont solides. Lorsqu'ils sont relâchés en même temps, le contact avec l'atmosphère abaisse leur température et permet aux HAP gazeux d'être adsorbés sur les feuillets de suie, surtout ceux ayant cinq cycles et plus [Olivier, 2007].

Du fait de sa grande diversité dans l'environnement, seuls certains HAP peuvent être identifiés par les analyses [OFSP, 2008]. L'US EPA a classé 15 HAP dans sa liste des polluants prioritaires et, généralement, ils sont considérés comme représentatifs de l'ensemble de la classe des HAP. Quant au CIRC, il en a classé 15 selon leur degré cancérigène pour l'humain (Tableau I, ci-dessous).

Tableau I : Liste des 15 HAP cancérigènes et leur classement en groupe cancérigène. *Source* : IARC, 2007.

HAP	Groupe cancérigène	Niveau cancérigène
Benzo-a-pyrène (BaP)	1	Cancérigène
Cyclopenta-c,d-pyrène	2A	
Dibenzo-a,h-anthracène	2A	Probablement cancérigènes
Dibenzo-a,l-pyrène	2A	
Benz-j-aceanthrylène	2B	
Benz-a-anthracène	2B	
Benzo-b-fluoranthrène	2B	
Benzo-j-fluoranthrène	2B	
Benzo-k-fluoranthrène	2B	
Benzo-c-phénanthrène	2B	Possiblement cancérigènes
Chrysène	2B	
Dibenzo-a,h-pyrène	2B	
Dibenzo-a,i-pyrène	2B	
Indéno-1,2,3,c,d-pyrène	2B	
5-méthylchrysène	2B	

D'autres HAP sont suspectés d'être potentiellement mutagènes ou cancérigènes pour l'humain, mais ils ne remplissent pas entièrement les principaux critères cancérigènes pour être classifiés [OFSP, 2008]. Les plus importants critères consistent en la production d'altérations irréversibles du génome (mutations) et la perte de la régulation du cycle cellulaire. Certains cancérigènes sont capables d'induire la transformation cellulaire en tirant parti des mutations présentes (héréditaires ou induites par des facteurs environnementaux) et en induisant une prolifération cellulaire anormale, par des modifications spécifiques de la méthylation de l'ADN [Kirsch-Volders et al, 2002a].

Les HAP peuvent être assimilés par trois voies d'absorption : par voie digestive en ingérant des aliments contenant des HAP, par voie respiratoire en inhalant de la poussière et par voie cutanée en touchant les matériaux qui en contiennent [OFSP, 2008] ou à cause de la suie qui s'est déposée en couches sur la peau. Les effets cancérigènes des HAP peuvent mener à l'augmentation de la mortalité et/ou de la morbidité causée par les maladies respiratoires, cardiovasculaires et le cancer [Taioli et *al*, 2007]. Les travailleurs exposés aux HAP ont, à long terme, un risque élevé de développer un cancer du poumon, du larynx, de la peau, des reins et de la vessie [Bosetti et *al*, 2007]. Parmi les cancers de la peau, le cancer du scrotum des ramoneurs, décrit par Percivall Pott en 1775, a une valeur historique. Il a permis de prendre conscience de la nécessité de protéger la peau avec des équipements spéciaux et des crèmes barrières ne permettant pas la pénétration cutanée des HAP.

1.1.1.3 La biotransformation des HAP

La plupart des HAP requièrent une activation métabolique et une détoxification par différentes enzymes pour exercer leurs effets mutagènes et cancérigènes. Cette biotransformation conduit à la formation d'époxydes et/ou de dérivés hydroxylés [Leng et *al*, 2004 ; Miller et Miller, 1981]. Les époxydes sont des composés extrêmement toxiques qui réagissent très facilement avec l'ADN, entraînant des mutations géniques pouvant mener au cancer [OFSP, 2008].

Le métabolisme des HAP implique les cytochromes P450 de la famille 1 (les CYP1 : CYP1A1, CYP1A2 et CYP1B1), une famille de mono-oxygénases, induites par le récepteur arylhydrocarbure (AhR) [Baird et *al*, 2005]. Les cytochromes P450 sont des hémoprotéines associées à des flavoprotéines qui sont liées à la membrane du réticulum endoplasmique lisse, un des organites internes de la cellule, et sont fortement exprimées dans le foie. Ces CYP1 se trouvent également dans les tissus extra-hépatiques comme les poumons, le tractus gastro-intestinal, la peau et les reins [Marie, 2007]. Les CYP1A1, CYP1B1 sont aussi retrouvés dans les lymphocytes sanguins périphériques [Iarmarcovai et *al*, 2008 ; Toide et *al*, 2003]. Le CYP1A1 et le CYP1B1 convertissent les HAP lipophiles en des réactifs électrophiles [Baird et *al*, 2005]. Bien qu'il y ait d'autres enzymes connues pour être cruciales dans la cascade de la cancérogenèse, elles n'ont pas fait l'objet d'études aussi

approfondies. Cependant, tous les HAP ne sont pas bioactivés par les CYP1. Dans leur squelette carboné, les HAP doivent avoir des « creux », par exemple, une région baie comme dans le benzo-a-pyrène (BaP), une région fjord comme dans le dibenzo-a,l-pyrène (DB-a,l-P) ou une région baie entravée accompagnée d'une région K (région de présence dense d'électrons) comme dans le 7,12-diméthyl-benzo-a-anthracène (DMBA) [Baird *et al*, 2005]. Ces régions sont illustrées à la [Figure 1](#), ci-dessous.

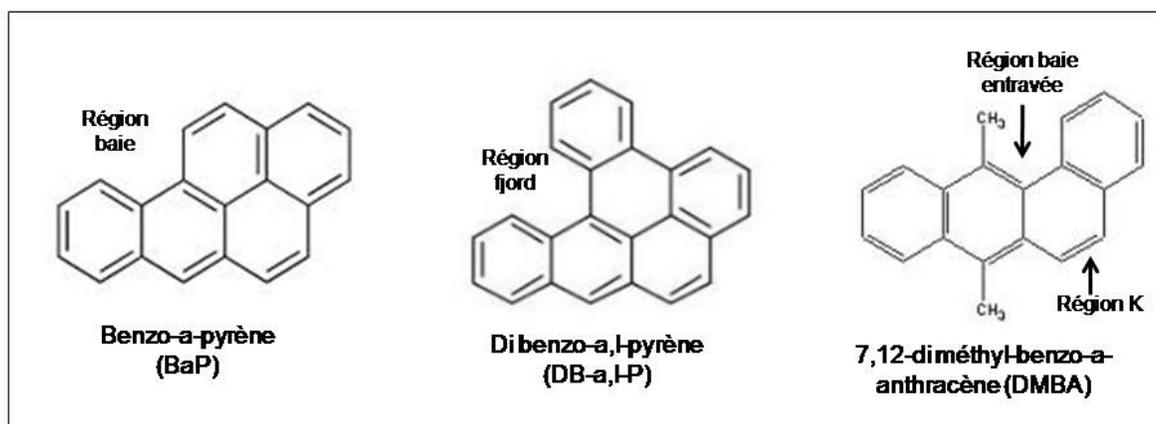


Figure 1 : Les différentes structures nécessaires à la bioactivation des HAP. *Source modifiée : Baird et al, 2005.*

Les réactions de biotransformation des substances toxiques sont habituellement groupées en réactions de phase I, qui comprennent les réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse, suivies par les réactions de phase II, qui sont des réactions de conjugaison. Celles-ci permettent aux substances étrangères ou à leurs métabolites, d'être couplés à des substrats endogènes pour devenir plus polaires et plus faciles à éliminer [Lauwerys *et al*, 2007]. Plusieurs études ont démontré que la majorité des HAP cancérogènes sont activés par la combinaison de l'activité des CYP1 avec l'époxyde hydrolase (mEH), produisant des diol-époxydes hautement réactifs initiant la transformation cellulaire [Shimada et Fujii-Kuriyama, 2003 ; Conney, 1982 ; Gelboin, 1980]. Les HAP sont donc biotransformés en passant par l'étape initiale de la phase I, commune à toutes les voies métaboliques, qui est l'oxydation. Cette étape peut être réalisée par trois voies métaboliques différentes qui sont : la voie des mono-oxygénases, la voie des peroxydases et la voie des dihydrodiol-déshydrogénases. Elles seront décrites plus en détail dans la section réservée au benzo-a-

pyrène (BaP) à la section 1.2 de ce chapitre (page 41), composé le plus étudié auquel sont comparés la majorité des HAP cancérigènes (ayant quatre cycles de carbone et plus). Les mono-oxygénases CYP1 et l'époxyde hydrolase (mEH), une enzyme microsomiale, sont responsables de la biodétoxification des époxydes par hydratation, de la formation des dihydrodiols, puis des diols [Botta, 2007]. Globalement, le métabolisme oxydatif des HAP aboutit à la formation de phénols, de diols et de diols-époxydes. Les diols subiront une deuxième oxydation pour donner des métabolites qui pourront être conjugués ensuite en sulfo ou glucuronoconjugués [Luch, 2005]. Les diols-époxydes sont hautement réactifs et réagissent rapidement avec les macromolécules cellulaires (protéines, ADN), conduisant à des produits cancérigènes lorsqu'ils se lient de manière covalente à l'ADN [Luch et Baird, 2005].

Le schéma général de la biotransformation des HAP est illustré à la Figure 2, page 11. En résumé, la phase II est la phase de conjugaison, aussi appelée phase de détoxification. Dans le foie, elle est réalisée par des enzymes comme la glutathion-S-transférase (GST), l'UDP-glucuronyl-transférase (UGT) et la sulfo-transférase (SULT). La GST conjugue le glutathion aux groupements époxydes électrophiles, limitant la formation d'adduits sur l'ADN, tandis que les UGT et SULT font la conjugaison de l'acide glucuronique et des sulfates aux groupements phénols formés dans certaines voies métaboliques des HAP [Botta, 2007].

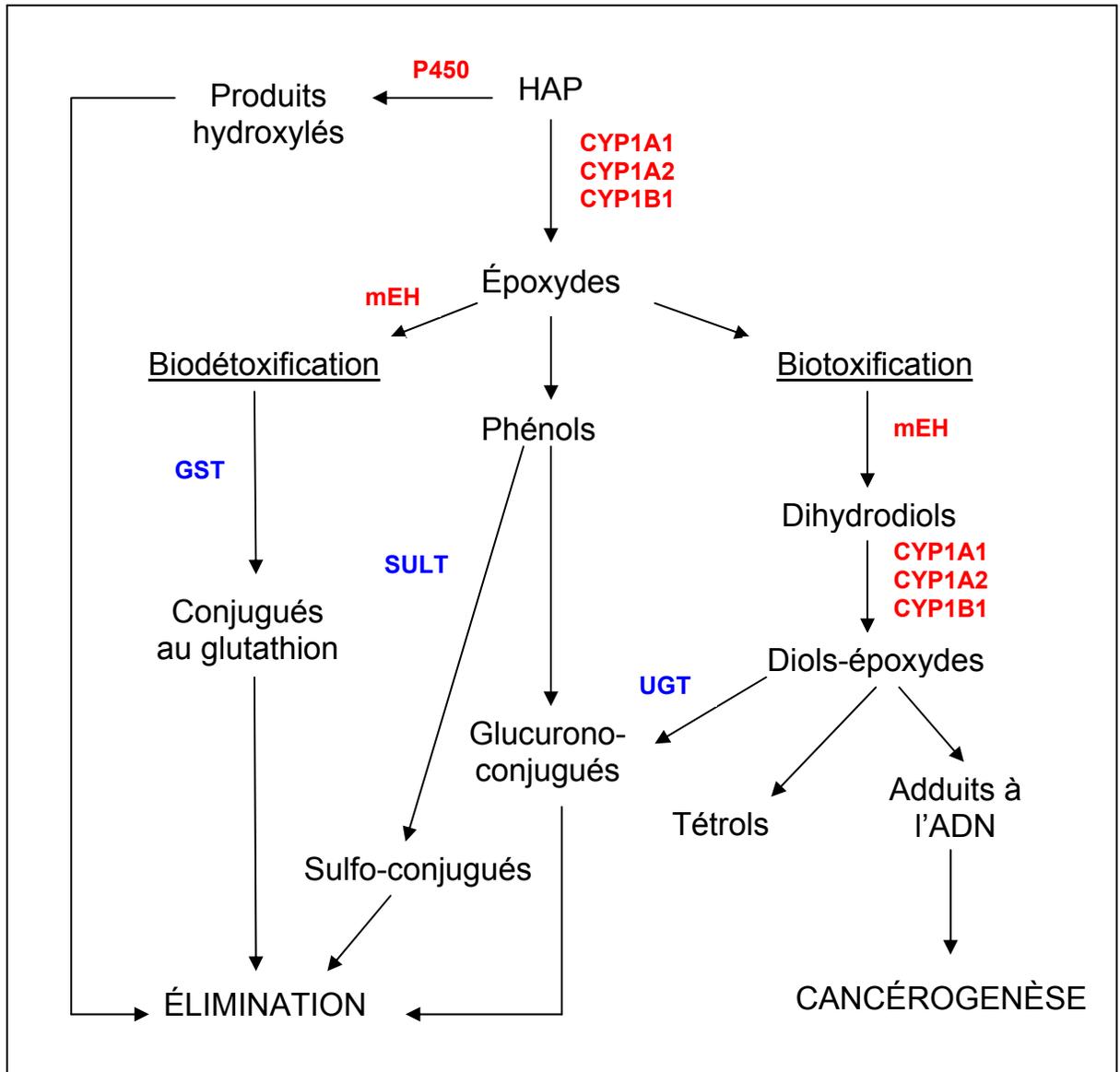


Figure 2 : Voie générale de biotransformation des HAP. *Source modifiée : Baird et al, 2005.*

Légende : Les enzymes de la phase I sont en **rouge** et celles de la phase II, en **bleu**.

Par la conjugaison des métabolites à des molécules hydrophiles (ex : l'acide glucuronique), il y a accroissement du poids moléculaire du produit de conjugaison et augmentation de la facilité de son passage dans la vésicule biliaire pour l'excrétion. La plupart des diols et des époxydes formés peuvent être éliminés sous la forme de conjugué dans les excréments et l'urine.

1.1.1.4 La formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et des adduits

L'activation métabolique des HAP forme des groupes électrophiles pouvant conduire aussi bien à la formation d'adduits covalents à l'ADN, qu'à des lésions oxydatives [Park et *al*, 2006]. Ces lésions sont dues à la formation des ERO : le radical hydroxyle (OH[•]), les ions superoxydes (O₂^{•-}) et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Ces ERO sont impliqués dans la production des dommages, soit en s'ajoutant sur les bases de l'ADN pour former des bases oxydées, soit en réagissant avec le 2'-désoxyribose pour former des cassures de l'ADN [Marie, 2007]. La formation d'une liaison covalente entre un diol-époxyde des HAP et une base de l'ADN génère des adduits. De plus, les radicaux libres peuvent réagir directement avec la molécule d'ADN et former plus de 100 lésions oxydatives différentes dont la plus fréquente est la 8-oxo-désoxyguanosine (8-OH-dG) : produit de l'oxydation de la 2'-désoxyguanosine en position C⁸. Les adduits 8-OH-dG ainsi formés sont susceptibles de conduire à des mutations, qui, si elles ne sont pas réparées et portent sur des gènes-clés, pourraient entraîner une transformation néoplasique de la cellule [Wogan et *al*, 2004]. Comme décrit aux pages 10 et 11, le métabolisme des HAP mène à la formation de métabolites hautement réactifs. Ces métabolites réagiront en formant des adduits avec les groupes électronégatifs des protéines, de l'ARN ou de l'ADN. Les adduits seront décrits plus en détail dans la partie réservée au BaP (sections 1.2.3.1 - 1.2.3.2 - 1.2.3.3, pages 48 à 50).

1.1.1.5 Les dommages à l'ADN et les mécanismes de réparation

Les réactions des métabolites des HAP ou des ERO avec l'ADN pourront mener à un effet cancérigène suite à des erreurs lors de la réparation de l'ADN, par une modification de la séquence de bases conduisant à une mutation ou par un attachement à l'ADN entraînant une erreur de lecture pendant la réplication. Par ailleurs, l'ADN est continuellement soumis à des altérations d'origine endogène qui peuvent aussi entraîner des mutations, déclencher un processus cancéreux par activation de proto-oncogènes ou par inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Plusieurs causes sont à l'origine de la grande variété des dommages à l'ADN et peuvent être classées en trois grandes catégories [Pourquier, 2006] :

- Les lésions d'origine endogène qui sont provoquées par des produits ou sous-produits du métabolisme cellulaire, par la rupture spontanée de la liaison glycosidique entre la base et le désoxyribose ou par les activités des enzymes comme l'ADN glycosylase, qui réparent les bases endommagées.
- Les lésions oxydatives qui sont liées, entre autres, à l'action des radicaux libres issus de la respiration mitochondriale, telles que les ions superoxydes (O_2^{\bullet}), les radicaux hydroxyles (OH^{\bullet}) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).
- Les lésions d'origine exogène qui sont liées à des facteurs environnementaux comme les rayons ultra-violet (induisant le pontage de thymines adjacentes qui conduisent à des adduits), certaines substances génotoxiques présentes dans la fumée de cigarette ou les rejets industriels (eux aussi capables de former des adduits plus ou moins volumineux), de même que certains médicaments anticancéreux dont la nature des lésions dépend du mécanisme d'action de la drogue.

Pour préserver l'intégrité du génome, les cellules développent des mécanismes efficaces, capables de réparer l'ADN et de restituer fidèlement l'information génétique (réparation fidèle) [Fuchs et Tessier, 2005]. Différents mécanismes de réparation peuvent être déclenchés, en fonction du type de lésion. Certains mécanismes peuvent même prendre en charge un ou plusieurs types de lésion (Tableau II, ci-dessous).

Tableau II : Les différents types de lésions de l'ADN et leurs mécanismes de réparation. *Source modifiée : Pourquoi, 2006.*

Type de lésion	Mécanisme de réparation
Adduits O_6 -méthyl guanine	Réversion directe
Bases mal appariées	Réparation des mésappariements (MMR)
Sites abasiques	Réparation par excision de base (BER)
Bases oxydées	
Désaminations de bases	
Bases alkylées	
Cassures simple-brin	
Lésions UV	Réparation par excision des nucléotides (NER)
Adduits cancérogènes volumineux	Réparation par NER
Cassures double-brin	Réparation par recombinaison homologue (HRR) et/ou réparation par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ)

Les deux mécanismes d'excision qui éliminent la majorité des lésions de l'ADN sont la réparation par excision de base (BER) et la réparation par excision des nucléotides (NER). La réparation par BER (Figure 3, ci-dessous) est un mécanisme qui répare les dommages au niveau d'une base individuelle de l'ADN. La réparation peut se faire par deux voies : la voie courte (majoritaire) ou la voie longue (alternative). La voie courte consiste en une simple élimination de la base endommagée qui est excisée par une ADN glycolase spécifique, suivie par le remplacement de la base manquante et sa ligation par l'ADN ligase 3. La voie longue est activée quand il y a une interruption du brin d'ADN (par exemple lors d'une cassure simple-brin). Elle implique la synthèse de deux à six nucléotides par la polymérase δ/ϵ (Pol δ et/ou ϵ) en utilisant le brin opposé comme matrice, alors que la polymérase β (Pol β) et la protéine PARP stabilisent la réaction. Finalement, l'ADN ligase restaure la continuité du brin [Pourquier, 2006]. Même s'il y a une seule base endommagée, une série d'enzymes différentes sont nécessaires pour assurer une réparation correcte.

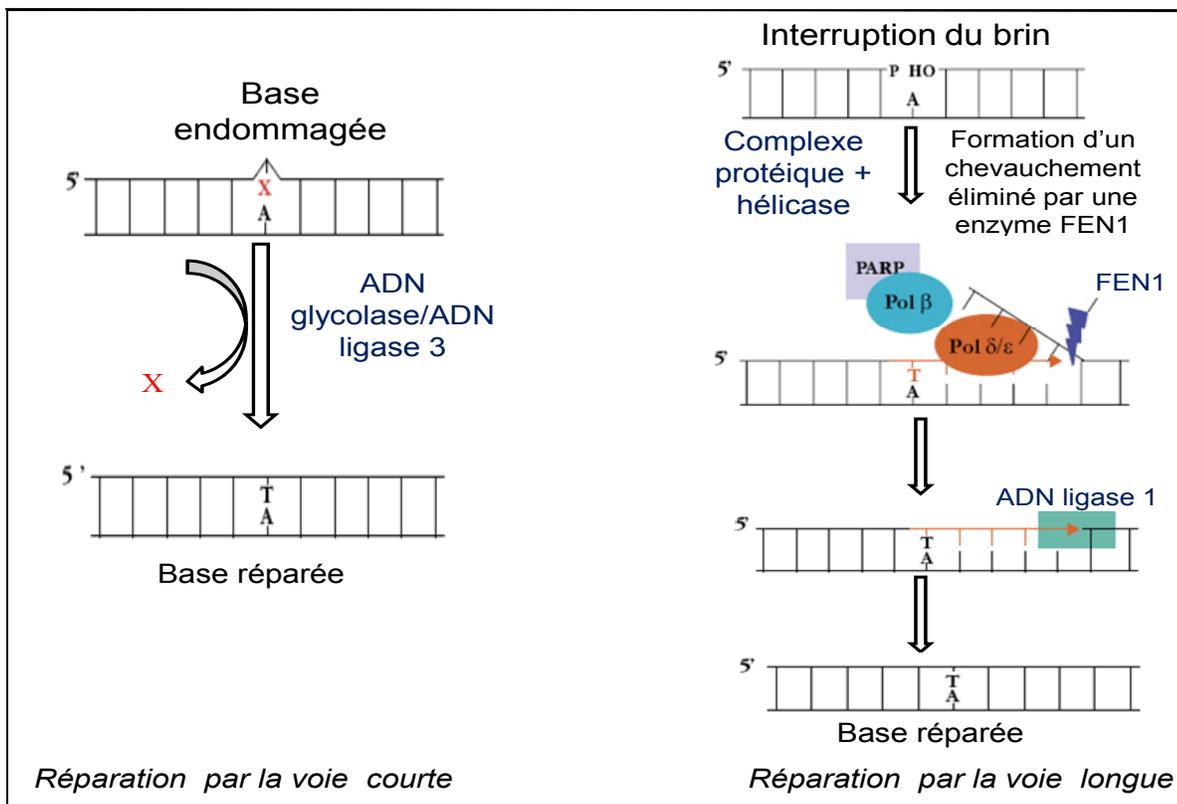


Figure 3 : Mécanisme de réparation du brin d'ADN par excision de base (BER). Source modifiée : Pourquier, 2006.

La réparation par NER (Figure 4, page 16) fait intervenir un grand nombre de protéines incluant les protéines XP dont la déficience chez l'homme cause une maladie récessive rare (*Xeroderma pigmentosum*) dans laquelle une hypersensibilité aux rayons ultraviolets de la lumière du soleil prédispose au développement du cancer de la peau [Cleaver, 2005]. Le NER a aussi deux voies de réparation, celle qui répare les lésions se trouvant sur le brin d'ADN non transcrit (GG-NER) et celle couplée à la transcription (TC-NER), dont les lésions se trouvent sur le brin d'ADN transcrit. Les étapes de reconnaissance des lésions diffèrent dans ces deux voies :

- dans la voie de GG-NER, c'est le complexe des protéines XP qui reconnaît la distorsion de l'ADN,
- dans la voie de TC-NER, au niveau de la lésion, la progression de l'ARN polymérase II (ARN-Pol II) est arrêtée pour que deux facteurs spécifiques, CSA et CSB (Syndrome de Cockayne A et B) puissent intervenir.

Une fois la lésion détectée, les protéines de réparation peuvent intervenir grâce à l'entrée en jeu des hélicases XPD et XPB qui maintiennent l'ouverture de la double hélice d'ADN et d'autres facteurs comme le complexe TFIIH (*Transcription Factor II H*), la protéine XPA, la protéine RPA (*Replication Protein A*), la protéine XPG, pour la voie GG-NER et les protéines XPG, BRCA1, BRCA2 (*BReast CAncer 1 et 2*) pour la voie TC-NER). Ces facteurs permettent le recrutement de l'endonucléase XPF en association avec la protéine ERCC1 (*Excision Repair Cross-Complementing 1*) et des nucléases, qui incise le brin endommagé de la lésion en 5' libérant un fragment de 24 à 32 bases [Friedberg, 2003] puis l'ADN polymérase δ (et/ou ϵ) effectue une nouvelle synthèse de brin en présence des facteurs RFC (*Replication Factor C*), PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) et RPA. L'ADN ligase relie le tout pour assurer la continuité de l'ADN [Pourquier, 2006].

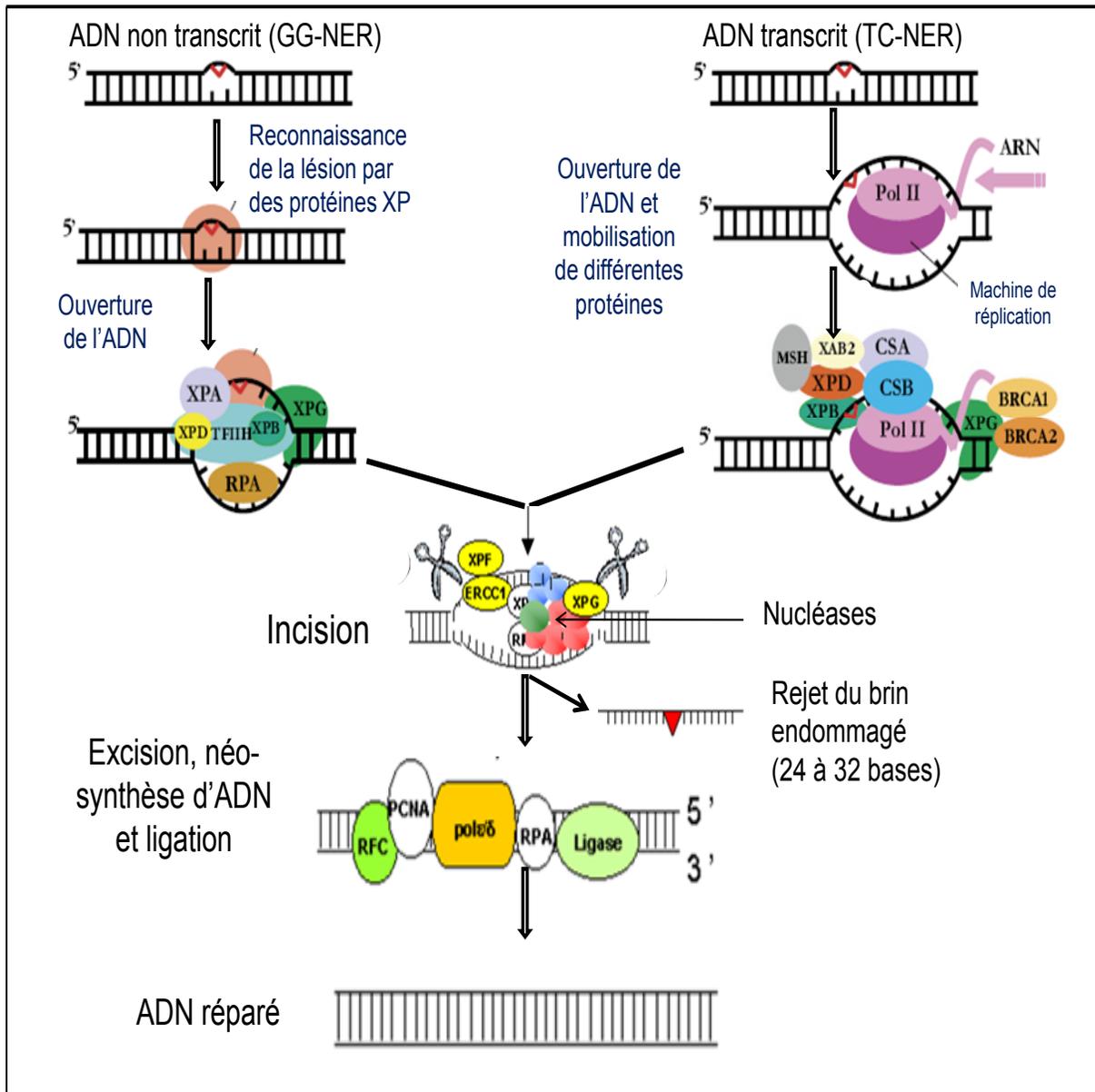


Figure 4 : Schéma simplifié montrant le mécanisme de réparation de l'ADN par excision de nucléotides (NER). Sources modifiées : Pourquier, 2006 ; Kériel, 2002.

Malgré l'efficacité de ces mécanismes de réparation, certaines lésions présentes dans l'ADN au moment de la réplication peuvent interférer avec la progression de la machinerie de réplication. L'achèvement de la synthèse de l'ADN dépend alors de l'existence de mécanismes de tolérance des lésions: la synthèse translésionnelle (TLS pour *Translesion Synthesis*) et la recombinaison de l'ADN.

La réparation par TLS (Figure 5, ci-dessous) permet de franchir la lésion grâce à l'intervention d'ADN polymérases spécialisées (les ADN polymérases η , ι , κ et la protéine Rev1) [Fuchs et Tessier, 2005]. En raison de la structure particulière des sites actifs de ces protéines, elles permettent la réplication de l'ADN contenant des lésions ou des distorsions [Lehmann, 2002], ce qui entraîne une certaine tolérance aux mésappariements. Ce mécanisme de réparation s'accompagne fréquemment de la mise en place d'une mutation [Fuchs et Tessier, 2005].

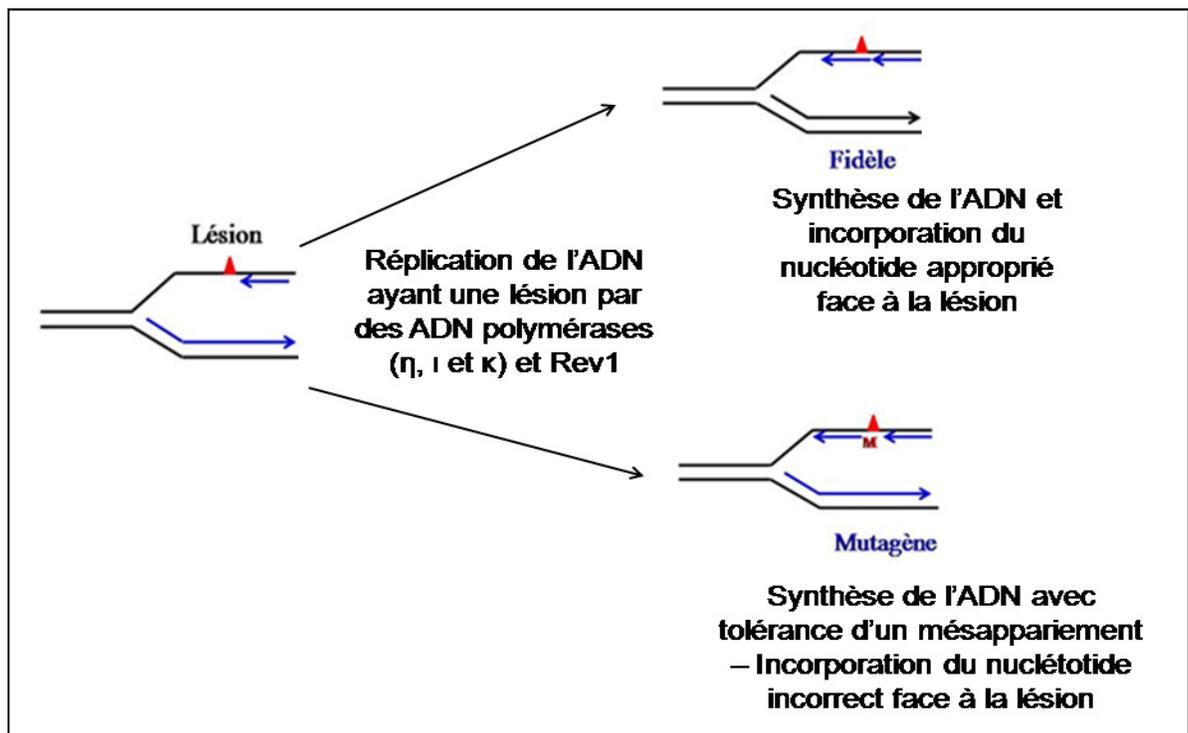


Figure 5 : Mécanisme de réparation de l'ADN par synthèse translésionnelle (TLS). Sources modifiées : Cordonnier, 2010 ; Pourquier, 2006.

En ce qui concerne la recombinaison de l'ADN, deuxième mécanisme de tolérance des lésions, des bris double-brin peuvent survenir dans la structure de l'ADN lorsque celle-ci est soumise à des agents toxiques de nature physique (exemples : rayonnements ionisants, rayons UV) et/ou chimique (exemples : agents alkylants, bléomycine). Certains processus spécifiques durant la réparation de l'ADN (BER, NER, etc.) peuvent aussi causer des bris double-brin. Ces dommages peuvent être détectés par des protéines senseurs comme ATM (ataxie télangiectasie muté) et ATR (ataxie télangiectasie et connexes Rad3), qui phosphorylent des protéines effectrices essentielles pour le remodelage de la chromatine [Matsuoka et *al*, 2007] comme l'histone γ H2AX, afin de coordonner les premières étapes de la recombinaison [Pourquier, 2006]. La recombinaison de l'ADN peut se faire par deux voies : 1- la voie de recombinaison non homologue (NHEJ) et 2- la voie de recombinaison homologue (HRR). Ces deux voies de recombinaison sont illustrées sur la [Figure 6](#), page 19. Au cours de la réparation, il peut y avoir des gains ou des pertes de quelques nucléotides. De plus, un bris double-brin peut être réparé sans pour autant restituer la séquence d'origine, soit par recombinaison illégitime avec une séquence prise au hasard (les plus fréquentes étant les séquences Alu) [Balosso et Foray, 2005], ou soit par recollement d'extrémités non homologues par NHEJ. Les séquences Alu sont de courts segments d'ADN caractérisés par la présence d'un site de restriction reconnu par l'enzyme Alu I et sont des éléments mobiles abondants dans le génome humain.

La voie NHEJ permet de recoller ensemble les extrémités de deux cassures double-brin qui sont situées à proximité l'une de l'autre. Suite à la reconnaissance des lésions, les extrémités double-brin de l'ADN cassé sont raboutées en faisant intervenir un complexe protéique ADN-PK avec ses sous-unités catalytiques (Ku80, Ku70, Artemis), puis la continuité des brins est restaurée par la ligase IV. La voie NHEJ est la plus rapide, mais génère des erreurs d'insertion ou de délétion de quelques bases [Pourquier, 2006]. De plus, la mise en continuité des séquences présentes au voisinage de l'extrémité des fragments de l'ADN coupés semble être le fruit du hasard, menant à la génération des inversions et des translocations chromosomiques [Iarmarcovai et *al*, 2007b]. Donc, à la suite d'une mauvaise réparation, les bris double-brin peuvent donner naissance à des aberrations chromosomiques qui sont soit stables (translocations, inversions), soit instables (dicentriques, fragments acentriques, anneaux).

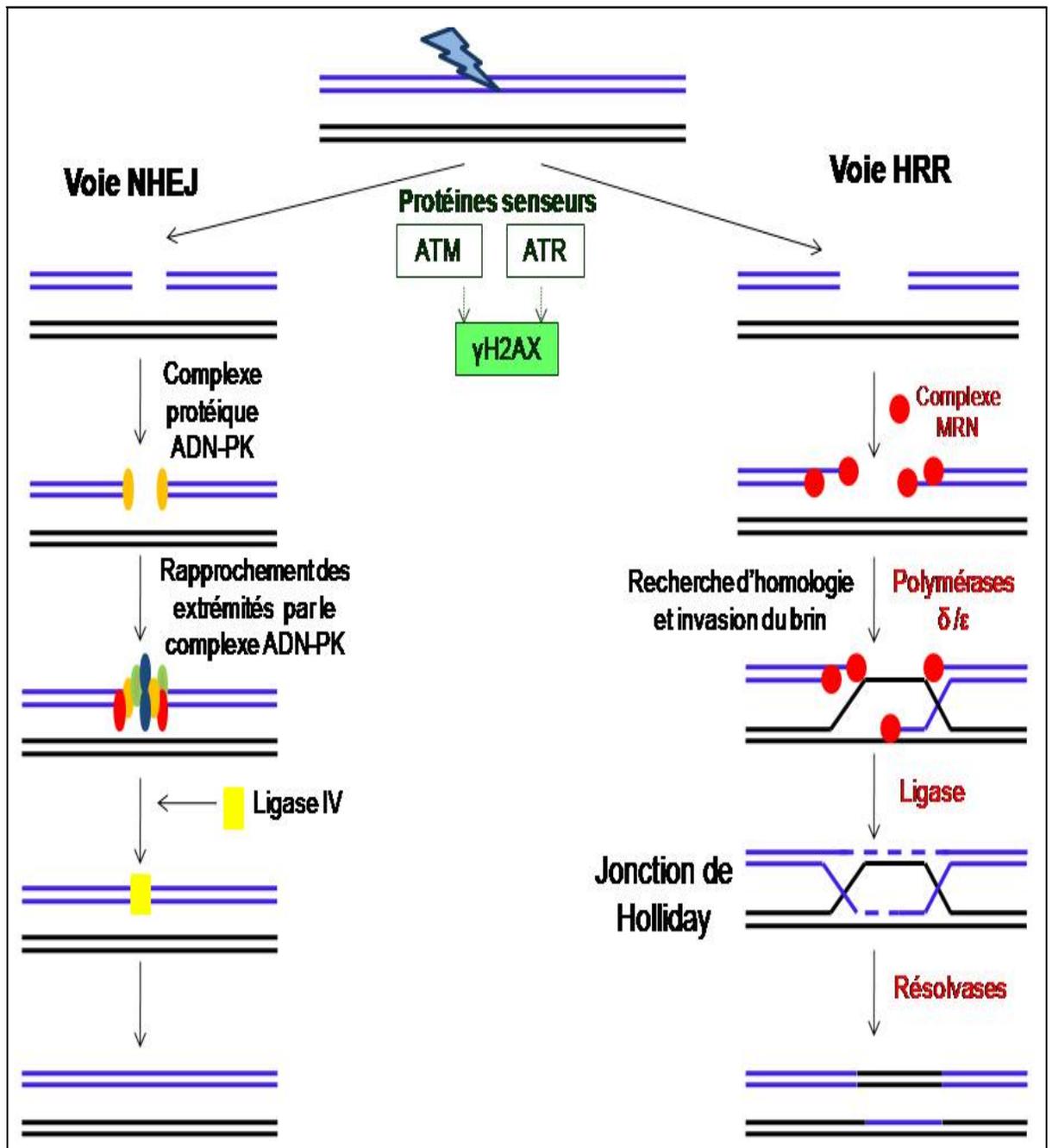


Figure 6 : Schéma simplifié montrant la réparation d'un bris double-brin à l'ADN par recombinaison non homologe (NHEJ) et par recombinaison homologe (HRR).
Source modifiée : Pourquier, 2006.

La voie HRR, quant à elle, se sert de la séquence homologue de l'ADN non endommagé présent sur la chromatide-sœur pour synthétiser un nouveau brin. Ce système de réparation nécessite l'action de plus d'une dizaine de protéines et du recrutement du

complexe MRN (constitué de trois molécules : Mre11, Rad50 et Nbs1) pour produire l'échange et l'invasion du brin complémentaire. Ceci donne naissance à une structure intermédiaire appelée « jonction de Holliday » qui nécessite la participation des résolvas, pour permettre la restauration des deux fragments d'ADN originaux [Pourquier, 2006]. Le système de réparation HRR permet une réparation fidèle de l'ADN, même s'il cause parfois des atteintes visibles en cytogénétique, appelées échanges entre chromatides-sœurs. La déficience des protéines impliquées dans la voie HRR entraînent des syndromes comme l'ataxie télangiectasie, le syndrome de Nijmegen, le syndrome de Bloom, le syndrome de Werner et l'anémie de Fanconi [Fuchs et Tessier, 2005].

Des bris simple-brin situés sur un fragment d'ADN peuvent aussi survenir lors d'une exposition aux agents toxiques. Ils se produisent lorsqu'une liaison sucre-phosphate est rompue et se réparent facilement à partir du brin opposé qui sert de matrice. Le brin d'ADN lésé est réparé par l'ADN polymérase I. Ses activités exonucléase 5'→3' et polymérase jumelées déplacent la cassure vers l'extrémité 3' du brin cassé sans changer le reste de la molécule ; c'est le mécanisme de la *nick translation* comme le montre la [Figure 7](#), ci-dessous. Les cassures simple-brin sont ressoudées par une réaction catalysée par une ligase [Voët et Voët, 2005]. Lorsqu'un bris simple-brin est présent durant la phase S et qu'il est répliqué, la réparation se fera par recombinaison homologue [Cortés-Ledesma et Aguilera, 2006].

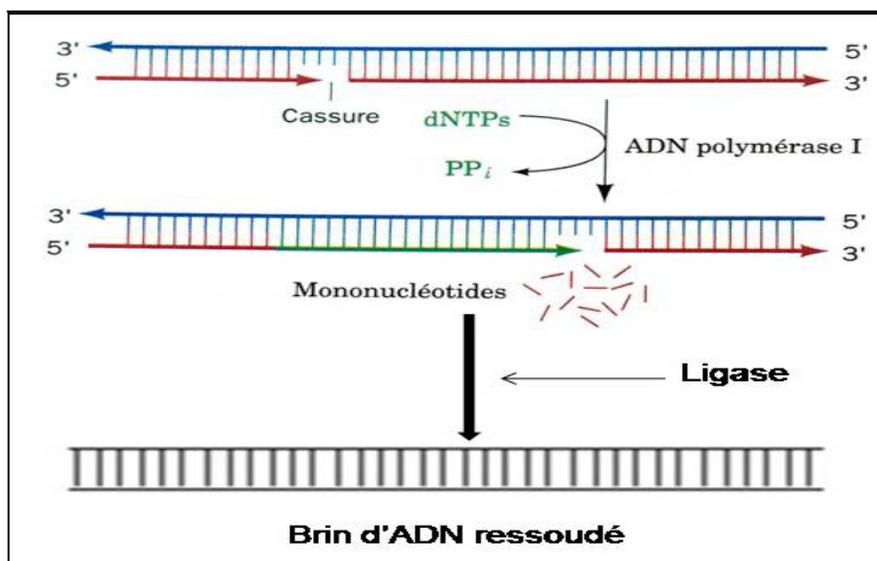


Figure 7 : Le déplacement de coupure (*nick-translation*), catalysé par l'ADN polymérase I et ressoudé par la ligase. *Source modifiée : Voët et Voët, 2005.*

D'autre part, une autre voie appelée la réparation des mésappariements (MMR) est activée lorsque des bases mal appariées apparaissent au cours de la réplication du génome (Figure 8, ci-dessous). Le mécanisme de MMR comporte quatre étapes : la reconnaissance du mésappariement, le recrutement de facteurs accessoires, la recherche d'un signal permettant de reconnaître le brin nouvellement synthétisé contenant l'erreur pour le dégrader et la resynthèse [Fuchs et Tessier, 2005]. Ce mécanisme de réparation fait entrer en jeu des hétérodimères (MSH2-MSH6 ou MSH2-MSH3) et de l'ATP pour recruter d'autres hétérodimères (MLH1, PMS2) permettant ainsi de glisser sur l'ADN à distance du mésappariement [Pourquier, 2006]. La dégradation du brin contenant le mésappariement se fait par l'exonucléase I (Exo I) et la protection de l'ADN simple-brin du brin matrice est assurée par la présence de la molécule RPA [Pourquier, 2006].

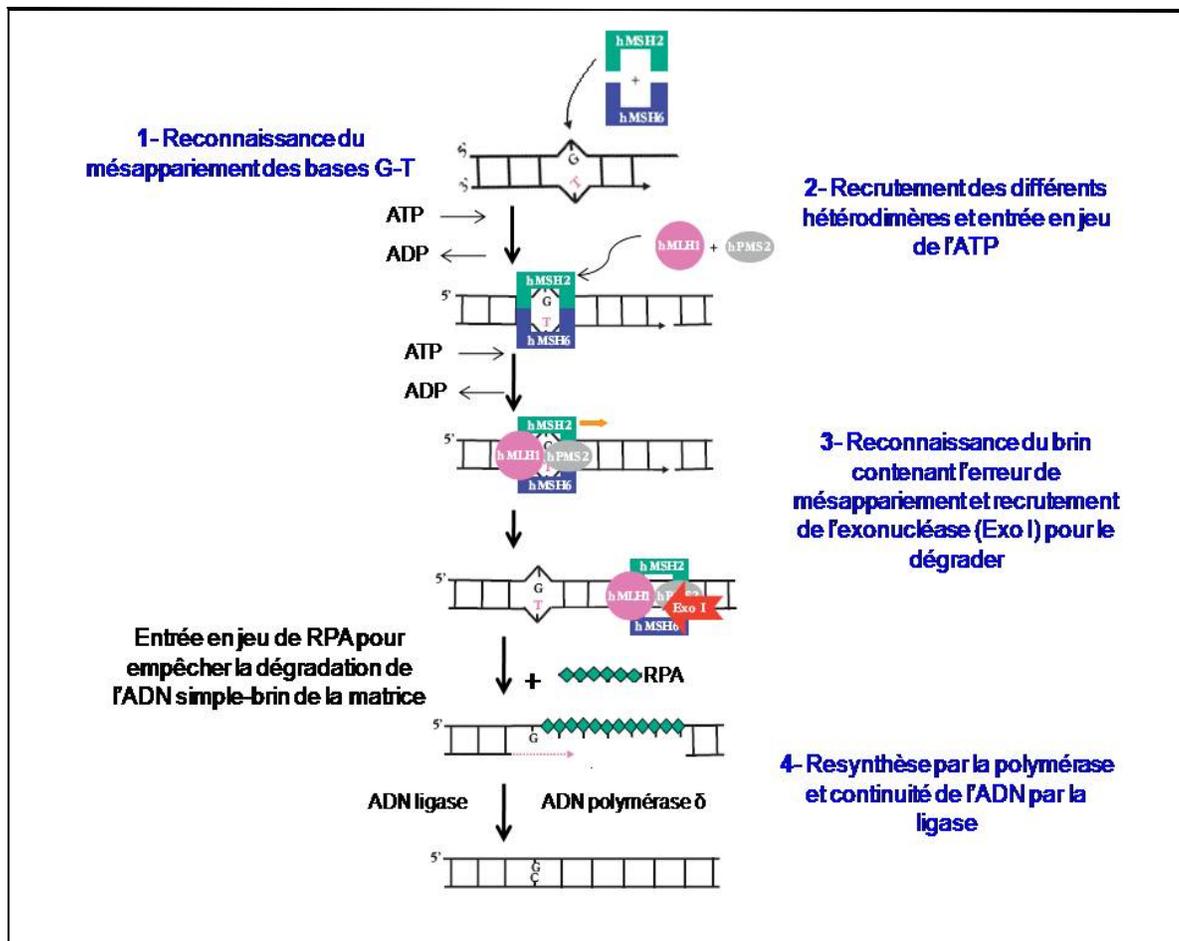


Figure 8 : La réparation de l'ADN par MMR. Source modifiée : Pourquier, 2006.

1.1.2 La génétique et la génotoxicologie

La génétique est l'étude de la structure moléculaire et de la fonction du matériel génétique, alors que l'étude même de la toxicité spécifique des agents sur le matériel génétique est appelée la génotoxicologie [Preston et Hoffmann, 2001]. La génotoxicité est la capacité des produits toxiques à produire des changements dans le matériel génétique des organismes exposés. Son étude consiste à détecter les molécules toxiques et à identifier les mécanismes sous-jacents des agents toxiques pour permettre une évaluation du risque pour l'homme suite à leur exposition. L'évolution de ces deux disciplines s'est faite d'une manière assez parallèle [Garcia-Sagredo, 2008], bien que les premières étapes d'induction de la mutagenèse furent faites en 1927 chez la drosophile [Muller, 1927]. Avec l'avènement des techniques de plus en plus performantes de la biologie cellulaire et moléculaire, les progrès de la génétique et de la toxicologie ont grandement favorisé la compréhension des effets des substances chimiques sur le génome [Kirsch-Volders et *al*, 2002b]. Ainsi, les avancées en génétique clinique sont largement utilisées en génotoxicologie [Garcia-Sagredo, 2008], favorisant la recherche dans le but de comprendre l'action spécifique des polluants environnementaux et chimiques et de trouver des moyens de prévention et de thérapie contre leurs effets néfastes sur la santé humaine.

1.1.2.1 La génétique et la cytogénétique

La cytogénétique, une sous-discipline de la génétique, est l'étude de la chromatine chromosomique. Ses techniques se sont développées rapidement pour apporter de grandes contributions dans les connaissances du génome humain normal et ses anomalies. Les techniques de cette discipline sont très variées comme la production de divers types de bandes sur les chromosomes, les différentes méthodes d'hybridation *in situ* utilisant des sondes marquées avec des fluorochromes ou le test des micropuces d'ADN génomique [Berger, 2007]. Leur utilisation doit être adaptée à chaque contexte. Par exemple, l'analyse des chromosomes est la technique utilisée en génotoxicité pour évaluer les bris chromosomiques et les divers remaniements chromosomiques. L'hybridation *in situ* en fluorescence est la technique la plus souvent utilisée pour déterminer la localisation de gènes ou de séquences spécifiques sur les chromosomes ou les noyaux interphasiques.

1.1.2.1.1 L'hybridation in situ en fluorescence (la FISH)

Cette technique utilise des sondes (principalement d'ADN) couplées à des fluorochromes reconnaissant des régions spécifiques, observables en microscopie à fluorescence [Garcia-Sagredo, 2008]. Elle permet une visualisation directe des altérations génétiques dans la cellule [Kjeldsen et Kolvraa, 2001] et est particulièrement utile pour le marquage d'un chromosome donné et pour quantifier les séquences d'ADN cible [Pinkel et *al*, 1986].

Les principes de l'hybridation

L'utilisation et la production de fragments d'ADN sont basées sur la structure biochimique et moléculaire de la double hélice d'ADN, dont les bases sont reliées par des liaisons hydrogène [Muleris et *al*, 1996]. L'hybridation se base sur une alternance des processus de dénaturation et de renaturation. La dénaturation consiste à déstabiliser les liaisons hydrogène des deux chaînes d'acides nucléiques, entraînant l'ouverture de la double hélice d'ADN. La renaturation est le phénomène inverse avec le retour des conditions normales. Ainsi, les liaisons hydrogène peuvent se reformer avec le même brin ou avec un brin marqué complémentaire constituant la sonde. Lorsque la sonde est hybridée sur l'ADN des chromosomes ou des noyaux, elle se fixe sur la séquence d'ADN chromosomique ou nucléaire qui lui est complémentaire.

En bref, les exigences de base des techniques dérivées de la FISH sont donc : 1) une sonde qui est complémentaire à la séquence d'intérêt ; 2) un marquage par fluorescence de cette sonde pour en permettre la détection ; et 3) un échantillon biologique à étudier, pour déterminer la localisation de la sonde marquée après hybridation [Kjeldsen et Kolvraa, 2001].

Les sondes utilisées en FISH

Une variété de sondes peut être utilisée pour la FISH en fonction de l'application [Muleris et *al*, 1996]. Les sondes sont les plus souvent obtenues par clonage dans un vecteur qui dépend lui-même de la taille de la séquence d'ADN utilisé. Traditionnellement, le fragment d'ADN provient des plasmides recombinants, des cosmides et des chromosomes artificiels de levures (YAC) ou de bactéries (BAC). Les sondes peuvent être

aussi générées par PCR. Deux grandes classes de sonde permettent d'étudier des régions différentes du génome humain : les sondes à séquence unique et les sondes à séquences répétées. Les sondes à séquence unique sont préparées à partir de l'ADN présent en un seul exemplaire dans le génome haploïde. Parmi les sondes à séquence unique se trouvent les sondes subtélomériques et les sondes à locus unique. Les peintures chromosomiques, quant à elles, sont constituées de toutes les séquences uniques d'un chromosome ou d'une portion de chromosome. Les sondes à séquences répétées sont spécifiques à l'ADN répété des chromosomes et servent à étudier principalement les régions centromériques, les télomères et les régions hétérochromatiques telles que celle du chromosome Y. La sonde centromérique ou alphasatellitaire, est complémentaire aux séquences α -satellites et est spécifique à chaque paire chromosomique. Elles sont souvent utilisées pour déterminer l'aneuploïdie d'un chromosome particulier. La sonde pancentromérique permet d'identifier la région péri-centromérique de tous les chromosomes en une seule technique [Iarmarcovai et al, 2007b]. Quant à la sonde pantélomérique, elle permet de détecter la séquence TTAGGG répétée en tandem aux extrémités de tous les télomères de tous les chromosomes en même temps [Muleris et al, 1996].

1.1.2.1.2 Les avantages et les limites de la FISH

La FISH est rapide et l'analyse des cellules se fait facilement en un temps relativement court. Grâce à sa grande sensibilité de détection et à sa spécificité d'hybridation, la FISH permet non seulement d'identifier une séquence chromosomique mais aussi de déterminer les points de cassure impliqués dans une anomalie. De plus, par l'utilisation simultanée de plusieurs sondes marquées différemment, cette technique peut cibler plusieurs régions dans un même échantillon [Kjeldsen et Kolvraa, 2001].

Une des principales limites de cette technique est que dans la plupart des cas, il faut connaître à l'avance les anomalies chromosomiques que l'on veut étudier. De plus, c'est une technique qui est onéreuse avec l'achat des sondes spécifiques, des réactifs et l'utilisation d'équipements spécialisés (microscope à fluorescence et logiciels d'analyse d'images).

1.1.2.2 La génotoxicologie

Avant d'aborder la génotoxicologie proprement dite, il faut faire la distinction entre la toxicologie génétique, la toxicogénétique et la génotoxicologie. La toxicologie génétique met en évidence tout risque toxique au niveau du matériel génétique. Plus précisément c'est une science qui évalue les interactions toxiques de l'environnement avec l'ADN par la détection, l'analyse de la composition chimique et de l'action biologique des substances toxiques dans le but de prévenir et de traiter les manifestations toxiques [Iarmarcovai, 2008 ; Janiaud et al, 1985]. La Figure 9, ci-dessous, résume les différentes études en toxicologie génétique.

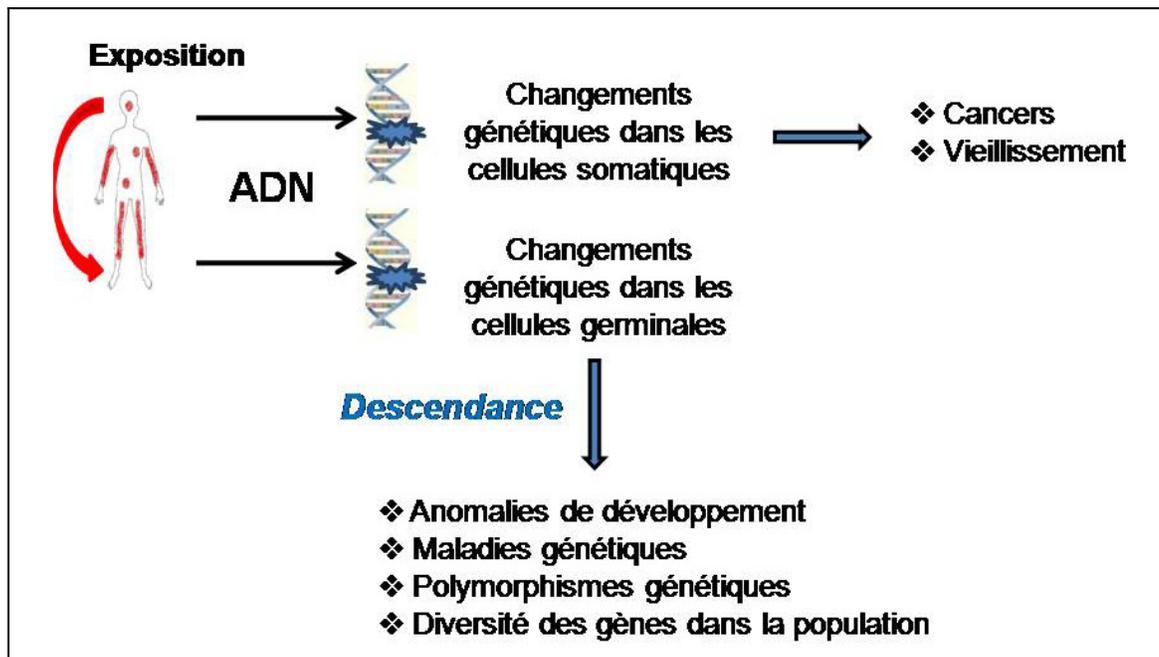


Figure 9 : Les objectifs de la toxicologie génétique. Sources modifiées : Lauwerys et al, 2007 ; Barouki et al, 2006.

La toxicogénétique est l'étude des connaissances génétiques existantes et la génération de nouvelles données génétiques dans le but de comprendre et de prévenir la toxicité des médicaments et des substances toxiques provenant de l'environnement (Figure 10, page 26). Ce domaine s'oriente plus sur l'étude du polymorphisme des gènes codant pour les enzymes de biotransformation, résultant en des altérations positives ou négatives de leur

activité [Lauwerys et *al*, 2007] ; elle est associée étroitement avec la pharmacogénétique. Les techniques d'analyse de la structure et de l'expression des gènes se sont développées considérablement avec la biologie structurale, la génomique et la protéomique, permettant de découvrir de nouveaux mécanismes de toxicité [Barouki et *al*, 2006].

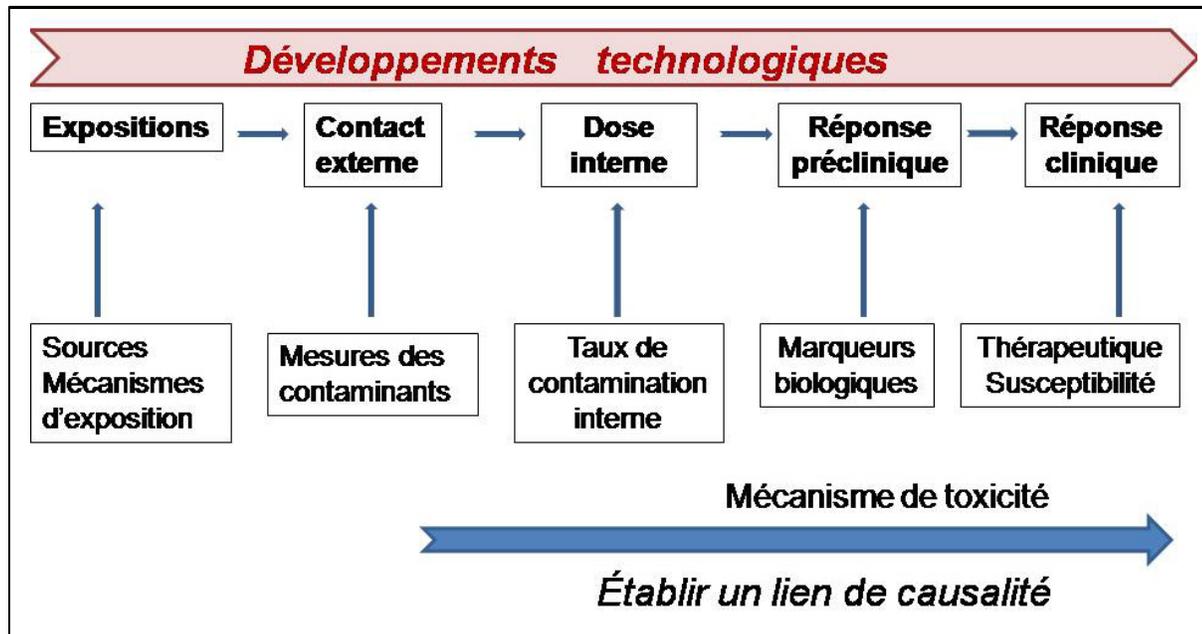


Figure 10 : Les objectifs de la toxicogénétique. *Source modifiée : Barouki et al, 2006.*

La génotoxicologie, quant à elle, est un domaine d'étude visant la détection et l'identification des agents toxiques pour l'ADN, la détermination des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les modifications de l'ADN (par exemple : la clastogénicité, l'aneugénicité, les mutations ponctuelles, etc.) et l'évaluation des conséquences des lésions à l'ADN [Orsière et *al*, 2005]. Elle s'est développée pendant la deuxième guerre mondiale avec les études sur le gaz moutarde et les travaux sur les aberrations chromosomiques chez l'homme causées par des radiations ionisantes, découlant de l'irradiation massive des survivants d'Hiroshima et Nagasaki au Japon [Garcia-Sagredo, 2008].

L'essor de la génotoxicologie a été considérable ces dernières décennies en raison de la révolution de la biologie moléculaire et de l'analyse génétique, ayant contribué à la

richesse des informations nouvelles sur la régulation de la différenciation cellulaire et la cancérogenèse [Elespuru, 1996]. La génotoxicologie tente également de fournir des informations essentielles au maintien de l'intégrité du matériel génétique pour prévenir ou ralentir les maladies héréditaires et le vieillissement, et cela, en se concentrant sur les dommages génétiques causés par des agents chimiques et physiques [Kramer, 1998]. Même si, à court terme, les données des tests sont toujours des éléments de l'évaluation du risque cancérogène, les dommages génétiques sont considérés comme importants, parce qu'ils entraînent des risques génétiques héréditaires et d'autres effets reliés à la santé, tels le vieillissement, l'échec de la reproduction et le développement de la toxicité [Elespuru, 1996]. Le champ de connaissance de la génotoxicologie se développe sans cesse et devient tellement complexe qu'une approche multidisciplinaire est indispensable pour traduire ces données scientifiques en actions concrètes, en vue d'une protection adéquate de la santé des êtres humains [Kirsch-Volders et al, 2002b].

Bien que les domaines de recherche de la toxicologie génétique, de la toxicogénétique et de la génotoxicologie soient différents, leur association peut aider à mieux comprendre l'étiologie d'une maladie d'origine génétique et à déterminer les facteurs environnementaux susceptibles d'interagir avec le patrimoine génétique des cellules [Orsière et al, 2005].

1.1.2.3 Les tests de génotoxicité

La séquence en nucléotides (structure primaire), la configuration et la situation des nucléotides au sein de la double hélice (structure secondaire) et l'état de compaction sous lequel se trouve la molécule d'ADN (structure tertiaire) jouent tous un rôle considérable dans la survenue des lésions, puis des mutations [Orsière et al, 2005]. Les lésions primaires représentent le premier stade de l'action d'un agent génotoxique (bris simple-brin et double-brin à l'ADN, adduit, etc.), suivi des lésions secondaires et tertiaires (mutations géniques, mutations chromosomiques, etc.). Comme les altérations touchant l'ADN sont diverses, il faut plus d'un test de génotoxicité pour déterminer les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sont impliqués. Plusieurs tests de génotoxicité se sont développés et peuvent être classés en trois grandes catégories [Orsière et al, 2005] :

- Les tests de mutation génique, regroupant les variantes du test Ames. Ce test biologique permet de déterminer le potentiel mutagène d'un composé chimique par l'évaluation de la facilité par laquelle une substance induit une réversion dans l'expression des gènes. Ce test utilise des bactéries et pour l'appliquer chez l'Homme, des variantes se sont développées pour analyser des effluents industriels, des gaz d'échappement, de l'eau potable ou des liquides biologiques humains [Lauwerys et *al*, 2007].
- Les tests d'altération primaire et de réparation de l'ADN, comportant la détection des adduits à l'ADN, le test COMET et le test des ÉCS. Pour l'analyse des adduits à l'ADN, la chromatographie en phase liquide à haute performance est utilisée. Les composants de l'ADN sont séparés selon leur vitesse de migration et entraînés le long d'une colonne (phase stationnaire) à l'aide d'un solvant mobile. La détection des adduits se fait ensuite par spectrométrie de masse, une méthode de mesure des molécules ionisées, selon leur rapport masse/charge. Le test COMET (ou SCGE pour *Single Cell Gel Electrophoresis*) est une simple méthode d'analyse simple des cassures des brins (simple-brin et double-brin) d'ADN induites par un agent génotoxique, en utilisant l'électrophorèse sur microgel d'agarose avec des cellules isolées. Quand l'ADN a subi des cassures, le noyau prend la forme d'une queue de comète, détectée par microscopie en fluorescence [Collins, 2004 ; Singh et *al*, 1988]. Le test des échanges entre chromatides sœurs (ÉCS), quant à lui, est un test standard qui se base sur la réplication semi-conservative des brins d'ADN et se fait sur des chromosomes métaphasiques. La méthode consiste à substituer la thymidine normale de l'ADN par la bromodéoxyuridine (BrdU) et les cellules sont incubées pour deux cycles de réplication [Sonoda et *al*, 1999]. À la fin, un chromosome possède une chromatide contenant toujours le brin de la cellule parentale (coloré en foncé au Giemsa) et une chromatide avec deux brins substitués (couleur pâle au Giemsa) qui est moins condensée à cause de l'incorporation du BrdU et plus susceptible à la dégradation par photolyse [Perry et Wolff, 1974]. Les ÉCS sont alors dénombrées au microscope.
- Les tests de mutation chromosomique, comprenant le test des micronoyaux (MN) et le test des aberrations chromosomiques (AC). Le test des MN consiste à

dénombrer des entités formées par cassures ou dommages chromosomiques, après l'exposition des cellules à un agent génotoxique, lors de la division cellulaire. Le test des AC, quant à lui, permet d'étudier les cassures et les remaniements dans les chromosomes sur des cellules en métaphase suite à l'exposition à des agents génotoxiques. Ces deux tests seront décrits plus en détail ultérieurement dans le chapitre 2 - Matériel et Méthodes, section 2.3, page 78 et section 2.6 page 88.

Les tests utilisés pour évaluer le potentiel génotoxique d'une substance, doivent être validés à l'échelle internationale, en fonction du mode d'action de l'agent génotoxique étudié [Iarmarcovai et al, 2007c]. Pour conclure à la génotoxicité d'un agent chimique, les résultats de plusieurs tests, à la fois *in vitro* et *in vivo*, doivent être pris en considération. Plusieurs groupes et associations ont établis des normes pour ces tests standards, notamment l'Union Européenne (EU) et l'Organisation pour la Coopération et le Développement Économique (OCDE) [Kramer, 1998].

1.1.2.3.1 Les biomarqueurs

Pour pouvoir évaluer l'exposition aux effets adverses des polluants et détecter de façon précoce les risques pour la santé, des biomarqueurs sont utilisés et il est essentiel de connaître leur portée et leurs limites afin d'éviter de faire une interprétation abusive des données de surveillance biologique de l'exposition [Viau, 2008a].

Tout d'abord, un biomarqueur est un indicateur biologique (protéine, métabolite, caractéristique biologique, etc.) qui permet de mesurer, au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire ou physiologique, l'exposition à des agents chimiques polluants. Les biomarqueurs les plus utilisés dans le développement de stratégie de prévention des cancers sont classés en trois catégories [Sari-Minodier et al, 2005] :

- Les biomarqueurs d'exposition : ils permettent d'évaluer la pénétration d'une substance exogène dans l'organisme par le dosage de la substance elle-même ou de ses métabolites dans les fluides biologiques, les tissus ou les cellules [Orsière et al, 2008] et de donner une appréciation de la dose interne. Ils peuvent aussi

mesurer l'activité mutagène des métabolites, par exemple le test d'Ames urinaire sur les opérateurs d'épandage de bitume routier, les travailleurs dans la fabrication d'ensilage de noir de carbone et dans l'incinération de déchets [Sari-Minodier et *al*, 2005]. L'approche par l'utilisation de ces biomarqueurs prend en considération les différentes voies d'absorption, ainsi que les conditions réelles d'exposition, telles que le port d'équipements de protection individuelle.

- Les biomarqueurs d'effet : ils mettent en évidence une interaction entre des agents génotoxiques et le matériel génétique de la cellule [Orsière et *al*, 2008]. Les biomarqueurs d'effets les plus utilisés sont des marqueurs biochimiques, tels que les adduits à l'ADN ou aux protéines, et des marqueurs cytogénétiques comme les MN et les AC [van Delf et *al*, 2001]. Par exemple, dans diverses études de surveillance chez les travailleurs de four à coke, une augmentation des adduits à l'ADN et des ÉCS sont observés lors de l'exposition aux HAP [Binkova et *al*, 1998 ; Kalina et *al*, 1998 ; Forni et *al*, 1996 ; Schell et *al*, 1995]. Parmi les biomarqueurs d'effet, deux types sont cités : les biomarqueurs de prévention et les biomarqueurs de prédiction. Les biomarqueurs de prévention, comme son nom l'indique, sont plus utilisés pour la prévention en biologie médicale dans l'identification et le calcul d'un risque ou d'une prédisposition pathologique [Orsière et *al*, 2008]. Ce terme est plus employé dans la recherche sur le cancer. Quant aux biomarqueurs de prédiction, ils prédisent le développement d'une maladie et peuvent aider à implanter des programmes de prévention [Bonassi et Au, 2002].

- Les biomarqueurs de susceptibilité : ils permettent d'expliquer les différences interindividuelles dans la réponse à une exposition génotoxique, résultant du polymorphisme des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et dans la réparation des lésions de l'ADN [Sari-Minodier et *al*, 2005]. La plupart des agents génotoxiques requièrent une activation métabolique pour exercer leurs effets. La dose efficace d'un agent génotoxique est dépendante de la compétition entre les réactions métaboliques d'activation et de détoxification de cet agent, ainsi que des composés auxquels un individu est exposé. Toute variation dans ces voies métaboliques constitue un important déterminant de la susceptibilité individuelle, ce qui suggère qu'une meilleure identification des déterminants de

cette variabilité interindividuelle sera possible grâce au développement de biomarqueurs de susceptibilité [Kirsch-Volders et *al*, 2002b].

Les biomarqueurs cytogénétiques les plus utilisés en génotoxicité sont les AC, les ÉCS et les MN. Ils sont utilisés pour la surveillance de l'exposition chez l'humain et pour la détection des effets précoces des cancérogènes génotoxiques, principalement, sur les lymphocytes sanguins humains [Miliç et *al*, 2008 ; Murgia et *al*, 2008 ; Norppa, 2004]. L'utilisation de ces biomarqueurs est basée sur le fait que la plupart des cancérogènes reconnus chez l'homme sont génotoxiques après une courte exposition et sont capables d'induire des dommages chromosomiques [Norppa, 2004]. C'est en Europe que ces biomarqueurs cytogénétiques sont les plus utilisés, en comparaison avec l'Amérique du Nord.

Les AC sont causées par des agents mutagènes, lorsque les lésions à l'ADN qu'ils induisent, ne sont pas réparées rapidement ou que leur réparation est erronée. Les AC sont habituellement mesurées dans des cultures de lymphocytes sanguins stimulés par la phytohémagglutinine (PHA) [Norppa, 2004]. Les AC sont des anomalies de nombre et de structure des chromosomes. Afin de définir le mode d'action du BaP par exemple, en l'occurrence, son effet clastogène, les AC de structure constituent un bon choix. Elles sont facilement observables sur des cellules en métaphase après l'exposition à un agent génotoxique. Ce sont des structures induites par des dommages mécaniques dans les chromosomes pendant la division cellulaire et peuvent être de deux types, intra-chromosomiques et inter-chromosomiques [Pfeiffer et *al*, 2000]. Ces anomalies de structure sont des cassures ou bris, des lacunes (*gaps*), des chromosomes acentriques et des réarrangements. Les cassures, en elles-mêmes, sont : soient des cassures simple-brin (bris simple-brin, BSB) et sont appelées des cassures chromatidiennes, soient des cassures double-brin (bris double-brin, BDB) ou cassures chromosomiques. La [Figure 11](#), page 32, illustre ces deux types de cassures.

Les fragments provenant des BDB peuvent mener à des délétions terminales ou intercalaires sur le chromosome ou se recoller ensuite sur le segment restant avec/sans inversion ou alors même, aller se coller à un autre chromosome pour former une

translocation. Dans les aberrations intra-chromosomiques, en général, l'implication d'un seul chromosome mène à des délétions interstitielles, terminales et des inversions, tandis que, dans les aberrations inter-chromosomiques, il y a des réarrangements entre deux chromosomes ou plus, aboutissant à des translocations ou à des dicentriques [Pfeiffer et *al*, 2000].

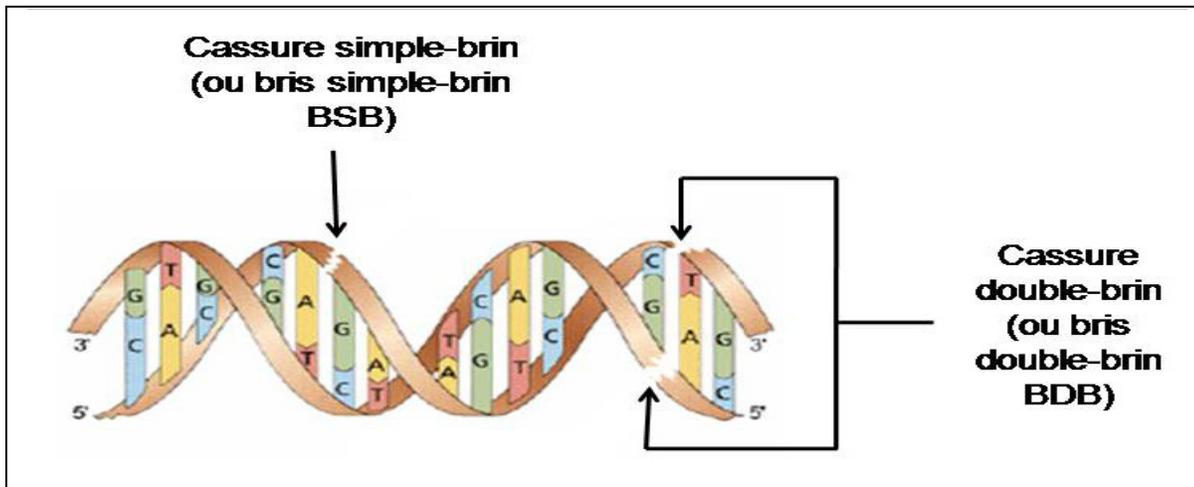


Figure 11 : Les deux types de cassures pouvant se trouver dans l'ADN. *Source modifiée : Association nucléaire canadienne, 2010.*

Les molécules de l'ADN sont des cibles permanentes des agents chimiques de diverses origines [Obe et *al*, 2002] et les principales lésions dans le processus de formation des AC concernent les BDB et leurs mécanismes de réparation [Pfeiffer et *al*, 2000]. Les BDB peuvent être formés et réparés pendant la phase G_0 ou G_1 par la voie NHEJ. Des erreurs peuvent s'ensuivre par cette voie et il y aura des AC stables (translocations, inversions) ou instables (fragments acentriques, dicentriques, anneau). Si les BDB ne sont pas réparés en phase G_1 , des cassures chromosomiques peuvent survenir et en phase G_2 , des cassures chromatidiennes. De plus, si ces BDB ne sont pas réparés en phase G_2 , des fragments acentriques pourront se perdre et il y aura des délétions.

Le test des ÉCS peut déterminer le potentiel génotoxique et le degré d'exposition à un agent génotoxique et est basé sur la réplication semi-conservatrice de l'ADN ; c'est-à-dire que chaque chromatide contient toujours un brin de la cellule parentale et un nouveau

brin après la synthèse. Les ÉCS sont des interchanges produits lors de la réplication de l'ADN, au niveau des locus homologues entre les chromatides-sœurs suite à la réparation de BDB à l'ADN par la recombinaison homologue [Sonoda et *al*, 1999].

L'autre biomarqueur d'effet souvent utilisé dans les tests de génotoxicité est le MN. Ce sujet va être traité plus en détail à la section 1.3, page 54, puisqu'il constitue le sujet principal de ce mémoire.

1.1.2.4 Les effets clastogène et aneugène.

Dans les dernières décennies, les prédispositions génétiques pouvant affecter la susceptibilité individuelle aux cancers induits par des carcinogènes sont de plus en plus étudiées par des biomarqueurs d'exposition et d'effet [van Delf et *al*, 2001]. Parmi les HAP les plus étudiés et les plus connus, se retrouve le benzo-a-pyrène dont la cancérogenèse est établie chez l'humain par le CIRC. Ce composé chimique sert de modèle d'étude du caractère cancérogène des HAP et est choisi dans le cadre de ce mémoire pour l'étude de son effet génotoxique sur les lymphocytes sanguins humains en culture.

Mais, avant de faire un exposé sur le BaP, les notions d'effet clastogène et aneugène méritent d'être décrites pour aider à mieux comprendre les effets génotoxiques de ce composé.

Les agents physiques/chimiques génotoxiques ont des activités biologiques pouvant altérer l'information génétique codée par l'ADN capable d'entraîner, comme nous venons de le mentionner, la formation des AC de nombre et de structure. Un agent génotoxique possède un effet clastogène lorsqu'il cause des anomalies de structure, résultats des cassures des chromosomes, suivies de recollements normaux ou anormaux. D'ailleurs, le mot clastogène dérive du grec et signifie « causer des fragments, des cassures ». Certains des agents génotoxiques étudiés dans la littérature qui causent ce type d'effet sont listés dans le Tableau III, page 34.

Tableau III : Liste de quelques agents chimiques ayant un effet clastogène.

Agents toxiques	Références
Actinomycine	Hashimoto et al, 2010
Afugan	Yüzbaşıoğlu et al, 2006
Alachlor	Mattiozzo et al, 2006 ; Ribas et al, 1996
Bléomycine	Sadiq et al, 2000 ; Chattopadhyay et al, 1997
Cyclophosphamide	Fowler et al, 2010 ; Darroudi et al, 1996
Diméthyl sufoxyde (DMSO))	Darroudi et al, 1996
Étoposide	Hashimoto et al, 2010
Rayons γ	Huber et al, 1996
Hydrazide maléique	Ribas et al, 1996
Hydroxyurée	Hashimoto et al, 2010
Méthylméthanesulfonate	Hashimoto et al, 2010 ; Darroudi et al, 1996
Mitomycine C	Hashimoto et al, 2010 ; Rosefort et al, 2004
N-méthyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine	Hashimoto et al, 2010

La [Figure 12](#), page 35, illustre quelques anomalies chromosomiques dues à un effet clastogène. Les AC qui résultent d'un agent clastogène peuvent être des délétions, des duplications, des insertions, des inversions, des isochromosomes ainsi que des insertions, des inversions ou des translocations [Jeanpierre et al, 2004]. Cependant, si des gènes sont coupés ou s'associent lors d'un remaniement chromosomique pour former de nouvelles protéines, comme ce qui se produit dans la translocation (9;22) avec la formation de la protéine BCR-Abl, un processus tumoral peut s'initier [Leguay et Mahon, 2005].

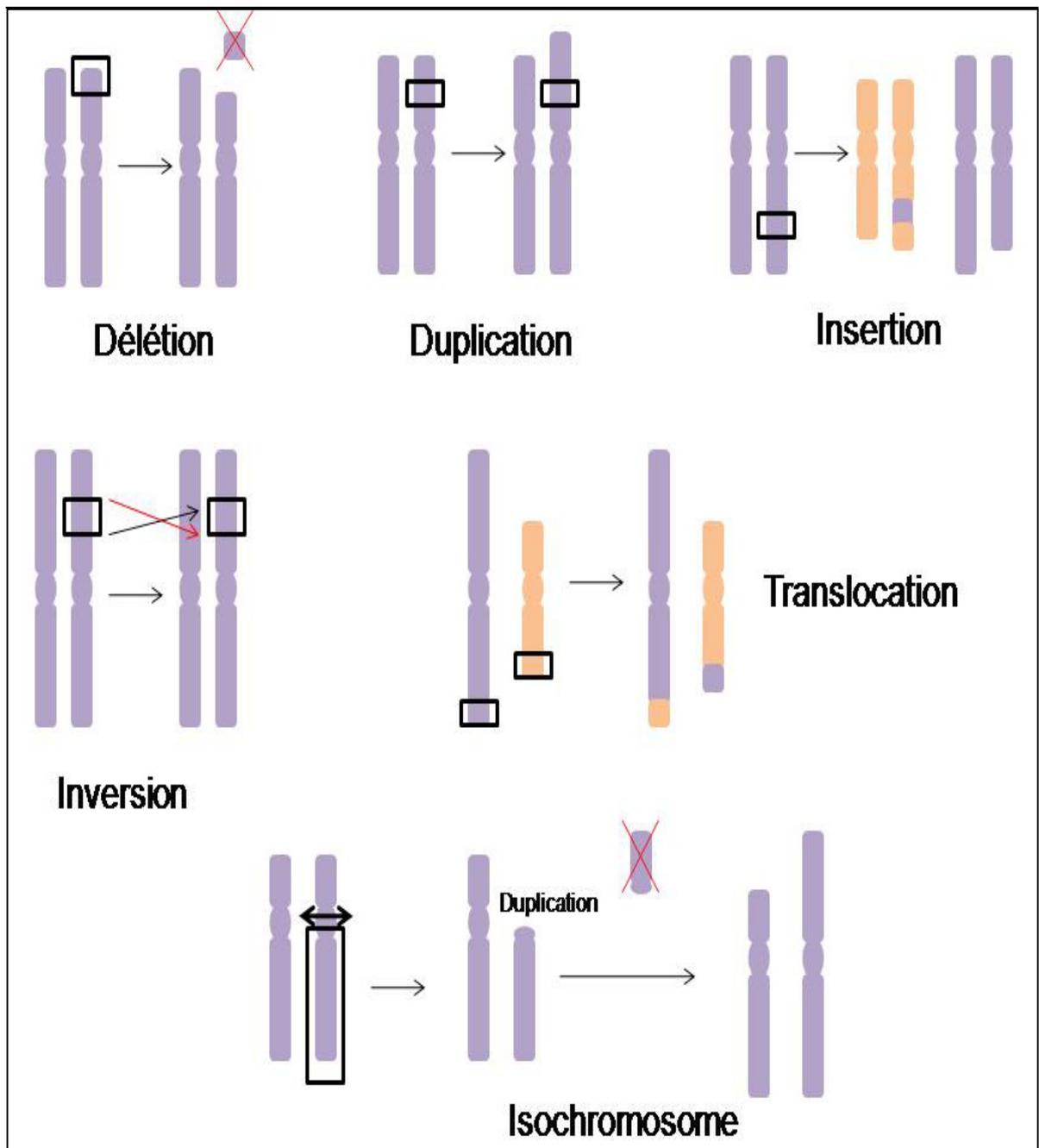


Figure 12 : Différentes anomalies chromosomiques de structure.

Un agent génotoxique possède un effet aneugène (dérivé du grec signifiant multiple erroné) lorsqu'il cause des anomalies dans la répartition du nombre de chromosomes pendant la division cellulaire. Quelques composés toxiques ayant des effets aneugènes sont listés dans le Tableau IV de la page suivante.

Tableau IV : Liste de quelques agents chimiques ayant un effet aneugène.

Agents toxiques	Références
Acide okadaïque	Hashimoto <i>et al</i> , 2010
Arsenic	Aardema <i>et al</i> , 1998
Bérényl	Rosefort <i>et al</i> , 2004
Benzoxazinone	Arroyo <i>et al</i> , 2010
Bisphénol A	Hashimoto <i>et al</i> , 2010
Cadmium	Aardema <i>et al</i> , 1998
Chromate de plomb	Aardema <i>et al</i> , 1998
Colchicine	Ramirez <i>et al</i> , 1997 ; Darroudi <i>et al</i> , 1996
Colcémide	Hashimoto <i>et al</i> , 2010
Diéthylstilbestrol	Hashimoto <i>et al</i> , 2010 ; Rosefort <i>et al</i> , 2004
Fiséline	Hashimoto <i>et al</i> , 2010
Griseofulvine	Hashimoto <i>et al</i> , 2010 ; Rosefort <i>et al</i> , 2004
Hexaméthylphosphoramide	Darroudi <i>et al</i> , 1996
Paclitaxel	Hashimoto <i>et al</i> , 2010 ; Digue <i>et al</i> , 1999
Thiabendazole	Hashimoto <i>et al</i> , 2010
Vinblastine sulfate	Darroudi <i>et al</i> , 1996 ; Huber <i>et al</i> , 1996
Vincristine sulfate	Hashimoto <i>et al</i> , 2010 ; Darroudi <i>et al</i> , 1996
2-acétylaminofluorène	Darroudi <i>et al</i> , 1996
1,2,4-benzènetriol	Chung <i>et al</i> , 2002

Les agents aneugènes peuvent avoir des effets directs ou indirects. Les agents directs comme par exemple, les radiations ionisantes, ciblent directement l'ADN provoquant des cassures simple-brin et double-brin en entraînant des défauts de répartition des chromosomes lors de la mitose, donnant ainsi un nombre différent du nombre modal de l'espèce étudiée [Mateuca *et al*, 2006]. Les agents indirects, quant à eux, induisent principalement des AC de nombre par interaction avec les structures cellulaires constituant le fuseau mitotique, responsables de la disjonction, la ségrégation et la migration des chromatides lors de la division cellulaire [Iarmarcovai *et al*, 2007b].

Des hypothèses sont émises sur les liens de causalité entre l'instabilité génétique et l'aneuploïdie : celle-ci constituerait un événement initial primordial dans la transformation de la cellule normale en cellule cancéreuse ou représenterait un effet tardif relié à l'instabilité chromosomique [Descamps *et al*, 2002]. Le rôle causal direct de l'aneuploïdie

dans le développement d'un cancer chez l'homme a été observé dans une maladie autosomique récessive très rare, l'aneuploïdie en mosaïque (*mosaic variegated aneuploidy*), où les patients atteints ont un retard de croissance, un cancer pédiatrique (rhabdomyosarcome, leucémies, etc.), en plus de gains et pertes chromosomiques constitutionnels [Iarmarcovai et *al*, 2007b]. Ce syndrome est dû à une mutation bi-allélique du gène *BUB1B*, ce qui entraîne un dysfonctionnement du point de contrôle lors de la transition métaphase/anaphase [Iarmarcovai et *al*, 2007b ; Nguyen et Ravid, 2006]. Ce point de contrôle surveille l'attachement des fibres du fuseau mitotique à chaque complexe protéique kinétochore-centromère avant que la ségrégation commence [Iarmarcovai et *al*, 2007b]. Dans une cellule en division, les deux centrosomes sont responsables du contrôle de la ploïdie. Ils sont les centres organisateurs du réseau microtubulaire à partir duquel se structure le fuseau mitotique bipolaire qui permet la répartition équitable des chromosomes dans les deux cellules-filles [Fukasawa, 2005]. Une aneuploïdie par perte ou gain d'un chromosome entier peut se produire dans une cellule de deux façons :

1. Par une non-disjonction à l'anaphase, où l'un des chromosomes ségrège anormalement : une cellule-fille sera trisomique et l'autre, monosomique.
2. Par la perte d'un chromosome durant la division cellulaire (le chromosome perdu pouvant être inclus dans un micronoyau), menant à une cellule-fille monosomique et une autre, normale.

L'aneuploïdie dans les cellules somatiques est associée avec le développement de plusieurs cancers et celle dans les cellules germinales contribue significativement aux maladies génétiques humaines comme le syndrome de Down [Aardema et *al*, 1998]. Des études cytogénétiques dans des tumeurs ont montré que des variations dans le nombre de chromosomes y sont le plus souvent observées et suggèrent qu'il est nécessaire de limiter l'augmentation de la fréquence des événements aneugènes, causés par l'exposition aux produits aneugènes [Parry et *al*, 2002].

1.1.2.5 Les études *in vivo* et *in vitro*

L'évaluation du potentiel cancérigène des HAP se base sur des connaissances scientifiques obtenues à partir des études épidémiologiques, expérimentales au niveau cellulaire ou génétique. Dans les études *in vivo*, la mise en évidence d'une augmentation du risque pour la santé chez des sujets exposés aux HAP se fait en analysant directement leur sang, ou fluide corporel pour détecter des indices de toxicité par l'utilisation de biomarqueurs [Scherer, 2005]. La concentration du composé chimique ou du métabolite dans le sang ou fluide corporel (urine, salive) donne la dose interne. La dose externe est représentée, par exemple, par des échantillons d'air ambiant collectés dans des filtres à quartz spéciaux pris dans la zone respiratoire du travailleur [Tarantini et al, 2009]. Les avantages de ces études sont que cela reflète l'exposition réelle du sujet et que les dommages d'une période de deux à trois mois ou plus longue peuvent être suivis de façon concrète. De cette manière, la réparation de ces dommages peut être observée également. Cela a été vu par l'étude de l'exposition aux HAP des policiers s'occupant du trafic routier dans Prague, une des villes les plus polluées de la République tchèque. Dans cette étude, la fréquence des aberrations chromosomiques (AC) mesurée dans leurs lymphocytes sanguins périphériques durant l'hiver a diminué significativement trois mois plus tard pour revenir à la normale (de 0,27 à 0,16 % ; $p < 0,001$) quand ces policiers sont retirés du trafic routier [Sram et al, 2007]. Par contre, il est plus souvent difficile de déterminer quel est l'agent spécifiquement responsable des dommages pouvant mener au cancer, parce que l'exposition humaine concerne habituellement des mélanges de HAP ou autres polluants avec des concentrations variables, et non un seul HAP particulier. Par ailleurs, le métabolite urinaire le plus utilisé dans l'analyse de l'exposition aux HAP est le 1-hydroxy-pyrène (1-OHP). Considéré comme un biomarqueur de l'exposition récente (24 à 48 h), ce métabolite a une demi-vie de 20 h. Cependant, il n'est pas très spécifique car pour un poste de travail donné, sa concentration dans l'urine sera très variable [Scherer, 2005]. Par ailleurs, dans le cas de l'analyse des MN urinaires, l'exfoliation quotidienne des cellules urothéliales varie considérablement d'un individu à l'autre et influence beaucoup le temps écoulé entre l'induction des dommages et la collection des cellules [Lehucher-Michel et al, 1996]. Finalement, les études *in vivo* causent parfois des problèmes éthiques si des produits cancérigènes doivent être testés sur des humains.

En génotoxicologie, les études *in vitro* permettent d'améliorer les connaissances sur les mécanismes d'action d'un grand nombre de substances cancérigènes en plus d'être utiles pour l'obtention d'informations complémentaires, quand l'interprétation des données provenant des études *in vivo* s'avère compliquée. L'avantage principal des études *in vitro* réside dans le fait que les tests se font en exposant des cellules à un composé unique avec des concentrations bien définies, afin de déterminer la relation dose-réponse et le seuil cytotoxique. De cette manière, il n'y a aucun danger pour l'être humain. Ces tests peuvent se faire relativement rapide et définissent spécifiquement les mécanismes d'action du composé étudié, mais ne peuvent pas être transposables au milieu biologique réel de l'humain sans tenir compte des variables cinétiques [Blauboer, 2010]. Il est également impossible de prévoir l'interaction éventuelle du composé toxique avec d'autres composés présents dans l'environnement, puisqu'il n'est pas présent sous la forme isolée, mais mélangé à d'autres substances. L'extrapolation des résultats obtenus permet de prédire les effets des substances cancérigènes chez l'humain. C'est pourquoi des efforts sont déployés pour mettre au point des procédures permettant de combiner les types d'études *in vivo* et *in vitro*, afin de réduire les erreurs dans l'évaluation de la génotoxicité des produits cancérigènes [Bolt et Hengstler, 2008].

1.1.2.6 Les cellules utilisées en génotoxicologie pour les études *in vitro*

En général, les modèles pour les études en génotoxicologie sont du genre animal ou humain. De très rares études se font avec des bactéries comme c'est le cas de deux études avec des souches de *Salmonella typhimurium* [Janik-Spiechowicz et al, 1998 ; Schrader et al, 1998]. Un résumé des études de mesure de génotoxicité sur des cellules en culture montre que la plupart des expériences sont faites chez l'humain, sur des fibroblastes, des lymphocytes et des lignées cellulaires, et chez l'animal, sur des lymphomes de souris, des cellules CHL, CHO, V9 de Hamster [Clare et Clements, 2001]. Durant la dernière décennie, les études en génotoxicologie se sont étendues sur d'autres types de cellules. Chez l'humain, dans la surveillance biologique des travailleurs exposés à différents agents génotoxiques, surtout ceux qui oeuvrent dans l'industrie de l'aluminium, les prélèvements d'urine sont faits pour détecter des indices du cancer de la vessie. De là, les cellules urothéliales deviennent un

matériel d'intérêt pour les études *in vitro* [Chai et *al*, 2007.]. Certaines autres études font appel aux lignées cellulaires comme les cellules HepG2 de l'hépatocarcinome [Yedjou et *al*, 2010 ; Jin et *al*, 2009], les cellules épithéliales pulmonaires A549 [Billet et *al*, 2008], les cellules K562 de la leucémie myéloïde chronique [Huguet et *al*, 2008], LNCaP du cancer de la prostate [Quéro et *al*, 2010] et beaucoup d'autres pour ne citer que celles qui sont les plus souvent utilisées. Chez les mammifères, en plus des études sur les lignées cellulaires de souris et hamsters, des astrocytes de rat [Miyakoshi et *al*, 1999], des cellules de vésicule séminale ovin [Degen et *al*, 1997], des lignées permanentes de poisson (EPC) [Kamman et *al*, 2001], etc. ont contribué à la recherche en génotoxicologie. Les avantages de travailler sur des lignées cellulaires sont que ces spécimens peuvent être fournis en grande quantité. Les inconvénients avec les lignées animales résident dans le fait que le métabolisme des animaux est différent de celui de l'humain et ne reflète pas complètement le mécanisme d'action des agents génotoxiques dans les cellules humaines. C'est pourquoi, de plus en plus, les études se font sur des lignées cellulaires humaines mais ce sont les lymphocytes sanguins périphériques qui sont les plus utilisés et seront décrits plus en détail dans la section 1.3.6.1, page 65.

1.2. LE BENZO-A-PYRÈNE (BaP)

Ce composé est un des HAP considéré comme un agent procancérogène par le CIRC [Straif et *al*, 2005]. C'est une substance solide qui fond à 179°C et qui est faiblement soluble dans l'eau, soit 0,2 à 6,1 µg/L [Conseil national de recherches du Canada, 1983 ; Ministère de l'environnement de l'Ontario, 1985]. Le BaP est présent dans l'environnement parce qu'il se forme lors de la combustion des matières organiques. En général, le BaP, tout comme les autres HAP, est associé à de fines matières particulaires dans l'air [IARC, 2010], ce qui explique que l'on puisse le retrouver dans les sols et dans l'eau souterraine, suite au transport et à la migration de ces particules [Twardowska et Kolodziejczyk, 1998]. Comme le BaP n'est pas utilisé à l'état pur dans l'industrie, il n'existe pas encore de données véritables sur la seule exposition à cet agent. On le retrouve dans des mélanges complexes avec d'autres HAP et sa valeur d'exposition moyenne pondérée (VEMP) au Québec est de 0,005 mg/m³ dans l'air [RSST, 2007].

Les travailleurs de l'industrie de l'aluminium, entre autres, sont exposés à des mélanges de HAP contenant notamment du BaP. Actuellement, le BaP est un modèle d'étude de carcinogenèse car il sert de produit de référence auquel sont comparés les autres HAP.

1.2.1 Les sources d'exposition au BaP

Les sources environnementales, comme l'air, l'eau et le sol, aussi bien que les habitudes de vie (cigarette) et la nourriture (aliments fumés et grillés) peuvent nous exposer au BaP. La population générale peut aussi être exposée à la poussière et à d'autres particules contenant du BaP. Les plus grandes sources de BaP dans l'air proviennent de la combustion du bois et du charbon de chauffage.

Les travailleurs dans les industries, surtout dans les usines de production de goudron, de houille, les cokeries, les usines de production d'asphalte, sont les plus exposés. Il ne faut pas oublier de mentionner aussi ceux qui travaillent dans des fumoirs, des incinérateurs d'ordures municipales et dans des sites de gazéification du charbon. Le BaP peut aussi se

retrouver dans des endroits où il y a des friteuses et des rôtissoires à haute température [ATSDR, 1990].

1.2.2 Le métabolisme du BaP et son mode d'activation dans la cellule

L'exposition au BaP par la peau, par les voies pulmonaires ou par l'ingestion fait qu'il est absorbé dans l'organisme. Il débute ainsi sa phase de distribution dans les différents organes. Chez le rat, l'injection intraveineuse de BaP entraîne une distribution rapide (en deux heures) dans les poumons, la peau, les reins, le foie et le tissu adipeux [Marie et al, 2010]. Cependant, l'organe cible de ce composé est le foie parce que celui-ci possède les enzymes impliquées dans la biotransformation de son métabolite cancérigène ultime, le benzo-a-pyrène-7,8-dihydrodiol-9,10-époxyde (BPDE) [Miller et Ramos, 2001]. C'est ce dernier qui est responsable de la formation d'adduits sur les sites nucléophiles de l'ADN [Botta, 2007]. Donc, une fois absorbée par la cellule cible, le BaP est biotransformé en suivant différentes voies métaboliques qui vont être décrites à la page 44.

Les enzymes des phases I et II métabolisent le BaP hydrophobe en des intermédiaires hydrophiles dans les processus de détoxification et d'élimination de l'organisme. Mais, certains métabolites issus de la phase I ont des propriétés électrophiles et sont capables d'aller se fixer dans les sites nucléophiles présents dans des cibles comme les lipides, les protéines, l'ARN et l'ADN. Les métabolites primaires du BaP sont des époxydes et des hydroxydes, dont les oxydations subséquentes mènent à la formation de quinones, des diols et des diols époxydes. Dans la phase I, les enzymes impliquant le cytochrome P450 sont des oxydases, des époxydes réductases et des époxydes hydrolases. Dans la phase II, on retrouve des enzymes de conjugaison qui sont les GST, les UDP-glucuronyl transférases (UGT) et les SULT [Botta, 2007]. La Figure 13, page 43, montre les différentes étapes de la biotransformation du BaP.

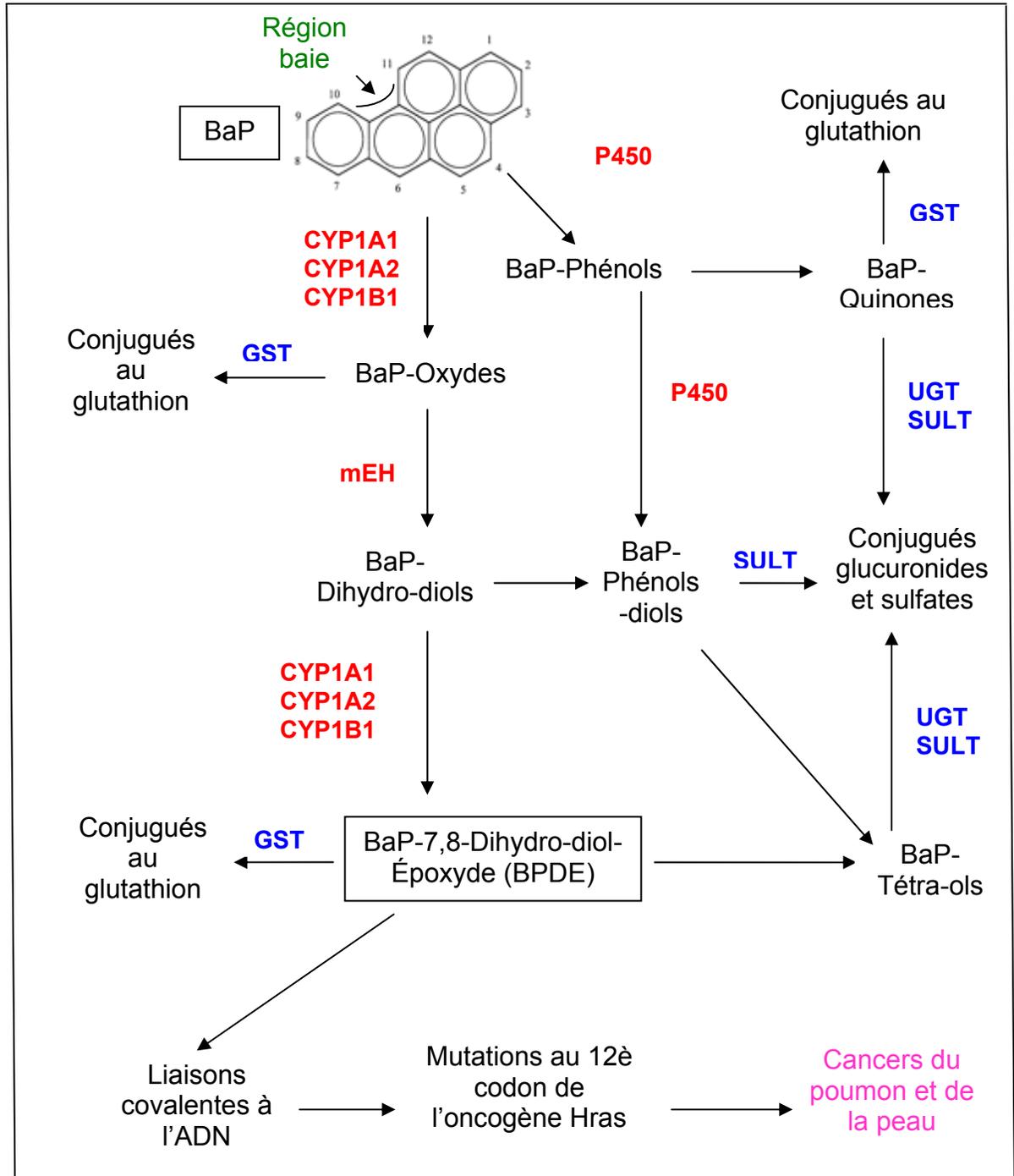


Figure 13 : Schéma général des étapes de la biotransformation du BaP. Sources modifiées : Parkinson, 2001 ; Eaton et al, 1998 ; Cavalieri et Rogan, 1995.

Légende : Les enzymes de la phase I sont en rouge et celles de la phase II, en bleu.

La Figure 14, page 45 résume les trois voies métaboliques possibles du BaP. Dans la phase I, le BaP peut suivre trois voies métaboliques : 1- la voie de mono-oxygénation ; 2- la voie d'oxydation par l'activité peroxydase ; 3- la voie d'oxydation par des aldo-kéto réductases (AKR). La 1^{ère} voie fait entrer en jeu le CYP1A1, produit du gène *CYP1A1* dont les polymorphismes sont associés à des variations d'activité enzymatique [Botta, 2007]. Cette enzyme est principalement impliquée dans l'oxydation du BaP au niveau des sites extra-hépatiques et elle est présente, par exemple, en quantités plus importantes dans les poumons et le foie des fumeurs suite à la présence d'hydrocarbures polycycliques dans la fumée de tabac [Lauwerys et al, 2007]. La 2^{ème} voie est celle de l'oxydation par des peroxydases et comprend trois caractéristiques qui sont : l'arrachement d'un électron pour former un radical cation ; la réactivité du radical cation vis-à-vis des molécules nucléophiles sur des sites bien spécifiques (exemple : sur le C⁶ du BaP) et l'intercalation dans l'ADN de ces radicaux grâce à leur configuration géométrique, formant des liens covalents avec des nucléotides [Cavalieri et Rogan, 1995 ; Cavalieri et Rogan, 1992]. La 3^{ème} voie, quant à elle, fait intervenir des dihydrodiol-déshydrogénases de la famille des AKR. Ce sont des enzymes cytosoliques NADPH-dépendantes catalysant l'oxydation du BaP trans-dihydrodiol en des quinones qui réagissent fortement avec les thiols, le glutathion et la cystéine pour former des conjugués hydrosolubles [Miller et Ramos, 2001]. Cette dernière voie peut aussi entraîner la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Les quinones prédominantes formées peuvent aussi générer des ERO par leur cycle d'oxydoréduction entre les formes hydroquinone et semi-quinone. Les métabolites de type phénols, diols et quinones formés par le BaP peuvent être éliminés sous-forme de glucurono- et sulfo-conjugués [Peltonen et Dipple, 1995].

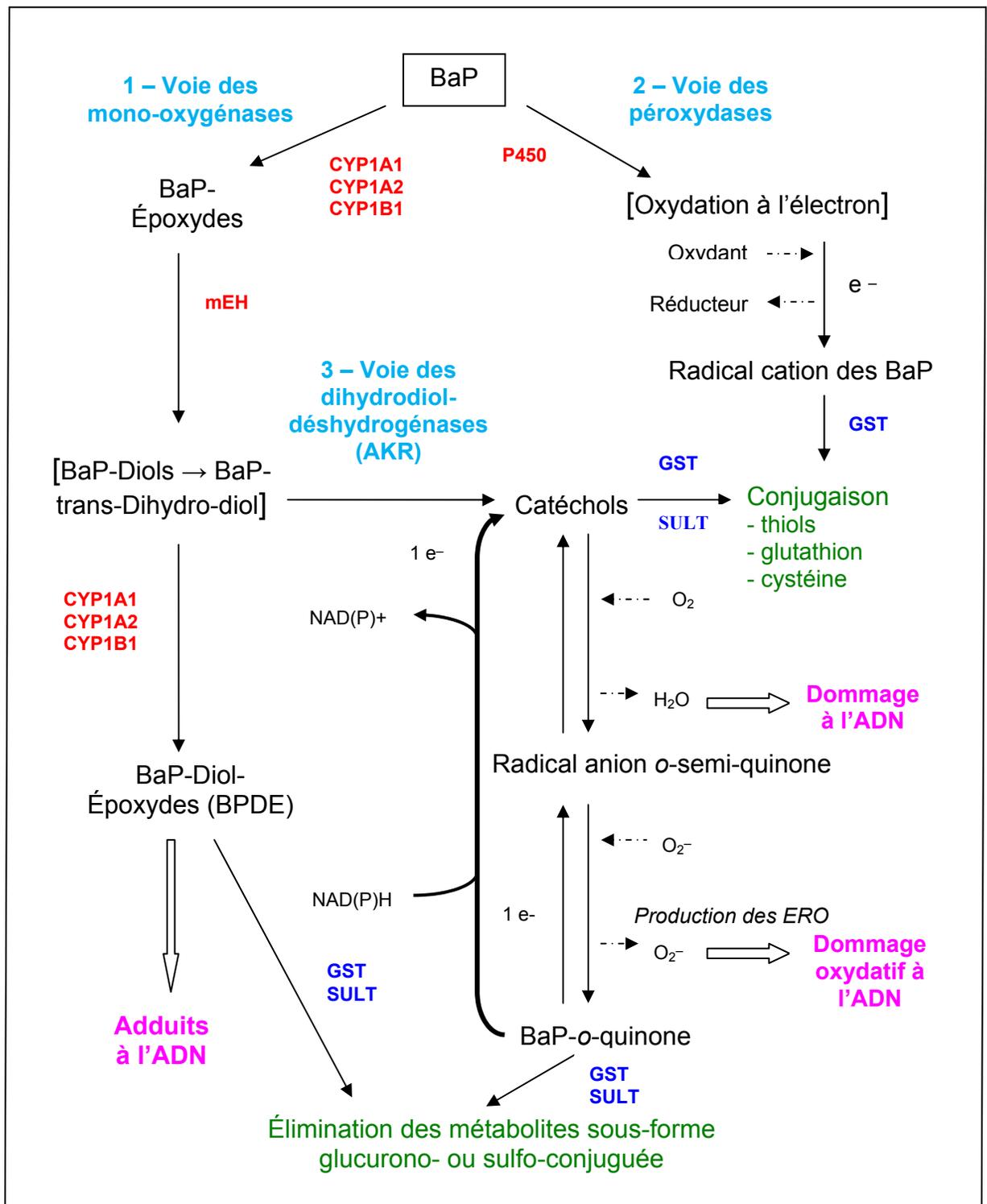


Figure 14 : Voies métaboliques du BaP débutant dans la phase I de la biotransformation. Sources modifiées de : Burczynski et Penning, 2000 ; Cavalieri et Rogan, 1995.

Légende : Les enzymes de la phase I sont en rouge et celles de la phase II, en bleu.

Le mécanisme d'action du BaP se fait de la manière suivante (Figure 15, ci-dessous) : par sa haute lipophilie, il traverse facilement la membrane plasmique et par sa structure aromatique plane, il a une grande affinité pour le récepteur des hydrocarbures aromatiques (AhR pour *Aryl hydrocarbon Receptor*), une protéine cytosolique associée à une autre protéine Hsp90 (*Heat shock protein 90*). Ces deux protéines le prennent en charge dès qu'il pénètre dans le cytoplasme de la cellule et le transportent jusqu'au noyau [Miller et Ramos, 2001].

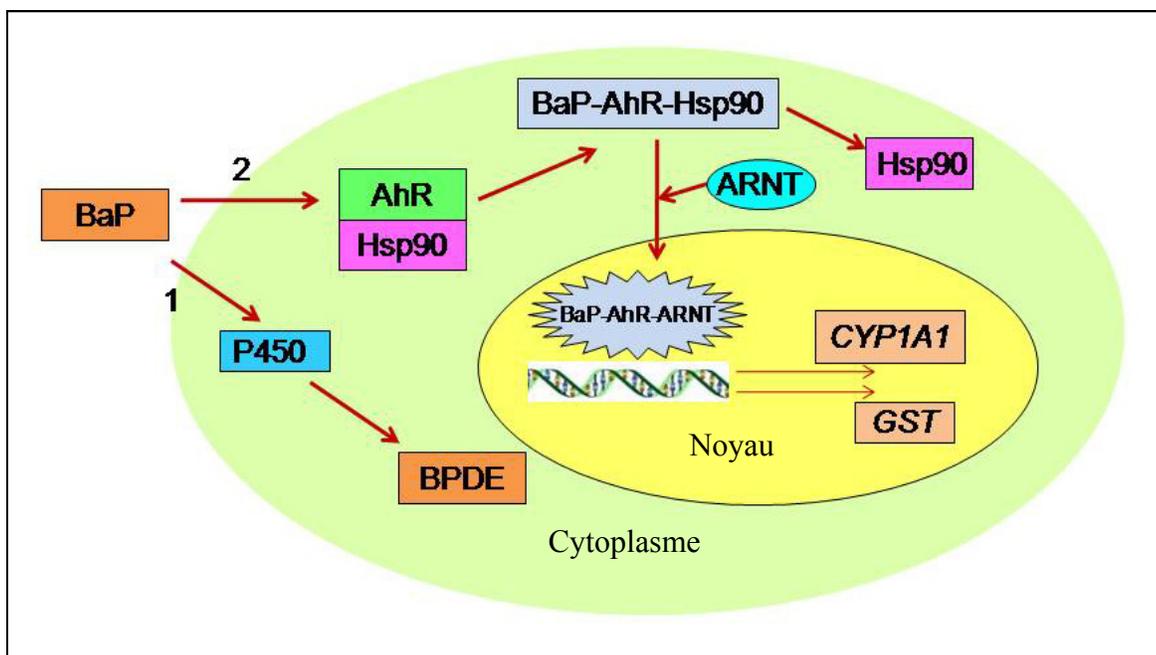


Figure 15 : Mécanisme d'action du BaP dans la cellule. Source modifiée : Miller et Ramos, 2000.

Légende : 1 : Voie que prend le BaP pour se biotransformer en BPDE

2 : Le BaP est pris en charge par le système d'auto-induction enzymatique jusqu'au noyau où la formation du complexe BaP-AhR-ARNT va induire l'expression des gènes de transcription entraînant la biotoxification.

Dans le noyau, la Hsp90 se libère du complexe BaP-AhR, ne laissant que le duplex BaP-AhR qui ira se lier à l'ARNT (*Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*), une protéine nucléaire. Le complexe BaP-AhR-ARNT formé est un hétérodimère jouant le rôle de facteur de transcription induisant l'expression de plusieurs gènes, dont le *CYP1A1*, certaines isoformes du glutathion-S-transférase et le *NQO1* qui est impliqué dans le

métabolisme de phase II. [Miller et Ramos, 2001]. Si le BaP n'est pas pris en charge dans ce processus d'auto-induction enzymatique, il pourra se distribuer dans les membranes de divers organites comme l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique, le noyau, les lysosomes et les mitochondries [Barhoumi et *al*, 2000].

1.2.3 L'induction de la cancérogenèse du BaP

Une des premières étapes du processus néoplasique est l'apparition des dommages à l'ADN causés par des modifications dues aux productions des ERO, aux altérations de son ultrastructure comme les croisements des brins d'ADN (*DNA-strand crosslinking*), à leurs cassures et à leurs réarrangements [Poirier, 2004].

La grande majorité des agents chimiques cancérogènes pour l'homme cause des dommages à l'ADN et des mutations dans les gènes impliqués dans la régulation de la croissance, de la prolifération et de la mort cellulaire. Ces agents chimiques peuvent être divisés en deux grandes classes : les cancérogènes à action directe (ou électrophiles) et les cancérogènes inertes (ou nucléophiles). À l'inverse des cancérogènes à action directe qui interagissent directement avec les constituants cellulaires, les cancérogènes nucléophiles ont besoin du métabolisme enzymatique pour se biotransformer en produits cancérogènes. C'est pourquoi ils sont dits procancérogènes. Le BaP peut entraîner la formation d'adduits à l'ADN, formés par le BPDE, le radical cation et les quinones du BaP, dont les propriétés électrophiles facilitent leur liaison à l'ADN. Comme ces métabolites sont très réactifs, ils réagiront avec une molécule cible très proche de leur site de production, c'est-à-dire dans la cellule où ils sont produits [Viau et Tardif, 2003]. Donc, seules les cellules pourvues d'enzymes de biotransformation adéquates seront touchées. Le BaP peut également induire des dommages oxydatifs. Ces dommages et ces adduits causeront des mutations et des altérations dans la structure de l'ADN, tels les réarrangements chromosomiques, les délétions, les cassures chromosomiques et autres.

1.2.3.1 La formation des adduits par le BPDE

Le taux de formation des adduits à l'ADN augmente en fonction de la concentration du BaP [Rojas et *al*, 2000]. Comme il est présenté dans la [Figure 16](#), page ci-dessous, les adduits sont formés par la liaison du BPDE à l'ADN. Plus précisément, il y a liaison covalente du-BPDE (position C¹⁰) avec les groupes amines des acides nucléiques, tels les atomes N² de la 2'-déoxyguanosine (dG) et N⁶ de la 2'-déoxyadénosine (dA) [Dipple, 1994], qui sont les deux sites majeurs de la formation d'adduits BPDE-ADN. D'autres adduits formés en position N⁴ de la dC (déoxycytidine) et en N⁷ de la G (guanine) sont minoritaires [Tarantini, 2010].

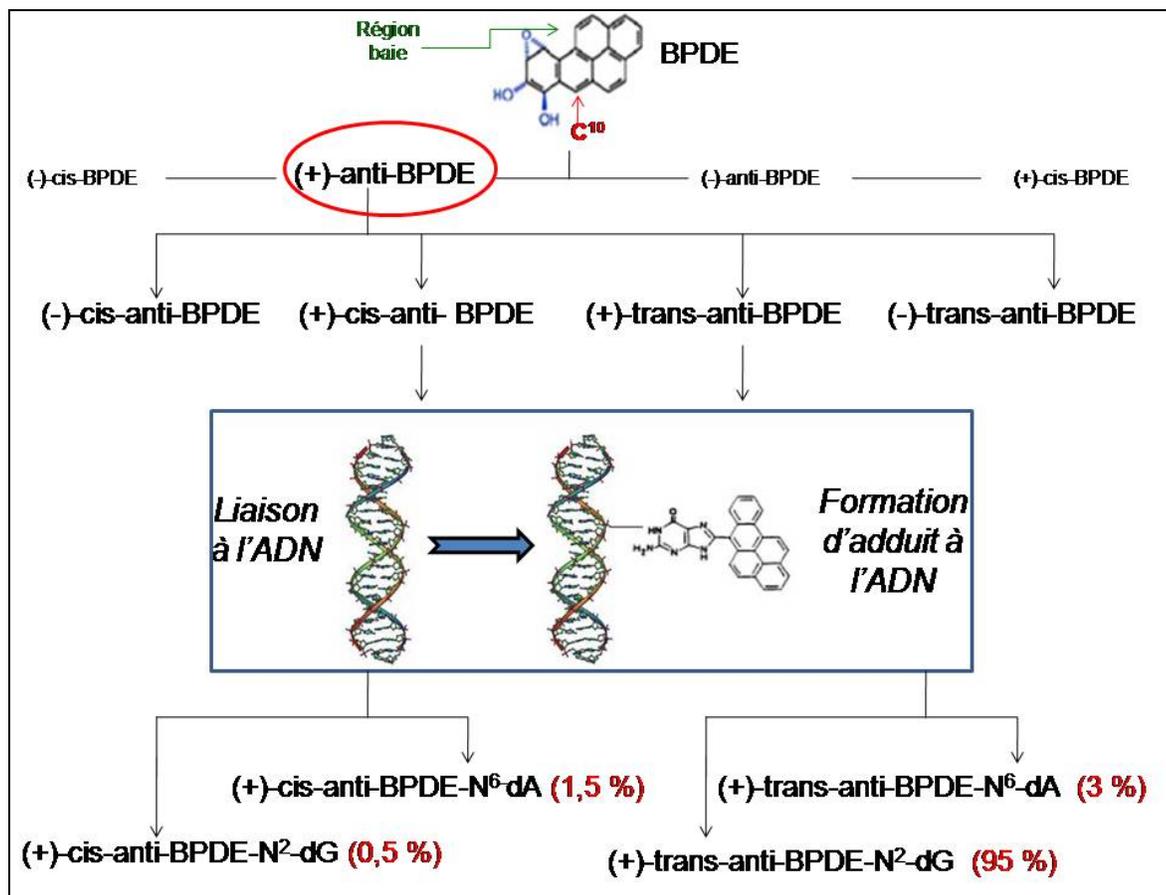


Figure 16 : Formation des quatre principaux adduits à l'ADN par le BPDE. *Source modifiée : Ströck, 2006.*

Théoriquement, le BaP peut être métabolisé en quatre différents stéréo-isomères de BPDE, donnant chacun deux adduits *cis* et *trans*. Le plus fréquemment observé est l'isomère BaP(+)-anti-7R,8S-diol-9S,10R-époxyde [(+)-anti-BPDE], formé en plus grande quantité que ses trois autres stéréo-isomères, les (+)-*cis*, (-)-*cis* et (-)-anti-BPDE [Luch, 2005]. Voici le pourcentage des quatre principaux adduits dérivant du (+)-anti-BPDE [Dreij et *al*, 2005] : 95 % pour le (+)-*trans*-anti-BPDE-N²-dG, 3% pour le (+)-*trans*-anti-BPDE-N⁶-dA, 1,5 % pour le (+)-*cis*-anti-BPDE-N⁶-dA et 0,5 % pour le (+)-*cis*-anti-BPDE-N²-dG. Par ailleurs, les expériences de Okano et *al*. en 1979 ont montré que le pourcentage de (+)-anti-BPDE formés dans les lymphocytes humains est de 90 à 95 %. Le (+)-anti-BPDE a intrinsèquement le potentiel génotoxique et cancérigène le plus élevé de tous les stéréo-isomères du BaP. Son adduit, le (+)-*trans*-anti-BPDE-N²-dG, résiste plus fortement à la réparation par la NER que le (+)-*cis*-anti-BPDE-N²-dG. Ce dernier peut être réparé par la NER 10 fois plus vite que le (+)-*trans*-anti-BPDE-N²-dG parce que la distorsion causée dans l'ADN induite par le produit *cis* est plus sévère [Okano et *al*, 1979]. De plus, les expériences ont montré que le produit principal de la région baie du BaP est le (+)-*trans*-anti-BPDE-N²-dG [Luch et Baird, 2005]. Celui-ci induit principalement des mutations comme des transversions G→T, qui sont retrouvés dans les gènes suppresseurs de tumeurs *TP53* ou *KRAS* dans les tumeurs de cancer du poumon des fumeurs [Luch, 2005].

1.2.3.2 La formation des adduits par le radical cation du BaP

L'activation catalysée par les enzymes mEH et mono-oxygénases cyt P450-dépendantes aboutissant à des diol-époxydes électrophiles peut prendre d'autres voies alternatives comme celle de l'oxydation à un électron pour générer des radicaux cations du BaP par des peroxydases H₂O₂-dépendantes. L'interaction covalente se fait entre la position C⁶ du BaP (où la densité électrophile est la plus haute) et le nucléophile [Luch et Baird, 2005]. Les adduits formés sont : le BaP-6-N⁷-dG [Luch et Baird, 2005], le BaP-N⁷-G, le BaP-C⁸-G, le BaP-C⁸-dG, le BaP-N²-dG, le BaP-N³-dG et le BaP-N⁷-A [Tarantini, 2010]. Il semblerait que les adduits dépurinants peuvent former au moins 10 fois plus de sites apuriniques comparés aux lésions formées par dépurination spontanée dans des cellules conduisant aux mutations ou à l'initiation des tumeurs [Luch et Baird, 2005].

1.2.3.3 La formation des adduits par les quinones

Les enzymes dihydrodiol-déshydrogénases de la superfamille des AKR métabolisent le BaP-diol pour former le BaP-*o*-quinone, tout en produisant des ERO lors de deux étapes d'oxydation : la première oxydation génère un anion *o*-quinone avec du peroxyde (H₂O₂) et la deuxième, un *o*-quinone avec un anion superoxyde (O₂^{•-}) [Smithgall et al, 1988]. En présence de métaux comme le fer (Fe²⁺) ou le cuivre (Cu²⁺), le H₂O₂ peut aussi donner naissance à des radicaux •OH. Ces espèces réactives conduisent à la génération de bases oxydées dans l'ADN, dont la plus connue est le produit d'oxydation de la dG en position C⁸ [Tarantini, 2010]. Cependant, les lésions formées par les ERO sont dépendantes de la balance de la production de celles-ci et de leur désactivation par les systèmes de protection anti-oxydante [Marie, 2007].

1.2.3.4 Les propriétés clastogéniques du BaP

Les propriétés clastogéniques des produits chimiques parmi lesquels se trouve le BaP ont été mises en évidence pour la première fois par Bender et al. [1974] en étudiant les AC. Ensuite, en 1988, les propriétés clastogéniques du BaP ont été étudiées par Schmuck et al. en utilisant le test des MN. À partir de 1988, les AC et les MN ont été étudiés en parallèle pour mettre en évidence les effets clastogéniques du BaP [Études avec les AC : Ishidate et al, 1988 ; Matsuoka et al, 1993 ; Bean et Galloway, 1993 - Études avec les MN : Ellard et al, 1991 ; Gu et al, 1992 ; Matsuoka et al, 1993 ; Vian et al, 1993 ; Elhajouji et al, 1994 – etc.]. En conséquence, il a été rapporté que le BaP cause des dommages à l'ADN par des cassures des chromosomes entraînant des anomalies de structure. En effet, l'effet clastogène du BPDE (métabolite du BaP) étudié *in vitro* sur des lignées cellulaires de hamster chinois, induit surtout des cassures chromatidiennes et différentes aberrations complexes (translocations, inversions, etc.) [Meschini et al, 2008 ; Natarajan et Palitti, 2008]. Les cassures et les aberrations complexes sont aussi étudiées dans les lymphocytes humains exposés au BaP [Güven et al, 2006] confirmant bien son effet clastogène. De plus, cet effet est étudié *in vivo* chez des travailleurs exposés aux HAP et cette étude a démontré que le BPDE est responsable des cassures double-brin de l'ADN et des AC menant à l'instabilité

chromosomique [Pavanello et *al*, 2009]. Par conséquent, la grande majorité des études classent le BaP comme étant un composé clastogène.

Par ailleurs, l'effet aneugène du BaP a été suggéré pour la première fois suite à deux études de Matsuoka et *al*, en 1997 et 1998. Tout d'abord, dans leur premier article, la lignée V79-MZ de hamster chinois a été exposée à des concentrations de BaP de 1,25 à 10 µg/mL pour 24 h. Les auteurs ont observé un changement dans le nombre de chromosomes, puisque ces cellules (normalement diploïdes - 2n chromosomes) présentaient une distribution de chromosomes variant entre 2n et 4n [Matsuoka et *al*, 1997]. Les auteurs ont poursuivi avec une étude en microscopie confocale [Matsuoka et *al*, 1998], qui leur a permis une mise en évidence de cellules comportant un fuseau mitotique incomplètement formé et des chromosomes retardataires; ce qui suggère un effet aneugène. Plus tard, les travaux de Shinmura et *al*. [2008], effectués sur des cellules du carcinome pulmonaire exposées au BPDE, appuient ainsi l'effet aneugène du BaP.

1.2.3.5 Les principales étapes de la cancérogenèse du BaP

La Figure 17, page 53 résume l'enchaînement des événements menant à l'apparition d'un cancer, après l'exposition à des produits cancérogènes comme le BaP.

En cancérogenèse, trois étapes principales dans la formation du cancer ont été proposées et sont l'initiation, la promotion et la progression.

Lors de l'initiation, une substance cancérogène entraîne la formation d'une ou de plusieurs altérations au matériel génétique produisant des mutations et/ ou des délétions. À cette étape, les cellules initiées ne sont pas encore des cellules tumorales et ne peuvent être distinguées des cellules saines. Ce phénomène peut déclencher la voie de l'apoptose. Les possibilités de contrôle et de réparation des lésions initiales dépendent de l'intégrité des gènes suppresseurs de tumeurs (comme le gène *TP53*) [Lacave, 2005]. La capacité du BaP à entraîner des dommages à l'ADN lui confère le rôle d'initiateur dans le processus de formation des cancers [Marie, 2007].

Lors de la promotion, les cellules initiées prolifèrent sous l'action des hormones ou des facteurs de croissance. S'il y a une mutation au niveau des gènes régulant la mitose

(oncogène ou suppresseur), un dérèglement du contrôle du cycle cellulaire et de la synthèse de l'ADN se déclenche. Comme nous l'avons déjà mentionné, certains HAP, comme le BaP, ont une grande affinité pour le récepteur AhR qui contrôle des gènes impliqués dans la promotion [Sjogren et *al*, 1996]. Généralement, les promoteurs induisent des modifications cellulaires réversibles qui n'altèrent pas directement l'ADN [Lacave, 2005]. Cependant, ils pourront promouvoir la croissance des cellules initiées et former des masses de cellules tumorales bénignes. De ce fait, la transcription génique, la communication intercellulaire et le patron d'expression de protéines impliquées dans la croissance, la différenciation cellulaire et l'apoptose pourront être modifiés par les promoteurs [Luch, 2005].

Au stade de la progression, il y a acquisition de la croissance indépendante des facteurs de croissance, début de l'expression phénotypique de la malignité et de l'instabilité génétique et chromosomique. Il y a accroissement du taux de croissance cellulaire, ce qui augmente les risques de mutation. C'est l'étape où des caractéristiques de plus en plus malignes apparaissent ; une invasion tumorale, ainsi que des métastases peuvent être également observées [Lacave, 2005].

Cependant, l'apparition d'un cancer dépend de nombreux facteurs ; si ce sont les gènes qui portent l'altération initiale, ce sont les protéines qui en sont issues après transcription et traduction, qui sont porteuses des propriétés pathologiques caractérisant le phénotype cancéreux. Le cancer n'est pas le produit d'une altération unique mais plutôt de la survenue progressive d'altérations multiples donnant un avantage sélectif aux cellules [Robert, 2006]. Comme le BaP, mais surtout son métabolite le BPDE, est capable d'induire les étapes d'initiation et de promotion de la cancérogenèse, il est donc un cancérogène complet [Rubin, 2001].

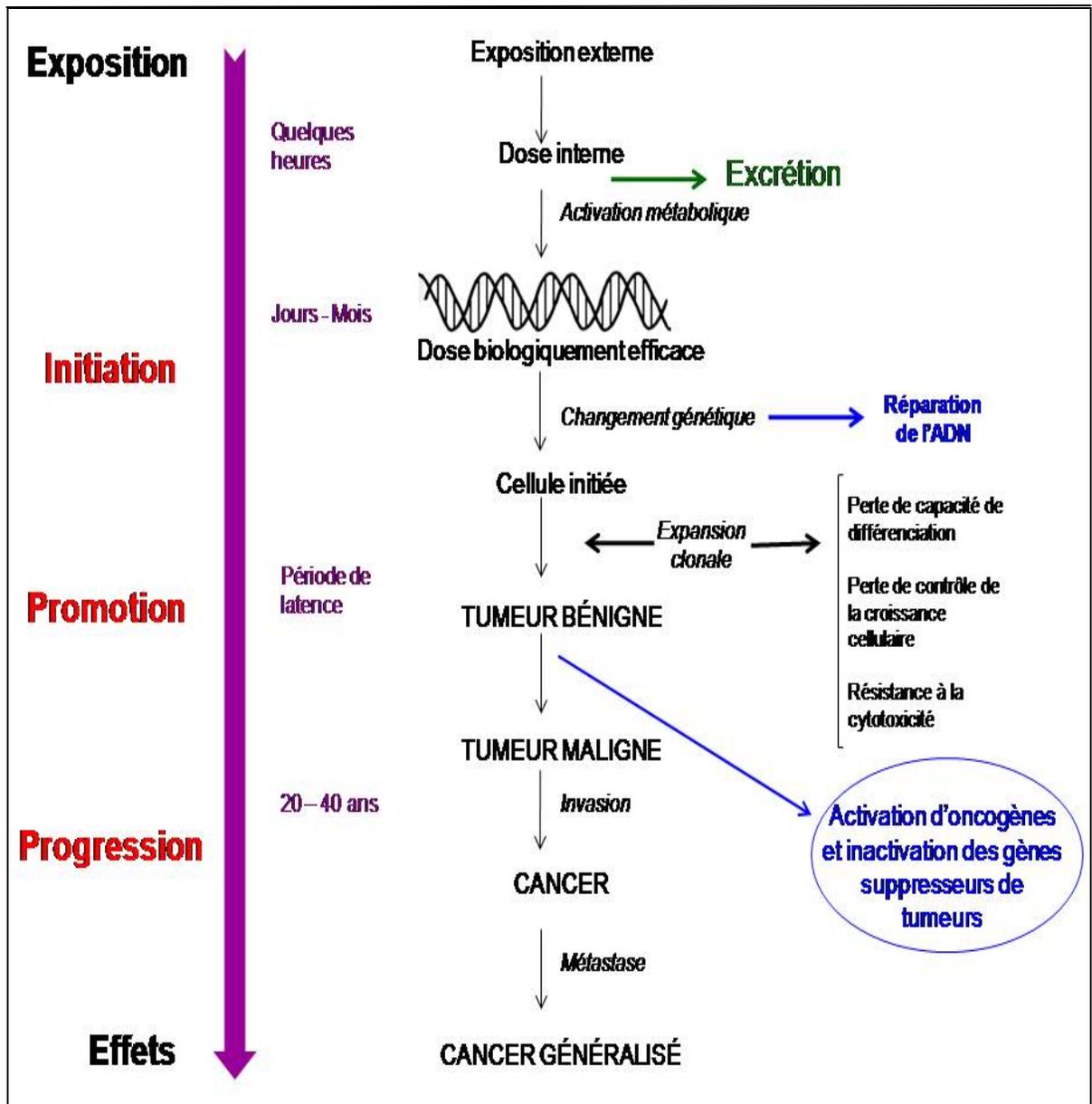


Figure 17 : Les principales étapes de la cancérogenèse, depuis l'exposition jusqu'à la généralisation d'un cancer. *Source modifiée : Pfohl-Leskowicz, 2008.*

1.3. LES MICRONOYAUX SANGUINS (MN)

Comme le cancer ne se déclare qu'après un temps de latence, il est essentiel de développer des biomarqueurs précoces qui peuvent aider à déterminer et à prévenir les risques génotoxiques. La validation d'un simple biomarqueur demande de longues périodes d'étude depuis le développement et la standardisation du protocole de recherche, jusqu'à l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité de ce biomarqueur comme prédicteur de risque de cancer. Le seul biomarqueur cytogénétique qui a passé à toutes les étapes jusqu'à présent est le test classique d'analyse des AC (cassures et réarrangements chromosomiques) dans les lymphocytes humains [Fenech, 2002]. Cependant, le test des MN gagne de plus en plus en popularité parce qu'il est plus facile à réaliser (entre autres depuis la mise au point de la variante qui inclut un blocage de la cytocinèse (variante CBMN)) [Duan et al, 2009 ; Pavanello et al, 2008] et parce que l'analyse des MN se fait plus rapidement que l'analyse des métaphases dans le test des AC.

Grâce à la collaboration internationale du projet des MN (*HUMN project*), les critères standardisés d'analyse permettent d'obtenir des résultats plus uniformes dans les différents laboratoires du monde entier pour atteindre les objectifs suivants : 1) déterminer les variables les plus importantes qui influencent le taux de dommages de l'ADN; 2) établir un protocole de test standardisé (le test des MN avec ou sans utilisation de cytochalasine B (Cyt B) est autorisé par l'OCDE [OECD, 2009]); 3) déterminer la valeur du test des MN à prédire les risques de cancer et de maladies dégénératives (par exemple : la maladie d'Alzheimer) [Bonassi et al, 2007 ; Fenech, 2002].

1.3.1 La nature et l'origine

Dès les toutes premières cultures de sang humain induites à la phytohémagglutinine (PHA), des MN ont pu être observés dans les cellules en interphase [Obe et al, 1975]. Également appelés corps de Howell-Jolly par les hématologistes, ils sont utilisés comme biomarqueur précoce des dommages chromosomiques, de l'instabilité génomique et éventuellement de risque de cancer [Iarmarcovai, 2008]. Ils sont générés au cours de la division cellulaire, lorsque l'ADN présente des cassures double-brin (directes ou issues de la

réplication de l'ADN non ou mal réparé) ou encore lorsque l'appareil mitotique présente des anomalies de fonctionnement entraînant la perte de chromosomes entiers [Iarmarcovai et *al*, 2007b]. Les MN se retrouvent dans les cellules interphasiques sous la forme de petites entités extranucléaires [Decordier et *al*, 2009 ; Norppa, 2004] et ils possèdent leur propre membrane nucléaire. Actifs d'un point de vue transcriptionnel et réplicatif [Fortin et *al*, 2008], ils représentent à la fois un biomarqueur d'effet et un indicateur potentiel de la réponse biologique à des agents génotoxiques [Fenech, 1993].

1.3.2 Le mécanisme de formation

Dépendamment du contenu des MN (fragments acentriques ou chromosomes entiers ou partiels), leur mécanisme de formation sera fondamentalement différent. Les fragments chromosomiques seront induits directement par des agents clastogènes et les MN contenant des chromosomes entiers ou partiels le seront par des agents aneugènes. La constitution des MN est influencée aussi bien par le type d'exposition que par des facteurs biologiques (âge et genre) et la détermination du contenu des MN est particulièrement importante quand ce test est utilisé pour la surveillance des effets génotoxiques chez l'homme [Lindberg et *al*, 2008].

1.3.2.1 La formation de fragments chromosomiques acentriques

Le plus souvent, les agents clastogènes altèrent les deux brins d'ADN et induisent des cassures double-brin. Ce sont souvent des agents intercalants présentant une structure chimique plane qui favorise leur positionnement entre les paires de bases ou des agents pontants établissant des liaisons covalentes entre les bases et/ou les sucres situés sur chacun des brins [Iarmarcovai et *al*, 2007c]. Les cassures double-brin qui résultent de ces modifications représentent des lésions primaires de l'ADN particulièrement sévères, car plus difficilement réparables sans erreur. Théoriquement, si une cassure double-brin formée en phase G1 n'est pas réparée, elle se manifestera lors de la mitose par la libération d'un fragment chromosomique [Balosso et Foray, 2005], par un phénomène de rejet du fragment hors du noyau (l'exonucléose) conduisant à la formation d'un MN. Les fragments

chromosomiques sont produits avec une incidence en moyenne six à sept fois plus faible que celle des cassures double-brin, car la majorité de ces cassures serait présente dans la chromatine très condensée [Balosso et Foray, 2005].

Les agents clastogènes peuvent causer aussi des cassures simple-brin pendant la phase G₁. En général, ces lésions sont réparées en-dedans d'une heure, avant le passage de la fourche de réplication. Dans le cas contraire, lors de la réplication (phase S), les cassures simple-brin sont alors converties en cassures double-brin qui peuvent être réparées par recombinaison homologue [Cortés-Ledesma et Aguilera, 2006]. Si ces cassures double-brin ne sont pas réparées, ce seront des cassures chromatidiennes qui se produiront à la mitose ou encore des délétions lorsque le fragment acentrique est perdu [Delacôte et Lopez, 2008]. Quelques exemples d'AC se trouvent à la [Figure 12](#), page 35.

Comme nous venons de le mentionner, les fragments contenus dans les MN peuvent être de type chromatidien ou chromosomique ; cependant leur formation ne se fait pas de manière égale parce que, à la métaphase, les fragments chromatidiens sont attachés à la région homologue de la chromatide-sœur tandis que les fragments chromosomiques acentriques sont isolés de leurs chromosomes d'origine [Norppa et Falck, 2003]. Les fragments chromatidiens acentriques ne sont pas toujours séparés de la chromatide-sœur à l'anaphase et, dans ce cas, ne forment pas de MN d'une manière aussi efficace que les fragments chromosomiques acentriques.

1.3.2.2 La formation de MN constitués de chromosomes entiers ou partiels

Plusieurs études suggèrent que les MN contenant des centromères (MN C⁺) sont consécutifs à diverses altérations des éléments protéiques structurant l'appareil mitotique et que la plupart des événements aneugènes impliquent plusieurs chromosomes qui se retrouvent dans les MN [Iarmarcovai et *al*, 2007c ; Baciuchka-Palmaro et *al*, 2002 ; Descamps et *al*, 2002]. Ainsi, la formation des MN C⁺ résulterait de l'action d'agents aneugènes qui induisent des anomalies de la répartition des chromosomes à l'anaphase par des dysfonctionnements au niveau de la disjonction, de la ségrégation et de la migration des deux lots de chromosomes-fils [Iarmarcovai et *al*, 2007c]. L'instabilité dynamique des

microtubules, c'est-à-dire de l'équilibre entre la polymérisation et la dépolymérisation des dimères de tubuline α et β , ainsi que les anomalies des kinétochores, peuvent entraîner des problèmes lors de la migration des chromosomes et induire très majoritairement des MN contenant un centromère, alors que des anomalies de duplication des centrosomes devaient induire des MN avec plusieurs centromères [Iarmarcovai et *al*, 2006].

Des altérations touchant les centrosomes, le fuseau mitotique constitué de deux types principaux de microtubules originant du centrosome (les microtubules kinétochoriens et les microtubules polaires [Kierszenbaum, 2002]), les kinétochores, ainsi que les protéines régulant le point de contrôle de la phase M, sont tous susceptibles d'entraîner la formation de MN. Par ailleurs, des anomalies présentes lors de la formation de l'enveloppe nucléaire à la télophase, pourraient aussi induire l'isolement d'un ou de plusieurs chromosomes entiers et donc conduire à la formation d'un MN [Iarmarcovai et *al*, 2007c]. Toutes ces anomalies de répartition des chromosomes entraînent une aneuploïdie des cellules-filles qui auront, soit perdu, soit gagné un ou des chromosomes. Les cellules anormales ainsi produites pourront éventuellement participer au processus de transformation néoplasique.

1.3.2.3 La distinction par FISH entre les effets clastogène et aneugène en utilisant les MN

La technique de FISH associée au test des MN en utilisant une sonde qui reconnaît tous les centromères des chromosomes humains, la sonde pancentromérique, permet de détecter la présence de centromères dans les MN. Cette technique de FISH sera détaillée ultérieurement dans le chapitre 2 : Matériel et Méthodes, section 2.5, page 84. En utilisant cette sonde, il est possible de faire la distinction entre les agents clastogènes (fragments chromosomiques ne contenant pas de centromères : MN C-) et aneugènes (chromosomes contenant des centromères : MN C+). Cette distinction a été réalisée sur des MN pour la première fois en 1989, en utilisant des anticorps anti-kinétochores, qui ciblent les protéines associées aux centromères [Fenech et Morley, 1989], alors que l'utilisation de la première sonde pancentromérique a été réalisée en 1990 par l'équipe de Becker et *al*. Les agents clastogènes induisent surtout des MN formés suite à des cassures chromosomiques provoquant la formation de fragments acentriques, qui, faute de centromères, ne peuvent pas

s'attacher au fuseau mitotique pour migrer. Par contre, les MN induits par des agents aneugènes peuvent contenir des chromosomes entiers ou partiels avec centromères. Jusqu'en 2006, le contenu des MN était divisé en deux catégories, MN sans centromères (MN C-), MN avec centromères (MN C+), date à laquelle Iarmarcovai et *al.* [2006] suggèrent d'introduire deux nouvelles catégories : MN ayant un ou deux centromères (MN C₁₋₂₊) et MN avec trois centromères et plus (MN C₃₊₊). Cette nouvelle subdivision est effectuée au cours d'une nouvelle analyse des données obtenues lors de leurs études antérieures chez des travailleurs de l'industrie de la sidérurgie [Iarmarcovai et *al.*, 2007a]. Depuis, aucune nouvelle étude n'a été publiée en utilisant cette subdivision.

1.3.3 Le devenir des MN après leur formation

La question de l'avenir du micronoyau après sa formation n'est pas encore tout à fait élucidée. Plusieurs possibilités sont avancées dans la littérature, en fonction de la situation fonctionnelle de la cellule [Mateuca et *al.*, 2006 ; Leach et Jackson-Cook, 2004] :

- Le MN est expulsé hors de la cellule principale. Ceci se produirait lorsque l'ADN constituant le MN est considéré comme non fonctionnel et incapable de se répliquer.
- Le MN est réincorporé dans le noyau principal. Ceci permettrait une activité biologique normale de la cellule.
- Le MN est conservé à l'intérieur du cytoplasme de la cellule comme une entité extranucléaire après un ou plusieurs cycles de réplication. C'est la situation la plus fréquente. La durée de cette rétention est indéterminée et la fonction de l'ADN contenu dans le MN n'est pas connue. Cette situation n'a été mise en évidence, jusqu'à présent, que chez des femmes dont les MN comportaient des chromosomes X.

1.3.4 Le devenir des cellules comportant des micronoyaux

La question de la survie de la cellule comportant un MN est, elle aussi, encore discutée. Une anomalie de répartition de chromosomes lors de la division cellulaire induite par un agent aneugène entraîne une aneuploïdie, ce qui est un événement crucial dans la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse [Iarmarcovai et *al*, 2007c]. Toutefois, dans des cas bien particuliers, l'aneuploïdie et la polyploïdie peuvent être compatibles avec la vie cellulaire. Par exemple, les individus porteurs d'un troisième chromosome 21 (syndrome de Down) ou d'un seul chromosome X (syndrome de Turner) sont tout à fait viables, même si leur constitution génétique est aneuploïde. De même, dans le foie humain, la présence de cellules polyploïdes est tout à fait normale [Saeter et *al*, 1988]. Cependant, dans beaucoup d'autres situations, les cellules aneuploïdes pourraient être les déclencheurs de l'apoptose, contribuant à éliminer les cellules ayant des lésions prémutagéniques ou des mutations [Decordier et *al*, 2008].

D'ailleurs, plusieurs études rapportent que la plupart des agents aneugènes et clastogènes sont de bons inducteurs à la fois des MN et de l'apoptose [Decordier et *al*, 2005 ; Elhajouji et *al*, 1997 ; Elhalouji et *al*, 1995]. Ainsi, les agents interférant avec les microtubules formant le fuseau mitotique peuvent déclencher une réponse apoptotique significative en activant des protéinases de la famille des caspases suite au clivage de différents substrats dans le cytosol et le noyau pour désintégrer systématiquement la cellule en train de mourir [Decordier et *al*, 2002]. En effet, des recherches ont pu démontrer que certains agents chimiothérapeutiques cytostatiques comme le paclitaxel, peuvent altérer la polymérisation dynamique des microtubules et bloquer la mitose. Par leurs effets spécifiques sur la division cellulaire, ces drogues peuvent aussi induire l'aneuploïdie, la polyploïdie et/ou l'apoptose [Decordier et *al*, 2008]. L'apoptose, en elle-même, est impliquée dans l'élimination sélective des cellules endommagées et ce phénomène est observé pour les cellules ayant des MN contenant aussi bien des chromosomes complets ou partiels que des fragments chromosomiques acentriques, de l'ADN amplifié (les double-minutes) [Shimizu et *al*, 2000] et des types d'aberrations instables comme des dicentriques et des anneaux [Bassi et *al*, 2003 ; Schwartz et Jordan, 1997].

La question qui se pose et qui risque de ne pas être résolue de façon définitive est celle-ci : est-ce le contenu du MN ou le MN lui-même qui déclenche le signal apoptotique ? Est-ce la perte d'un chromosome entier ou du fragment chromosomique résultant d'une non réparation du bris double-brin qui en est responsable ? [Decordier et *al*, 2008]. Les expériences de ces auteurs avec le nocodazole (agent aneugène) ont montré qu'une concentration au-dessus du seuil (0,032 μM) de ce composé chimique augmente la fréquence de MN contenant des chromosomes avec centromère, ce qui pourrait être responsable du déclenchement apoptotique [Decordier et *al*, 2002]. Par ailleurs, les microtubules à l'interphase semblent aussi jouer un rôle dans l'induction de l'apoptose [Decordier et *al*, 2002].

1.3.5 Les facteurs de variation de la fréquence des MN

Les sources de variabilité pouvant influencer la formation ou la fréquence des MN sont nombreuses. D'abord, une variabilité inter-laboratoire existe, car les protocoles, méthodes ou critères d'analyse des MN peuvent être différents. C'est pourquoi un effort international est en marche afin de mettre au point un protocole normalisé [Protocole 487 de l'OECD, 2009].

La [Figure 18](#), page 61 présente les sources majeures de variation : la variabilité interindividuelle et intergenre, le mode de vie de chaque individu (alcoolisme, tabac, habitudes alimentaires), l'exposition à des agents génotoxiques (expositions professionnelles et environnementales), ainsi que le polymorphisme génétique existant dans la population (gènes du métabolisme et gènes de réparation). L'existence de variations de la séquence d'ADN à un locus donné constitue le polymorphisme génétique qui joue un rôle déterminant dans la modulation des dommages à l'ADN et dans la variabilité de la fréquence des MN. Ceci mène à l'application du test des MN comme un champ d'investigation de l'interaction entre l'environnement et le matériel génétique [Iarmacovai et *al*, 2007c]. C'est pourquoi l'application des concepts de susceptibilité génétique et d'interaction entre les facteurs de risque génétiques et environnementaux constitue le nouvel axe de recherche de l'épidémiologie moléculaire des cancers [Bonassi et *al*, 2005]. Ces études en sont encore à

leurs premiers pas étant donné la nature multifactorielle du cancer et la nécessité d'avoir des grandes cohortes pour mettre en évidence des effets significatifs [Norppa, 2004].

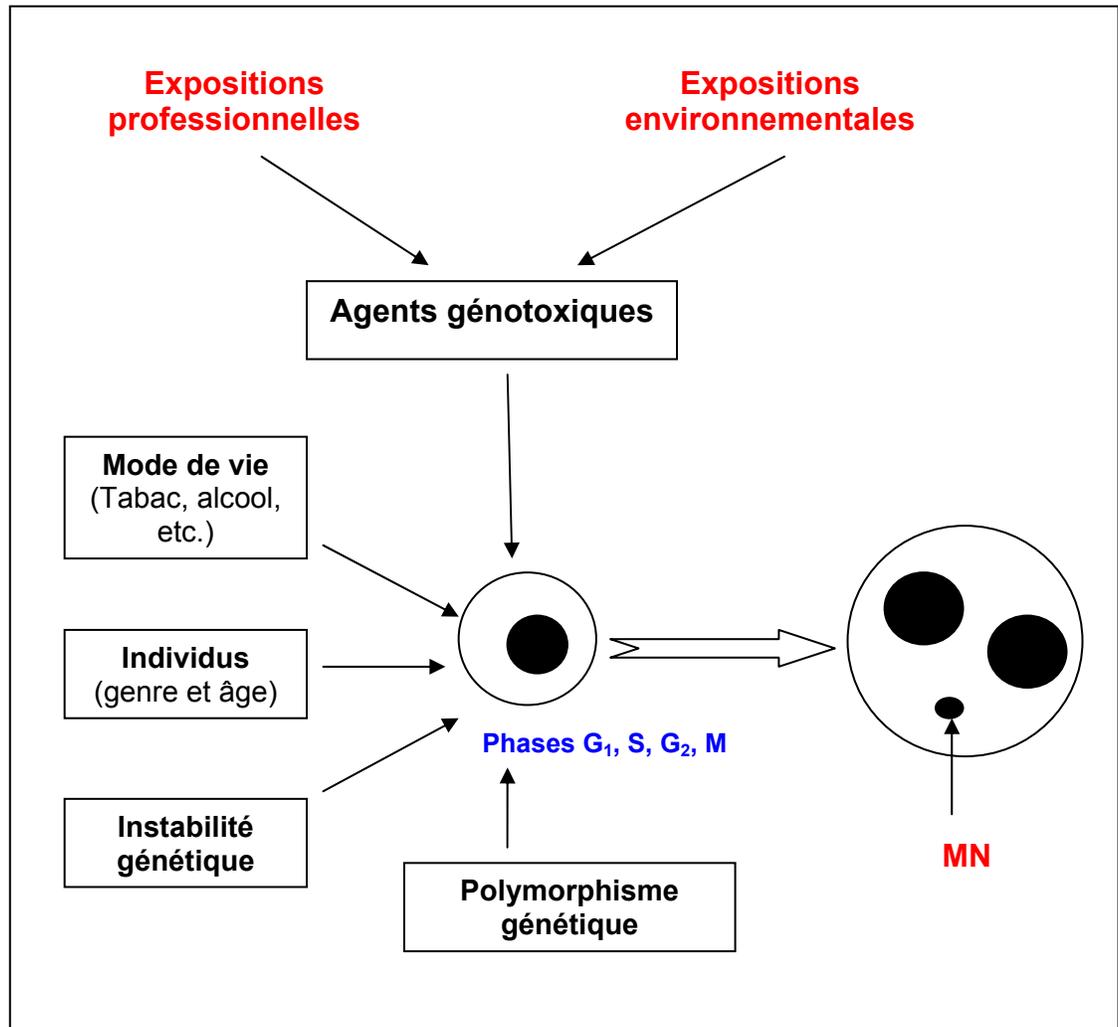


Figure 18 : L'influence des facteurs de variation sur la formation de MN. *Source modifiée: Iarmarcovai et al, 2007c.*

1.3.5.1 L'effet de l'âge

Les personnes âgées ont un taux significativement plus élevé ($p < 0,001$) de cellules contenant des MN ($10,3 \pm 7$ de cellules avec MN) en comparaison avec des personnes plus jeunes ($1,8 \pm 1,8$ de cellules avec MN) [Kazimírová et al, 2009]. Cela s'explique en partie par la diminution de l'efficacité du processus de réparation des dommages à l'ADN et par

l'accumulation de mutations qui sont plus importantes avec l'âge. Ainsi, les anomalies de nombre et/ou de structure des chromosomes sont augmentées avec l'âge [Wojda et *al*, 2007 ; Bolognesi et *al*, 1999]. Des études sur l'aneuploïdie et le vieillissement ont montré un taux significativement élevé de pertes chromosomiques et de formation de MN aussi bien chez les hommes que chez les femmes. En effet, une corrélation positive entre la présence de MN avec l'accroissement de l'âge est d'environ quatre fois plus dans des cultures de lymphocytes des donneurs âgés de 80 ans en comparaison avec celles des nouveaux-nés ($p < 0,001$) [Fenech et Morley, 1985]. De plus, la fréquence de MN se rapproche du ratio de 2 dans le groupe d'âge de 50 à 59 ans (RF = 1,9 ; $p < 0,05$) [Bolognesi et *al*, 1997] et la moyenne % de MN avec la déviation standard est de $2,6 \pm 1,7$ ($p < 0,01$) chez les personnes âgées de plus de 45 ans comparée à $1,4 \pm 0,8$ chez celles âgées de 20 à 44 ans ($p < 0,01$) [Bolognesi et *al*, 1999].

1.3.5.2 L'effet du genre

Le genre est une variable significative influençant le taux des MN et doit être pris en considération dans leur analyse [Fenech et *al*, 1994]. Les pertes chromosomiques impliquent fréquemment le chromosome X chez les femmes et le chromosome Y chez les hommes [Nowinski et *al*, 1990 ; Fitzgerald et McEwan, 1977].

1.3.5.2.1 La perte du chromosome X chez la femme

L'étude du contenu des micronoyaux chez des femmes, par FISH avec des sondes centromériques spécifiques, a montré la présence du chromosome X dans leurs MN [Surrallés et *al*, 1996 ; Zijno et *al*, 1996 ; Catalán et *al*, 1995 ; Guttenbach et *al*, 1995 ; Guttenbach et *al*, 1994 ; Richard et *al*, 1994] dans une proportion élevée (8 % chez les jeunes femmes vs 20 % chez les femmes âgées). L'incidence de la perte du chromosome X a été étudiée chez des femmes âgées d'une semaine à 91 ans, montrant une croissance de la perte du X avec l'âge. Cela serait dû à la variation de la concentration d'hormones circulantes, par exemple une diminution avec l'âge des oestrogènes, qui joue un rôle important dans l'aneuploïdie du chromosome X [Wojda et Witt, 2003]. Cependant, tous les

chromosomes peuvent se retrouver dans les MN, mais le chromosome X est celui qui s'y retrouve le plus souvent seul chez les femmes normales [Leach et Jackson-Cook, 2004]. Selon la même étude, les MN contenant 6 à 10 copies du chromosome X proviendraient de MN qui sont restés dans le cytoplasme de la cellule durant plusieurs divisions cellulaires et dont l'ADN a été répliqué plusieurs fois. De plus, l'utilisation d'anticorps anti-kinétochore montre que les MN trouvés chez les individus normaux contiennent à la fois des fragments acentriques et des chromosomes entiers, dont la proportion avec kinétochore est de 37 % chez les femmes âgées entre 24 et 35 ans et de 45 % chez les femmes âgées de plus de 65 ans [Fenech et Morley, 1989 ; Thomson et Perry, 1988]. Il semblerait que le chromosome X inactif ait une propension spéciale à être mal ségrégué lors de la division mitotique, faisant en sorte qu'il y ait principalement une association entre l'augmentation de l'aneuploïdie et l'âge chez les femmes [Abruzzo et *al*, 1985 ; Nakagome et *al*, 1984 ; Fitzgerald, 1975]. Certains auteurs mentionnent que c'est souvent ce chromosome qui se retrouve dans les MN [Tucker et *al*, 1996 ; Abruzzo et *al*, 1985] alors que d'autres [Surrallés et *al*, 1996] n'aient pas noté de différence significative entre la présence du chromosome X inactif et celle du X actif dans les MN.

1.3.5.2.2 La perte du chromosome Y chez l'homme

L'aneuploïdie chez les hommes a été décrite et souligne la perte du chromosome Y [Zhang et *al*, 2007 ; Fitzgerald et McEwan, 1977]. L'analyse caryotypique a montré que l'incidence de la perte du chromosome Y chez les hommes est nettement plus basse que celle du X chez les femmes. À la puberté, la fréquence de la perte de l'Y est de 0,24 % et atteint 1,34 % chez les hommes de 76 à 80 ans, en raison du changement hormonal [Wojda et Witt, 2003]. Cependant, cette perte n'a aucun effet sur les lymphocytes périphériques étant donné qu'il n'a pas de fonction cruciale pour la survie de ces cellules [Galloway et Buckton, 1978].

L'étude des MN par FISH a montré que chez des jeunes hommes, une moyenne de 14 % des MN analysés contiennent un chromosome Y alors que ce pourcentage grimpe à 20 % pour une cohorte d'hommes plus âgés [Guttenbach et *al*, 1994]. La perte du chromosome Y dans les MN est de six fois plus chez des hommes centenaires comparée aux hommes plus

jeunes (29 à 33 ans) [Bukvic et *al*, 2001]. Stone et Sandberg [1995] ont suggéré que des phénomènes de disjonction prématurée des centromères pourraient causer la perte du chromosome Y avec l'âge. Les protéines comme CENP-A, CENP-B et CENP-C sont essentielles à l'activité du kinétochore et si l'une d'elles manque ou subit un changement non conventionnel, les microtubules pourraient devenir non fonctionnels pour le chromosome qui va se retrouver dans un MN [Nath et *al*, 1995]. Le kinétochore du Y est différent des autres et n'a pas de site de liaison pour la protéine CENP-B [Masumoto et *al*, 1989]. L'absence de cette protéine causerait une dysfonction dans le kinétochore et le chromosome Y pourrait se détacher des microtubules du fuseau mitotique pour s'incorporer dans un MN [Nath et *al*, 1995]. Ces auteurs ont trouvé que 15,6 % des MN contiennent le chromosome Y dans une cohorte d'hommes âgés de plus de 35 ans.

1.3.6 Le développement du test des MN

La première réalisation du test des MN dans les lymphocytes a été faite en 1976 par Countryman et Heddle [Countryman et Heddle, 1976], méthodologie dérivant de la culture des cellules sanguines pour en réaliser le caryotype. Cette première méthode fut reprise par d'autres chercheurs et l'un d'entre-eux, Michaël Fenech, en 1984, s'aperçut qu'il existait un défaut majeur dans le décompte des MN : la fréquence des MN observés dépendait de la proportion des lymphocytes répondant à l'action mitogénique, ainsi que du nombre de divisions survenues durant la période de culture avant la récolte cellulaire. Suite à ces travaux, Fenech et Morley, en 1985, songent à exploiter la courte période durant laquelle la cellule est binucléée, mais pas encore divisée en cellules-filles. Ils mirent à profit les propriétés de la cytochalasine B (Cyt B), une mycotoxine inhibant la polymérisation des microfilaments d'actine responsables de la formation du sillon de clivage lors de la télophase. Les caractéristiques de la Cyt B seront détaillées plus tard dans la section 2.3.3, page 79 du chapitre 2, Matériel et Méthodes. La variante du test des MN par blocage de la cytokinèse (CBMN) était née [Revue dans Fenech, 2009].

Le test CBMN permet une précision accrue étant donné que les données obtenues ne sont pas influencées par les cinétiques d'altérations cellulaires causées par la cytotoxicité des agents testés ou par des conditions de cultures sous-optimales [Fenech, 2008]. De plus, la

certitude est acquise qu'au moins un cycle cellulaire s'est effectué après l'exposition à un agent chimique, puisque les cellules analysées comportent deux noyaux au sein d'un même cytoplasme. Cette innovation permet de démontrer que le taux d'augmentation de la fréquence des MN chez les personnes âgées était sous-estimé avec la méthode conventionnelle. Depuis, la technique CBMN est utilisée dans le monde entier et des critères sont établis par le comité international pour l'étude des MN (*HUMN project*) et son protocole par l'OCDE. Cette technique et les critères de sélection des MN sont décrits plus en détail dans la section 2.4, page 82 du chapitre 2, Matériel et Méthodes.

1.3.6.1 Les lymphocytes sanguins : un choix préférentiel

Comme nous l'avons déjà mentionné pour l'humain dans l'introduction (section 1.1.2.6, page 39), plusieurs types de cellules primaires (dérivées du tissu foetal, fibroblastes, etc.) et de cellules transformées sont utilisées pour effectuer ce test, mais ce sont les lymphocytes périphériques sanguins qui constituent le matériel préférentiel [Bonassi et *al*, 2007 ; Iarmarcovai et *al*, 2007c] parce qu'ils s'obtiennent et se cultivent facilement, en plus de présenter une grande stabilité génomique. En effet, les lymphocytes contiennent un ensemble diploïde de chromosomes ($2n = 46$) et leur caryotype est très stable durant la culture cellulaire.

Les lymphocytes T et les lymphocytes B constituent la majorité des cellules sanguines, et ont une sensibilité différente face aux agents physiques et chimiques. Les lymphocytes B sont des réparateurs lents alors que les lymphocytes T sont des réparateurs rapides [Boerrigter et Vijg, 1991]. Les lymphocytes offrent les avantages suivants :

- La plupart des agents génotoxiques requièrent une activation métabolique pour exercer leurs effets. La dose efficace d'un agent génotoxique est dépendante de la compétition entre les réactions métaboliques d'activation et de détoxification de cet agent, ainsi que des autres composés auxquels un individu est exposé. Les lymphocytes, en comparaison avec d'autres types de cellules, ont la capacité métabolique pour biotransformer le BaP en BPDE et autres métabolites sans avoir besoin d'activation métabolique exogène [Elhajouji et *al*, 1994].

- La disponibilité d'un grand nombre de cellules. Il suffit d'obtenir quelques millilitres du sang périphérique d'un individu pour pouvoir faire plusieurs tests. 1mL de sang contient environ $1 \text{ à } 3 \times 10^6$ lymphocytes [Evans et O'Riordan, 1975]. Pour une culture à court terme, les lymphocytes ont l'avantage d'être en suspension et facilement manipulables.
- Les lymphocytes sanguins périphériques peuvent être stimulés facilement par des agents mitogènes afin de retourner à leur état lymphoblastique et de se diviser. L'agent mitogène ajouté dans le milieu de culture, la phytohémagglutinine (PHA), stimule principalement les lymphocytes T à se diviser. De plus, dans le milieu de culture, 95 % des lymphocytes sont viables et représentent un excellent matériel pour les expériences.
- Les lymphocytes peuvent résister à la toxicité de la Cyt B permettant ainsi d'utiliser la variante CBMN dans le test des MN.

L'inconvénient de l'utilisation des lymphocytes pour des études à plus long terme réside dans le fait que ces cellules ont une durée de vie courte en culture (96 h) [Rooney et Czepulkowski, 1992]. Normalement, après trois ou quatre divisions successives, ils retournent à leur état lymphoblastique pour ensuite, se détériorer dans le milieu de culture, alors que dans le corps humain, les lymphocytes périphériques T ont une durée de vie normale de 1,5 à 10 ans [Bogen, 1993]. Les lymphocytes B, bien que leur nombre diminue avec la sénescence, peuvent durer pendant toute la vie de l'individu [Ademokun et al, 2010].

1.3.6.2 Les avantages et limites du test des MN

Le test CBMN est simple à réaliser, en plus d'être rapide; ses plus grands avantages sont la fiabilité et le coût peu élevé de la technique. Ce test est largement utilisé en épidémiologie moléculaire et en cytogénétique pour évaluer la présence et l'étendue des dommages chromosomiques dans la population exposée à des agents génotoxiques ou pour étudier un profil génétique. Le test CBMN peut être appliqué à plusieurs types cellulaires et permet de faire la distinction entre les cellules apoptotiques et/ou nécrotiques et les cellules

qui se sont divisées après l'exposition aux agents testés par l'analyse des MN dans les cellules binucléées seulement [Fenech et *al*, 1999].

Une des limites de cette technique est qu'elle ne permet pas de détecter toutes les aberrations structurales [Kirsch-Volders et *al*, 2002b]. De plus, le nombre de MN n'est pas entièrement proportionnel aux dommages à l'ADN. Par ailleurs, l'utilisation de la Cyt B dans le test CBMN pourrait causer une interférence avec certains produits chimiques, particulièrement les inhibiteurs du fuseau mitotique. Finalement, la cytotoxicité même de la Cyt B varie selon le type cellulaire, et parfois selon le sous-type de cellule employé [Kirsch-Volders et *al*, 2002b].

1.4. LES MICRONOYAUX REPRÉSENTENT QUEL TYPE DE BIOMARQUEUR?

1.4.1 Le continuum Exposition-Maladie

Dans l'élaboration d'un programme de biosurveillance de l'exposition à des agents génotoxiques, il faut se souvenir que l'effet induit ne survient, en général, qu'après une longue période d'exposition. Il est donc important de pouvoir détecter le plus tôt possible les premières altérations causées par cette exposition [Kirsch-Volders et *al*, 2002b]. C'est pourquoi des biomarqueurs d'effet précoce ont été développés. Le déroulement des événements à partir de l'exposition, par exemple à des sources de BaP, jusqu'au développement des maladies et/ou cancers suit un enchaînement continu, illustré dans la Figure 19, page 68.

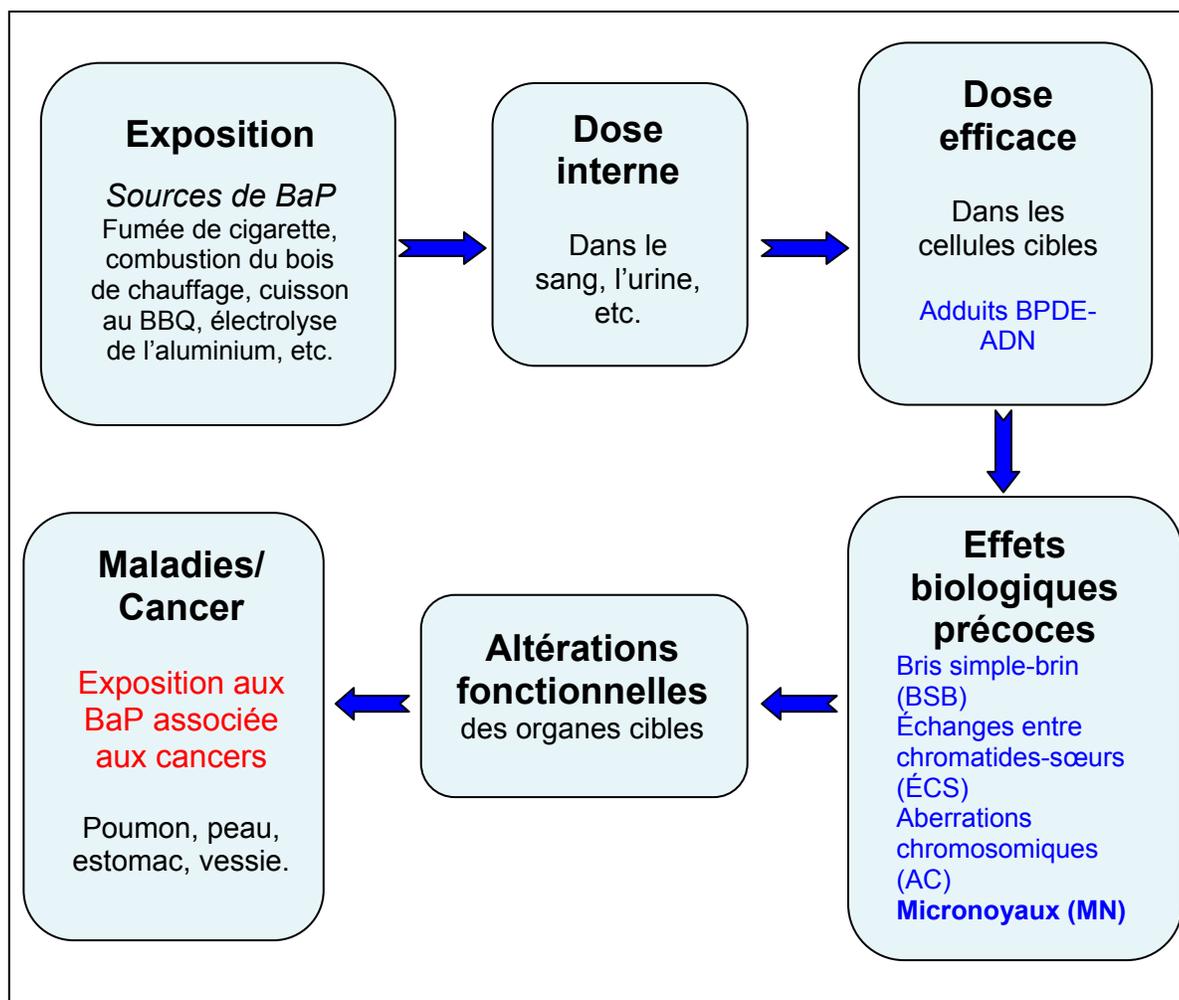


Figure 19 : Le continuum Exposition-Maladie.

D'après ce schéma, les MN représentent un des biomarqueurs des effets biologiques précoces après une exposition aux agents cancérigènes. De manière générale, la formation de MN suite à une exposition *in vivo* intègre de nombreux facteurs de variations tels que les facteurs individuels, le mode de vie et le polymorphisme génétique [Iarmarcovai et al, 2007c]. Les MN figurent, à l'heure actuelle, en bonne place parmi les biomarqueurs appliqués dans de nombreuses situations à risque de cancer parmi lesquelles se retrouvent les expositions professionnelles [Fenech, 2007].

1.4.2 Les MN : un biomarqueur de prédiction

La classification des biomarqueurs par Sari-Minodier et *al* en 2005 décrite à la section 1.1.2.3.1 à la page 29 place les MN comme type de biomarqueur de prédiction compris dans le groupe des biomarqueurs d'effet. La plupart des auteurs suivent cette classification. Cependant, il y a, actuellement, une nouvelle tentative de classification des biomarqueurs dans le cadre de la biosurveillance : ce sont les biomarqueurs de prévention, de prédiction et de susceptibilité [Orsière et *al*, 2008 ; Iarmacovai et *al*, 2007c ; Bonassi et *al*, 2005].

Plusieurs études relient la formation accrue des MN et la survenue du cancer et beaucoup d'arguments appuient cette hypothèse [Mateuca et *al*, 2006]. Comme les AC sont reconnues comme un biomarqueur de risque de cancer, la similitude existant entre les mécanismes de formation des MN et des AC, permet de suggérer un lien de causalité entre les MN et le cancer [Norppa et *al*, 2006]. Ainsi, une augmentation de la fréquence des MN est observée chez des patients cancéreux (non traités) souffrant de tumeurs sporadiques et chez des patients porteurs d'une mutation dans les gènes impliqués dans les syndromes d'instabilité chromosomique comme l'ataxie-télangiectasie et le syndrome de Bloom; ces syndromes sont associés à un risque modéré ou sévère de cancer [Iarmacovai et *al*, 2007c]. De plus, une corrélation existe entre la fréquence des MN et la concentration sanguine de folates, dont la carence est associée à un risque élevé de cancer, particulièrement de cancer colorectal [Iarmacovai et *al*, 2007c ; Duthie et *al*, 2002]. Par ailleurs, ces folates sont essentiels à la synthèse d'une des bases de l'ADN, le dTTP, et leur carence ralentit la synthèse de l'ADN pouvant favoriser l'apparition d'erreurs lors de la réplication, par incorporation erronée d'uracile [Duthie et *al*, 2002]. Également, une étude sur le cancer du col utérin a pu établir un lien direct entre une augmentation de la fréquence des MN dans les cellules cervicales du col et les premières étapes de la cancérogenèse à ce site [Olaharski et *al*, 2006]. Finalement, la méta-analyse des résultats obtenus lors de la réalisation du test des MN dans plusieurs cohortes européennes atteintes de cancer en général, dans le cadre des collaborations internationales à la base des projets HUMN et *Cancer Risk Biomarkers*, a permis de démontrer un lien de causalité entre les MN et le cancer. Cette méta-analyse consiste à rassembler des données provenant d'études pertinentes et à les analyser au moyen des tests statistiques adéquats. Elle a démontré que les sujets ayant une fréquence élevée de

MN (fréquence observée dans le tiers supérieur de la population) ont plus de risque de développer un cancer dans les 12 à 15 années suivant la réalisation du test [Bonassi et al, 2007].

Par ailleurs, les réarrangements chromosomiques observés dans les cellules tumorales témoignent d'une instabilité chromosomique, mais la signification biologique de ces altérations, lorsqu'elles sont retrouvées dans les lymphocytes sanguins des patients affectés de divers cancers, est encore sujette à des questionnements [Orsière et al, 2008]. Ces anomalies chromosomiques pourraient être le résultat d'un statut inflammatoire associé au cancer, d'une instabilité génétique constitutionnellement présente, d'un environnement génotoxique connu ou occulte, ou encore à des infections virales. Comme le test des MN est le plus souvent réalisé sur des lymphocytes sanguins, les dommages à l'ADN pourraient y être moins fréquemment observés que dans les cellules cibles d'un agent génotoxique potentiellement cancérigène [Orsière et al, 2008]. Puisque les MN représentent les effets directs des agents causant une augmentation du risque de cancer, et que ces effets sont considérés comme étant en amont du processus cancérigène, les MN peuvent être considérés comme un biomarqueur de prédiction.

1.4.3 Le test des MN et l'étude de la génotoxicité du BaP

La plupart des mutations sont récessives dans la nature et apparaissent spontanément, à un très faible taux, suite à l'action des agents endogènes et exogènes. Cependant, sous l'influence de l'augmentation des polluants chimiques dans notre environnement, le taux d'induction de ces mutations risque d'augmenter. La présence et l'étendue des dommages chromosomiques dans les populations humaines exposées à des agents génotoxiques peuvent être évaluées avec plusieurs biomarqueurs. Un de ceux-ci, le test des MN, est extensivement utilisé en cytogénétique et en épidémiologie moléculaire [Fenech et al, 1999]. De plus et comme nous l'avons déjà mentionné, le choix du BaP dans le cadre de ce projet de recherche est motivé par le fait que cet agent est présent partout dans notre environnement. Il est un des procancérigènes les plus étudiés et représente bien la classe des HAP cancérigènes.

Des études *in vitro* antérieures sur le BaP utilisant le test des MN ont été réalisées avec des concentrations variant de 0 à 300 µg/mL (0 à 1200 µM) et des temps d'exposition différents sur des lymphocytes sanguins humains. L'effet du sexe n'a pas été étudié séparément. Le Tableau V, ci-dessous, résume ce qui a été fait dans la littérature.

Tableau V : Études antérieures de l'exposition du BaP avec le test des MN.

[BaP] µg/mL	Mélange avec S9*	Temps d'exposition	Nombre de donneurs	Résultats	Références
1 - 5 - 10 - 15	+	48 h	1	↑MN	Cho et Chung, 2003
2,5 - 5 - 7,5 - 10 - 12,5	-	48 h	37	↑MN	Onaran et al, 2001
0,1 - 1 - 10	-	64 h	5	↑MN	Warshawsky et al, 1995
25 - 50 - 100 - 150 - 300	+	1,5 h	2	↑↑MN	Elhajouji et al, 1994
25 - 50 - 100 - 150 - 300	-	48 h	2	↑MN	Elhajouji et al, 1994
50 µg/tube	-	20 h	6	↑MN	Ghaisas et Bhide, 1994
25 - 62,5 - 125	-	48 h	21	↑MN à 25 puis ↓MN à 125	Vian et al, 1993
12,5 - 25 - 62,5	+(phase G ₁)	90 min	21	↓MN à 12,5 puis ↑MN à 62,5	Vian et al, 1993
12,5 - 25 - 62,5	-(phase G ₂)	90 min	21	↑MN à 22,5 puis ↓MN à 62,5	Vian et al, 1993
0,2 - 5 - 10	+	2,5 h	1	↑MN	Lo Jacono et al, 1992

* Le S9 est un mélange de microsome de rat qui induit une activation métabolique exogène.

1.5. LES HYPOTHÈSES DE RECHERCHE

Comme nous venons de le constater, plusieurs études se sont intéressées à la génotoxicité du BaP. Jusqu'à maintenant plusieurs équipes ont obtenu des résultats suffisamment convaincants motivant le choix du test des MN pour étudier les effets directs du BaP qui est reconnu comme un agent procancérogène. Même si certains mécanismes génotoxiques ont été expliqués en partie, 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 BaP, d'en comprendre les mécanismes et de mieux évaluer le risque des personnes exposées aux HAP.

Pour atteindre ce but principal, nous nous sommes basés sur les hypothèses de recherche suivantes :

Hypothèse 1 : Le BaP produit des effets génotoxiques mesurables et significatifs sur les cellules humaines, même à de faibles concentrations et avec un temps d'exposition plus court.

Pour vérifier cette hypothèse, nous utiliserons quatre concentrations de benzo-a-pyrène (0,1 – 1 – 5 et 10 $\mu\text{g/mL}$), un contrôle négatif (0 $\mu\text{g/mL}$ de BaP) et un temps d'exposition de 24 heures. Les effets génotoxiques du BaP seront mesurés avec le test des MN sur les lymphocytes sanguins en culture de 20 sujets (10 hommes et 10 femmes) rigoureusement sélectionnés afin de former un groupe homogène. Nous déterminerons à partir de quelle concentration de BaP nous avons une augmentation significative de la fréquence des MN dans les cellules binucléées.

Le test statistique ANOVA pour mesures répétées sera utilisé. Il sera validé par le contrôle de sphéricité des données avec les corrections ϵ de Greenhouse-Geisser et Huynh-Feldt. Dans le cas où la sphéricité n'est pas respectée, nous utiliserons le test des rangs signés de Wilcoxon.

Hypothèse 2 : Il existe une relation dose-réponse dans les effets génotoxiques produits par le BaP et l'intensité de ces effets augmente linéairement avec la concentration de BaP.

Pour vérifier cette hypothèse, nous déterminerons dans un premier temps la fréquence des MN par 1000 cellules analysées, pour chacune des concentrations de BaP chez tous nos sujets ; puis, nous déterminerons si la forme de la relation dose-réponse produite par le BaP est bien linéaire. Les tests statistiques utilisés seront l'ANOVA pour mesures répétées et le test des rangs de Wilcoxon puis, nous ferons le calcul du ratio de cote pour chaque concentration du BaP afin de savoir si le fait d'avoir deux MN et plus dans une cellule binucléée est associé avec l'exposition.

Nous déterminerons dans un deuxième temps si le nombre de MN par lymphocyte micronucléé (donc contenant un/des MN) augmente en fonction de la concentration de BaP. Il y a des cellules binucléées qui peuvent avoir de un à plusieurs MN. Tant que la cellule contenant des MN est viable, elle peut être prise en compte dans les analyses. Cette viabilité sera vérifiée par le calcul de l'index de division nucléaire. Les tests statistiques utilisés seront l'ANOVA pour mesures répétées et le test des rangs signés de Wilcoxon.

Dans un troisième temps, nous vérifierons si le nombre de cellules micronucléées contenant un MN est plus élevé que le nombre de cellules micronucléées contenant plus d'un MN, en fonction de la concentration de BaP. Le calcul du ratio de cote sera fait pour chaque concentration.

Hypothèse 3 : Il existe des différences entre les individus dans la réponse génotoxique produite par le BaP.

Pour vérifier cette hypothèse, les fréquences de MN de nos 20 sujets seront comparées entre elles afin de déterminer si certains individus sont plus sensibles ou moins sensibles à l'action du BaP. Le test statistique utilisé sera plutôt un test qualitatif qui consiste à regrouper les sujets selon leur niveau de sensibilité, à partir des données brutes.

Hypothèse 4 : Il existe des différences entre les hommes et les femmes dans la réponse génotoxique produite par le BaP.

Pour vérifier cette hypothèse, les résultats du test des MN obtenus dans le groupe des hommes seront comparés à ceux obtenus dans le groupe des femmes. Les tests statistiques utilisés seront l'ANOVA pour mesures répétées et le test t de Student pour échantillons indépendants.

Hypothèse 5 : Le BaP a des propriétés clastogéniques

Pour vérifier cette hypothèse, nous analyserons dans un premier temps, par FISH, le contenu en centromère des MN en utilisant la sonde pancentromérique chez nos 20 sujets. Ceci nous permettra de déterminer si les MN produits suite à l'exposition au BaP, contiennent moins souvent des centromères que les MN produits sans exposition. Le test z de deux proportions indépendantes et la régression linéaire seront utilisés.

Dans un deuxième temps, nous analyserons les AC dans les cellules en métaphase de nos sujets, en fonction de la concentration du BaP. Les tests statistiques seront l'ANOVA pour mesures répétées et le test des rangs signés de Wilcoxon.

Le premier objectif du projet est d'abord de mesurer la génotoxicité du BaP en évaluant la fréquence des micronoyaux suite à une exposition *in vitro* des lymphocytes sanguins. Pour atteindre cet objectif, nous utiliserons des concentrations de BaP inférieures à celles les plus souvent utilisées jusqu'à présent dans la littérature sur des sujets sélectionnés selon des critères bien précis. Ces critères seront décrits dans le chapitre 2, section 2.2, page 77. Avant tout, il faut vérifier si les lymphocytes ont donné une réponse mitogénique et si la viabilité des fractions cellulaires est adéquate. Le deuxième objectif est d'analyser le contenu des MN pour déterminer l'effet clastogène du BaP. Pour cela, nous devons faire la technique de FISH et dénombrer les signaux centromériques dans les MN.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 LA PRÉPARATION DES SOLUTIONS DE BAP

Le BAP (CAS : 50-32-8 ; Sigma-Aldrich-Canada Ltd, Oakville, Ontario, Canada) est fourni sous la forme de poudre et doit être dissout dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO) (Catégorie culture cellulaire 100% ; Sigma-Aldrich-Canada Ltd) pour donner une solution-mère à une concentration de 12,5 mg/mL (1250X) à partir de laquelle trois solutions de travail sont préparées : 0,125 mg/mL ; 1,25 mg/mL et 6,25 mg/mL. Toutes les concentrations de BaP sont filtrées dans des conditions stériles et sont gardées à la température de la pièce dans des tubes à fond conique (Sarstedt Inc, Montréal, Québec, Canada) enveloppés d'aluminium pour les protéger de la dégradation par la lumière.

2.2 LES SUJETS SÉLECTIONNÉS

Pour la réalisation de cette étude, 20 sujets (10 hommes et 10 femmes) sont sélectionnés selon des critères bien précis visant principalement à former un groupe homogène (tranche d'âge restreinte, origine génétique commune, etc). La sélection de ces 20 sujets est faite dans la population estudiantine de l'Université de Montréal, suite à l'affichage du projet de recherche sur les babillards du Pavillon Roger-Gaudry. La taille de notre échantillon, avec la tranche d'âge restreinte choisie, permet adéquatement d'évaluer l'effet du BaP et de mettre en évidence la variabilité entre les individus. Cet échantillonnage est comparable à ceux utilisés dans la littérature (Tableau V, page 71).

Le projet de recherche a été approuvé par le Comité d'Éthique de la Recherche de la faculté de médecine (CERFM) de l'Université de Montréal et enregistré sous le code : CERFM 94(08)4#308. Le formulaire de consentement et le questionnaire sont retrouvés en Annexe VI et Annexe VII aux pages xliii et liii.

Ce projet de recherche est expliqué dans les grandes lignes aux candidats, qui remplissent ensuite le questionnaire de sélection. Ceux qui remplissent tous les critères signent le formulaire de consentement, puis un rendez-vous est fixé pour le prélèvement sanguin.

Voici les critères de sélection retenus :

- Être caucasien, en bonne santé et âgé de 21 à 34 ans. La population caucasienne est en plus grand nombre et il est plus facile de recruter des volontaires.
- Être non-fumeur parce que la fumée des cigarettes contient des HAP.
- Ne pas prendre de drogues douces ou dures.
- Ne pas avoir subi de radiographie durant les 3 mois précédant le prélèvement sanguin.
- Ne pas prendre de médicaments sur une base régulière, exception faite des remplacements hormonaux (anovulants, thyroïde).
- Ne jamais avoir subi de radio- ou de chimiothérapie car ces traitements causent des dommages à l'ADN.
- Ne pas avoir été diagnostiqué avec une maladie d'instabilité génétique (Fanconi, Bloom, Ataxie télangiectasie, etc.).
- Ne pas avoir consommé d'alcool 24 heures avant le prélèvement sanguin pour que les enzymes métaboliques n'interfèrent pas.

2.3 L'OBTENTION DES MN DANS LES CELLULES BINUCLÉÉES

Nous nous sommes basés sur les techniques *in vitro* du test des MN décrites par Fenech en 2000. Nous décrirons brièvement ces techniques dans les paragraphes qui suivent.

2.3.1 La culture

Le sang de chaque sujet est prélevé par ponction veineuse dans des tubes héparinés au sodium de 10 mL (Fisher Scientific Ltd, Toronto, Ontario, Canada). 0,35 mL de sang est mis en culture dans 5 mL de RPMI 1640 complet. Deux cultures sont faites par concentration pour chaque sujet. Le milieu RPMI 1640, en plus de contenir des composants

minéraux, des acides aminés essentiels, des acides aminés non essentiels et des vitamines, est complété, pour 500 mL, de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 1 % de gentamycine, 1 % de glutamax et 1 % de phytohémagglutinine (PHA). Tous ces produits ajoutés proviennent d'Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario, Canada. Les tubes sont ensuite placés sur des supports inclinés dans l'incubateur à 37°C pour une durée de 24 h.

2.3.2 L'exposition au BaP

Après 24 h de culture, nous avons exposé les cellules au BaP aux concentrations suivantes : 0,1 - 1 - 5 et 10 µg/mL (avec le DMSO comme diluant) correspondant respectivement à 0,4 µM - 4 µM - 20 µM et 40 µM. Le DMSO a été utilisé comme contrôle avec une concentration finale de 0,08 %. Tous les tubes sont ensuite remis dans l'incubateur pour une durée de 24 h.

2.3.3 Le blocage de la cytokinèse

L'utilisation de la Cyt B (CAS : 14930-96-2, Sigma-Aldrich-Canada Ltd, Oakville, Ontario, Canada) est nécessaire pour bloquer la division cellulaire. C'est une mycotoxine qui inhibe la division cellulaire par blocage de la formation des micro-filaments d'actine. La division cytoplasmique, appelée cytokinèse, est bloquée, mais pas la division nucléaire. Par conséquent, après l'ajout de cet agent, la cellule-mère ne se divise pas en deux cellules-filles distinctes et possède deux noyaux. La Cyt B est fournie sous la forme de poudre (10 mg) et est dissoute dans 4,67 mL de DMSO pour obtenir une concentration de 2,14 mg/mL ou de 47 µM de solution-mère.

Après 24 h d'exposition à 37°C, les tubes sont centrifugés à la vitesse de rotation de 1800 tours/minute. Ensuite, le surnageant est retiré. Les cellules sont lavées deux fois avec la solution saline équilibrée de Hank (*Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS) ; Invitrogen Canada Inc.), afin d'enlever le BaP. Les cellules sont remises en culture dans 5 mL de RPMI 1640 complet, puis la Cyt B est ajoutée pour obtenir une concentration finale de 6 µg/mL. La culture est poursuivie pour une autre durée de 24 h.

La culture, l'exposition et l'ajout de la Cyt B doivent se faire sous la hotte biologique pour minimiser la contamination par des agents exogènes.

2.3.4 La récolte

Après le transfert des cultures dans des tubes coniques en plastique (Sarstedt Inc), un choc hypotonique est fait avec du KCL 0,56 % ou 0,075 M (Sigma-Aldrich-Canada Ltd) durant 5 minutes à 37°C. Après centrifugation, les cellules sont fixées deux fois avec du Carnoy I (méthanol et acide acétique dans les proportions 3:1 - Fisher Scientific Ltd). Dès la première fixation, la lyse des globules rouges est déclenchée par le Carnoy. Après la dernière centrifugation, la suspension cellulaire est étalée sur des lames propres préalablement chauffées à 37°C, afin de conserver le cytoplasme des cellules. Les lames sont séchées à la température de la pièce pour une nuit. Elles sont ensuite colorées avec du Giemsa à 2 % dilué dans du tampon Gurr's à pH 6,8 (ces deux solutions proviennent d'Invitrogen Canada Inc)

2.3.5 Un résumé des différentes étapes du test des MN

La Figure 20, page 81, illustre la manipulation depuis la culture jusqu'à l'obtention des lames prêtes pour l'analyse microscopique.

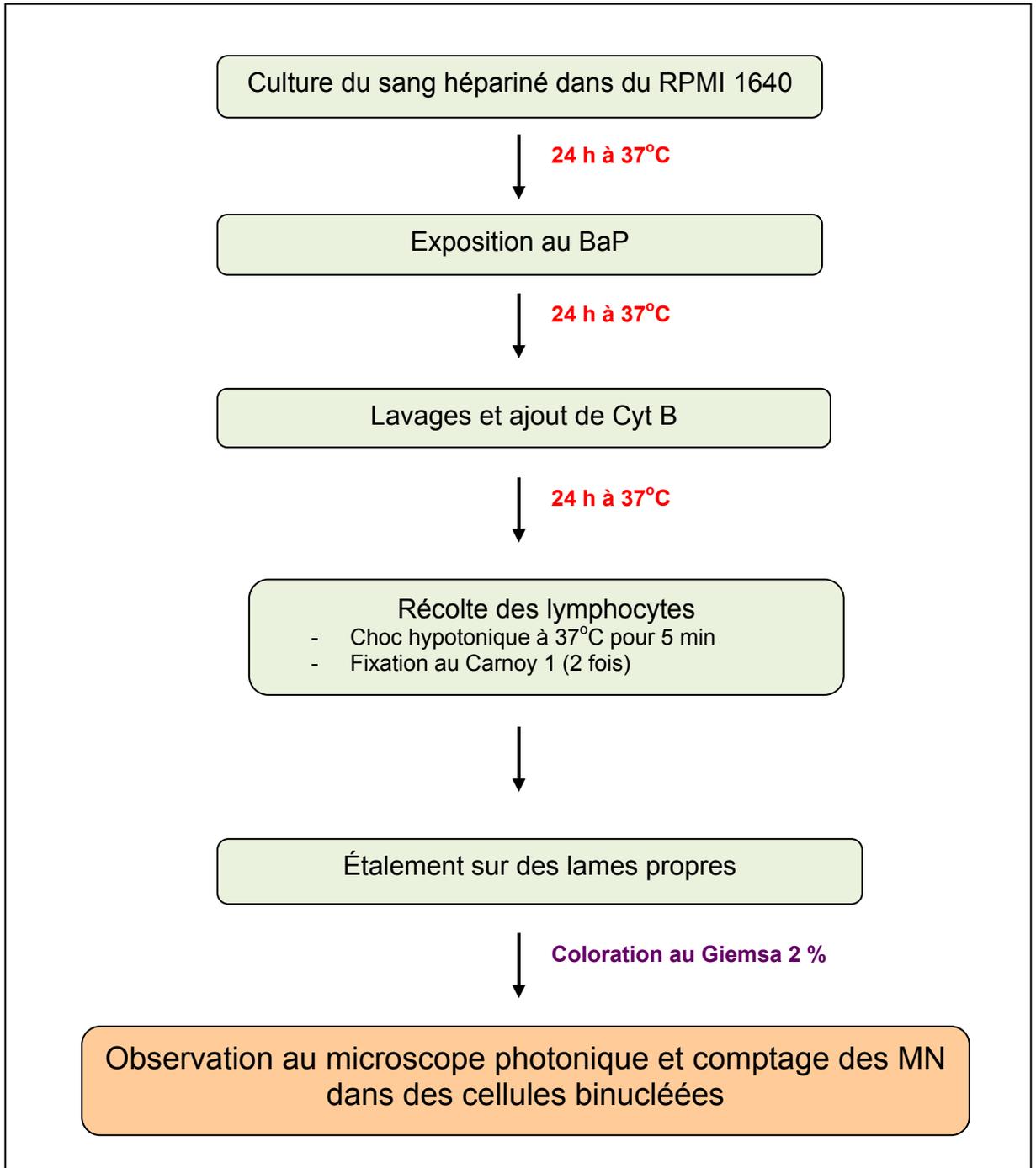


Figure 20 : Schéma résumant les différentes étapes de l'analyse de la fréquence des MN dans les lymphocytes sanguins humains.

2.4 LE DÉCOMPTE DES MN ET LES CRITÈRES DE SÉLECTION

Pour chaque sujet, 2000 cellules sont analysées par concentration.

L'analyse se fait avec un microscope Leitz-Aristoplan (Leica Microsystems Canada Inc., Richmond Hill, Ontario, Canada) à 1000X. Pour l'analyse des MN, nous avons suivi les critères de sélection des MN établis par le projet international de MN humains (HUMN *project*) [Fenech et *al*, 2003].

Tout d'abord le choix des cellules binucléées doit respecter les critères suivants :

- Les cellules doivent obligatoirement être binucléées.
- Les deux noyaux doivent avoir leur membrane nucléaire intacte (Figure 21, ci-dessous), avoir approximativement la même taille, le même patron et la même intensité de coloration.

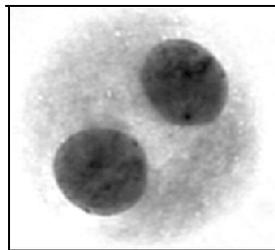


Figure 21 : Une cellule binucléée respectant les critères de sélection. *Source* : Échantillon 07-2s - Laboratoire du Dre Nicole Lemieux.

- Les deux noyaux peuvent se toucher mais ne doivent pas se chevaucher. Les limites des deux noyaux doivent être nettement distinctes.
- La limite du cytoplasme doit être intacte et nettement distincte de celle des cellules adjacentes.

Les MN sont morphologiquement plus petits que les deux noyaux de la cellule binucléée et doivent avoir les caractéristiques suivantes (Figure 22, ci-dessous) :

- Le diamètre du MN dans les lymphocytes humains varie généralement entre $1/16$ et $1/3$ du diamètre du noyau principal ou des deux noyaux principaux de la cellule binucléée.
- Le MN doit avoir une forme ronde ou ovoïde
- Il ne doit pas être réfringent sous la lumière du microscope et doit être distinct des artéfacts, comme les dépôts de colorant et autres.
- Il ne doit pas être lié ou attaché au noyau principal.
- Le MN peut toucher mais non chevaucher le noyau principal et sa membrane nucléoplasmique doit être bien délimitée
- Le MN doit avoir la même intensité de coloration que celle du noyau principal mais occasionnellement, sa coloration peut être un peu plus intense.

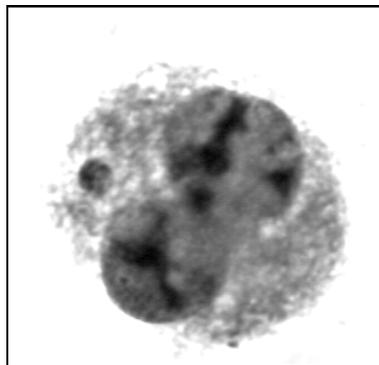


Figure 22 : Une cellule binucléée contenant un MN. *Source : Échantillon 07-2s - Laboratoire du Dre Nicole Lemieux.*

2.4.1 L'index de division nucléaire

Afin de vérifier la viabilité des cultures cellulaires, nous avons mesuré l'index de division nucléaire (IDN), tel que suggéré par Fenech en 2007. L'IDN se calcule suivant la méthode d'Eastmond et Tucker [1989] avec la formule :

$$\text{IDN} = (N_1 + 2N_2 + 3N_3 + 4N_4) / (N_1 + N_2 + N_3 + N_4)$$

N_1 à N_4 représentent le nombre de cellules viables contenant un (N_1), deux (N_2), trois (N_3) ou quatre (N_4) noyaux. Un minimum de 1000 cellules analysées par concentration est nécessaire pour calculer l'IDN.

Cet index mesure le statut de prolifération et, dans le cas des lymphocytes sanguins, mesure la réponse mitogénique des cultures cellulaires. La valeur de l'IDN nous indique si des effets cytostatiques sont présents. L'IDN le plus bas est de 1,0 indiquant que toutes les cellules viables ne se sont pas divisées durant le blocage de la cytokinèse et sont mononucléées. Ceci indique une cytotase complète. Un index de 2,0 indique que toutes les cellules viables ont complété une division nucléaire et sont binucléées. [Fenech, 2007].

Nous avons calculé l'IDN pour le contrôle et les quatre concentrations du BaP chez 6 sujets.

2.5 LA DÉTECTION PAR FISH DU CONTENU DES MN

2.5.1 Les étapes préliminaires

Pour étudier le contenu des MN par FISH, nous avons comparé la concentration 5 $\mu\text{g/mL}$ de BaP au contrôle DMSO pour les 20 sujets. Avant la technique de FISH, les MN à analyser sont d'abord repérés en microscopie photonique, en utilisant les critères déjà mentionnés à la page 84. Nous avons pris les repères de tous les MN observés pour avoir la certitude que les signaux centromériques de la FISH détectés ultérieurement en font partie. Les repères sont pris à l'aide d'un graticule (Fisher Scientific Ltd), puis les lames sont décolorées et fixées dans du Carnoy I pendant 24 h. Avant l'hybridation, les lames sont séchées sous la hotte chimique puis placées dans l'étuve à 37°C pour 30 minutes.

2.5.2 La préparation du matériel pour la FISH

2.5.2.1 La préparation des lames de MN sanguins:

Les lames sont placées dans un bain de RNase/2XSSC (*Saline Sodium Citrate*, solution de tampon de citrate de sodium), durant 60 minutes à 37°C. Le 2XSSC est une solution obtenue à partir de la solution-mère 20XSSC préparée préalablement avec 132 g de SSC en poudre (Biopharm Inc, Laval, Québec, Canada) dans 500 mL d'eau purifiée à pH 5,3. Les lames sont ensuite passées successivement dans des bains de pepsine (ID Labs inc, London, Ontario, Canada) pour 6 minutes, puis lavées au tampon de phosphate salin (*Phosphate Buffered Saline*, PBS), pour 5 minutes. Elles sont ensuite fixées dans de la formaldéhyde (Sigma-Aldrich-Canada Ltd, Oakville, Ontario, Canada) pour 5 minutes, avant d'être déshydratées dans des bains successifs d'éthanol 70 %, 85 % et 100 % (Les Alcools de commerce, Brampton, Ontario, Canada).

2.5.2.2 La préparation de la sonde

La sonde pancentromérique (Cambio, Cambridge, Royaume-Uni) est chauffée à 37°C pour 5 minutes avant d'être mélangée avec le tampon d'hybridation (hybrisol) préparé à partir de : formamide, 2XSSC, Denhart et Dextran (provenant tous de Sigma-Aldrich-Canada Ltd). Les sondes sont ensuite dénaturées dans un bain à 85°C pour 10 minutes. Cette sonde commerciale est déjà couplée à la fluorescéine isothiocyanate (FITC), qui donne une fluorescence verte.

2.5.2.3 L'hybridation *in situ* proprement dite et les lavages post-hybridation

Les lames sont dénaturées dans un bain de 70 % de formamide/2XSSC à 70°C pour 2 minutes, avant d'être déshydratées dans des bains d'éthanol froid de 70 %, 85 % et 100 % successivement. La sonde dénaturée est déposée sur les lames, puis recouverte d'une lamelle de plastique. L'hybridation se fait à 37°C pour 18 h, dans une chambre humide.

Les lavages post-hybridation se font avec 50 % de formamide/2XSSC à 37°C pour 3 minutes, puis avec du 2XSSC à 37°C pour 2 minutes.

2.5.2.4 La coloration des lames et l'analyse de l'effet clastogène et/ou aneugène

La coloration des noyaux se fait avec du 4',5-Diamidine-2'-phénylindole dihydrochloride (DAPI) (Laboratoires Roche, Bâle, Suisse) dilué à 0,5 µg/µL dans du P-phényl diamine dihydrochloride (PPD) à pH 9,0 (Sigma-Aldrich-Canada Ltd). Ce fluochrome donne une coloration bleue aux noyaux. Les micronoyaux préalablement repérés sont analysés avec un microscope à fluorescence Leitz-Aristoplan (Leica Microsystems Canada Inc).

L'effet clastogène et/ou aneugène du BaP sera déterminé grâce au décompte en FISH du signal produit par la sonde pancentromérique qui s'hybride sur tous les centromères des chromosomes. En effet, lorsqu'un centromère est présent, il y a émission d'un signal vert sous la lumière du microscope à fluorescence grâce à la sonde qui s'est hybridée à l'ADN centromérique du chromosome se trouvant dans les MN. Un effet aneugène sera mis en évidence si les MN émettent des signaux verts. Au contraire, si les MN n'émettent aucun signal, nous aurons un effet clastogène. La Figure 23, page 87 illustre le mécanisme de formation des MN dû à ces deux effets.

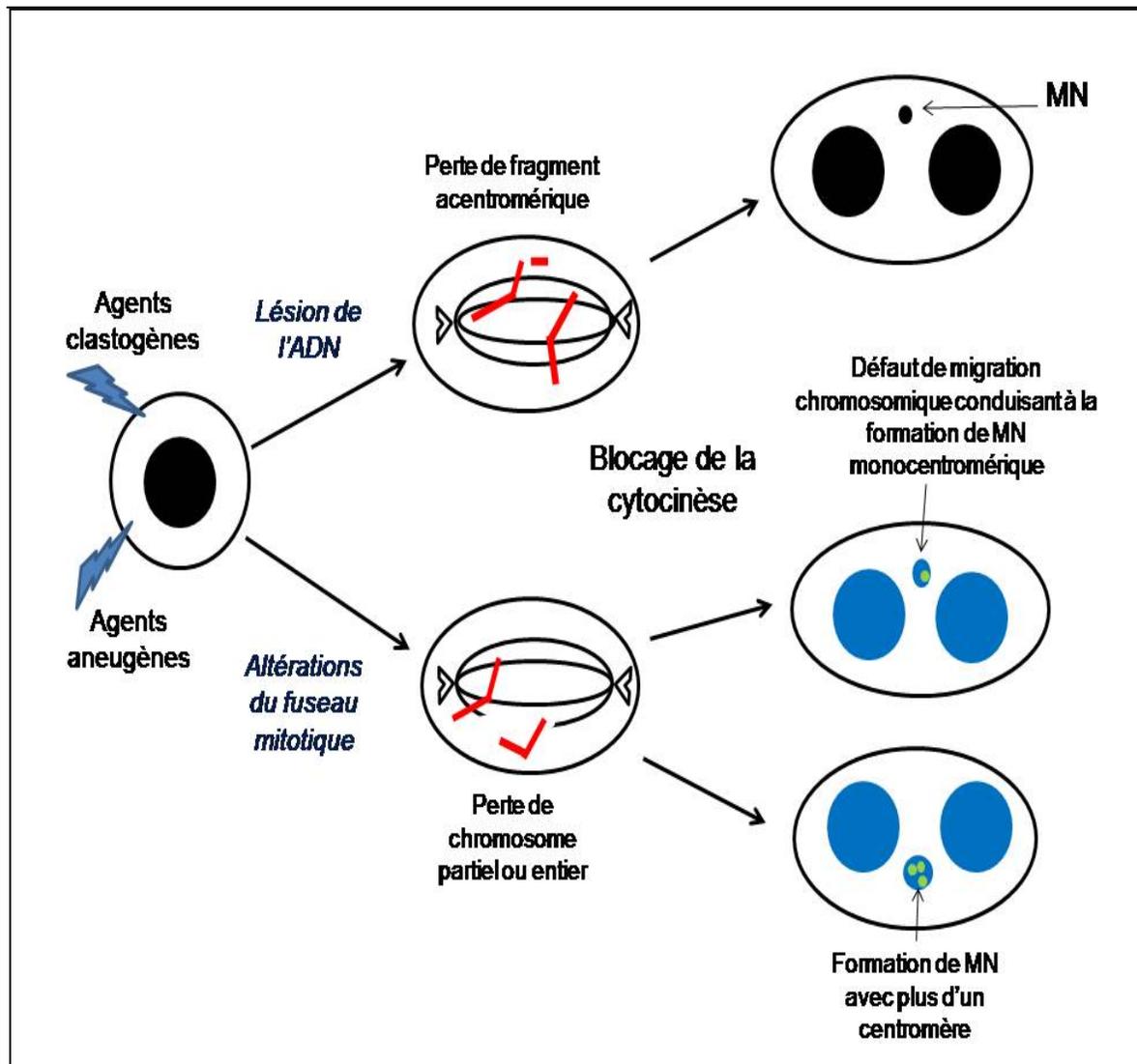


Figure 23 : Schéma représentant le mécanisme de formation des MN dû à un effet clastogène et/ou aneugène. Détection de centromères par la FISH avec la sonde colorée au FITC. *Source modifiée : Iarmarcovai et al, 2007c.*

2.6 LA DÉTECTION DES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES

Le test des AC est effectué chez 15 (8 femmes et 7 hommes) des 20 sujets qui ont été préalablement sélectionnés pour le test des MN. Pour chaque sujet, cinq concentrations sont analysées : un contrôle et quatre concentrations de BaP : 0,1 – 1 – 5 et 10 µg/mL. La culture se fait de la même façon que pour les MN, avec une légère modification. La Cyt B n'est pas ajoutée pour les 24 dernières heures de la culture. Cependant, deux heures avant la récolte, 0,1 mg/mL de colcémide (Invitrogen Canada Inc.) est ajouté aux cultures pour arrêter les cellules en métaphase. Après la récolte, les suspensions cellulaires sont étalées sur des lames prénettoyées, puis sont ensuite colorées au Giemsa 3 % dilué avec du tampon Gurr's à pH 6,8.

L'analyse est effectuée par deux observateurs au microscope Leitz-Aristoplan (Leica Microsystems Canada Inc) à 1000X. Tous les sujets sont analysés par chaque observateur : 200 métaphases par sujet (100 métaphases par observateur). Les cellules ayant 46 ± 2 chromosomes sont choisies pour l'analyse des AC selon les critères de l'OECD [OECD, 1997]. Les AC analysées sont : les cassures, les lacunes (*gaps*) et les aberrations complexes (figures triradiales, quadriradiales, etc). Elles sont illustrées à la [Figure 24](#), page 89.

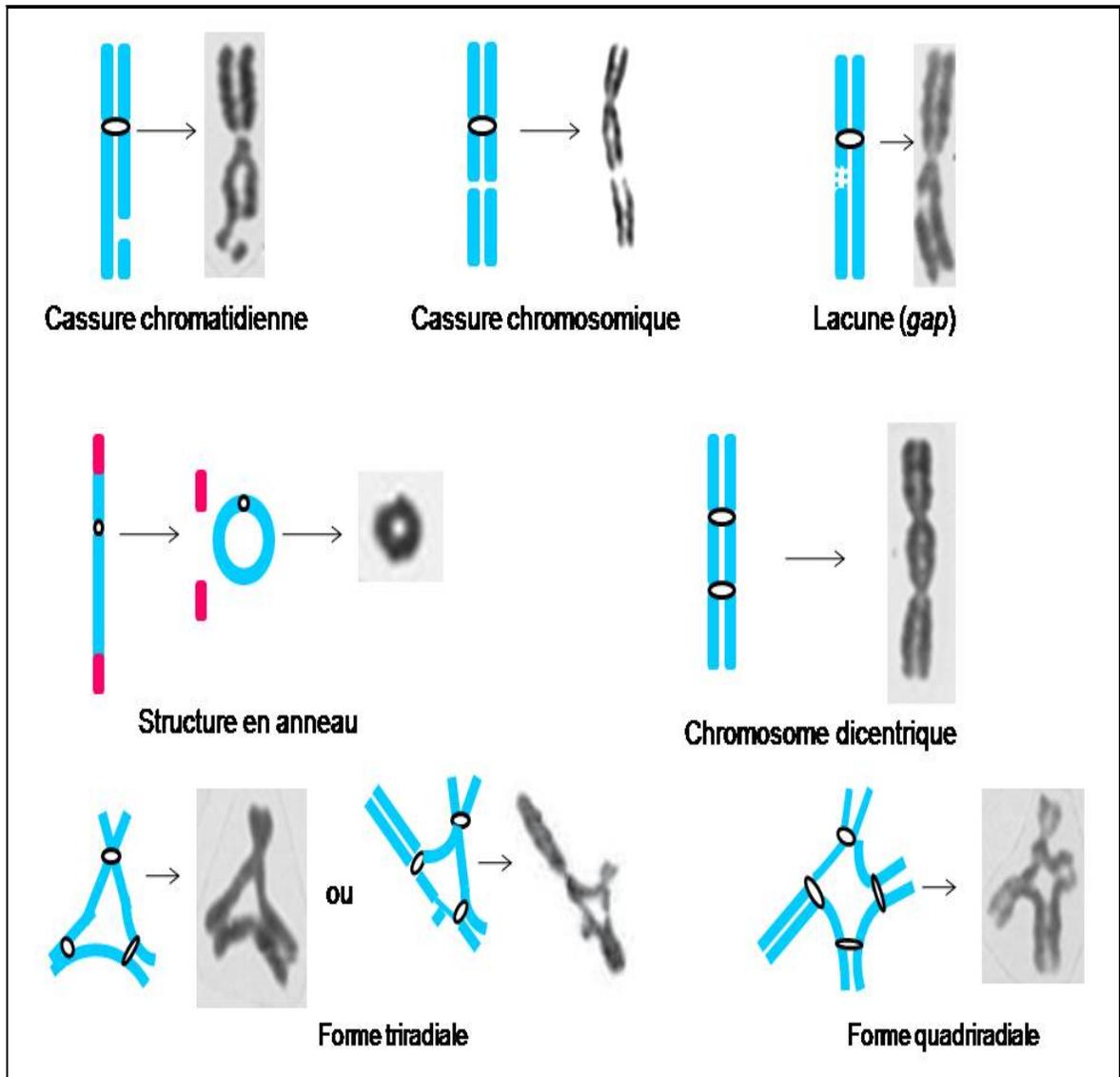


Figure 24 : Quelques exemples d'aberrations chromosomiques. Sources modifiées : Czub et al, 2009 ; Huret, 2002.

2.7 LES TESTS STATISTIQUES

2.7.1 Le devis de l'étude

Dans le cadre de cette étude, des sujets sont sélectionnés et un prélèvement sanguin est effectué pour chacun d'entre eux. Le sang de chaque sujet est soumis à cinq conditions d'exposition différentes: un contrôle négatif et quatre concentrations de BaP.

Toutes les analyses statistiques sont supervisées par le Docteur Yvette Bonvalot, biostatisticienne à la Chaire en analyses des risques toxicologiques du département de santé environnementale et santé au travail de l'Université de Montréal et de la direction de la Santé Environnementale et de la Sécurité des Consommateurs à Santé Canada.

Comme chaque sujet est testé pour chacune des conditions, on dit que des mesures répétées sont effectuées sur les sujets. Le facteur «concentration» est donc un facteur de type «intra-sujet», puisque la réponse génotoxique est mesurée à différentes concentrations au sein d'un même individu. Lorsque l'on veut savoir si des différences existent entre les sexes pour une condition donnée, le facteur «genre» est de type «inter-sujet», puisque des sujets différents font partie des deux groupes analysés (hommes et femmes).

Les tests statistiques choisis pour cette étude seront brièvement expliqués, puis pour chacun des biomarqueurs utilisés (MN et AC), les différents indicateurs à tester seront décrits, accompagnés des tests statistiques réalisés.

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel SPSS, version 17.0 pour Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, États-Unis), ainsi qu'avec le tableur Excel de la suite Microsoft Office 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, États-Unis). Un $p < 0,05$ est considéré comme statistiquement significatif.

2.7.2 Les tests statistiques retenus

2.7.2.1 L'ANOVA pour mesures répétées

Comme nous devons tester un effet intra-sujet et un effet inter-sujet, le test statistique de choix est l'ANOVA pour mesures répétées. Ce test doit être validé en effectuant un

contrôle de la sphéricité des données. Lorsque les variances des différences entre chacune des conditions d'exposition sont similaires, cela veut dire que les sujets répondent toujours de la même façon à l'exposition. Nous disons donc que la sphéricité est respectée. Le test de sphéricité de Mauchly, ainsi que les corrections ϵ de Greenhouse-Geisser et Huynh-Feldt servent à vérifier la sphéricité.

2.7.2.2 Le test des rangs signés de Wilcoxon

Si la sphéricité n'est pas respectée, le test d'ANOVA pour mesures répétées ne sera pas valide et un test non-paramétrique doit être utilisé pour évaluer l'effet intra-sujet de la concentration de BaP. C'est le test des rangs signés de Wilcoxon qui est retenu. Il permet d'évaluer l'effet de la concentration de BaP sur les indicateurs évalués, en appariant les données de chacun des sujets. La comparaison des données se fait deux par deux : [BaP] = 0 $\mu\text{g/mL}$ vs 0,1 $\mu\text{g/mL}$, [BaP] = 0 $\mu\text{g/mL}$ vs 1 $\mu\text{g/mL}$, etc. et toutes les paires de concentrations sont testées. Par la suite, l'analyse de l'effet du sexe (effet inter-sujet) sur les indicateurs analysés est effectuée avec le test t de Student pour des échantillons indépendants.

2.7.2.3 Le test z de deux proportions indépendantes

Ce test est sélectionné pour comparer la fréquence d'apparition d'une caractéristique donnée, par exemple les MN comportant des centromères (MN C+) au sein de deux groupes différents. En pratique, pour effectuer ce test, nous devons connaître la proportion de MN C+ dans les deux groupes comparés (p_0 et p_5 qui identifient les deux concentrations de BaP étudiées), la proportion de MN C+ dans la population totale (p), ainsi que le nombre de MN analysés dans chaque groupe et dans la population totale (n_0 , n_5 et n). La formule mathématique suivante est ensuite appliquée, en sachant que $p + q = 1$:

$$z = (p_5 - p_0) / \sqrt{(pq/n_0 + pq/n_5)}$$

La valeur de z est ensuite recherchée dans une table de distribution normale centrée réduite, ce qui permet de déterminer la valeur de p qui lui est associée. Le test z de deux

proportions indépendantes est valable lorsque de grands groupes sont comparés. Cette validation se fait en vérifiant que tous les produits : np , n_0p , n_5p , nq , n_0q , n_5q sont supérieurs ou égaux à cinq [Schwartz, 1993].

2.7.2.4 Le rapport de cote

Le rapport de cote (RC) est une mesure du degré de dépendance existant entre deux variables qualitatives et permet de mesurer l'effet d'un facteur donné. Dans cette étude, nous voulons savoir si le fait d'avoir deux MN et plus dans une cellule binucléée est significativement associé à l'exposition au BaP. Les intervalles de confiance à 95 % des RC obtenus s'interprètent de la façon suivante :

Si l'intervalle de confiance du RC inclut la valeur 1, le fait d'avoir deux MN et plus ne sera pas associé significativement à l'exposition au BaP.

Si l'intervalle de confiance du RC est inférieur à la valeur 1, l'association entre le fait d'avoir deux MN et plus et l'exposition au BaP sera inverse. C'est-à-dire que l'exposition au BaP pourrait empêcher la formation de cellules binucléées comportant deux MN et plus.

Si l'intervalle de confiance du RC est supérieur à la valeur 1, il y aura une forte association entre le fait d'avoir deux MN et plus et d'avoir été exposé au BaP.

2.7.2.5 La régression linéaire

Finalement, une régression linéaire est réalisée pour étudier la relation pouvant exister entre le nombre de signaux centromériques présents dans les MN et l'exposition au BaP. Pour chaque condition d'exposition au BaP, nous avons déterminé la contribution relative de chaque catégorie de signaux FISH (de 1 à 18 signaux) à la somme des signaux répertoriés lors de l'analyse. La régression linéaire est effectuée lorsque nous sommes en présence de deux variables quantitatives dont nous souhaitons savoir s'il existe une relation entre elles. Une droite d'équation $Y = mX + b$ est alors tracée entre ces deux variables. La pente (m) de cette droite peut être ascendante ou descendante. Le coefficient de corrélation

(R) permet de déterminer la force de la relation existant entre les deux variables étudiées et le coefficient de détermination (R^2) de déterminer quelle fraction de la variation de Y est expliquée par la variation de X.

2.7.3 La fréquence des MN dans les cellules binucléées

L'index de division nucléaire (IDN) est comparé avec les valeurs décrites dans [Fenech, 2007], afin de déterminer si la viabilité des cultures lymphocytaires est adéquate. Ensuite, la présence d'un effet cytotatique significatif est déterminée à l'aide du test des rangs signés de Wilcoxon.

Les indicateurs à tester sont: la fréquence des MN par 1000 cellules binucléées, la fréquence des MN par cellule micronucléée et le nombre de MN par cellule micronucléée. Ils seront analysés afin de vérifier si ces fréquences et ce nombre de MN varient en fonction de la concentration de BaP et du sexe.

La variation des indicateurs en fonction de la concentration de BaP est analysée avec l'ANOVA pour mesures répétées et le test des rangs signés de Wilcoxon. La variation des indicateurs en fonction du sexe est analysée avec l'ANOVA pour mesures répétées et le test t de Student pour échantillons indépendants.

2.7.4 La relation dose-réponse

La forme de la relation dose-réponse est décrite à partir des résultats obtenus aux tests statistiques énoncés au point 2.7.3 précédent. De plus, l'analyse du nombre de MN par cellule micronucléée est effectuée en divisant les cellules micronucléées en deux catégories: celles contenant un seul MN et celles contenant deux MN et plus. Nous avons vérifié si le nombre de cellules présentes dans ces deux catégories est associé à une condition d'exposition donnée en effectuant le calcul du rapport de cote (RC) pour chaque concentration de BaP. La condition non exposée est $[\text{BaP}] = 0 \text{ } \mu\text{g/mL}$ et la condition exposée est $[\text{BaP}] = 0,1 - 1 - 5 \text{ ou } 10 \text{ } \mu\text{g/mL}$.

2.7.5 La différence existant entre les individus

À partir des données de la fréquence des MN en fonction de la concentration de BaP de nos 20 sujets, nous comparons la réponse aux effets génotoxiques de chaque individu pour voir leur sensibilité à l'action du BaP. Les données obtenues sont divisées en tertiles afin de composer trois groupes de sujets : 1) Les plus sensibles (fréquence de MN les plus élevées) ; 2) Les intermédiaires ; 3) Les moins sensibles (fréquence de MN les plus faibles). La composition en sujets des trois groupes est comparée pour chaque condition d'exposition. Les sujets étant présents dans un groupe donné pour 80 % des conditions d'exposition testées seront assignés à ce groupe. Cette analyse qualitative donnera un aperçu de la sensibilité au BaP de notre groupe de sujets.

2.7.6 La mise en évidence des propriétés clastogéniques et/ou aneugéniques du BaP

2.7.6.1 Le contenu des MN par FISH

Afin de savoir si l'effet clastogène et/ou aneugène du BaP est visible avec le test des MN, leur contenu est analysé par FISH avec une sonde pancentromérique. Deux approches statistiques différentes ont été utilisées. Dans la première approche, les MN analysés sont divisés en quatre catégories, en fonction du nombre de signaux qu'ils contiennent, tel que décrit par Iarmarcovai *et al.* [2007b]

- MN ne contenant aucun signal centromérique (MN C-).
- MN contenant un ou des signaux centromériques (MN C+).
- MN contenant un ou deux signaux centromériques (MN C₁₋₂+).
- MN contenant trois signaux centromériques ou plus (MN C₃₊+).

Dans la deuxième approche, les MN analysés ont été classés en 18 catégories, en fonction du nombre de signaux centromériques présents (1, 2, 3, ..., 18 signaux centromériques). Ce seuil maximal de 18 signaux a été fixé expérimentalement, étant donné que les plus gros MN (diamètre égal à 1/3 des noyaux principaux) contenaient au plus 18

signaux. Quelques gros MN contenant 19, 20 ou 21 signaux ont été rencontrés avec une très faible fréquence. Ils ont été exclus de l'analyse, car leur diamètre réel était probablement supérieur à la limite d'un tiers du diamètre émis par Fenech [2007]. La contribution relative de chaque catégorie de signaux à la somme des signaux énumérés a été calculée pour les deux conditions d'exposition et une régression linéaire a été réalisée. Finalement, une comparaison des coefficients de régression a été effectuée pour confirmer la différence existant entre les deux conditions d'exposition.

2.7.6.2 Le test des AC

Le test des AC est destiné à mettre en évidence les agents clastogènes. En étudiant la relation dose-réponse des lymphocytes exposés au BaP, il est possible de mettre cet effet en évidence. Les indicateurs à tester sont le nombre de métaphases comportant des AC et le nombre total d'AC, qui peuvent varier en fonction de la concentration de BaP testée et en fonction du sexe. La variation des indicateurs en fonction de la concentration de BaP est analysée avec l'ANOVA pour mesures répétées et le test des rangs signés de Wilcoxon.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 L'ANALYSE DES MN SUITE À UNE EXPOSITION AU BaP

3.1.1 L'effet cytostatique du BaP

L'index de division nucléaire (IDN) est utilisé pour mesurer l'effet cytostatique du BaP. Il nous permet aussi de s'assurer que les cultures cellulaires présentent une viabilité adéquate pour réaliser les tests de génotoxicité. Les résultats présentés dans le Tableau VI, ci-dessous, montrent des IDN se situant entre 1,442 et 1,817 chez les sujets qui ont été évalués. La valeur de ces IDN indique que la viabilité des cellules est adéquate pour toutes les conditions d'exposition au BaP. L'analyse de ces IDN par le test non paramétrique des rangs signés de Wilcoxon montre un abaissement significatif de l'IDN à [BaP] = 10 µg/mL ($p < 0,05$), ce qui suggère la présence d'un léger effet cytostatique.

Tableau VI : Index de division nucléaire calculé chez six témoins pour les différentes conditions d'exposition.

[BaP] µg/mL	Index de division nucléaire (IDN)						Moyenne ± erreur-standard
	Sujet #1	Sujet #2	Sujet #3	Sujet #18	Sujet #19	Sujet #20	
0	1,627	1,817	1,761	1,685	1,694	1,738	1,720 ± 0,066
0,1	1,664	1,796	1,758	1,749	1,736	1,701	1,732 ± 0,045
1	1,670	1,677	1,679	1,668	1,636	1,679	1,678 ± 0,016
5	1,729	1,701	1,671	1,713	1,693	1,670	1,696 ± 0,023
10	1,442	1,793	1,534	1,587	1,566	1,645	1,594 ± 0,118 *

* $p < 0,05$.

3.1.2 La fréquence des MN, des cellules micronucléées et le nombre de MN par cellule

Lors de l'analyse microscopique, des cellules BN avec un ou plusieurs MN sont retrouvées comme le montre la Figure 25, page 100. Les données brutes de l'analyse des MN pour les différentes conditions d'exposition au BaP sont également présentées aux Annexes I et II, Tableau XVI, Tableau XVII, pages xxxv, xxxvi, xxxvii et xxxviii.

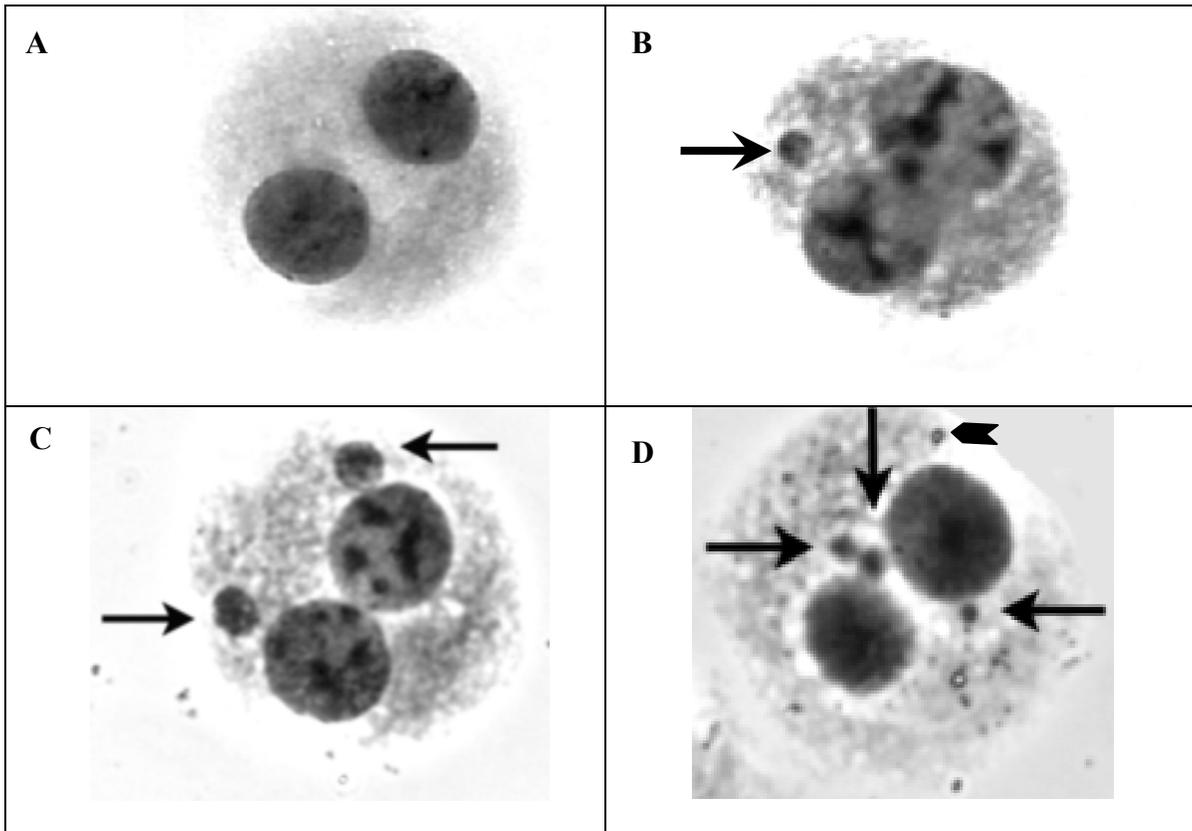


Figure 25 : Cellules binucléées contenant des MN. Les flèches pointent les MN. **A** – Absence de MN dans une cellule BN. **B** – Présence d'un MN dans une cellule BN. **C** – Présence de deux MN. **D** – Présence de trois MN. La tête de flèche montre une inclusion cytoplasmique qui ne doit pas être comptabilisée comme un MN, car sa dimension est trop petite (moins de 1/16 du diamètre d'un des noyaux principaux).

Les trois indicateurs choisis pour effectuer les analyses statistiques chez les 20 sujets de notre étude sont : la fréquence des MN par cellule BN, la fréquence des cellules micronucléées et le nombre de MN par cellule micronucléée. La compilation des résultats de ces trois indicateurs se trouve dans le [Tableau VII](#), page 101. Tout d'abord, nous pouvons voir que dans notre groupe de sujets, le niveau de base ($[BaP] = 0 \mu\text{g/mL}$) de la fréquence des MN varie entre 1 et 21 % et que la fréquence des cellules micronucléées varie entre 1 et 20 %. Suite à l'exposition au BaP, la fréquence maximale des MN retrouvée est de 38 % et la fréquence maximale de cellules micronucléées est de 32,5 %. Quant au nombre de MN par cellule micronucléée, il varie entre 1,00 et 1,17 (niveau de base) et grimpe jusqu'à une valeur maximale de 1,43 MN suite à l'exposition au BaP.

Tableau VII : Compilation des résultats chez les 20 sujets à l'étude pour les trois indicateurs choisis.

Sujet #/ Sexe/Âge	Fréquence des MN (% BN)					Fréquence des cellules micronucléées (% BN)					Nombre de MN par cellule micronucléée				
	[BaP] µg/mL					[BaP] µg/mL					[BaP] µg/mL				
	0	0,1	1	5	10	0	0,1	1	5	10	0	0,1	1	5	10
1/F/34	10,5	11,5	12,0	20,0	34,5	10,5	11,0	11,0	19,5	32,5	1,00	1,05	1,09	1,03	1,06
2/F/30	3,5	2,5	5,0	11,5	11,5	2,5	2,5	5,0	11,0	10,0	1,40	1,00	1,00	1,05	1,15
3/F/30	9,0	15,0	19,5	13,0	8,0	9,0	15,0	19,0	12,5	7,5	1,00	1,00	1,03	1,04	1,07
4/F/29	8,0	12,0	25,0	35,0	15,0	7,5	12,0	23,0	31,5	15,0	1,07	1,00	1,09	1,11	1,00
5/F/21	7,5	6,5	17,0	13,5	13,5	7,0	6,5	13,0	12,5	13,0	1,07	1,00	1,31	1,08	1,04
6/F/29	10,5	11,5	17,0	20,5	13,0	10,5	10,0	14,0	17,5	11,5	1,00	1,15	1,21	1,17	1,18
7/F/27	21,0	23,5	38,0	36,5	25,0	20,0	19,5	31,0	32,5	21,5	1,05	1,20	1,23	1,12	1,16
8/F/23	4,5	4,5	13,0	12,0	21,5	4,5	4,5	11,0	12,0	21,5	1,00	1,00	1,18	1,00	1,00
9/F/23	15,0	24,0	26,5	28,5	20,0	12,5	21,0	21,0	24,0	17,0	1,20	1,14	1,26	1,19	1,18
10/F/22	10,0	17,0	15,0	20,5	25,5	9,5	14,0	14,0	19,0	22,5	1,05	1,21	1,07	1,08	1,13
11/M/29	11,5	18,5	19,5	23,0	13,5	11,5	17,0	19,5	22,0	12,0	1,00	1,09	1,00	1,05	1,13
12/M/30	1,0	1,5	1,50	3,0	nd	1,0	1,5	1,5	3,0	nd	1,00	1,00	1,00	1,00	nd
13/M/28	12,0	16,0	19,0	16,5	13,5	11,0	16,0	15,0	15,5	13,5	1,09	1,00	1,27	1,06	1,00
14/M/21	16,0	20,0	22,0	27,0	17,5	15,5	15,5	21,0	23,5	16,5	1,03	1,29	1,05	1,15	1,06
15/M/29	8,0	16,0	18,5	16,0	13,5	8,0	14,5	16,5	15,0	11,5	1,00	1,10	1,12	1,07	1,17
16/M/30	14,0	21,0	20,0	17,0	14,0	13,5	18,0	17,5	15,5	13,0	1,04	1,17	1,14	1,10	1,08
17/M/23	4,5	7,0	7,0	10,0	12,0	4,5	7,0	7,0	10,0	12,0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
18/M/26	12,5	20,0	21	31,5	25,0	12,0	18,0	17,0	22,0	23,0	1,04	1,11	1,24	1,43	1,09
19/M/23	17,0	15,0	24,5	22,5	24,0	14,5	13,0	18,5	19,0	21,5	1,17	1,15	1,32	1,18	1,12
20/M/28	8,5	10,0	17,0	22,0	20,0	8,5	9,5	15,5	20,0	19,5	1,00	1,05	1,10	1,10	1,03

BN = binucléée

MN = micronoyau

nd = non disponible

3.2 LA RELATION DOSE-RÉPONSE AU BaP

À partir des résultats des trois indicateurs (Tableau VII page 101), nous avons effectué les analyses statistiques visant à évaluer l'effet de la dose d'exposition au BaP avec le test non paramétrique des rangs signés de Wilcoxon. Avec ce test, les comparaisons se font par paires: le contrôle négatif est comparé aux différentes conditions d'exposition au BaP, puis ces conditions d'exposition sont comparées entre-elles. Les tests détaillés de Wilcoxon des trois indicateurs se trouvent à l'Annexe III (Tableau XVIII, Tableau XIX, Tableau XX, pages xxxix et xl).

3.2.1 Les indicateurs conventionnels du test des MN : la fréquence des MN et la fréquence des cellules micronucléées.

L'analyse statistique de ces deux indicateurs indique que, pour le groupe entier, l'augmentation est déjà significative ($p < 0,01$) à partir de notre plus faible concentration utilisée (BaP = 0,1 $\mu\text{g/mL}$) (Tableau VIII, page 103). Ces deux fréquences augmentent et deviennent maximales à [BaP] = 5 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$). Nous remarquons ensuite une diminution significative de la fréquence des MN entre [BaP] = 5 et [BaP] = 10 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,01$ - groupe entier) (Figure 26-(A), page 104). Par contre, pour la fréquence de cellules micronucléées, cette diminution est non significative (Figure 26-(B), page 104).

Tableau VIII : Résultats de l'analyse des MN dans les lymphocytes humains exposés *in vitro* au BaP, présentés pour le groupe entier et par sexe (moyenne \pm erreur standard de la moyenne).

Indicateurs	[BaP] $\mu\text{g/mL}$				
	0	0,1	1	5	10
Fréquence de MN (%o BN)					
Groupe entier	9,9 \pm 1,2	13,6 \pm 1,5**	17,8 \pm 1,8***	20,0 \pm 1,9***	17,9 \pm 1,5***
Femmes	10,4 \pm 1,8	12,8 \pm 2,3†	18,8 \pm 2,9**	21,1 \pm 3,0**	18,7 \pm 2,5**
Hommes	9,4 \pm 1,6	14,4 \pm 2,0*	16,9 \pm 2,2**	18,9 \pm 2,6**	17,0 \pm 1,6**
Fréquence de cellules micronucléées (%o BN)					
Groupe entier	9,3 \pm 1,0	12,3 \pm 1,3**	15,6 \pm 1,5***	17,9 \pm 1,6***	16,6 \pm 1,4***
Femmes	9,6 \pm 1,6	11,6 \pm 1,9	16,2 \pm 2,3**	19,2 \pm 2,5**	17,2 \pm 2,4**
Hommes	8,9 \pm 1,4	13,0 \pm 1,7*	14,9 \pm 1,9**	16,6 \pm 2,0**	15,8 \pm 1,5**
Nombre de MN par cellule micronucléée					
Groupe entier	1,061 \pm 0,02	1,086 \pm 0,02	1,135 \pm 0,03**	1,100 \pm 0,02*	1,083 \pm 0,01
Femmes	1,084 \pm 0,04	1,076 \pm 0,029	1,147 \pm 0,03†	1,086 \pm 0,02	1,092 \pm 0,02
Hommes	1,037 \pm 0,02	1,097 \pm 0,03†	1,124 \pm 0,04*	1,114 \pm 0,04*	1,074 \pm 0,02
	†p < 0,1	*p < 0,05	**p < 0,01	***p < 0,001	

Les valeurs de p sont données pour les comparaisons entre le contrôle négatif et les conditions d'exposition au BaP.

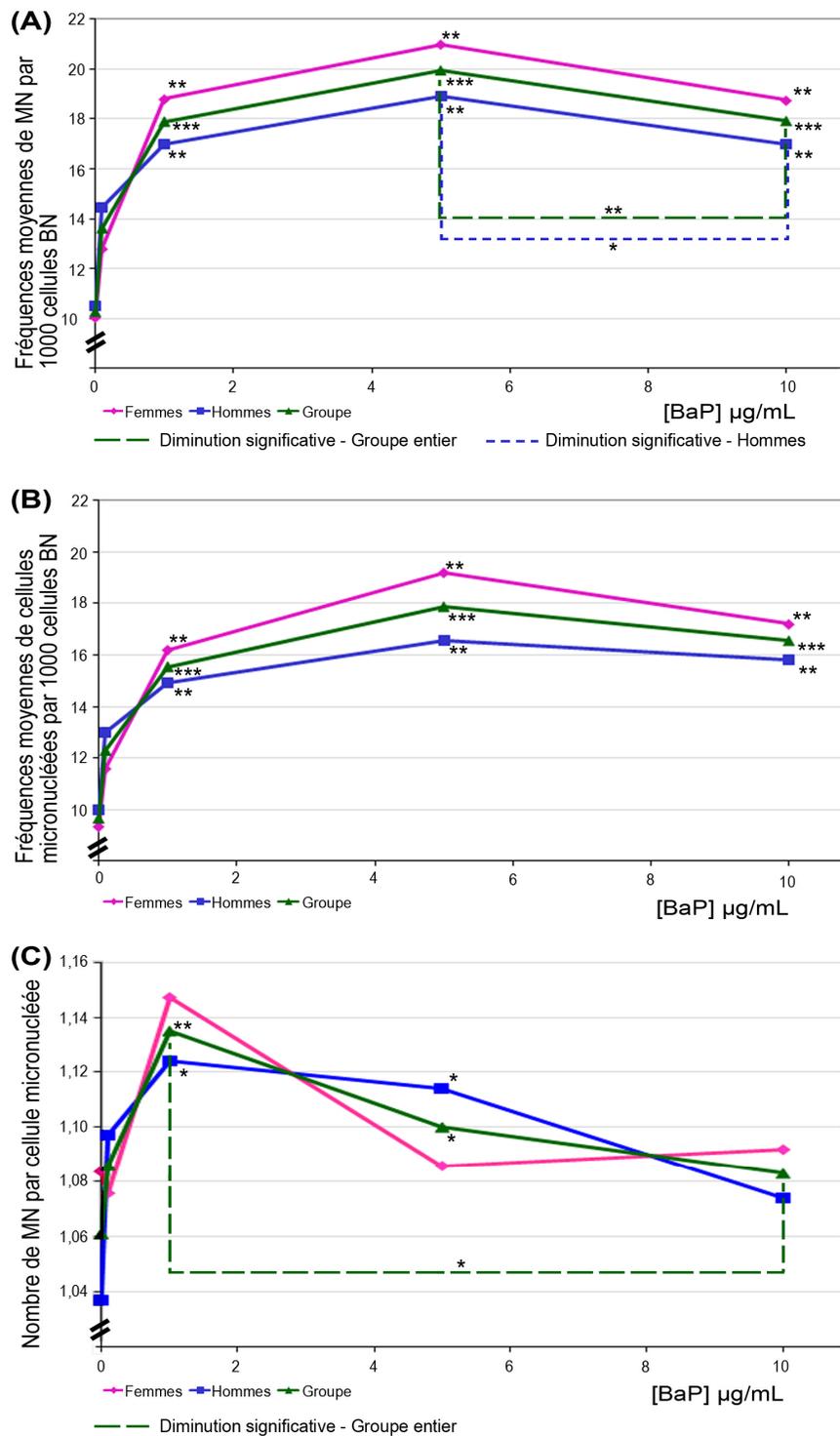


Figure 26 : Courbes dose-réponse des trois indicateurs du test des MN, en fonction de la concentration de BaP chez les deux sexes et le groupe entier. **(A)** Fréquences moyennes de MN; **(B)** Fréquences moyennes de cellules micronucléées. **(C)** Nombre de MN par cellule micronucléée. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

3.2.2 Le troisième indicateur : le nombre de MN par cellule micronucléée

L'analyse des résultats du groupe entier (Tableau VII, page 101) montre une augmentation du nombre de MN par cellule micronucléée qui devient maximal et significatif à [BaP] = 1 µg/mL, en comparaison avec le contrôle ($p < 0,01$). Par la suite, ce nombre s'abaisse significativement à [BaP] = 10 µg/mL, tel qu'on peut le voir à la Figure 26-(C), page 104 ($p < 0,05$ - groupe entier).

3.2.2.1 Le rapport de cote (RC)

Nous avons calculé les RC pour les quatre concentrations de BaP testées (0,1 – 1 – 5 – 10 µg/mL), ainsi que leurs intervalles de confiance à 95 % (Tableau IX, ci-dessous). L'analyse des résultats montre, pour un intervalle de confiance de 95 %, que la valeur des RC est supérieure ou égale à 1 pour les concentrations de BaP (0,1 – 1 et 5 µg/mL) et devient maximale suite à l'exposition à [BaP] = 1 µg/mL. Ceci indique qu'il y a une association significative entre l'exposition à ces trois concentrations de BaP et la présence de deux MN ou plus dans une cellule micronucléée. De plus, comme le RC est maximal à [BaP] = 1 µg/mL, c'est à cette concentration que l'association est la plus forte.

Tableau IX: Rapports de cote (RC) pour le nombre de cellules contenant deux MN et plus, en comparaison avec le nombre de cellules contenant un seul MN, présentés pour les quatre concentrations de BaP testées.

[BaP] µg/mL	Nombre de cellules micronucléées ayant 1 MN	Nombre de cellules micronucléées ayant 2 MN et plus	RC (Intervalle de confiance à 95 %)
0	368	19	1,00
0,1	451	41	1,76 (1,00 - 3,09)
1	561	61	2,11 (1,24 - 3,58)
5	650	65	1,94 (1,14 - 3,28)
10	587	42	1,39 (0,79 - 2,42)

3.3 LA VARIABILITÉ INTERINDIVIDUELLE

L'analyse des résultats obtenus avec le test des MN a montré qu'il existait une grande variabilité de réponse génotoxique entre les individus, suite à l'exposition de leurs lymphocytes au BaP. Cette variabilité se constate au premier coup d'œil jeté sur le graphique de la [Figure 27](#), page 107. Ainsi, l'étendue de la fréquence des MN en fonction de la concentration de BaP mesurée chez nos sujets, est très grande. Avant l'exposition au BaP, l'étendue de fréquence des MN est de 1 – 21 ‰ et elle augmente avec l'exposition au BaP : 1,5 – 24 ‰ ([BaP] = 0,1 µg/mL) ; 1,5 – 38 ‰ ([BaP] = 1 mg/mL) ; 3 – 36,5 ‰ ([BaP] = 5 µg/mL) ; puis 8 – 34,5 ‰ ([BaP] = 10 µg/mL) ([Tableau VII](#), page 101). Par ailleurs, en regroupant les réponses génotoxiques de nos sujets, il est possible de mettre en évidence l'existence de deux niveaux extrêmes de sensibilité. Pour identifier ces extrêmes, nous avons divisé notre groupe en trois catégories ([Tableau X](#), page 108). Les sujets les moins sensibles sont ceux qui ont une fréquence de MN dans le 20^{ième} percentile inférieur de la distribution des réponses pour un minimum de quatre des cinq conditions d'exposition, alors que les plus sensibles sont dans le 20^{ième} percentile supérieur. Les autres sujets sont alors classés dans le groupe de sensibilité intermédiaire. En effectuant ce classement, nous avons identifié trois sujets qui sont systématiquement moins sensibles que les autres (une femme et deux hommes). Il s'agit des sujets 2, 12 et 17 (en **rouge** dans le [Tableau X](#), page 108), classés comme moins sensibles. De la même manière, deux sujets systématiquement plus sensibles (deux femmes) sont identifiés. Il s'agit des sujets 7 et 9, indiqués en **bleu** dans le [Tableau X](#), page 108.

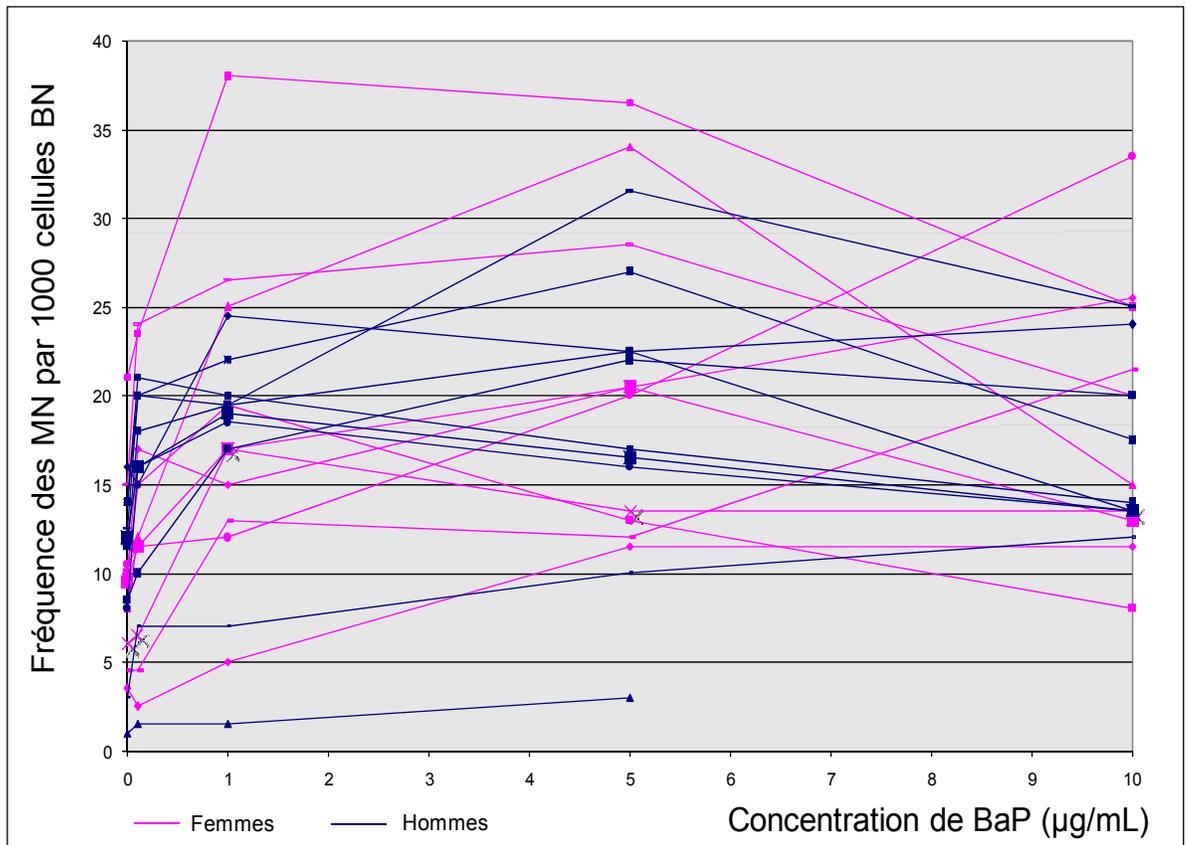


Figure 27 : Graphique de la fréquence de MN (‰) en fonction de la concentration de BaP chez les 20 sujets.

Tableau X : Étude de la sensibilité des sujets aux effets génotoxiques du BaP, sur la base des réponses génotoxiques observées lors de l'évaluation de la fréquence des MN.

Sujets #	Groupe 1 Moins sensibles ^a					Groupe 2 Sensibilité intermédiaire					Groupe 3 Plus sensibles ^b				
	[BaP] µg/mL					[BaP] µg/mL					[BaP] µg/mL				
	0	0,1	1	5	10	0	0,1	1	5	10	0	0,1	1	5	10
	2	2	1	2	2	1	1	3	1	4	7	7	4	4	1
	8	5	2	8	3	3	3	5	3	5	9	9	7	7	7
	12	8	12	12	6	4	4	6	5	8	14	14	9	9	10
	17	12	17	17	17	5	6	8	6	9	19	16	19	18	18
						6	10	10	10	11		18			
						10	11	11	11	13					
						11	13	13	13	14					
						13	15	14	14	15					
						15	17	15	15	16					
						16	19	16	16	19					
						18	20	18	19	20					
						20		20	20						

^a **Groupe 1:** premier 20 % des réponses génotoxiques. Les sujets écrits en **rouge** font partie du groupe sensible pour un minimum de quatre des cinq conditions d'exposition.

^b **Groupe 3:** dernier 20 % des réponses génotoxiques. Les sujets écrits en **bleu** font partie du groupe des plus sensibles pour un minimum de quatre des cinq conditions d'exposition.

3.4 LES DIFFÉRENCES ENTRE LES HOMMES ET LES FEMMES

Il existe des différences entre les hommes et les femmes, en ce qui a trait à la relation dose-réponse. En effet, les hommes montrent une génotoxicité plus marquée que les femmes à la plus faible concentration de BaP. Pour ceux-ci, la fréquence des MN et la fréquence des cellules micronucléées sont significativement augmentées à [BaP] = 0,1 µg/mL ($p < 0,05$) (Tableau VIII, page 103, Figure 26-(A) et Figure 26-(B) page 104). De même, les hommes montrent également une augmentation significative du nombre de MN par cellule micronucléée à [BaP] = 1 et 5 /mL ($p < 0,05$), comme l'indique la Figure 26-(C), page 104. Toutefois, la situation est différente chez les femmes, alors que ces trois indicateurs sont légèrement augmentés, mais non significativement, à ces concentrations de BaP (Tableau VIII, page 103). Malgré ces différences observées entre les sexes pour la relation dose-

réponse, la comparaison directe des résultats obtenus chez les hommes et les femmes par le test t de Student pour échantillons indépendants ne montre pas de différence significative.

3.5 LES PROPRIÉTÉS CLASTOGÉNIQUES ET ANEUGÉNIQUES DU BaP.

3.5.1 L'analyse des signaux centromériques dans les MN par la FISH

Lors de l'analyse microscopique du contenu des MN par FISH avec une sonde pancentromérique, des MN contenant un ou plusieurs signaux centromériques sont retrouvés, comme le montre la [Figure 28](#), ci-dessous.

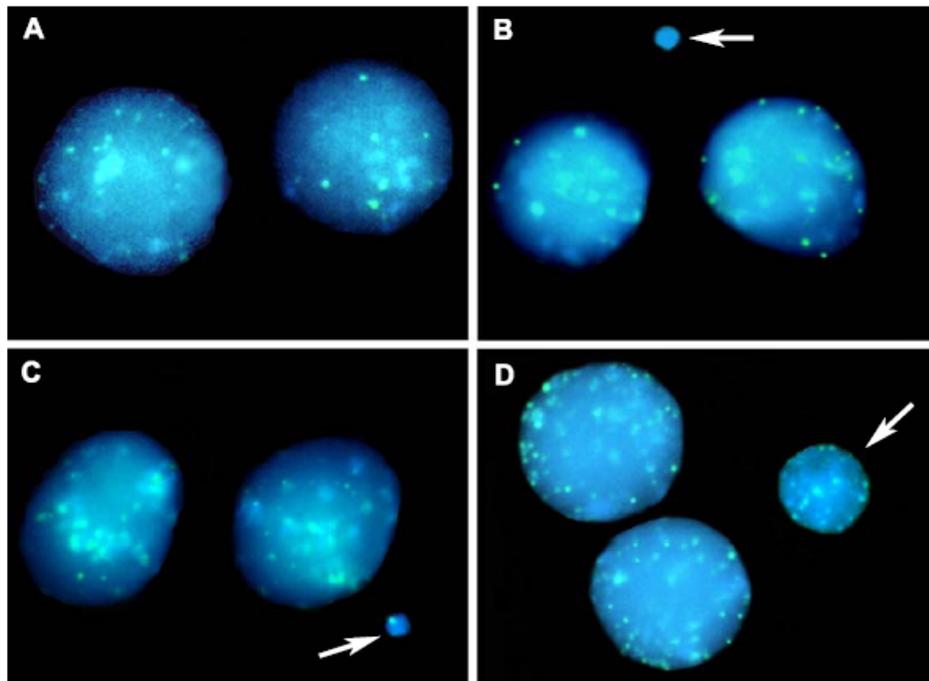


Figure 28: Analyse par FISH avec une sonde pancentromérique, du contenu des MN. Les cellules sont colorées avec le DAPI (**bleu**), alors que les centromères sont marqués avec le FITC (**vert**). Les flèches pointent les MN. **A** - Une cellule binucléée sans MN. **B** - Une cellule binucléée contenant un MN, sans signal centromérique. **C** - Un MN contenant un signal centromérique. **D** - Présence de 14 signaux centromériques dans un grand MN.

Les analyses statistiques sont présentées en fonction des deux approches utilisées. Dans la première approche, celle de Iarmarcovai et *al.* [2007b], les MN sont classifiés en quatre catégories de signaux : les données brutes de cette classification sont présentées à l'Annexe IV, Tableau XXI, page xli. L'analyse des résultats montre que les MN produits suite à l'exposition au BaP contiennent majoritairement un ou des centromères (C+). En effet, l'histogramme de la Figure 29, page 111) montre que le pourcentage de MN C+ passe de 69 % dans la condition contrôle, à 77 % suite à l'exposition à [BaP] = 5 µg/mL. L'utilisation du test des proportions montre que ce pourcentage est significativement augmenté, tant pour le groupe entier ($p < 0,01$) que pour les hommes ($p < 0,05$) (Tableau XI, page 111 et à l'Annexe V, Tableau XXII, page xlii. Par ailleurs, chez les femmes, l'augmentation du pourcentage de MN C+ est modérée, mais non significative ($p < 0,1$).

Parmi les MN C+, la subdivision en catégories C₁₋₂₊ et C₃₊₊ révèle que les MN causés par le BaP contiennent majoritairement trois centromères ou plus. L'histogramme de la Figure 30, page 112 montre que le pourcentage des MN C₃₊₊ passe de 67 % dans la condition contrôle, à 78 % suite à l'exposition au [BaP] = 5 µg/mL. Le test des proportions à l'Annexe V, Tableau XXIII, page xlii, indique que ce pourcentage augmente significativement ($p < 0,01$) tant pour le groupe entier que pour les femmes. Chez les hommes, l'augmentation de ce pourcentage est modérée, mais non significative ($p < 0,1$).

Tableau XI: Résultats de l'analyse du contenu des MN par FISH avec une sonde pancentromérique, présentés par sexe et pour le groupe entier. Les MN sont classifiés en quatre catégories, en fonction du nombre de signaux centromériques présents.

Sujets	[BaP] µg/mL	Nbre de MN analysés	MN C-	MN C+	% MN C+	MN C ₁₋₂ +	MN C ₃₊ +	% MN C ₃₊ +
Femmes	0	138	39	99	71,7	37	62	62,6
	5	236	52	184	78,0†	44	140	76,1**
Hommes	0	97	35	62	63,9	17	45	72,6
	5	241	57	184	76,3**	36	148	80,4†
Total	0	235	74	161	68,5	54	107	66,5
	5	477	109	368	77,1**	80	288	78,3**

C- = aucun signal centromérique

C+ = un signal centromérique ou plus

C₁₋₂+ = 1 à 2 signaux centromériques

C₃₊+ = 3 signaux centromériques et plus

†p < 0,1

**p < 0,01

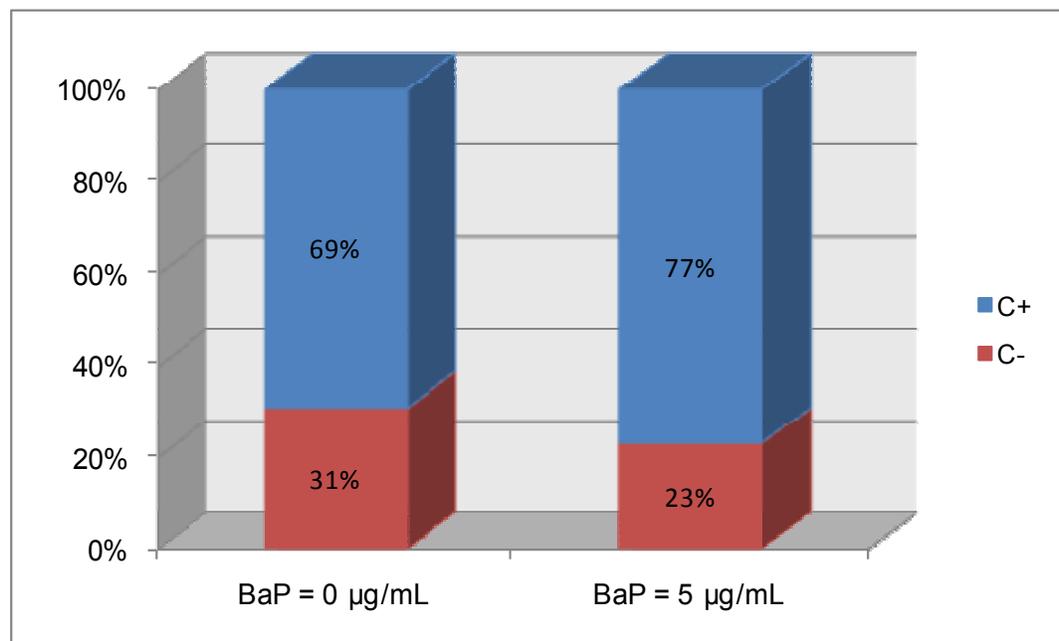


Figure 29: Histogramme illustrant les pourcentages de MN avec centromères (C+) et sans centromère (C-), pour les deux conditions étudiées de BaP.

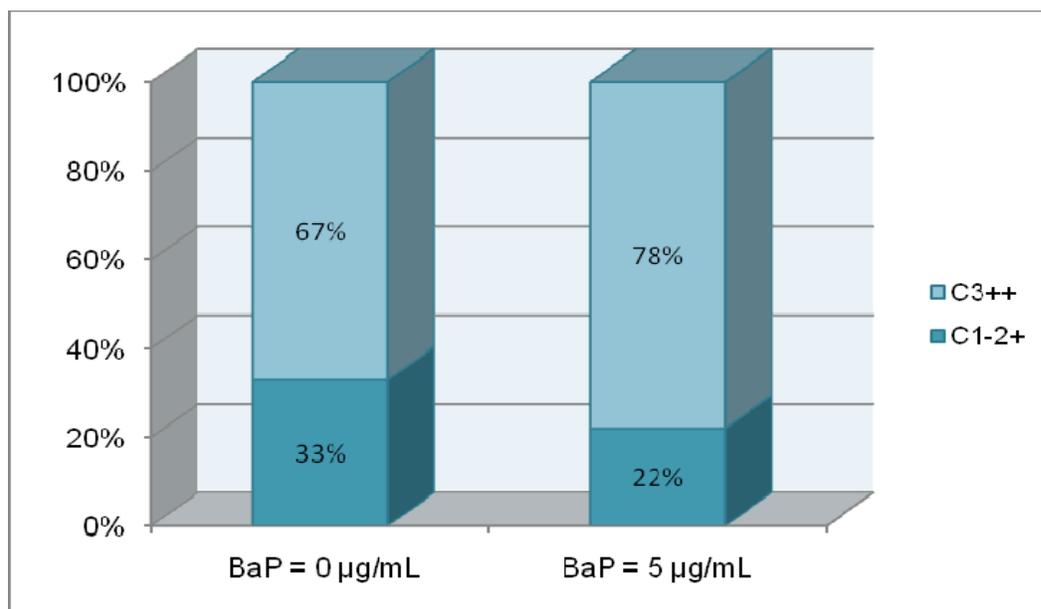


Figure 30 : Histogramme illustrant les pourcentages de MN ayant 1 ou 2 centromères (C₁₋₂₊) et ayant 3 centromères et plus (C₃₊₊), pour les deux conditions étudiées de BaP.

Dans la deuxième approche statistique utilisée, les MN sont classifiés en 18 catégories de signaux FISH, en fonction du nombre de signaux centromériques retrouvés dans les MN analysés (1, 2, 3, ..., 18 signaux) et ce, pour les deux conditions d'exposition au BaP étudiées. Pour chaque catégorie de signaux FISH, nous avons calculé la contribution relative de chaque catégorie à la somme des signaux dénombrés lors de l'analyse (Tableau XII, page 113). La régression linéaire effectuée montre l'existence d'une relation fortement significative (coefficient de corrélation $R = 0,671$; $p = 0,0023$) entre ces deux paramètres, dans le cas de l'exposition à $[BaP] = 5 \mu\text{g/mL}$ (Figure 31, page 114).

Tableau XII : Nombre de MN analysés dans chaque catégorie de signal FISH et leur contribution relative à la somme des signaux répertoriés, pour [BaP] = 0 et [BaP] = 5 µg/mL.

Catégorie de signal FISH	[BaP] = 0 µg/mL			[BaP] = 5 µg/mL		
	Nombre de MN analysés	Nombre de signaux répertoriés	Contribution relative à la somme des signaux répertoriés	Nombre de MN analysés	Nombre de signaux répertoriés	Contribution relative à la somme des signaux répertoriés
1	34	34	3,31 %	46	46	1,62 %
2	20	40	3,89 %	34	68	2,39 %
3	12	36	3,50 %	26	78	2,74 %
4	7	28	2,72 %	23	92	3,24 %
5	7	35	3,40 %	25	125	4,40 %
6	14	84	8,17 %	25	150	5,28 %
7	6	42	4,09 %	19	133	4,68 %
8	11	88	8,56 %	18	144	5,07 %
9	9	81	7,88 %	11	99	3,48 %
10	10	100	9,73 %	16	160	5,63 %
11	3	33	3,21 %	18	198	6,97 %
12	5	60	5,84 %	28	336	11,82 %
13	0	0	0 %	8	104	3,66 %
14	4	56	5,45 %	19	266	9,36 %
15	5	75	7,30 %	18	270	9,50 %
16	6	96	9,34 %	16	256	9,01 %
17	4	68	6,61 %	7	119	4,19 %
18	4	72	7,00 %	11	198	6,97 %
Total	161	1028	100 %	368	2842	100 %

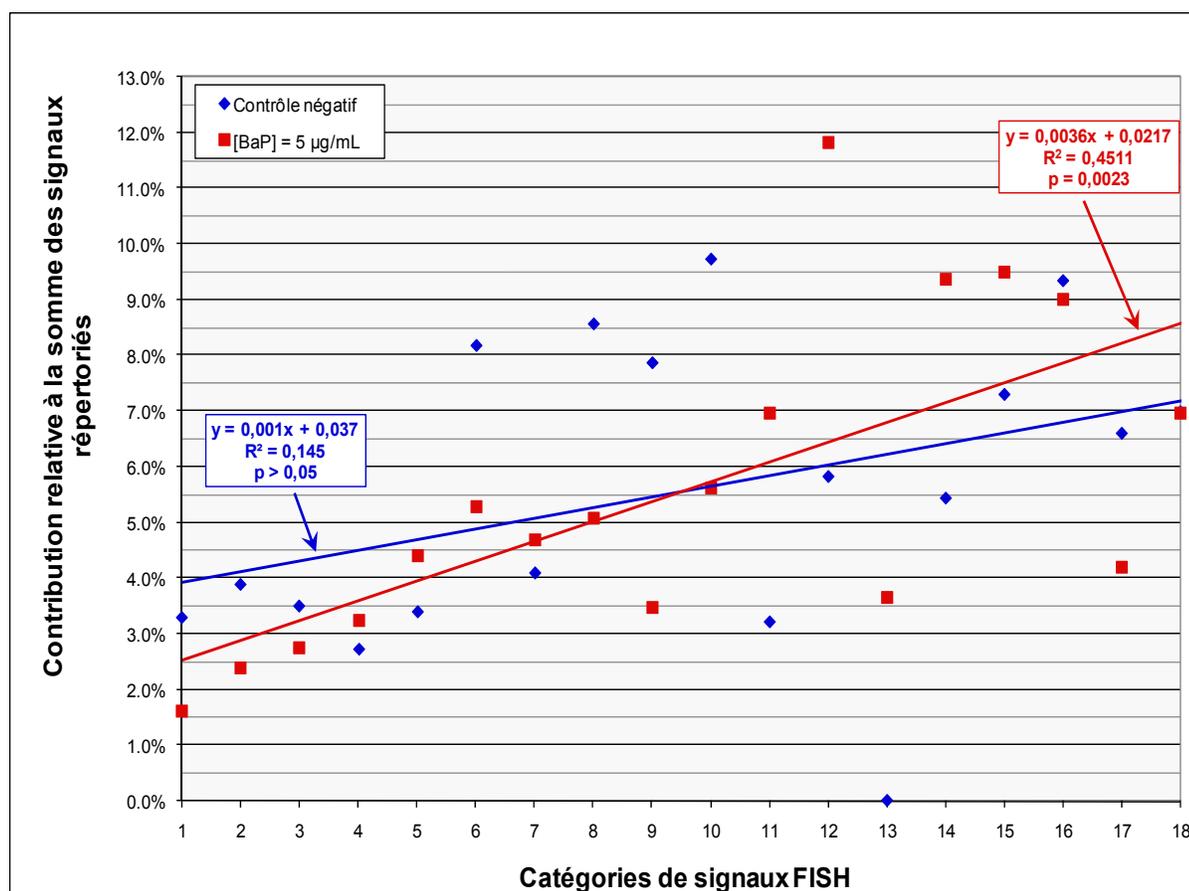


Figure 31

Graphique illustrant la contribution relative à la somme des signaux FISH répertoriés, de chaque catégorie de signaux FISH, pour les deux conditions d'exposition au BaP étudiées : [BaP] = 0 µg/mL (en **bleu**) et [BaP] = 5 µg/mL (en **rouge**). La ligne en continu est la droite de régression linéaire. L'équation de la droite, le coefficient de détermination (R^2) et la valeur de p associés à chacune des droites sont indiqués pour chaque condition.

3.6 L'ANALYSE DES AC

Dans le groupe de sujets étudiés, nous retrouvons un pourcentage d'AC de $1,6 \pm 0,3$ % dans les lymphocytes humains non exposés au BaP (Tableau XIII, ci-dessous). Suite à l'exposition à $[\text{BaP}] = 5 \mu\text{g/mL}$, ce pourcentage grimpe à $7,5 \pm 1,0$ %, ce qui représente une importante augmentation de 4,7 fois. Globalement, l'exposition au BaP cause une augmentation significative du pourcentage des AC, ainsi que du pourcentage de cellules comportant des AC dans les lymphocytes, pour les trois premières conditions d'exposition au BaP (0,1 - 1 et 5 $\mu\text{g/mL}$; $p < 0,01$). Une augmentation de ces deux indicateurs est également visible à $[\text{BaP}] = 10 \mu\text{g/mL}$, mais elle est non significative.

Tableau XIII: Résultats de l'analyse des AC dans les lymphocytes humains exposés *in vitro* au BaP, présentés pour le groupe entier.

[BaP] $\mu\text{g/mL}$	Indicateurs	
	AC (%)	Cellules comportant des AC (%)
0	$1,6 \pm 0,3$	$1,5 \pm 0,2$
0,1	$3,6 \pm 0,5^{**}$	$3,3 \pm 0,3^{**}$
1	$4,4 \pm 0,8^{**}$	$3,6 \pm 0,5^{**}$
5	$7,5 \pm 1,0^{**}$	$6,6 \pm 0,9^{**}$
10	$6,9 \pm 1,6$	$5,8 \pm 1,4^{\dagger}$

$^{\dagger}p < 0,1$

$^{**}p < 0,01$

Les valeurs de p sont représentées pour la comparaison entre la condition contrôle et l'exposition aux différentes concentrations de BaP.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

Comme nous venons de le constater, l'activité génotoxique du BaP a été étudiée suite à une exposition *in vitro* de 24 heures à quatre faibles concentrations, suivie d'une période de 24 heures sans BaP en présence de Cyt B. Cette dernière période de 24 heures a été incluse dans le protocole afin de permettre l'expression des dommages à l'ADN S-dépendant et afin d'éviter une interaction possible entre le BaP et la Cyt B.

Dans notre groupe de sujets, nous retrouvons une moyenne de la fréquence basale des MN à [BaP] = 0 µg/mL de $9,9 \pm 1,2$ ‰ (Tableau VIII, page 103) et une étendue de la fréquence individuelle de 1 à 21 ‰ (Tableau VII, page 101), comparables à ce qui a été rapporté dans la littérature pour d'autres cohortes de sujets non exposés. En effet, dans son protocole publié en 2007, Fenech propose un intervalle de fréquence de 0 à 30 MN ‰ comme fréquence normalement retrouvée dans une population non exposée. Quant à la moyenne de la fréquence des MN, elle est respectivement de 7,8 ‰, de 12,2 ‰ et de 15,5 ‰ dans les études de Surrallés et Natarajan, [1997], Pastor et *al*, [2003] et Bonassi et *al*, [2003], effectuées sur des cohortes comportant plusieurs centaines de sujets non exposés à des produits génotoxiques.

4.1 LE BaP CAUSE UN EFFET CYTOSTATIQUE.

Les valeurs d'IDN obtenues dans nos échantillons varient entre 1,442 et 1,796 après exposition (Tableau VI, page 99). Puisque ces IDN sont supérieurs à 1,3 (valeur seuil fixée expérimentalement par Fenech, 2007), ceci démontre que la viabilité de nos cellules est adéquate et n'est pas compromise par l'exposition au BaP. Nous observons, cependant, un léger effet cytostatique significatif à [BaP] = 10 µg/mL ($p < 0,05$), indiquant ainsi que la viabilité cellulaire décroît quand la concentration de BaP augmente. Cela permet de comprendre les résultats obtenus par Vian et *al*, [1993], qui ont constaté une importante diminution de l'index mitotique lors de l'exposition de 48 heures des lymphocytes sanguins à des concentrations de BaP variant entre 12,5 et 125 µg/mL. Par ailleurs, un allongement à 64 heures du temps d'exposition au BaP entraîne l'apparition d'un effet cytostatique visible dès la concentration de 1 µg/mL [Warshawsky et *al*, 1995]. En conséquence, notre étude et les études précédentes indiquent que, pour une concentration de BaP donnée, le choix du temps

d'exposition est important car plus il est long, plus la viabilité des lymphocytes sanguins décroît.

4.2 LE BaP CAUSE DES EFFETS GÉNOTOXIQUES MESURABLES À FAIBLES CONCENTRATIONS.

Dans notre étude, nous rapportons une augmentation significative de la fréquence des MN à toutes les concentrations de BaP testées (Tableau VIII, page 103). Nos résultats sont en accord avec ce qui est décrit dans la littérature. Warshawsky et *al.* [1995] rapportent une augmentation significative ($p < 0,01$) de la fréquence des MN suite à une exposition variant entre $[BaP] = 0,5$ et $10 \mu\text{g/mL}$, chez les cinq sujets (quatre femmes et un homme). La même situation est observée dans l'étude de Cho et Chung, [2003], chez un seul sujet, pour des concentrations de BaP variant entre 1 et $15 \mu\text{g/mL}$. Toutefois, l'exposition à une concentration plus faible de BaP ($0,1 \mu\text{g/mL}$) durant 64 h, n'a pas entraîné d'augmentation significative de MN chez le sujet masculin testé [Warshawsky et *al.*, 1995]. Cela nous semble tout à fait vraisemblable puisque cette concentration a été réalisée sur un seul sujet et que, dans notre groupe, nous observons la même situation. En effet, certains de nos sujets (# 2 et # 12) ne montrent pas de formation accrue de MN suite à une exposition à $[BaP] = 0,1 \mu\text{g/mL}$ (Tableau VII, page 101).

Pour ce qui est de notre deuxième indicateur, nous observons que la fréquence des cellules micronucléées augmente significativement ($p < 0,01$) à partir de $[BaP] = 0,1 \mu\text{g/mL}$ (Tableau VIII, page 103). Cet indicateur n'a jamais été utilisé dans la littérature pour les études *in vitro* avec le BaP. En effet, les auteurs analysent uniquement la fréquence des MN. Par contre, l'utilisation de la fréquence des cellules micronucléées est rapportée dans une unique étude *in vivo* portant sur des travailleurs exposés aux HAP (fours à coke). En effet, dans un résumé écrit en chinois et traduit en anglais par PubMed, Wang et *al.* [1999] rapportent que la fréquence des cellules micronucléées est de 1,79 ‰ chez des travailleurs exposés au BaP, contre 1,10 ‰ chez les non exposés. Les analyses statistiques effectuées montrent que l'augmentation observée chez ces travailleurs est très significative, mais la valeur de p n'est pas précisée dans le résumé. Dans d'autres études *in vivo* portant sur des

produits chimiques différents, les analyses statistiques sur la fréquence des cellules micronucléées sont aussi rarement effectuées. Une seule étude, celle de Arsoy et *al.* [2009], utilise cet indicateur chez des patients ayant subi une chimiothérapie et montre que la fréquence des cellules micronucléées augmente très significativement ($p < 0,001$) avec l'exposition à ces agents cytostatiques (10,2 ‰ chez les non exposés vs 29,3 ‰ chez les patients).

Par l'analyse des résultats de nos deux indicateurs, nous pouvons affirmer que les effets génotoxiques du BaP sont mesurables et significatifs sur les lymphocytes sanguins humains, avec des concentrations faibles et un temps d'exposition plus court que les études actuellement présentes dans la littérature.

Nous discuterons de notre troisième indicateur, le nombre de MN par cellule micronucléée, ultérieurement dans la section qui suit. Comme nous allons le voir, certains auteurs ont constaté que l'effet génotoxique est plus évident quand le composé étudié induit 2 MN et plus dans les cellules. Cependant, le nombre de MN par cellule micronucléée est très rarement analysé statistiquement dans les études d'exposition *in vivo* et jamais dans les études *in vitro*. Dans notre étude *in vitro* sur le BaP, le nombre de MN par cellule micronucléée est donc un nouvel indicateur.

4.3 L'EXPOSITION AU BaP MONTRE UNE RELATION DOSE-RÉPONSE NON-LINÉAIRE.

4.3.1 L'intensité de la réponse génotoxique diminue à de plus hautes concentrations.

Dans notre étude, pour une exposition au BaP de 24 heures, la fréquence des MN et celle des cellules micronucléées sont maximales à $[\text{BaP}] = 5 \mu\text{g/mL}$, puis il y a une diminution à la concentration de BaP de $10 \mu\text{g/mL}$ (Tableau VIII, page 103). Cette diminution est statistiquement significative pour la fréquence des MN seulement ($p < 0,01$ – groupe entier – Figure 26-(A), page 104). Le deuxième indicateur suit la même courbe (Figure 26-(B), page 104). Les résultats montrent bien que la courbe de la relation dose-

réponse des deux indicateurs est non-linéaire. Nous pouvons interpréter la diminution de la fréquence des MN observée à $[BaP] = 10 \mu\text{g/mL}$ par un phénomène de saturation de l'activation métabolique des enzymes [Slikker et *al*, 2004] ou par l'induction de la réparation de l'ADN. En effet, le métabolisme du BaP peut être dévié vers la production de quinones, ce qui diminuerait la quantité de BPDE produite, ou encore, par l'induction de la phase II du métabolisme du BaP, résultant en une détoxification du BPDE. Comme moins de BPDE est présent, il y a donc moins d'adduits BPDE-ADN [Miller et Ramos, 2001]. Comme la production d'adduits BPDE-ADN est à la base des différentes lésions de l'ADN [Shinmura et *al*, 2008], tels les MN et les AC, cela expliquerait, dans notre étude, la diminution de la fréquence des MN, celle des cellules micronucléées, qui se font toutes les deux à $[BaP] = 10 \mu\text{g/mL}$. Par ailleurs, cette diminution pourrait aussi être causée par une réparation accrue des adduits à ces concentrations [Pavanello et *al*, 2009 ; Meschini et *al*, 2008]. D'ailleurs, une diminution de la fréquence des MN lors d'exposition plus forte aux HAP a été aussi mise en évidence dans des fours à coke, où les travailleurs les plus exposés présentaient moins de MN que ceux qui étaient exposés à un niveau intermédiaire [van Hummelen et *al*, 1993].

Si nous analysons les résultats de Warshawsky et *al*. [1995] effectuée chez cinq sujets de 20 à 43 ans, il y a une augmentation linéaire de la fréquence des MN avec les faibles concentrations de BaP utilisées (0,5 à $10 \mu\text{g/mL}$) pour une exposition de 64 heures. Nous croyons que si dans cette étude, il n'y a pas de diminution de la fréquence des MN à $[BaP] = 10 \mu\text{g/mL}$, contrairement à ce que nous rapportons, trois raisons possibles peuvent être soulevées : 1) le nombre de sujets restreint et l'intervalle d'âge ; 2) la méthode d'obtention des MN faite sans blocage de la cytotocinèse avec la Cyt B, ce qui fait que les MN analysés proviennent de cellules dont le nombre de divisions cellulaires est inconnu. Les cellules pourraient ne pas s'être divisées ou avoir fait plus d'un cycle de division cellulaire, ce qui pourrait modifier la fréquence de MN ; et 3) le seuil de sensibilité des cinq sujets choisis pour cette étude. En effet, chez nos 20 sujets, nous en avons quatre, chez qui la fréquence des MN augmente à toutes les concentrations de BaP testées (sujets #1, #8, #10, #17). La variabilité interindividuelle sera discutée plus loin à la section 4.4, page 127.

Par ailleurs, lorsque nous regardons les études effectuées avec des concentrations de BaP plus élevées, nous remarquons que la fréquence des MN est nettement plus faible que ce

que nous et Warshawsky et *al.* [1995] avons obtenu sur de plus faibles concentrations. Ainsi, Vian et *al.* [1993] obtiennent une faible fréquence de MN de 4 à 7 ‰ entre [BaP] = 25 et 62,5 µg/mL, qui diminue encore entre [BaP] = 62,5 et 125 µg/mL (48 h d'exposition, chez 21 sujets). La même tendance est observée dans l'étude de Elhajouji et *al.* [1994] avec des concentrations de BaP de 15 à 150 µg/mL, effectuée sur deux sujets seulement. À la lecture des quelques études présentes dans la littérature, nous constatons qu'à de plus hautes concentrations de BaP, la fréquence des MN diminue en même temps que la viabilité des cellules exposées, telle que mentionnée dans la section 4.1 (page 119). Nous pouvons expliquer, en partie, ce phénomène par l'effet cytostatique qui survient quand la concentration de BaP augmente, ce qui avait été expliqué comme une non génotoxicité apparente de ce composé par Vian et *al.* [1993] et Elhajouji et *al.* [1994]. Plus précisément, suite à l'exposition au BaP, il se produit des dommages à l'ADN et si ceux-ci sont peu nombreux, ils peuvent être réparés ; mais, dans la situation où il y en aurait trop, l'apoptose apparaît et l'effet cytostatique se manifeste.

Lors de l'analyse des MN, nous avons observé que le troisième indicateur, le nombre de MN par cellule micronucléée, suit la même courbe de non-linéarité de la relation dose-réponse (Figure 26-(C), page 104). Comme l'analyse du troisième indicateur est très peu utilisée en génotoxicité, nous nous sommes demandés s'il pouvait être associé plus spécifiquement à l'exposition au BaP. Nous avons donc interprété les résultats avec le test du rapport de cote (RC) pour en faire une application pratique. En effet, le RC a été calculé pour vérifier si le fait d'avoir deux MN ou plus dans une cellule micronucléée veut dire qu'il existe un effet génotoxique significatif. Dans notre étude, la valeur des RC augmente avec les concentrations de BaP ; il est maximal à [BaP] = 1 µg/mL, puis il décroît aux deux dernières concentrations de BaP (Tableau IX, page 105). Ceci indique une association entre l'exposition aux quatre concentrations de BaP et la présence de 2 MN et plus dans une cellule micronucléée.

4.3.2. Le calcul du rapport de cote : une façon plus appropriée d'analyser le nombre de MN par cellule micronucléée ?

Afin de déterminer si le fait d'avoir deux MN ou plus dans une cellule BN est associé plus spécifiquement à l'exposition à un produit génotoxique, nous avons recensé la littérature afin de trouver des articles rapportant le nombre de MN dans les cellules micronucléées. Par la suite, nous avons calculé les RC et leurs intervalles de confiance, à partir des données publiées. Cela nous a permis de séparer les études en fonction des RC et intervalles de confiance observés :

1 - LES CONDITIONS D'EXPÉRIMENTATION (CONCENTRATION ET TEMPS D'EXPOSITION) QUI DONNENT UN RC ET UN INTERVALLE DE CONFIANCE (IC 95 %) SIGNIFICATIFS.

Lorsque les lymphocytes sont exposés à la mitomycine C (agent pontant qui inhibe la réplication de l'ADN) pendant 24 h à 0,25 µg/mL, un RC de 10,9 (IC 95 % : 1,5 – 79,5) est calculé en analysant 74 cellules micronucléées de la condition contrôle et 745 cellules micronucléées de la condition exposée (12 000 cellules BN par condition). Ceci indique qu'il y a une forte association entre l'exposition à cette concentration de mitomycine C et le fait d'avoir deux MN et plus [Kocaman et Topaktas, 2007]. Cette forte association est aussi retrouvée dans l'étude de Ramírez et *al.* [1997] où les lymphocytes sont exposés à une concentration de colchicine (produit inhibant la polymérisation du fuseau mitotique) de 0,02 µg/mL pendant 24 h (RC = 4,6 et IC 95 % : 1,4 – 14,7 ; avec 87 cellules micronucléées de la condition contrôle et 72 cellules micronucléées de la condition exposée ; 1500 cellules BN analysées). Dans ces deux cas, la viabilité cellulaire est optimale.

Avec les conditions d'expérimentation utilisées dans notre étude, l'effet génotoxique observé est suffisamment important pour avoir un RC avec un intervalle de confiance significatif aux concentrations de BaP de 0,1 – 1 et 5 µg/mL (à [BaP] = 1 µg/mL, RC = 2,11 avec IC (1,24 – 3,58) - Tableau IX, page 105). Nous avons analysé 40 000 cellules BN pour chaque condition d'exposition et nous avons retrouvé 387 cellules micronucléées à la condition contrôle, puis de 492 à 715 cellules micronucléées suite à l'exposition aux quatre concentrations de BaP. À [BaP] = 10 µg/mL, nous avons un intervalle de confiance non

significatif associé à une induction du métabolisme de phase II et/ou de la réparation de l'ADN, telle que discutée précédemment au point 4.3.1 (page 121).

2 – LES CONDITIONS D'EXPÉRIMENTATION (CONCENTRATION ET TEMPS D'EXPOSITION) QUI DONNENT UN RC ACCEPTABLE, MAIS UN INTERVALLE DE CONFIANCE (95 %) NON SIGNIFICATIF.

Dans les deux études qui suivent, c'est encore la mitomycine C qui est utilisée. Tout d'abord, en poursuivant avec l'étude de Kocaman et Topaktas [2007], lorsque le temps d'exposition est prolongé jusqu'à 48 h (même concentration de mitomycine C (0,25 µg/mL) avec 74 cellules micronucléées de la condition contrôle et 2583 cellules micronucléées pour 12 000 cellules BN par condition), le RC diminue à 5,2 avec un intervalle de confiance non significatif (IC 95% : 0,7 – 37,9) montrant que cette association n'existe plus. De plus, l'index mitotique à cette condition est faible. Par ailleurs, dans la seconde étude, celle de do Céu Silva et *al.* en 2004 portant sur la mitomycine C (exposition à 0,5 µg/mL pour 48 h), l'analyse d'un nombre plus élevé de cellules (137 cellules micronucléées de la condition contrôle et 662 cellules micronucléées de la condition exposée; 60 000 cellules BN) ne suffit pas pour voir un effet significatif (RC = 0,9 ; IC 95 % : 0,3 – 2,2). L'analyse des données rapportées par ces auteurs témoigne de la présence de cytotoxicité à cette concentration (IDN inférieur à 1,3), ce qui pourrait expliquer une diminution du RC, même si la fréquence des cellules micronucléées reste encore significativement élevée. Finalement, l'autre exemple porte sur la colchicine. Dans l'étude de Darroudi et *al.* [1996], les lymphocytes humains sont exposés à une concentration de colchicine de dix fois plus élevée (0,2 µg/mL) que celle utilisée par Ramírez et *al.* [1997] (décrite au point précédent). Suite à l'analyse de 1000 cellules, un RC plus faible (RC = 2,9) comportant un intervalle de confiance non significatif (IC 95 % : 0,4 – 25,1) est retrouvé [Darroudi et *al.*, 1996]. Encore une fois, une cytotoxicité est présente (faible pourcentage de cellules BN retrouvées dans la préparation cellulaire) à cette concentration élevée de colchicine.

3 – LES CONDITIONS D'EXPÉRIMENTATION QUI DONNENT UN RC ET UN INTERVALLE DE CONFIANCE (95 %) NON SIGNIFICATIFS.

C'est le cas dans l'étude de Kocaman et Topaktas, [2007] effectuée pour évaluer la génotoxicité de l'acétamipride (25 – 30 – 35 et 40 mg/mL), suite à une exposition de 24 h. Cet insecticide de la famille des néonicotinoïdes cause une augmentation significative des AC, des ÉCS à toutes les concentrations testées et une augmentation significative des MN aux trois dernières concentrations. À 40 µg/mL d'acétamipride, l'analyse nous a donné une valeur du RC de 2,74 et un intervalle de confiance non significatif (IC 95 % : 0,3 – 26,9), alors que 12 000 cellules provenant de six donneurs aient été analysées. Bien que la viabilité cellulaire soit acceptable, la génotoxicité de ce produit est trop subtile pour donner un RC et un intervalle de confiance significatifs avec le nombre de cellules analysées.

L'utilisation des RC peut être intéressante, mais pour avoir des rapports de cote et des intervalles de confiance significatifs, le nombre de cellules analysées doit être très élevé. En effet, l'analyse de 12 000 cellules exposées à 25 µg/mL pour 24 heures a été insuffisante [Kocaman et *al.*, 2007], alors que dans notre étude, avec 40 000 cellules pour chaque condition d'exposition, les résultats ont été significatifs. En pratique, le nombre de MN analysés est faible dans les études *in vitro* visant à évaluer un produit. Par exemple, 1000 cellules par condition sont analysées pour évaluer deux herbicides (l'alachlor et l'hydrazide maléique) dans l'étude de Ribas et *al.* [1996]. Le même nombre de cellules est également analysé dans l'étude de Liviac et *al.* [2009] visant à évaluer la génotoxicité du bromonitrométhane, un halonitrométhane produit lors de désinfection de l'eau par chloration. C'est également le cas de beaucoup d'autres études *in vitro*, rendant les RC moins utiles. Cependant, il pourrait être intéressant d'évaluer la pertinence des RC dans les études *in vivo* (populations ou travailleurs exposés à divers contaminants), étant donné que le nombre de cellules totales analysées est important.

En résumé, quel que soit le produit utilisé, il est impératif que les conditions d'expérimentation d'une étude de génotoxicité *in vitro* (concentration et temps d'exposition utilisés) soient choisies afin de conserver une viabilité cellulaire acceptable. Par exemple, lors de la réalisation du test des MN, l'IDN doit être supérieur à 1,3 [Fenech 2007] et lors du test des AC, l'index mitotique doit être supérieur à 2 % [Rooney et Czepulkowski, 1992]. Par

ailleurs, l'analyse de nos trois indicateurs (la fréquence des MN et celle des cellules micronucléées ainsi que le nombre de MN par cellule micronucléée) indique que nous n'avons pas une relation dose-réponse linéaire avec les MN. En effet, nous observons un abaissement de la courbe dose-réponse qui pourrait être compatible avec un phénomène de saturation des enzymes d'activation métabolique, avec une induction de la détoxification du BPDE et/ou le déclenchement de la réparation de l'ADN.

4.4 UNE IMPORTANTE VARIABILITÉ INTERINDIVIDUELLE EXISTE DANS LA RÉPONSE GÉNOTOXIQUE CAUSÉE PAR LE BaP.

Dans notre étude, la fréquence des MN varie de 1 à 21 ‰ dans la condition contrôle, alors que dans les cellules exposées au BaP, elle est de 1,5 à 38 ‰ (Tableau VII, page 101). Dans la littérature, nous avons pu recenser seulement une étude où les concentrations de BaP sont comparables aux nôtres (faibles concentrations) et où plus d'un sujet ont été étudiés. En effet, les études de Cho et Chung [2003] et de Lo Jacono *et al.* [1992] ont été réalisées avec le sang d'un seul donneur et ne seront pas traitées ici. L'analyse de l'étude de Warshawsky *et al.* [1995] montre qu'avec des concentrations de BaP de 0,5 à 10 µg/mL et un temps d'exposition de 64 h, une fréquence des MN variant entre 7,25 et 51,75 ‰ est observée dans les lymphocytes exposés des cinq sujets.

Quand nous analysons la fréquence de MN chez nos sujets et ceux de ces auteurs, nous voyons qu'il y a beaucoup de variabilité interindividuelle. En effet, la fréquence des MN varie considérablement, même entre les cinq sujets de l'étude de Warshawsky *et al.* (quatre femmes et un homme) avec des fréquences variant de 7,25 à 20,50 ‰ à [BaP] = 1 µg/mL et de 27,25 à 51,75 ‰ à [BaP] = 10 µg/mL. En ce qui concerne trois autres études réalisées sur le BaP, la présentation des données ne permet pas d'étudier la variabilité interindividuelle et de la comparer avec nos résultats [Elhajouji *et al.*, 1994 ; Ghaisas et Bhide, 1994 ; Vian *et al.*, 1993].

De plus, dans notre groupe, nous avons remarqué que certains sujets semblaient se démarquer des autres concernant leur fréquence de MN et qu'ils pourraient représenter deux extrêmes pour la sensibilité au test des MN. C'est pourquoi, nous avons divisé nos sujets en

trois groupes de sensibilité, afin que se détachent du groupe les individus plus sensibles et les moins sensibles (Tableau X, page 108). Nous avons fait une analyse qualitative et avons classé nos sujets comme étant des extrêmes lorsqu'ils sont présents dans ces groupes pour quatre des cinq conditions d'exposition lors de la distribution des résultats, comme décrit dans la section 3.3 du chapitre Résultats (page 106).

Si nous revenons à notre étude, nous notons globalement, qu'il y a une diminution de la fréquence des MN à [BaP] = 10 µg/mL. Cependant, au niveau individuel, la situation peut varier. Ainsi, comme mentionné à la section 4.3.1, quatre de nos sujets (# 1, # 8, # 10 et # 17) ne montrent pas de diminution à [BaP] = 10 µg/mL (Tableau VII, page 101). Chez ces individus, la fréquence des MN augmente linéairement à toutes les concentrations de BaP testées. Cela peut s'expliquer par le fait que chez ces quatre sujets, le processus de détoxification du BPDE et le mécanisme de réparation de l'ADN pourraient s'enclencher plus tardivement. Un sujet masculin (# 12) se distingue des 19 autres témoins, avec une très faible fréquence basale de MN (1 ‰) qui augmente très légèrement, suite à l'exposition au BaP, pour atteindre une fréquence maximale de MN de 3 ‰ à [BaP] = 5 µg/mL (Tableau VII, page 101). Ce sujet est donc peu sensible à l'action du BaP. D'ailleurs, il fait partie du groupe de sujets les moins sensibles, composé d'une femme et deux hommes (sujets # 2, # 12 et # 17 - Tableau X, page 108). Dans le groupe des sujets plus sensibles à l'action génotoxique du BaP, nous retrouvons deux femmes (sujets # 7 et # 9) qui ont déjà une fréquence basale de MN élevée (21 ‰ et 15 ‰ respectivement). Cette fréquence augmente encore plus, lors de l'exposition au BaP (jusqu'à 38 ‰ pour le sujet # 7 et 28,5 ‰ pour le sujet # 9).

Ces fréquences de MN extrêmes pourraient s'expliquer par le fait que ces individus seraient porteurs d'un ou de plusieurs polymorphismes présents dans de nombreux gènes de réparation des dommages de l'ADN, d'activation/désactivation des cancérogènes, de la cascade métabolique du folate et du transport des micronutriments. Ces polymorphismes joueraient un rôle important dans la sensibilité au test des MN [Dhillon et *al*, 2011], en modulant à la hausse ou à la baisse, la fréquence des MN. De plus, de nombreuses recherches ont démontré l'importance du folate dans le régime nutritionnel de l'être humain, puisqu'une déficience de cette vitamine B essentielle entraîne une accumulation du dUMP

(déoxyuracile monophosphate) et une incorporation de l'uracile dans l'ADN à la place de la thymine [Dhillon et *al*, 2009 ; Beetstra et *al*, 2005 ; Fenech et *al*, 1998]. Ceci induit des cassures simple-brin et double-brin de l'ADN, des cassures chromosomiques et des MN [Fenech et *al*, 1998].

La variabilité existant entre les individus pourrait s'expliquer par le fait que la biotransformation du BaP en BPDE suit une cascade métabolique qui procède selon une cinétique distincte à chaque individu, en raison de la polyallélie existant dans la population. En effet, chaque individu possède ses propres allèles pour les enzymes métaboliques, dont la combinaison est différente des autres individus. Comme ces allèles pourraient avoir une efficacité différente, une variabilité de capacité métabolique existe dans la population [Norppa, 2004]. Chez les individus qui ont une plus faible fréquence de MN, il se pourrait que la détoxification du BPDE ou encore que les mécanismes de réparation de l'ADN soient particulièrement efficaces vis-à-vis de ce composé [Iarmarcovai et *al*, 2008 ; Salama et *al*, 2001]. Cette variabilité métabolique se traduirait aussi par une variation dans le niveau de dommages chromosomiques induits par les composés présents dans notre environnement [Iarmarcovai et *al*, 2008 ; Leng et *al*, 2004]. Par exemple, les individus chez lesquels l'activité de l'enzyme GSTM1 est détectée, présentent un niveau de base de MN sanguin plus élevé [Norppa, 2004]. De plus, il y a aussi une différence entre les individus dans l'efficacité des processus de réparation des dommages à l'ADN. Les individus possédant certains variants génétiques particuliers pourraient donc avoir des niveaux d'aberrations cytogénétiques différents. C'est notamment le cas des individus présentant une activité réduite de deux enzymes impliquées dans le métabolisme des folates (les enzymes MTHFR et MTRR), importantes dans la production des précurseurs nucléotidiques (purines et thymidine). Ces individus ont aussi un niveau de base de MN plus élevé [Norppa, 2004]. De plus, le patrimoine génétique joue aussi un rôle dans la variabilité interindividuelle et cela est démontré dans une étude où l'hérédité montre déjà des variations dans la fréquence basale de MN. En effet, la comparaison des groupes de jumeaux avec des groupes composés de personnes n'ayant aucun lien de parenté, illustre très bien cette variabilité qui existe même entre des jumeaux monozygotes [Surowy et *al*, 2011]

4.5 L'UTILISATION DE TRÈS FAIBLES CONCENTRATIONS DE BaP PERMET DE VOIR LA DIFFÉRENCE ENTRE LES SEXES

En regroupant les données des trois indicateurs selon le sexe, nous remarquons qu'il existe des différences entre les hommes et les femmes en ce qui a trait à la relation dose-réponse. Tout d'abord, nos résultats montrent que la fréquence des MN (‰) varie de 3,5 à 21 pour les femmes et de 1 à 17 pour les hommes et celle des cellules micronucléées (‰), de 2,5 à 20 pour les femmes et de 1 à 15,5 pour les hommes (Tableau VII, page 101). Puis en regardant la fréquence spontanée des MN ([BaP] = 0 µg/mL), nous pouvons voir qu'il est plus élevé chez les femmes que chez les hommes (Tableau X, page 103). C'est également le cas suite à l'exposition au BaP. Nous pouvons donc dire qu'il y a une tendance vers une différence entre les deux sexes, puisque la différence en elle-même n'est pas statistiquement significative lorsque ces deux groupes sont comparés directement l'un à l'autre pour chaque concentration de BaP (test *t* de Student pour échantillons indépendants section 3.4, page 108).

Dans la littérature, tout comme nous, plusieurs études ont souligné que les femmes avaient une fréquence de MN plus élevée que les hommes (Tableau XIV, page 131). Par exemple, l'étude de Wojda et *al.* [2007] sur un groupe d'adultes de 20 à 50 ans a montré que les femmes ont environ 2 fois plus de MN que les hommes ($p = 0,0046$). Cette différence a été aussi observée dans deux autres groupes de sujets (âgés de 20 à 89 ans et de 20 à 67 ans - $p < 0,05$) [Fenech et *al.*, 1994 ; Bolognesi et *al.*, 1993]. La question de l'influence des hormones sur la fréquence des MN peut être aussi soulevée pour expliquer la fréquence de MN plus élevée chez les femmes. Cependant, les concentrations d'œstrogène et de progestérone ne semblent pas avoir d'influence significative, d'après l'étude de Baeyens et *al.* [2005]. Par ailleurs, un âge avancé est également associé à une augmentation de la fréquence des MN, dans les cohortes où la tranche d'âge est assez large [Wojda et *al.*, 2007 ; Radack et *al.*, 1995 ; Fenech et *al.*, 1994 ; Bolognesi et *al.*, 1993]. En effet, une augmentation de la fréquence des MN de 0,58 ‰ par année chez les femmes est observée dans l'étude de Thierens et *al.* en 2000 après une exposition aux radiations dans les hôpitaux, alors que cette augmentation est de 0,31 ‰ par année pour les hommes [Vral et *al.*, 2011].

Tableau XIV: Revue des études ayant évalué l'effet de l'âge et du sexe sur la fréquence basale des MN.

Intervalle d'âge	Effet de l'âge	Effet du sexe	Auteurs
0 à 70 ans	Oui	Non	Ganguly, 1993
0 à 82 ans	Oui	Non disponible	Fenech et Morley, 1985
8 à 55 ans	Oui	Non disponible	Thierens et al, 1996
18 à 78 ans	Oui	Non	Köteles et al, 1993
19 à 71 ans	Oui	Non	Odagiri et al, 1997
20 à 59 ans	Non	Non	Di Giorgio et al, 1994
20 à 67 ans	Oui	Oui (f > h)*	Bolognesi et al, 1993
20 à 85 ans	Oui	Non disponible	Fenech et Morley, 1986
21 à 72 ans	Oui	Non	Tomanin et al, 1991
21 à 90 ans	Oui	Oui (f > h)*	Fenech et al, 1994
21 à 108 ans	Oui	Oui (f > h)*	Wojda et al, 2007
24 à 75 ans	Oui	Oui (f > h)*	Fenech, 1993
45 à 85 ans	Oui	Oui (f > h)*	Radack et al, 1995

*f = sujets féminins h = sujets masculins

Dans la deuxième approche utilisée, nous avons analysé la relation dose-réponse pour les trois indicateurs chez les femmes et chez les hommes, puis nous avons comparé ces relations dose-réponse entre elles. C'est alors que nous avons noté un comportement différent des hommes et des femmes en réponse aux faibles concentrations de BaP utilisées dans cette étude. En effet, la fréquence des MN et celle des cellules micronucléées augmentent significativement ($p < 0,05$) chez les hommes à partir de $[BaP] = 0,1 \mu\text{g/mL}$, alors que chez les femmes, cette augmentation est modérée et non significative ($p < 0,1$ – Tableau VIII, page 103). Quant au nombre de MN par cellule micronucléée, encore une fois, il augmente significativement chez les hommes à $[BaP] = 1$ et à $[BaP] = 5 \mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$), alors que chez les femmes, il n'y a pas d'augmentation significative à ces deux concentrations. De plus, une diminution significative de la fréquence des MN est observée chez les hommes, entre les concentrations de BaP de 5 et 10 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,05$) (Figure 26-(A), page 104). Chez les femmes, cette diminution, quoique visible, est non significative. Il semble donc qu'à nos conditions expérimentales, les hommes soient plus sensibles à l'action

génétoxique du BaP. Toutefois, il est difficile de déterminer si ce phénomène est également présent chez les individus exposés aux HAP, étant donné que les études de travailleurs incluent le plus souvent uniquement des hommes et que, très peu d'études sur l'exposition environnementale considèrent l'influence du sexe sur des biomarqueurs génétiques.

Par ailleurs, les résultats de la FISH montrent aussi une légère différence entre les hommes et les femmes dans le pourcentage des MN contenant des signaux centromériques. En effet, dans les lymphocytes exposés à $[BaP] = 5 \mu g/mL$, les hommes ont une augmentation significative ($p < 0,01$) du pourcentage de MN C+ par rapport à celui des lymphocytes non exposés. Chez les femmes, cette proportion est augmentée, mais pas significativement ($p < 0,1$). En regardant le pourcentage des MN contenant 3 signaux centromériques et plus (MN C₃₊), c'est l'inverse, puisque ce pourcentage est augmenté chez les femmes ($p < 0,01$), mais ne l'est pas chez les hommes (Tableau XI, page 111). Cependant, le nombre de MN analysés est insuffisant pour voir une différence statistique entre les sexes et une comparaison directe des pourcentages obtenus chez les deux sexes ne montre pas de différence significative entre les hommes et les femmes. Il serait intéressant d'analyser les MN produits chez les hommes et les femmes avec une sonde reconnaissant le centromère du chromosome X. En effet, il a été noté chez des sujets non exposés, que les femmes perdaient plus fréquemment le chromosome X dans leurs MN C+ et que ceci pouvait expliquer la différence entre les deux sexes [Vral et al, 2011]. Ceci nous permettrait de déterminer si le BaP agit en accentuant la perte du chromosome X chez la femme, un phénomène déjà présent, ou s'il agit via un autre mécanisme.

4.6 LES EFFETS DU BaP SUGGÈRENT QU'IL POSSÈDE À LA FOIS DES PROPRIÉTÉS CLASTOGÉNIQUE ET ANEUGÉNIQUE

Comme nous l'avons déjà mentionné, nous avons effectué le test des AC et analysé le contenu des MN par FISH afin de vérifier les propriétés clastogéniques du BaP. Dans notre étude, l'analyse des AC montre que le BaP est un agent clastogène. En effet, nous avons mis en évidence une augmentation significative du pourcentage d'AC, du pourcentage de cellules comportant des AC et de la fréquence des MN et des cellules micronucléées,

suite à l'exposition *in vitro* des lymphocytes au BaP (Tableau XIII, page 115). Ces résultats concordent avec les études présentes dans la littérature.

Dans le but de valider l'utilisation du test des MN comme une alternative valable au test des AC, deux groupes, la GUM (*Gesellschaft für Umweltmutationsforschung*, un groupe parlant allemand de la *Environmental Mutagen Society* par Miller et *al.* en 1998) et l'ECVAM (*European Centre for the Validation of Alternative Methods* par Corvi et *al.* en 2008), ont effectué une revue exhaustive de la littérature. La GUM a pu recueillir des données valides provenant de 30 composés où les tests des MN et des AC ont été faits, parmi lesquels se trouve le BaP. En effet, le BaP induit des MN et des AC dans les lignées cellulaires de hamster chinois (CHL, V79) et les cellules sanguines humaines [Miller et *al.*, 1998]. Comme les résultats de ces deux tests concordent pour la majorité des substances étudiées (incluant le BaP) et que le test des MN est plus facile et moins long à réaliser que le test des AC, ces auteurs concluent que l'utilisation du test des MN présente plus d'avantages que celui des AC. Finalement, ce groupe classe le BaP comme un composé clastogène. Plus tard, l'ECVAM regroupe les données de la GUM en plus de celles provenant d'autres études plus récentes et classifie aussi le BaP comme étant un agent clastogène [Corvi et *al.*, 2008].

Nos résultats concordent en partie avec cette conclusion. En effet, les classifications de l'ECVAM et du groupe GUM ne tiennent pas compte de l'analyse du contenu des MN par la FISH. Pour pouvoir classifier les agents chimiques comme étant des composés clastogènes ou aneugènes, tout comme certains auteurs, nous pensons que les études devraient aussi inclure le test des MN couplé avec la FISH [Hovhannisyan, 2010 ; Iarmarcovai et *al.*, 2007a ; Norppa et Falck, 2003 ; Parry et *al.*, 2002 ; Digue et *al.*, 1999 ; Matsuoka et *al.*, 1999]. Pour cette raison, nous avons analysé le contenu des MN par la FISH avec une sonde pancentromérique. Se basant sur l'approche de Iarmarcovai et *al.* [2007b], nos résultats montrent que l'exposition au BaP entraîne la formation de MN contenant majoritairement un ou des centromères (MN C⁺ : $p < 0,01$; Tableau XI, page 111). La subdivision des MN C⁺ en deux autres catégories indique que les MN formés suite à l'exposition au BaP contiennent surtout trois centromères et plus (MN C₃₊⁺ : $p < 0,01$; Tableau XI, page 111). Cherchant à confirmer ces résultats surprenants, nous avons développé une seconde approche différente de ce qui a été publié jusqu'à présent. Les MN

analysés ont été classifiés par catégorie de signaux (de 1 à 18) et la contribution relative de chacune de ces catégories de signal FISH à la somme des signaux dénombrés a été calculée (Tableau XII, page 113). L'analyse par régression linéaire effectuée à partir de cette deuxième approche, indique que l'exposition au BaP mène à la formation de MN contenant plus de signaux centromériques que ce qui serait normalement attendu ($R = 0,67$; $R^2 = 0,45$; $p = 0,0023$). Le coefficient de corrélation R indique que l'exposition au BaP est responsable de l'augmentation du nombre de signaux FISH répertoriés dans les MN analysés. Le coefficient de détermination R^2 indique que le facteur « exposition au BaP » contribue de façon importante à l'augmentation des signaux FISH, expliquant 45 % du modèle mathématique représenté par la régression linéaire (Figure 31, page 114). Ce facteur est significatif ($p = 0,0023$), et indique également que d'autres paramètres non mesurés sont également importants. Ces facteurs pourraient être génétiques, tels que démontrés par les études de jumeaux monozygotes, pour lesquels une fraction importante (57 %) de la variation interindividuelle observée dans la réponse aux radiations ionisantes est d'origine génétique. Par ailleurs, la comparaison des courbes de régression linéaire des conditions contrôle négatif et $[BaP] = 5 \mu\text{g/mL}$, montre qu'elles sont significativement différentes ($p < 0,001$), confirmant l'effet du BaP sur l'augmentation du nombre de centromères dans les MN. En ce qui a trait à l'analyse du contenu des MN produits par le BaP, ces deux approches n'ont jamais été effectuées *in vitro* sur des lymphocytes humains ou d'autres types de cellules humaines, ou encore *in vivo* avec des cohortes de travailleurs exposés.

Tout comme d'autres auteurs, nous avons démontré que le BaP possède des propriétés clastogéniques. Cependant, l'analyse par régression linéaire de nos résultats sur le contenu des MN montre également que le BaP semble avoir aussi des propriétés aneugéniques. Pour mieux interpréter les résultats de notre étude, nous les avons comparés avec ceux de quelques études sur des composés clairement identifiés comme clastogènes ou aneugènes. Tout d'abord, prenons comme agents clastogènes typiques, les composés suivants : la bléomycine et la mitomycine C. La bléomycine cause une augmentation très significative ($p < 0,001$) de la fréquence des AC dans les lymphocytes exposés *in vitro* de trois hommes [Sadiq et al 2000], et de six hommes [Chattopadhyay et al, 1997]. En ce qui concerne le second composé, la mitomycine C, elle induit une augmentation significative (p

< 0,01) du nombre de MN contenant des fragments chromosomiques sans signaux centromériques dans une lignée de hamster chinois (CHL) [Hashimoto et *al*, 2010]. Les propriétés clastogéniques de ce dernier composé sont aussi démontrées dans une autre étude, par l'augmentation significative ($p < 0,01$) du nombre de MN C- dans les lymphocytes humains binucléés provenant de deux hommes et deux femmes [Rosefort et *al*, 2004].

Ensuite, regardons les résultats des agents aneugènes typiques : la colcémide et la vincristine sulfate. La classification de ces deux agents dans les composés aneugènes est due à l'induction significative de MN après exposition à de faibles concentrations bien avant l'apparition des AC [Hashimoto et *al*, 2010 ; Miller et *al*, 1998 ; Ramírez et *al*, 1997 ; Darroudi et *al*, 1996]. De plus, une augmentation très significative de MN C+ est retrouvée suite à l'exposition à la vincristine sulfate de lymphocytes humains prélevés chez un nombre non précisé de femmes ($p < 0,001$) [Darroudi et *al*, 1996].

En résumé, les produits typiquement clastogènes produisent surtout des MN sans centromères (MN C-), alors que les composés aneugènes produisent surtout des MN contenant des centromères (MN C+). Dans notre étude, l'analyse des MN par la FISH nous a montré qu'il y a 77 % de MN C+ dans les lymphocytes exposés au BaP nous indiquant un effet aneugène de ce composé.

4.6.1 Les mécanismes sous-jacents à la formation de MN contenant des centromères

Dans la littérature, plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer les mécanismes menant à la formation des MN contenant un ou deux centromères (MN C₁₋₂+) et ceux contenant trois centromères ou plus (appelés MN C₃₊ ou MN C_x+ selon les études). D'après Iarmarcovai et *al*. [2007b et 2006], la malségrégation des chromosomes et les défauts de migration chromosomique résultant d'anomalies des microtubules ou des kinétochores conduiraient à des MN C₁₋₂+, alors que l'amplification des centrosomes contribuerait à la formation des MN C₃₊. En effet, quand il y a des centrosomes surnuméraires, la formation de fuseaux mitotiques tripolaires et multipolaires peut générer des mitoses aberrantes [Saunders et *al*, 2000] qui sont retrouvées dans de nombreux cancers,

notamment ceux de la prostate, du sein, du côlon et du cerveau [Fletcher et Muschel, 2006]. En fonction du nombre de chromosomes attachés au centrosome surnuméraire et de la capacité de la cellule à compléter la cytokinèse, la formation d'un micronoyau contenant plusieurs centromères est donc possible. Cependant, dans les cellules possédant les points de contrôle appropriés, les centrosomes surnuméraires vont se regrouper pour former un fuseau pseudo-dipolaire [Saunders et *al*, 2000]. Ceci serait dû au fait que les pôles surnuméraires n'ont, le plus souvent, qu'une influence mineure sur l'alignement métaphasique et sur le nombre de chromosomes attachés au fuseau. Par contre, la situation est différente lorsque des gènes importants, comme le *p53*, sont mutés, comme l'ont remarqué l'équipe de Shimura et *al*, en 2008. En effet, l'exposition des cellules du cancer du poumon au BPDE a entraîné une duplication des centrosomes suite à un arrêt prolongé en phase S. Dans ces cellules, les adduits BPDE-ADN bloquaient la réplication de l'ADN en raison d'un défaut dans le système de réparation par synthèse translésionnelle (TLS). Lorsque ce défaut a été corrigé par transfection de l'ADN polymérase κ , la synthèse de l'ADN a pu progresser normalement et aucune duplication des centrosomes n'a été retrouvée.

4.6.2 L'utilité des autres types de sondes en FISH, pour comprendre les mécanismes à la base des effets aneugènes

L'application du test des MN couplé avec la FISH, utilisant des sondes spécifiques d'un centromère donné, permet de dénombrer les signaux centromériques mais également d'étudier les mécanismes de l'aneuploïdie, comme la non-disjonction et la malségrégation, [Iarmarcovai et *al*, 2006]. Non seulement la distinction des effets clastogéniques et aneugéniques est plus facile, l'identification des deux mécanismes d'induction de l'aneuploïdie, soit la perte d'un chromosome dans le MN et la non-disjonction d'un chromosome à la mitose (menant à la formation d'une cellule-fille trisomique et d'une autre monosomique pour ce chromosome) se fait plus aisément [Kirsch-Volders et *al*, 2002b].

Voici un exemple d'étude publiée sur le benzène, où son activité aneugénique est mise en évidence par la FISH avec deux sondes centromériques spécifiques des chromosomes 7 et 9 qui sont détectées en orange et en vert, respectivement [Kim et al, 2010]. Avec cette méthode, on retrouvera dans une cellule normale, deux signaux oranges dans chaque noyau (Figure 32-A, page 138), alors qu'une non-disjonction se traduira par un nombre inégal de signaux dans les deux noyaux de la cellule BN. Par exemple, dans la Figure 32-B, page 138, il y a une non-disjonction du chromosome orange dans la cellule de gauche, avec un patron d'hybridation 3 + 1. La perte chromosomique, quant à elle, sera visible dans les cellules comportant des MN, lorsque le centromère du chromosome sera présent dans le MN (Figure 32-C, page 138). L'étude de Kim et al. [2010] a été réalisée chez des travailleurs d'une raffinerie de pétrole (30 exposés et 10 contrôles) et montre que l'exposition à de faibles concentrations de benzène est associée avec une augmentation globale de l'aneuploïdie des chromosomes étudiés, soient les chromosomes 7 et 9 ($p < 0,05$ – Tableau XV, ci-dessous). L'analyse des patrons d'hybridation suggère que la non-disjonction serait le mécanisme d'aneuploïdie le plus important avec ce composé. Par ailleurs, l'utilisation en parallèle d'une sonde pancentromérique a permis de mettre en évidence la prédominance des MN C- chez les travailleurs exposés (61,8 % vs 16,5 % chez les non exposés) suggérant que le benzène a aussi un effet clastogène.

Tableau XV: La fréquence des deux types d'aneuploïdie des chromosomes 7 et 9 observée chez des travailleurs d'une raffinerie de pétrole exposés au benzène. *Source modifiée : Kim et al, 2010.*

Chromosome	Sujets	Nombre de sujets	Aneuploïdie/1000 cellules BN				Total d'aneuploïdie /1000 cellules BN
			Non-disjonction		Perte chromosomique		
			3 + 1	4 + 0	(2 + 1) + 1	(1 + 1) + 2	
7	Contrôles	10	2,4 ± 0,7	0,3 ± 0,3	0,4 ± 0,2	0,0 ± 0,0	3,1 ± 0,7
	Exposés	30	4,1 ± 0,4	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,0 ± 0,0	4,9 ± 0,5*
9	Contrôles	10	3,3 ± 0,6	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,0 ± 0,0	4,3 ± 0,5
	Exposés	30	4,5 ± 0,4	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,1 ± 0,0	5,4 ± 0,4*

* $p < 0,05$

Les données sont représentées par la fréquence moyenne ± erreur-standard de la moyenne.

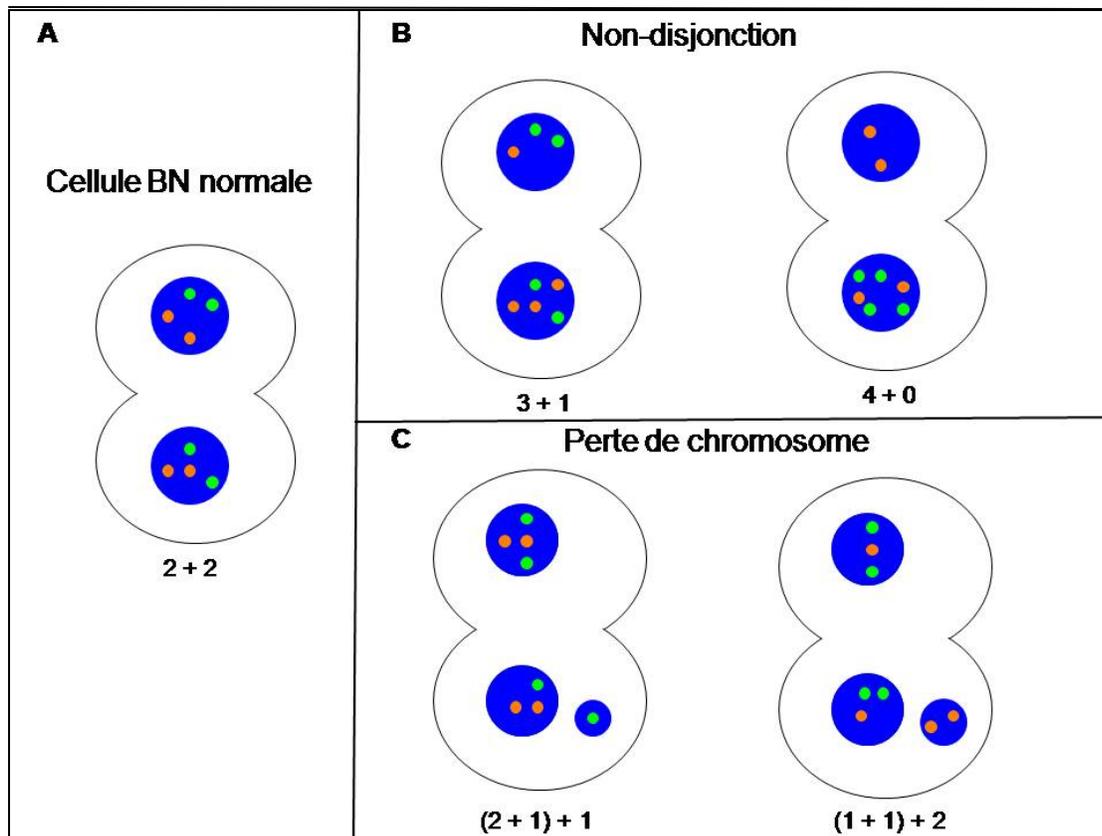


Figure 32 : Illustration des types d'aneuploïdies distinguées par la FISH avec deux sondes centromériques spécifiques de deux chromosomes, en orange et en vert. **A-** Cellule BN normale, avec un patron d'hybridation 2 + 2 pour chacun des chromosomes étudiés: il y a deux signaux centromériques pour chaque chromosome dans les deux noyaux. **B-** Cellule BN présentant une non-disjonction des chromosomes en orange (signal orange) avec un patron d'hybridation 3 + 1 dans la cellule de gauche et un patron d'hybridation 4 + 0 du chromosome en vert (signal vert) dans celle de droite. **C-** Cellule micronucléée présentant une perte chromosomique dans le MN, du chromosome en vert (cellule de gauche) avec un patron d'hybridation (2 + 1) + 1 et du chromosome en orange dans la cellule de droite avec un patron d'hybridation (1 + 1) + 2.

Pour déterminer quel est le chromosome le plus souvent perdu dans les MN ou pour décrire la composition en chromosomes des MN, l'utilisation de peintures chromosomiques (comme celle du chromosome X par Vral et *al.* [2011]) ou encore de multisondes (comme le caryotypage spectral SKY (*Spectral karyotyping*) qui permet d'identifier avec une couleur distincte les 24 chromosomes humains en une seule hybridation) [Leach et Jackson-Cook,

2001] sont des applications intéressantes. L'utilisation de la SKY chez trois femmes non exposées, âgées de 28, 42 et 72 ans, a permis de constater que leurs MN contenaient un seul chromosome dans 83 à 97 % des cas et que tous les chromosomes pouvaient être inclus dans des MN [Leach et Jackson-Cook, 2001]. Ainsi, l'utilisation de la SKY semble présenter un grand avantage pour la compréhension du contenu chromosomique des MN, par contre, elle est très dispendieuse et nécessite un système d'analyse d'image particulier, ce qui fait qu'elle n'est pas à la portée de tous les laboratoires de recherche. De plus, elle n'a pas encore été utilisée pour caractériser des MN causés par l'exposition à des clastogènes, dont on peut penser qu'ils contiendraient les fragments de plusieurs chromosomes différents.

Finalement, dans une étude utilisant une combinaison de sondes pancentromérique et d'une autre pantélomérique (reconnaissant tous les centromères et télomères, respectivement) détectées toutes deux avec une couleur différente, la distinction des chromosomes entiers ou partiels dans les MN est possible [Lindberg et al, 2008]. En fonction des signaux présents, les MN ont été divisés en catégories comme suit : MN contenant des chromatides entières (par exemple $1xC^+ 2xT^+$ - avec un signal centromérique et deux signaux télomériques), MN contenant des chromatides partielles (fragments interstitiels avec centromères - $C^+ T^-$), MN contenant des fragments terminaux ($C^- T^+$) et MN contenant des fragments acentriques seulement ($C^- T^-$). L'intérêt de l'utilisation de cette combinaison de sondes réside dans le fait que les auteurs ont pu observer une grande diversité dans le contenu des MN chez des individus non exposés, ce qui témoigne de la présence simultanée d'effets aneugènes et clastogènes dans la formation d'un MN. Une des limites à l'application de cette technique dans un cas d'exposition à un produit chimique, réside dans la difficulté à interpréter les événements survenus, lorsque plusieurs chromosomes sont présents dans les MN, comme ce que nous avons observé avec l'exposition au BaP.

Les données présentées dans ce mémoire font l'objet d'un manuscrit placé à l'Annexe VIII, page liv. Ce manuscrit a été soumis au journal *Mutation Research*, section *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* le 2 février 2011.

CHAPITRE 5

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre projet de recherche montre l'importance des effets génotoxiques du BaP sur les lymphocytes humains exposés *in vitro*, en utilisant de faibles concentrations de BaP, ainsi que de nouvelles connaissances sur son mode d'action dans ce type de cellules. En effet, une augmentation significative de la fréquence des MN et celle des cellules avec MN, de la fréquence des AC et de la fréquence des cellules comportant des AC montre que ces biomarqueurs reflètent l'effet génotoxique du composé. Cependant, nous observons une diminution significative de la fréquence des MN à la concentration de BaP de 10 µg/mL. Une diminution du pourcentage des AC et des cellules comportant des AC sont également observées à cette concentration, en accord avec le test des MN. Ces biomarqueurs montrent donc une courbe dose-réponse non-linéaire, suggérant le déclenchement du processus de détoxification du BPDE et de réparation de l'ADN. L'existence du phénomène de saturation des enzymes métaboliques entrant dans la voie de bioactivation du BaP est suggérée par les études de Till et al [1999] sur les hépatocytes de rat exposés au BaP pour 48 h, où la saturation de l'enzyme CYP1A1 entraîne une diminution des adduits à l'ADN.

Avec l'utilisation du rapport de cote (RC), nous avons montré une association forte entre l'exposition au BaP et la présence de 2 MN et plus dans les cellules BN. De plus, suite à l'étude de la littérature, nous croyons que le calcul du RC est utile pour mieux voir l'association entre l'exposition à un agent et son effet génotoxique, particulièrement si l'analyse se fait à l'échelle d'une population. Le calcul du RC montre que les études de génotoxicité doivent se faire à des concentrations auxquelles la viabilité cellulaire est optimale, afin que seuls les effets génotoxiques soient mesurés et non biaisés par la présence de cytotoxicité. En effet, comme c'est le cas dans certaines études décrites dans la littérature, lorsque les concentrations sont trop élevées ou lorsque le temps d'exposition est trop long, la viabilité cellulaire décroît et la génotoxicité est masquée par les effets cytostatiques.

Notre étude montre qu'il existe une grande variabilité interindividuelle dans les effets génotoxiques du BaP mesurés avec le test des MN. Cette variabilité s'expliquerait par le fait qu'un grand nombre d'évènements différents sont à la base de la formation des MN en réponse au BaP. Par exemple, la biotransformation du BaP suit une cinétique propre à chaque sujet, en raison du grand nombre d'allèles existant dans la population qui codent pour les enzymes impliquées. Cette polyallélie est également présente en ce qui a trait aux

différentes voies de réparation de l'ADN. Dans notre groupe de 20 sujets, nous avons identifié trois sujets qui sont très peu sensibles au BaP et deux chez qui, au contraire, l'induction de MN par le BaP est très importante, suggérant qu'ils sont très sensibles à ce produit. Le fait que des fréquences extrêmes de MN soient observées chez ces individus suggère qu'ils pourraient être porteurs de polymorphismes touchant plusieurs gènes différents (métabolisme du BaP et des folates, réparation de l'ADN, etc.) et dont la combinaison donnerait un effet additif, à la hausse ou à la baisse, sur la fréquence des MN. Notre étude montre également que des différences entre les sexes sont présentes, les hommes ayant un comportement différent des femmes en réponse à l'action génotoxique du BaP. L'étude de biomarqueurs additionnels (adduits BPDE-ADN, échanges entre chromatides-soeurs, etc.) évaluant la génotoxicité du BaP pourrait permettre de confirmer si ces effets existent réellement.

Dans le cadre de notre étude, les résultats obtenus indiquent que le BaP a des effets clastogènes sur les lymphocytes humains, mis en évidence par le test des AC et le test des MN. Ainsi, le BaP casse les chromosomes et les fragments sans centromère qui ne s'incorporent pas dans le noyau peuvent se retrouver dans un MN. Le BaP, classifié comme agent clastogène S-dépendant, est connu pour son action génotoxique sur le matériel génétique, causant une augmentation des AC et des MN dans plusieurs lignées cellulaires de mammifères et de cellules humaines [Corvi et *al*, 2008 ; Meschini et *al*, 2008 ; Natarajan et Palitti, 2008 ; Miller et *al*, 1998]. Les propriétés clastogéniques du BaP couplées à la formation d'adduits BPDE-ADN ont fait en sorte que ce produit est reconnu comme initiateur dans le processus de la cancérogenèse. L'apparition d'un cancer, dont plus de 90 % seraient causés par l'exposition à des agents cancérogènes environnementaux [Pathak et Multani, 2006], est le résultat d'un processus en plusieurs étapes dont les principales sont l'initiation, la promotion et la progression (voir Introduction, à la section 1.2.3.4, page 52). La présence d'adduits à l'ADN est associée à l'apparition de mutations qui apparaissent très tôt dans les cellules exposées [Miller et Ramos, 2001]. De plus, les cassures chromosomiques peuvent mener à la formation d'AC de structure et de nombre qui peuvent être permanentes et transmissibles. Celles-ci contribuent à transformer des cellules saines en cellules tumorales [Knudson, 2001].

Nous avons également mis en évidence les effets aneugènes du BaP sur les lymphocytes humains avec l'étude du contenu des MN par la FISH. Notre étude est la première à évaluer le contenu des MN induits par l'exposition au BaP et nous avons constaté que ce produit cause une augmentation significative de MN C⁺ et de MN C₃₊⁺. Ceci démontre qu'un effet aneugène est provoqué par le BaP dans les lymphocytes humains. Dans la littérature, des changements caryotypiques et des anomalies du fuseau mitotique, ont été observés dans des cellules de hamster chinois exposées au BaP [Matsuoka et al, 1998 ; Matsuoka et al, 1997] ; cependant la confirmation de l'effet aneugène du BaP n'a jamais été rapportée jusqu'à présent. Dans la pathogenèse du cancer, plusieurs études ont montré que les mitoses aberrantes et les erreurs de ségrégation chromosomique étaient souvent causées par l'amplification des centrosomes, source primaire de l'instabilité chromosomique [Fukasawa, 2005 ; D'Assoro et al, 2002 ; Lingle et al, 2002 ; Sato et al, 2001]. De plus, des malformations et des dysfonctionnements de l'appareil mitotique contribuent à la formation des MN, qui contiendront des chromosomes entiers ou partiels avec centromère [Norppa et Falk, 2003 ; Kirsch-Volders et al, 2002b]. Le nombre élevé de signaux centromériques retrouvés dans les MN a été associé dans la littérature à une amplification des centrosomes [Iarmarcovai et al, 2007b]. C'est précisément ce qui a été rapporté dans des cellules de carcinome pulmonaire déficientes en p53 et exposées au BPDE. Ainsi, une duplication excessive des centrosomes est causée par un arrêt prolongé en phase S dû à la présence d'adduits BPDE-ADN non réparés [Shinmura et al, 2008]. Par ailleurs, dans un nombre élevé de tumeurs caractérisées par une aneuploïdie et une amplification des centrosomes, une surexpression des protéines kinases mitotiques (famille des Aurora) est démontrée. Il semblerait que le gain d'activité de ces protéines kinases (surtout Aurora A), conjugué à l'absence du suppresseur de tumeur p53, entraînerait un découplage entre le cycle de réplication des centrosomes et celui du noyau [Zhu et al, 2005 ; Descamps et al, 2002]. De plus, dans les fibroblastes pulmonaires de hamster chinois exposés au diéthyle sulfate, on a retrouvé une amplification des centrosomes associée à la surexpression de Cdk2 et de cycline A [Hu et al, 2010]. Ces études montrent qu'il est possible de mettre en évidence l'induction de l'amplification des centrosomes par un agent génotoxique dans différents types cellulaires. Est-ce que ce phénomène est effectivement à l'oeuvre dans les lymphocytes humains exposés *in vitro* au BaP? Ce serait une piste à explorer dans des études futures.

Dans notre étude, l'augmentation du nombre de signaux centromériques présents dans les MN induits par le BaP dans notre étude pourrait être due à plusieurs causes. À la lumière des études antérieures, nous croyons que ce composé jouerait également un rôle dans la perturbation de l'appareil mitotique. Ce serait donc par son effet aneugène que le BaP induirait des anomalies chromosomiques de nombre, caractéristiques du phénomène d'aneuploïdie présent dans la majorité des cellules cancéreuses. De ce fait, le BaP serait aussi impliqué dans l'étape de la progression du cancer, puisque cela demande une assez longue période pour transformer une cellule tumorale en des colonies aboutissant à une tumeur visible. Ce nouveau rôle du BaP pourrait être assez important, étant donné que l'exposition au BaP et aux autres HAP dure généralement de nombreuses années (milieu de travail, air pollué, cigarette, etc.). Tout ceci pourrait également expliquer, par exemple, pourquoi les femmes fumeuses sont plus à risque d'avoir une tumeur agressive à haut taux de récurrence [Fentiman et *al*, 2005].

En ce qui concerne la comparaison des deux biomarqueurs utilisés dans ce travail, le test des MN avec blocage de la cytotinèse (test CBMN) et celui des AC sont considérés équivalents dans la littérature [Wolff et *al*, 2011]. Selon notre expérience et à première vue, le test des MN se révèle plus facile à réaliser dans un temps relativement court. L'analyse de la fréquence des MN permet d'avoir déjà des indices de l'effet génotoxique du composé étudié dans les lymphocytes sanguins humains. Le test des AC demande plus de temps d'analyse, mais son grand avantage est qu'il permet d'évaluer les effets clastogènes et aneugènes d'un composé lors de la même analyse. En effet, lorsque le matériel chromosomique est préparé par du personnel expérimenté, les informations concernant les cassures et le nombre de chromosomes présents dans les métaphases analysées peuvent être exploitées. Au contraire, afin de faire la distinction entre des agents clastogènes et aneugènes avec le test des MN, une deuxième analyse, la FISH avec une sonde pancentromérique, se révèle indispensable. Lorsque la mise en évidence des effets clastogènes et aneugènes doit être réalisée, le test des AC est, selon notre point de vue, plus rapide que le test des MN couplé à la FISH, que ce soit en termes de préparation que de temps d'analyse. Pour l'un et l'autre test, une très bonne acuité visuelle et de la rigueur au travail sont essentielles.

L'étude du contenu des MN par la FISH en utilisant d'autres sondes que des sondes pancentromériques comme nous l'avons fait dans ce travail, présente aussi des points intéressants. L'utilisation des sondes centromériques spécifiques permettra d'évaluer les causes des anomalies de la ségrégation des chromosomes, comme la non-disjonction et la ségrégation non équitable. Également, il pourrait être possible de déterminer quels chromosomes se retrouvent le plus souvent perdus dans les MN. Par ailleurs, les sondes télomériques et subtélomériques aideront à observer des chromosomes entiers ou partiels dans les MN. De plus, la combinaison de sondes pancentromériques et pantélomériques permettra de voir la diversité du contenu des MN. Cependant, l'utilisation de plusieurs sondes en même temps présente certaines difficultés, car comme le MN est petit, la distinction de plusieurs signaux est ardue.

Parmi les avancées technologiques qui pourraient bouleverser la réalisation conventionnelle du test des MN, il y a l'automatisation de l'analyse des MN. Elle commence à être validée pour l'étude des radiations comme une méthode alternative au test CBMN [Vral et al, 2011]. Pour ces auteurs, l'avantage du test CBMN est sa rapidité et sa facilité d'analyse en plus des coûts moins élevés. Mais son désavantage réside dans le fait que la détection des MN produits *in vivo* ne peut se faire qu'à hautes doses de radiations, étant donné la faible fréquence des MN induits. Le logiciel de détection automatique de la compagnie *MetaSystems* (logiciel *Metafer MNScore*) est déjà utilisé dans les phases précliniques de développement des médicaments, permettant ainsi de mesurer efficacement la fréquence, même faible, des MN dans les cellules. Parce que les résultats de la biosurveillance à l'exposition à l'air pollué et aux radiations ont montré l'efficacité du système automatique, le développement et la validation de ce système sont en cours afin d'élargir l'étude de l'induction des MN chez l'humain [Rossnerova et al, 2011]. De plus, un défi pour le futur serait l'automatisation d'une procédure de décompte des centromères contenus dans les MN, ce qui permettrait une biosurveillance systématique des travailleurs exposés à faibles concentrations d'agents cancérigènes [Vral et al, 2011]. Comme le test des MN est un biomarqueur de risque de cancer [Bonassi et al, 2007], en plus d'être un biomarqueur d'effet précoce d'agents cancérigènes et/ou mutagènes, son utilisation combinée aux autres techniques cytogénétiques devient de plus en plus importante pour la

prévention des risques de cancer. Grâce à l'automatisation du système d'analyse, il pourra être utilisé à plus grande échelle encore dans les études de génotoxicité.

Notre projet de recherche a bien montré l'utilité du test des MN couplé avec la FISH et du test des AC qui sont de très bons outils pour la surveillance biologique de l'exposition aux produits environnementaux posant des risques pour la santé. De plus, pour distinguer de manière efficace les propriétés génotoxiques (clastogène et aneugène) d'un agent chimique, la combinaison de ces tests serait plus appropriée. À long terme, la réalisation de la FISH pour étudier le contenu des MN induits par des produits chimiques pourrait conduire à une nouvelle classification de la génotoxicité, qui combinerait les effets aneugènes et clastogènes de ces composés. Une meilleure compréhension des effets génotoxiques des composés cancérigènes comme le BaP permettra d'élaborer des mesures de prévention et de protection pour la population générale et pour les travailleurs exposés aux HAP.

BIBLIOGRAPHIE

- Aardema, M.J.**, Albertini, S., Arni, P., Henderson, L.M., Kirsch-Volders, M., Mackay, J.M., Sarrif, A.M., Stringer, D.A., Taalman, R.D.F., **1998**. « *Aneuploidy : a report of an ECETOC task force* ». Mutation Research **410**:3-79.
- Abruzzo, M.A.**, Mayer, M., Jacobs, P.A., **1985**. « *Aging and aneuploidy : evidence for the preferential involvement of the inactive chromosome* ». Cytogenetics Cell Genetics **39**:275-278.
- Ademokun, A.**, Wu, Y-C., Dunn-Walters, D., **2010**. « *The ageing B cell population : composition and function* ». Biogerontology **11**:125-137.
- Arroyo, E.**, Chinchilla, N., Molinillo, J.M.G., Macias, F.A., Astola, A., Ortiz, M., Valdivia, M.M., **2010**. « *Aneugenic effects of benzoxazinones in cultured human cells* ». Mutation Research **695**:81-86.
- Arsoy, N.S.**, Neuss, S., Wessendorf, S., Bommer, M., Viardot, A., Schütz, P., Speit, G., **2009**. « *Micronuclei in peripheral blood from patients after cytostatic therapy mainly arise ex vivo from persistent damage* ». Mutagenesis **24**(4):351-357.
- Association Nucléaire Canadienne, 2010**. *Effets biologiques des rayonnements-Action directe et indirecte du rayonnement ionisant sur l'ADN*. Dernière mise à jour : 2010. Page visitée le 23 août 2010.
http://www.cna.ca/curriculum/cna_bio_effects_rad/direct_indirect_fra.asp?bc=Action%20directe%20et%20indirecte%20du%20rayonnement%20ionisant%20sur%20l'ADN&pid=Action%20directe%20et%20indirecte%20du%20rayonnement%20ionisant%20sur%20l'ADN
- ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease registry, 1990**. « *Toxicological profile for benzo-a-pyrene* ». ATSDR/TP-88/05 - U.S.Department of Health & Human Services, Atlanta, GA.
- Baciuchka-Palmaro, M.**, Orsière, T., Duffaut, F., Sari-Minodier, I., Pompili, J., Bellon, L., De Méo, M., Digue, L., Favre, R., Botta, A., **2002**. « *Acentromeric micronuclei are increased in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients* ». Mutation Research **520**:189-198.

- Baeyens, A., Vandersickel, V., Thierens, H., De ridder, L., Vral, A., 2005.** « *Effects of estradiol and progesterone on the variability of the micronucleus assay* ». Mutation Research **578**:308-316.
- Baird, W.M., Hooven, L.A., Mahadevan, B., 2005.** « *Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action* ». Environmental and Molecular Mutagenesis **45**(2-3):106-114.
- Balosso, J., Foray, N., 2005.** *Radiologie appliqué à la radiothérapie des cancers. Cancérologie fondamentale*, Monographie ISBN2-7420-0564-1:395-402.
- Barhoumi, R., Mouneime, Y., Ramos, K.,S., Safe, S.,H., Philips, T.,D., Centonze, V.,E, Ainley, C., Gupta, M.,S., Burghardt, R.,C., 2000.** « *Analysis of benzo-a-pyrene partitioning and cellular homeostasis in a rat liver cell line* ». Toxicology Science **53**:264-270.
- Barouki, R., Garlatti, M., Tomkiewicz, C., Aggerbeck, M., Coumoul, X., 2006.** *Nouvelles technologies en toxicologie de l'environnement - Bases fondamentales et applications.* Environnement, Risques et Santé **5**(6):477-488.
- Bassi, L., Carloni M., Meschini, R., Fonti, E., Palitti, F., 2003.** « *X-irradiated human lymphocytes with unstable aberrations and their preferential elimination by p53/surviving-dependent apoptosis* ». International Journal of Radiation Biology **79**:943-954.
- Bean, C.L., Galloway, S.M., 1993.** « *Evaluation of the need for a late harvest time in the assay for chromosome aberrations in Chinese hamster ovary cells* ». Mutation Research **292**:3-16.
- Becker, P., Scherthan, H., Zankl, H., 1990.** « *Use of a centromere-specific DNA probe (p82H) in nonisotopic in situ hybridization for classification of micronuclei* ». Genes Chromosomes Cancer **2**:59-62.
- Beetstra, S., Thomas, P., Salisbury, C., Turner, J., Fenech, M., 2005.** « *Folic acid deficiency increases chromosomal instability, chromosome 21 aneuploidy and sensitivity to radiation-induced micronuclei* ». Mutation Research **578**:317-326.
- Bender, M.A., Griggs, H.G., Bedford, J.S., 1974.** « *Mechanisms of chromosomal aberration production – III. Chemicals and ionizing radiation* ». Mutation Research **23**:197-212.

- Berger, R., 2007.** *Cytogénétique humaine de 1956 à 2006.* Pathologie Biologie **55**:1-12.
- Billet, S., Abbas, I., Le Goff, J., Verdin, A., André, V., Lafargue, P.E., Hachimi, A., Cazier, F., Sichel, F., Shirali, P., Garçon, G., 2008.** « *Genotoxic potential of polycyclic aromatic hydrocarbons-coated onto airborne particulate matter (PM 2.5) in human lung epithelial A549 cells* ». Cancer Letters **270**(1):144-155.
- Binkova, B., Topinka, J., Mrackova, G., Gajdosova, D., Vidova, P., Stavkova, Z., Peterka, V., Pilcik, T., Rimar, V., Dobias, L., Farmer, P.,B., Sram, R.,J., 1998.** « *Coke oven workers study : the effect of exposure and GSTM1 and NAT2 genotypes on DNA adduct levels in white blood cells and lymphocytes as determined by ³²P-postlabelling* ». Mutation Research **416**:67-84.
- Blaauboer, B.J., 2010.** « *Biokinetic modeling and in vitro-in vivo extrapolations* ». Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews **13**(2-4):242-252.
- Boerrigter, M.E., 1991.** « *DNA strand break metabolism in human lymphocytes : a reevaluation* ». Experimental Cell Research **196**(Special article):1-5.
- Boerrigter, M.E., Vijg, J., 1991.** « *Induction and disappearance of DNA single-strand breaks in human B and T lymphocytes after exposure to ethylnitrosourea* ». Mutation Research **255**(1):49-55.
- Bogen, K.T., 1993.** « *Reassessment of human peripheral T-lymphocyte lifespan deduced from cytogenetic and cytotoxic effects of radiation* ». International Journal of radiation Biology **64**(2):195-204.
- Bolognesi, C., Lando, C., Forni, A., Landini, E., Scarpato, R., Migliore, L., Bonassi, S., 1999.** « *Chromosomal damage and ageing : effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes* ». Age and Ageing **28**:393-397.
- Bolognesi, C., Abbondandolo, A., Barale, R., Casalone, R., Dalprà, L., De Ferrari, M., Degrassi, F., Forni, A., Lamberti, L., Lando, C., Migliore, L., Padovani, P., Pasquini, R., Puntoni, R., Sbrana, I., Stella, M., Bonassi, S., 1997.** « *Aged-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes* ». Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention **4**:249-256.

- Bolognesi, C., Parrini, M., Bonassi, S., Ianello, G., Salanitto, A., 1993.** « *Cytogenetic analysis of a human population occupationally exposed to pesticides* ». Mutation Research **285**(2):239-249.
- Bolt, H.M., Hensgtler, J.G., 2008.** « *Most cited articles in the Archives of Toxicology: the debate about possibilities and limitations of in vitro toxicity tests and replacement of in vivo studies* ». Archives of Toxicology **82**:881-883.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M.R., Zijno, A., Norppa, H., Fenech, M., 2007.** « *An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans* ». Carcinogenesis **28**:625-631.
- Bonassi, S., Ugolini, D., Kirsch-Volders, M., Stromberg, U., Vermeulen, R., Tucker, J.D., 2005.** « *Human population studies with cytogenetic biomarkers : review of the literature and future perspectives* ». Environmental and Molecular Mutagenesis **45**:258-270.
- Bonassi, S., Neri, M., Lando, C., et al, 2003.** « *Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes : results from the Human Micronucleus Project* ». Mutation Research **543**:155-166.
- Bonassi, S., Au, W.W., 2002.** « *Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction* ». Mutation Research **511**:73-86.
- Bosetti, C., Boffetta, P., La Vecchia, C., 2007.** « *Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers : a quantitative review to 2005* ». Annals of Oncology **18**:431-446.
- Botta, A., 2007.** *Biotransformation des HAP et des nitro-HAP- Influence du polymorphisme génétique des enzymes métaboliques.* Dernière mise à jour : date inconnue. Page visitée le 24 septembre 2009 : http://www.sante-securite-paca.org/1_savoir/risques_chimiques_cmrr/pdf/hydrocarbures_aromatiques_polycycliques/biotrans.pdf

- Bukvic, N.,** Gentile, M., Susca, F., Fanelli M., Serio, G., Buonadonna, L., Capurso, A., Guanti, G., **2001.** « *Sex chromosome loss, micronuclei, sister chromatid exchange and aging : a study including 16 centenarians* ». Mutation Research **498**:159-167.
- Burczynski, M.E.,** Penning, T.M., **2000.** « *Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor* ». Cancer Research **60**:908-915.
- Catalán, J.,** Autio, K., Wessman, M., Lindholm, C., Knuutila, S., Sorsa, M., Norppa, H., **1995.** « *Age-associated micronuclei containing centromeres and the X chromosome in lymphocytes of women* ». Cytogenetic Cell Genetic **68**:11-16.
- Cavalieri, E.L.,** Rogan, E.G., **1995.** « *Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons* ». Xenobiotica **25**(7):677-688.
- Cavalieri, E.L.,** Rogan, E.G., **1992:** « *The approach to understanding aromatic hydrocarbon carcinogenesis. The central role of radical cations in metabolic activation* ». Pharmacology and Therapeutics **55**:183-199.
- Chai, C.Y.,** Huang, Y.C., Hung, W.C., Kang, W.Y., Chen W.T., **2007.** « *Arsenic salt-induced DNA damage and expression of mutant p53 and COX-2 proteins in SV-40 immortalized human uroepithelial cells* ». Mutagenesis **6**:403-408.
- Chattopadhyay, A.,** Choudhury, S., Chatterjee, A., **1997.** « *Modulation of the clastogenic activity of bleomycin by reduced-glutathione, glutathione-ester and l-homocysteine sulphoximine* ». Mutagenesis **12**(4):221-225.
- Cho, Y.H.,** Chung, H.W., **2003.** « *The effect of extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EMF) on the frequency of micronuclei and sister chromatid exchange in human lymphocytes induced by benzo-a-pyrene* ». Toxicology Letters **143**(1):37-44.
- Chung, H.W.,** Kang, S.J., Kim, S.Y., **2002.** « *A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol* ». Mutation Research **516**:49-56.
- Clare, G.,** Clements, J., **2001.** « *Industrial genotoxicology group (IGG) : cytotoxicity in vitro, Royal Society of Medicine, London, UK, 6december 1999* ». Mutagenesis **16**(2):179-182.
- Cleaver, J.E.,** **2005.** « *Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair* ». Nature Reviews Cancer **5**:564-573.

- Collins, A.R., 2004.** « *The comet assay for DNA damage and repair : principles, applications and limitations* ». Molecular Biotechnology **26**(3):249-261.
- Conney, A.H., 1982.** « *Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons* ». Cancer Research **4**:4875-4917.
- Conseil national de recherches du Canada, 1983.** « *Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment : formation, sources, fate and effects on the aquatic environment* ». CNRC n°18981, Comité associé sur les critères scientifiques concernant l'état de l'environnement, Ottawa.
- Cordonnier, A., 2010.** *Mécanismes de tolérance des dommages à l'ADN*. Dernière mise à jour le 28 mai 2010. Page consultée le 30 août 2010 : http://idg.u-strasbg.fr/images/Team_3/fig01f.jpg
- Cortés-Ledesma, F., Aguilera, A., 2006.** « *Double-strand breaks arising by replication through a nick are repaired by cohesion-dependent sister-chromatid exchange* ». European Molecular Biology Organization **7**(9):919-926.
- Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhrer, S., van Benthem, J., Vanparys, P., 2008.** « *ECVAM retrospective validation of in vitro micronucleus test (MNT)* ». Mutagenesis **23**(4):271-283.
- Countryman, P.I., Heddle, J.A., 1976.** « *The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes* ». Mutation Research **41**(2-3):321-332.
- CSST - Commission de la Santé et de la Sécurité du Travail du Québec, 2003.** *L'exposition au plomb. Guide de prévention* DC200-16161-1(04-07), 2^{ème} éd- ISBN-2-550-42326-7.
- Czub, J., Adamus, T., Banas, D., Braziewicz, J., Choinski, J., Dyczewski, J., Jaskóla, A., Korman, A., Szeplinski, Z., Wójcik, A., 2009.** « *The Warsaw cyclotron facility with a horizontal beam for radiological studies* ». Dernière mise à jour : 18 décembre 2009. Page consultée le 22 août 2010. <http://www.slcj.uw.edu.pl/en/62.html>
- D'Assoro, A.B., Lingle, W.L., Salisbury, J.L., 2002.** « *Centrosome amplification and the development of cancer* ». Oncogene **21**:6146-6153.

- Darroudi, F.**, Meijers, C.M., Hadjidekova, V., Natarajan, A.T., **1996**. « *Detection of aneugenic and clastogenic potential of X-rays , directly and indirectly acting chemicals in human hepatoma (Hep G2) and peripheral blood lymphocytes, using the micronucleus assay and fluorescent in situ hybridization with a DNA centromeric probe* ». Mutagenesis **11**(5):425-433.
- Decordier, I.**, Papine, A., Plas, G., Roesems, S., Vande Loock, K., Moreno-Palomo, J., Cemeli, E., Anderson, D., Fusic, A., Marcos, R., Soussaline, F., Kirsch-Volders, M., **2009**. « *Automated image analysis of cytokinesis-blocked micronuclei : an adapted protocol and a validated scoring procedure for biomonitoring* ». Mutagenesis **24**:85-93.
- Decordier, I.**, Cundari, E., Kirsch-Volders, M., **2008**. « *Survival of aneuploid, micronucleated and/or polyploidy cells : crosstalk between ploidy control and apoptosis* ». Mutation Research **651**:30-39.
- Decordier, I.**, Cundari, E., Kirsch-Volders, M., **2005**. « *Influence of caspase activity on micronuclei detection : a possible role for caspase-3 in micronucleation* ». Mutagenesis **20**(3):173-179.
- Decordier, I.**, Dillen, L., Cundari, E., Kirsch-Volders, M., **2002**. « *Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules* ». Mutagenesis **17**:337-344.
- Degen, G.H.**, Gerber, M.M., Obrecht-Pflumio, S., Dirheimer, G., **1997**. « *Induction of micronuclei with ochratoxin A in ovine seminal vesicle cell cultures* ». Archives of Toxicology **71**(6):365-371.
- Delacôte, F.**, Lopez, B.S., **2008**. « *Importance of the cell cycle phase for the choice of appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance* ». Cell Cycle **7** (1):33-38.
- Descamps, S.**, Prigent, C., Aurora, A.B.C., **2002**. « *À l'aube d'une nouvelle connexion entre l'amplification des centrosomes, l'aneuploïdie et le cancer ?* Médecine et Sciences (Paris) **18**:474-480.
- Dhillon, V.S.**, Thomas, P., Iarmarcovai, G., Kirsch-Volders, M., Bonassi, S., Fenech, M. **2011**. « *Genetic polymorphisms of genes involved in DNA repair and metabolism*

influence micronucleus frequencies in human peripheral blood lymphocytes ». Mutagenesis **26**(1):33-42.

Dhillon, V.S., Thomas, P., Fenech, M., **2009**. « *Effect of common polymorphisms in folate uptake and metabolism genes on frequency of micronucleated lymphocytes in a South Australian cohort* ». Mutation Research **665**:1-6.

Di Giorgio, C., De Méo, M.P., Laget, M., Guiraud, H., Botta, A., Duménil, G., **1994**. « *The micronucleus assay in human lymphocytes: screening for interindividual variability and application to biomonitoring* ». Carcinogenesis **15** (2):313-317.

Digue, L., Orsière, T. De Méo, M., Mattéi, M.G., Duffaud, F., Favre, R., Botta, A., **1999**. « *Evaluation of the genotoxicity activity of paclitaxel by the in vitro micronucleus test in combination with fluorescent in situ hybridization of a DNA centromeric probe and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (Comet assay) in human T-lymphocytes* ». Environmental and Molecular Mutagenesis **34**:269-278.

Dipple, A., **1994**. « *Reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons with DNA* ». IARC Science Publications **125**:107-129.

do Céu Silva, M., Gaspar, J., Duarte Silva, I., Faber, A., Rueff, J., **2004**. « *GSTM1, GSTT1, and GSTP1 Genotypes and the genotoxicity of hydroquinone in human lymphocytes* ». Environmental and Molecular Mutagenesis **43**:258-264.

Dreij, K., Seidel, A., Jernström, B., **2005**. « *Differential removal of DNA adducts derived from anti-diol-epoxides of dibenzo-a,l-pyrene and benzo-a-pyrene in human cells* ». Chemical Research in Toxicology **18**(4):655-664.

Duan, H., Leng, S., Pan, Z., Dai, Y., Niu, Y., Huang, C., Bin, P., Wang, Y., Liu, Q. Chen, W., Zheng, Y., **2009**. « *Biomarkers measured by cytokinesis-block micronucleus cytome assay for evaluating genetic damages induced by polycyclic aromatic hydrocarbons* ». Mutation Research **677**:93-99.

Duthie, S.J., Narayanan, S., Brand, G.M., Pirie, L., Grant, G., **2002**. « *Impact of folate deficiency on DNA stability* ». The Journal of Nutrition **132**(8):2444S-2449S.

Eastmond, D.A., Tucker, J.D., **1989**. « *Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore* ». Environmental and Molecular Mutagenesis **13**:34-43.

- Eaton, D.L.**, Farin, F.M., Omiecinski, C.J., Omenn, G.S., **1998**. « *Genetic susceptibility* ». Environmental and Occupational Medicine 3ème édition (Rom WN édition), pp 209-221.
- Elespuru, R.K.**, **1996**. « *Future approaches to genetic toxicology risk assessment* ». Mutation Research **365**(1-3):191-204.
- Elhajouji, A.**, Tibaldi, F., Kirsch-Volders, M., **1997**. « *Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human lymphocytes* ». Mutagenesis **12**:133-140.
- Elhajouji, A.**, Van Hummelen, P., Kirsch-Volders, M., **1995**. « *Indications for a threshold of chemically-induced aneuploidy in vitro in human lymphocytes* ». Environmental and Molecular Mutagenesis **26**:292-304.
- Elhajouji, A.**, Santos, A.P., Van Hummelen, P., Kirsch-Volders, M., **1994**. « *Metabolic differences between whole blood and isolated lymphocyte cultures for micronucleus (MN) induction by cyclophosphamide and benzo-a-pyrene* ». Mutagenesis **9**(4):307-313.
- Ellard, S.**, Mohammed, Y., Dogra, S., Wölfel, J. Doehmer, Parry, J.M., **1991**. « *The use of genetically engineered V79 Chinese hamster cultures expressing rat liver CYP1A1, 1A2 and 2B1 cDNAs in micronucleus assay* ». Mutagenesis **6**:461-470.
- Evans, H.**, O'Riordan, M., **1975**. « *Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests* ». Mutation Research **31**:135-148.
- Fenech, M.**, **2009**. « *A lifetime passion for micronucleus cytome assays-reflections from Down under* ». Mutation Research **681**:111-117.
- Fenech, M.**, **2008**. « *The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage* ». Methods in Molecular Biology **410**:185-216.
- Fenech, M.**, **2007**. « *Cytokinesis-block micronucleus cytome assay* ». Nature protocols **2**(5):1084-1104.
- Fenech, M.**, Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E., **2003**. « *HUMN project : detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures* ». Mutation Research **534**:65-75.

- Fenech, M., 2002.** « *Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer* ». Drug Discovery Today **7**(22):1128-1137.
- Fenech, M., 2000.** « *The in vitro micronucleus technique* ». Mutation Research **455**:81-95.
- Fenech, M., Crott, J., Turner, J., Brown, S., 1999.** « *Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay : description of the method and results for hydrogen peroxide* ». Mutagenesis **14**(6):605-612.
- Fenech, M., Aitken, C., Rinaldi, J., 1998.** « *Folate, vitamin B12, homocysteine status and DNA damage in young Australian adults* ». Carcinogenesis **19**(7):1163-1171.
- Fenech, M., Neville, S., Rinaldi, J., 1994.** « *Sex is an important variable affecting spontaneous micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes* ». Mutation Research **313**:203-207.
- Fenech, M., 1993.** « *The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations* ». Mutation Research **285**(1):35-44.
- Fenech, M., Morley, A.A., 1989.** « *Kinetochores detection in micronuclei : an alternative method for measuring chromosome loss* ». Mutagenesis **4**(2):98-104.
- Fenech, M., Morley, A.A., 1986.** « *Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation* ». Mutation Research **161**(2):193-198.
- Fenech, M., Morley, A.A., 1985.** « *Measurement of micronuclei in lymphocytes* ». Mutation Research **147**(1-2):29-36.
- Fentiman, I.S., Allen, D.S., Hamed, H., 2005.** « *Smoking and prognosis in women with breast cancer* ». International Journal of Clinical Practice **59**(9):1051-1054.
- Fitzgerald, P.H., McEwan, C.M., 1977.** « *Total aneuploidy and age-related sex chromosome aneuploidy in cultured lymphocytes of normal men and women* ». Human Genetics **39**(3):329-337.
- Fitzgerald, P.H., 1975.** « *A mechanism of X chromosome aneuploidy in lymphocytes of aging women* ». Humangenetik **28**(2):153-158.
- Fletcher, L., Muschel, R.J., 2006.** « *The centrosome and the DNA damage induced checkpoint* ». Cancer Letters **243**:1-8.

- Forni, A.,** Guanti, G., Bukvic, N., Ferri, G., Foà, V., **1996.** « *Cytogenetic studies in coke oven workers* ». Toxicology Letters **88**:185-189.
- Fortin, F.,** Viau, C., Lemieux, N., **2008.** *Contribution de la cytogénétique à l'étude de la génotoxicité des HAP.* Institut National de Santé Publique du Québec **19**(5) :12-14.
- Fowler, P.,** Whitwell, J., Jeffrey, L., Young, J., Smith, K., Kirkland, D., **2010.** « *Etoposide; colchicines; mitomycin C and cyclophosphamide tested in the in vitro mammalian cell micronucleus test (MNvit) in Chinese hamster lung (CHL) cells at Covance laboratories; Harrogate UK in support of OECD draft Test Guideline 487* ». Mutation Research **702**(2):175-180.
- Friedberg, E.C.,** **2003.** « *DNA damage and repair* ». Nature **421**:436-440.
- Fuchs, R.,** Tessier, A., **2005.** *Réparation de l'ADN et cancer.* Cancérologie fondamentale, John Libbey Eurotext, Monographie, ISBN 2-7420-0564-1, pp 121-129.
- Fukasawa, K.,** **2005.** « *Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development* ». Cancer Letters **230**:6-19.
- Galloway, S.M.,** Buckton, K.E., **1978.** « *Aneuploidy and aging : chromosome studies on a random sample of the population using G-banding* ». Cell Cytogenetics **20**:78-95.
- Ganguly, B.B.,** **1993.** « *Cell division, chromosomal damage and micronucleus formation in peripheral lymphocytes of healthy donors : related to donor's age* ». Mutation Research **295**(3):135-148.
- Garcia-Sagredo, J.M.,** **2008.** « *Fifty years of cytogenetics : a parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology* ». Biochimica et Biophysica Acta **1779**:363-375.
- Gelboin, H.V.,** **1980.** « *Benzo-a-pyrene metabolism, activation and carcinogenesis : role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes* ». Physiology Reviews **60**:1107-1166.
- Ghaisas, S.D.,** Bhide, S.V., **1994.** « *In vitro studies on chemoprotective effect of purnark against benzo-a-pyrene-induced chromosomal damage in human lymphocytes* ». Cell Biology International **18**(1):21-27.
- Gu, Z.W.,** Whong, W.Z., Wallace, W.E., Ong, T.M., **1992.** « *Induction of micronuclei in BALB/c-3T3 cells by selected chemicals and complexed mixtures* ». Mutation Research **279**:217-222.

- Guttenbach, M.,** Koschorz, B., Berthaler, U., Grimm, T., Schmid, M., **1995.** « *Sex chromosome loss and aging : in situ hybridization studies on human interphase nuclei* ». *American Journal of Human Genetics* **57**:1143-1150.
- Guttenbach, M.,** Schkowsky, R., Schmid, M., **1994.** « *Aneuploidy and ageing : sex chromosome exclusion into micronuclei* ». *Human Genetics* **94**:295-298.
- Güven, G.S.,** Güven, M., Onaran, I., Ulutin, T., Hacıhanefioglu, S., **2006.** « *Individual sensitivity to cytogenetic effects of benzo[*a*]pyrene in cultured human lymphocytes : influence of glutathione-S-transferase M1 genotype* ». *Genetics and Molecular Biology* **29**(1):142-147.
- Haritash, A.K.,** Kaushik, C.P., **2009.** « *Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) : a review* ». *Journal of Hazardous Materials* **169**:1-15.
- Hashimoto, K.,** Nakajima, Y., Matsumura, S., Chatani, F., **2010.** « *An in vitro micronucleus assay with size-classified micronucleus counting to discriminate aneugens from clastogens* ». *Toxicology in vitro* **24**:208-216.
- Hovhannisyan, G.G.,** **2010.** « *Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology* ». *Molecular Cytogenetics* **3**(17):1-11.
- Hu, E.,** Fu, J., Zhao, P., Yao, B., Qi, Y., Yuan, Z., Zhou, Z., **2010.** « *Diethyl sulfate induced Cdk2-dependent centrosome amplification in CHL cells* ». *Toxicology* **275**(1-3):58-64.
- Huber, R.,** Salassidis, K., Kulka, U., Braselmann, H., Bauchinger, M., **1996.** « *Detection of centromeres in vinblastine- and radiation-induced micronuclei of human lymphocytes using FISH with an α satellite pancentromeric DNA probe* ». *Environmental and Molecular Mutagenesis* **27**:105-109.
- Huguet, F.,** Giocanti, N., Hennequin, C., Croisy, M., Touboul, E., Favaudon, V., **2008.** « *Growth inhibition by STI571 in combination with radiation in human chronic myelogenous leukemia K562 cells* ». *Molecular Cancer Therapeutics* **7**:398-406.
- Huret, J.L.,** **2002.** « *Fanconi anaemia* ». Atlas –ISSN1768-3262. Dernière mise à jour : 01 mars 2010. Page consultée le 11 août 2010.
<http://atlasgeneticsoncology.org/Kprones/FA10001.html>

IARC - International Agency for Research on Cancer, **2010**. « *Air pollution, Part 1, Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbon and some related industrial exposures* ». Monographie, **92**, ISBN 9789283212928, 853 pages. Dernière mise à jour: 18 mai 2010. Page consulté le 15 juillet 2010.

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol92/index.php>

IARC – International Agency for Research on Cancer, **2007**. « *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* ». Monographie, **89**, ISBN 9789283212898, 626 pages. Page consultée le 16 novembre 2010.

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol89/index.php>

Iarmarcovai, G., 2008. *Mutagenèse et cancérogénèse*. Sens Public ISSN : 2104-3272, Revue électronique internationale. Dernière mise à jour : 09 novembre 2008. Page consultée le 11 novembre 2009. <http://www.sens-public.org/spip.php?article516>

Iarmarcovai, G., Bonassi, S., Botta, A., Baan, R.A., Orsière, T., 2008. « *Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of literature* ». Mutation Research **658**:215-233.

Iarmarcovai, G., Bonassi, S., Sari-Minodier, I., Baciuchka-Palmaro, M., Botta, A., Orsière, T., 2007a. « *Exposure to genotoxic agents, host factors, and lifestyle influence the number of centromeric signals in micronuclei : a pooled re-analysis* ». Mutation Research **615**:18-27.

Iarmarcovai, G., Botta, A., Orsière, T., 2007b. *Anomalies chromosomiques de nombre, instabilité génétique et expositions professionnelles*. Bulletin du Cancer **94**(4) :381-388.

Iarmarcovai, G., Botta, A., Orsière, T., 2007c. *Micronoyaux et polymorphismes génétiques : de l'exposition à la susceptibilité*. Annales de Biologie Clinique **65**(4):357-363.

Iarmarcovai, G., Botta, A., Orsière, T., 2006. « *Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy* ». Toxicology Letters **166**:1-10.

Ishidate, M.Jr, Hamois, M.C., Sofuni, T., 1988. « *A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemicals substances tested in mammalian cell cultures* ». Mutation Research **195**(2):151-213.

- Janiaud, P.,** Averbeck, D., Moustachi, E., **1985.** *Mutagenèse et toxicologie génétique : acquis théoriques et méthodologiques.* Monographie ISBN 2855982804, 255 pages.
- Janik-Spiechowicz, E.,** Wyszynska, K., Dziubaltowska, E., **1998.** « *Genotoxicity evaluation of trimethylbenzenes* ». Mutation Research **412**(3):299-305.
- Jeanpierre, M.,** Jonveaux, P., Lacombe, D., Leporrier, N., Lyonnet, S., Moraine, C., **2004.** *Génétique médicale : formelle, chromosomique, moléculaire, clinique.* Monographie ISBN 229400812X, chap **8**:68-83.
- Jin, X.,** Chen, Q., Tang, S.S., Zou, J.J., Chen, K.P., Zhang, T., Xiao, X.L., **2009.** « *Investigation of quinocetone-induced genotoxicity in HepG2 cells using the comet assay, cytokinesis-block micronucleus test and RAPD analysis* ». Toxicology in vitro **23**(7):1209-1214.
- Kalina, I.,** Brezáni, P., Gajdosova, D., Binkova, B., Salagovic, J., Habalova, V., Mrackova, G., Dobias, L., Sram, R.J., **1998.** « *Cytogenetic monitoring in coke oven workers* ». Mutation Research **417**:9-17.
- Kammann, U.,** Bunke, M., Steinhart, H., Theobald, N., **2001.** « *A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay* ». Mutation Research **498**(1-2):67-77.
- Kazimírová, A.,** Barancoková, M., Dzupinková, Z., Wsóllová, L., Dusinská, M., **2009.** « *Micronuclei and chromosomal aberrations, important markers of ageing : possible association with XPC and XPD polymorphisms* ». Mutation Research **661**:35-40.
- Kériel, A.,** **2002.** Implications de la kinase de TFIIH dans les mécanismes de régulation de la transcription. Thèse de doctorat. Dernière mise en page : date inconnue. Page visitée le 19 juin 2010 : eprints-scd-ulp.u-strasbg.fr:8080/126/01/html...
- Kierszenbaum, A.L.,** **2002.** « *Sperm axonem : a tale of tubulin posttranslation diversity* » Molecular Reproduction and Development **62**(1):1-3.
- Kim, Y.J.,** Choi, J.Y., Cho, Y.H., Woo, H.D., Chung, H.W., **2010.** « *Micronucleus-centromere assay in workers occupationally exposed to low level of benzene* » Human and Experimental Toxicology **29**(5):343-350.

- Kirsch-Volders, M., De Boeck, M., Lison, D., 2002a.** *Génotoxicité et activité professionnelle.* Encyclopédie Médico-chirurgicale, Toxicologie-Pathologie professionnelle 16-537-C10, 9 pages.
- Kirsch-Volders, M., De Boeck, M., Lison, D., 2002b.** *Tests de génotoxicité.* Encyclopédie Médico-Chirurgicale, Toxicologie-Pathologie professionnelle 16-537-C-11, 4 pages.
- Kjeldsen, E., Kolvraa, S., 2001.** « *FISH techniques, FISH probes and their applications in medicine and biology* » An overview. Springer Lab Manual chap1:3-50.
- Knudson, A.G., 2001.** « *Two genetic hits (more or less) to cancer* » Nature Reviews Cancer 1:157-162.
- Kocaman, A.Y., Topaktas, M., 2007.** « *In vitro evaluation of the genotoxicity of acetamiprid in human peripheral blood lymphocytes* » Environmental and Molecular Mutagenesis 48:483-490.
- Köteles, G.J., Bojtor, I., Szirmai, S., Bérces, J., Otos, M., 1993.** « *Micronucleus frequency in cultured lymphocytes of an urban population* ». Mutation Research 319(4):267-271.
- Kramer, P.J., 1998.** « *Genetic toxicology* ». Journal of Pharmacy and Pharmacology 50:395-405.
- Lacave, R., 2005.** *Histoire naturelle des cancers. Biologie des lésions précancéreuses.* Cancérologie fondamentale, Monographie ISBN2-7420-0564-1:165-172.
- Lauwerys, R.R., Haufroid, V., Hoet, P., Lison, D., 2007.** *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles*, 5^{ème} édition. Elsevier Masson SAS, Monographie ISBN : 978-2-294-01418-5, chapitre 2:26-28, chapitre 5:89-107.
- Leach, N.T., Jackson-Cook, C., 2004.** « *Micronuclei with multiple copies of the X chromosome : do chromosomes replicate in micronuclei ?* ». Mutation Research 554:89-94.
- Leach, N.T., Jackson-Cook, C., 2001.** « *The application of spectral karyotyping (SKY) and fluorescent in situ hybridization (FISH) technology to determine the chromosomal content(s) of micronuclei* ». Mutation Research 495:11-19.
- Leguay, T., Mahon, F-X, 2005.** *Leucémie myéloïde chronique.* Encyclopédie Médico-Chirurgicale (EMC)-hématologie 2(3):187-205.

- Lehmann, A.R., 2002.** « *Replication of damaged DNA in mammalian cells: a new solutions to an old problem* ». Mutation Research **509**:23-34.
- Lehucher-Michel, M.P.,** Ait Amara-Mokrane, Y., Devictor, B., Catilina, P., Botta, A., **1996.** « *Micronuclei kinetics of exfoliated urothelial cells* ». Mutation Research **354**:1-7.
- Leng, S.,** Dai, Y., Niu, Y., Pan, Z., Li, X., Cheng, J., He, F., Zheng, Y, **2004.** « *Effects of genetic polymorphisms of metabolic enzymes on cytokinesis-block micronucleus in peripheral blood lymphocyte among coke-oven workers* ». Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention **13**(10):1631-1639.
- Lindberg, H.K.,** Falck, G.C.-M., Järventaus, H., Norppa, H., **2008.** « *Characterization of chromosomes and chromosomal fragments in human lymphocyte micronuclei by telomeric and centromeric FISH* ». Mutagenesis **23**(5):371-376.
- Lingle, W.L.,** Barrett, S.L., Negron, V.C., D'Assoro, A.B., Boeneman, K., Liu, W., Whitehead, C.M., Reynolds, C., Salisbury, J.L., **2002.** « *Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development* ». Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(4):1978-1983.
- Liviak, D.,** Creus, A., Marcos, R., **2009.** « *Genotoxicity analysis of two halonitromethanes, a novel group of disinfection by-products (DBPs), in human cells treated in vitro* ». Environmental Research **109**:232-238.
- Lo Jacono, F.,** Stecca, C., Duverger, M., **1992.** « *Mutagenic activation of benzo-a-pyrene by human red blood cells* ». Mutation Research **268**:21-26.
- Luch, A., 2005.** « *Nature and nurture-Lessons from chemical carcinogenesis* ». Nature Reviews-Cancer **5**:113-125.
- Luch, A.,** Baird, W.M., **2005.** « *Metabolic activation and detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons* ». The carcinogenic effects polycyclic of aromatic hydrocarbons, Monographie ISBN 1860944175 chapitre **2**:19-96.
- Maître, A., 2008.** *Méthodes d'évaluation de l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et étude des mélanges*. Bulletin d'information en santé environnementale (BISE), INSPQ **19**(5) :6.
- Marie, C.,** Bouchard, M., Heredia-Ortiz, R., Viau, C., Maître, A., **2010.** « *A toxicogenetic study to elucidate 3-hydroxybenzo(a)pyrene atypical urinary excretion profile*

- following intravenous injection of benzo(a)pyrene in rats* ». Journal of Applied Toxicology **30**:402-410.
- Marie, C., 2007.** *Recherche de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques à travers l'étude des lésions de l'ADN chez l'homme.* Thèse de doctorat présentée à l'Université Joseph Fourier de Grenoble I, France, 234 pages.
- Masumoto, H.,** Masukata, H., Muro, Y., Nozaki, N., Okasaki, T., **1989.** « *A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite* ». The Journal of Cell Biology **109**:1963-1973.
- Mateuca, R.,** Lombaert, N., Aka, P.V., Decordier, I., Kirsch-Volders, M., **2006.** « *Chromosomal changes : induction, detection methods and applicability in human biomonitoring* ». Biochimie **88**:1515-1531.
- Matsuoka, A.,** Matsuura, K., Sakamoto, H., Hayashi, M., Sofuni, T., **1999.** « *A proposal for a simple way to distinguish aneugens from clastogens in the in vitro micronucleus test* ». Mutatgenesis **14**(4):385-389.
- Matsuoka, A.,** Matsuura, K., Sakamoto, H., Hayashi, M., Sofuni, T., **1998.** « *Spindle disturbances induced by benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in a Chinese hamster cell line V79-MZ and the stability of the numerical chromosome aberrations that follow* ». Mutation Research **419**(1-3):1-12.
- Matsuoka, A.,** Ozaki, M., Takeshita, K., Sakamoto, H., Glatt, H-R., Hayashi, M., Sofuni, T., **1997.** « *Aneuploidy induction by benzo[a]pyrene and polyploidy induction by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in Chinese hamster cell lines V79-MZ and V79* ». Mutagenesis **12**(5):365-372.
- Matsuoka, A.,** Yamazaki, N., Suzuki T., Hayashi, M., Sofuni, T., **1993.** « *Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional in vitro chromosomal aberration test* ». Mutation Research **272**:223-236.
- Matsuoka, S.,** Ballif, B.A., Smogorzewska, A., Mc Donald III, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., Bakalarski, C., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., Shiloh, Y., Gygi, S.P., Elledge, S.J., **2007.** « *ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage* ». Science **316**:1160-1166.

- Mattiuzzo, M.**, Fiore, M., Ricordy, R., Degrassi, F., **2006**. « *Aneuploidy-inducing capacity of two widely used pesticides* ». Carcinogenesis **27**(12):2511-2518.
- Meschini, R.**, Marotta, E., Berni, A., Filippi, S., Fiore, M., Mancinelli, P., Natarajan, A.T., Palitti, F., **2008**. « *DNA repair deficiency and BPDE-induced chromosomal alterations in CHO cells* ». Mutation Research **637**(1-2):93-100.
- Milić, M.**, Kasuba, V., Orescanin, V., Zeljezic, D., Kopjar, N., Rozgaj, R., **2008**. « *Chromosome damage in workers in cigarette manufacturing industry* ». Journal of Applied Toxicology **28**:399-404.
- Miller, B.**, Pötter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D., Madle, S., **1998**. « *Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay : position of the GUM working group on the in vitro micronucleus test* ». Mutation Research **410**:81-116.
- Miller, E.C.**, Miller, J.A., **1981**. « *Mechanism of chemical carcinogenesis* ». Cancer **47**:1055-1064.
- Miller, K.P.**, Ramos, K.S., **2001**. « *Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo-a-pyrene and related hydrocarbons* ». Drug Metabolism Reviews **33**(1):1-35.
- Ministère de l'environnement de l'Ontario, 1985**. « *Review of benzo[a]pyrene. Occurrence, human exposure and health effects* ». Rédigé par Canviro Consultants Ltd, Kitchener et Toronto.
- Miyakoshi, Y.**, Suzuki, Y., Ooida, M., Takahashi, A., Tsukui, M., **1999**. « *Micronucleus test using cultured new born rat astrocytes* ». Industrial Health **37**(1):95-102.
- Muleris, M.**, Richard, F., Apiou, F., Dutrillaux B., **1996**. *Hybridation in situ en cytogénétique moléculaire, Principes et techniques*. Tec et Doc Lavoisier et Éditions Médicales Internationales, Paris p.15.
- Muller, H.J.**, **1927**. « *Artificial transmutation of the gene* ». Science **66**:84-87.
- Murgia, E.**, Ballardini, M., Bonassi, S., Rossi, A., M., Barale, R., **2008**. « *Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested cas-control study* ». Mutation Research **639**:27-34.

- Nakagome, Y.**, Abe, T., Misawa, S., Takeshita, T., Inuma, K., **1984**. « *The “loss” of centromeres from chromosomes of aged women* ». American Journal of Human Genetics **36**:398-404.
- Nantel, A.J.**, Gérin, M., Gosselin, P., Cordier, S., Viau, C., Quénel, P., Dewailly, É., **2003**. *Évaluation clinique en santé environnementale*. Environnement et santé publique-Fondements et pratiques, Monographie ISBN 2891301935, 274300603X (Tec et Doc), chapitre **34**:871-880.
- Natarajan, A.T.**, Palitti, F., **2008**. « *DNA repair and chromosomal alterations* ». Mutation Research **657**:3-7.
- Nath, J.**, Tucker, J.D., Hando, J.C., **1995**. « *Y chromosome aneuploidy, micronuclei, kinetochores and aging in men* ». Chromosoma **103**:725-731.
- Nguyen, H.G.**, Ravid, K., **2006**. « *Tetraploidy/aneuploidy and stem cells in cancer promotion : the role of chromosome passenger proteins* ». Journal of Cellular Physiology **208**:12-22.
- Norppa, H.**, Bonassi, S., Hansteen, I.L., Hagmar, L., Stromberg, U., Rossner, P. et al, **2006**. « *Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk* ». Mutation Research **600**(1-2):37-45.
- Norppa, H.**, **2004**. « *Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms* ». Toxicology Letters : **149**:309-334.
- Norppa, H.**, Falck, G.C., **2003**. « *What do human micronuclei contain ?* ». Mutagenesis **18**:221-233.
- Nowinski, G.P.**, van Dyke, D.L., Tilley, B.C., Jacobsen, G., Babu, V.R., Worsham, M.J., Wilson, G.N., Weiss, L., **1990**. « *The frequency of aneuploidy in cultured lymphocytes is correlated with age and gender but not with reproductive history* ». American Journal of Human Genetics **46**:1101-1111.
- Obe, G.**, Pfeiffer, P., Savage, J.R.K., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P., Natarajan, A.T., Martínez-López, W., Folle, G.A., Drets, M.E, **2002**. « *Chromosomal aberrations : formation, identification and distribution* ». Mutation Research **504**:17-36.

- Obe, G.,** Beek, B. and Dudin, G., **1975.** « *The human leukocyte test system V.DNA synthesis and mitosis in PHA-stimulated 3-day cultures* ». Humangenetik **28**(4):295-302.
- Odagiri, Y.,** Uchida, H., Shibasaki, S., **1997.** « *Interindividual variation in cytogenetic response to X-ray and colchicines measured with the cytokinesis-block micronucleus assay* ». Mutation Research **381**:1-13
- OECD** - Organisation for Economic Co-operation and Development, **2009.** « *In vitro Mammalian cell Micronucleus test (MNVIT)* ». OECD Guidelines for the testing of chemicals draft proposal for a new guidelines **487**:1-24.
- OECD** - Organisation for Economic Co-operation and Development, **1997.** « *In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test (CAT)* ». OECD Publishing, Paris **473**:1-24.
- OFSP** - Office fédéral de la santé publique, **2008.** *Les hydrocarbures aromatiques polycycliques.* Département fédéral de l'intérieur de la Confédération Suisse, Fiche d'information.
- Okano, P.,** Miller, H.N., Robinson, R.C., Gelboin, H.V., **1979.** « *Comparison of benzo-a-pyrene and (-)-trans-7,8-dihydro-7,8-dihydrobenzo-a-pyrene metabolism in human blood monocytes and lymphocytes* ». Cancer Research **39**:3184-3193.
- Olaharski, A.J.,** Sotelo, R., Solorza-Luna, G., Gonsbatt, M., E., Guzman, P., Mohat, A., et al, **2006.** « *Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis* ». Carcinogenesis **27**:337-343.
- Olivier, M-J.,** **2007.** *La pollution par les produits organiques anthropiques.* Chimie de l'environnement, 5^{ème} édition, chapitre 6, Productions Jacques Bernier, Lévis. Monographie ISBN 978-2-9810039-0-4.
- Onaran, I.,** Güven, G., Ozaydin, A., Ulutin, T., **2001.** « *The influence of GSTM1 null genotype on susceptibility to in vitro oxidative stress* ». Toxicology **157**(3):195-205.
- Orsière, T.,** Iarmarcovai, G., Botta, A., **2008.** *Les micronoyaux, un biomarqueur de susceptibilité ?* Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement **69**:475-484.

- Orsière, T.**, Sari-Minodier, I., Decome, L., Botta, C., Iarmarcovai, G., Botta, A., **2005**. *De la génotoxicologie à la biosurveillance*. Journées Nationales de Santé au Travail dans le BTP, Annales **28**:25-28.
- Park, J-H.**, Troxel, A.B., Harvey, R.G., Penning, T.M., **2006**. « *PAH-o-quinones produced by aldo-keto reductases (AKRs) generate abasic sites, oxidized pyrimidines and 8-oxo-dGuo via reactive oxygen species* ». Chemical Research in Toxicology **19**(5):719-728.
- Parkinson, A.**, **2001**. « *Biotransformation of xenobiotics* ». Casarett and Doull's Toxicology - The basic science of poisons – chap **6**:133-224. Monographie ISBN 0-07-134721-6.
- Parry, E.M.**, Parry, J.M., Corso, C., Doherty, A., Haddad, F., Hermine, T.F., Johnson, G., Kayani, M., Quick, E., Warr, T., Williamson, J., **2002**. « *Detection and characterization of mechanisms of action of aneugenic chemicals* ». Mutagenesis **17**(6):509-521.
- Pastor, S.**, Creus, A., Parrón, T., Cebulska-Wasilewska, A., Siffel, C., Piperakis, S., Marcos, R., **2003**. « *Biomonitoring of four European populations occupationally exposed to pesticides : use of micronuclei as biomarkers* ». Mutagenesis **18**(3):249-258.
- Pathak, S.**, Multani, A.S., **2006**. « *Aneuploidy, stem cells and cancer* ». Cancer :cell structures, carcinogens and genomic instability, Monographie ISBN 13:978-3-7643-7156-2, pp:49-64.
- Pavanello, S.**, Bollati, V., Pesatori, A.C., Kapka, L., Bolognesi, C., Bertazzi, P.A., Baccarelli, A., **2009**. « *Global and gene-specific promoter methylation changes are related to anti-B[a]PDE-DNA adduct levels and influence micronuclei levels in polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed individuals* ». International Journal of Cancer **125**:1692-1697.
- Pavanello, S.**, Kapka, L., Siwinska, E., Mielzyńska, D., Bolognesi, C., Clonfero, E., **2008**. « *Micronuclei related to anti-B[a]PDE-DNA adduct in peripheral blood lymphocytes of heavily polycyclic aromatic hydrocarbon-exposed nonsmoking coke-oven workers and controls* ». Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention **17**(10):2795-2799.

- Peltonen, K., Dipple, A., 1995.** « *Polycyclic aromatic hydrocarbons : chemistry of DNA adduct formation* ». Journal of Occupational and Environmental Medicine **37**(1):52-58.
- Perry, P., Wolff, S., 1974.** « *New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids* ». Nature **251**(5471):156-158.
- Pfeiffer, P., Goedecke, W., Obe, G., 2000.** . « *Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations* ». Mutagenesis **15**(4):289-302.
- Pfohl-Leszkowicz, A., 2008.** *Intérêt de la détection des adduits à l'ADN comme biomarqueur d'effet précoce dans le développement de cancer.* Conférence-Sol pollué, Toulouse, 23 octobre 2008. Page consultée le 03 novembre 2009 : <http://www.ecolab.ups-tlse.fr/IMG/pdf/A-Leszkowicz-INPT.pdf>
- Phillips, D.H., 1999.** « *Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet* ». Mutation Research **443**(1-2):139-147.
- Pinkel, D., Straume, T., Gray, J.W., 1986.** « *Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization* ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **83**:2934-2938.
- Poirier, M.C., 2004.** « *Chemical-induced DNA damage and human cancer risk* ». Nature Reviews-Cancer **4**:630-637.
- Pourquier, P., 2006.** *La réparation de l'ADN, cible potentielle d'un développement thérapeutique en cancérologie.* Bulletin du Cancer **93**(Numéros hors-série 1-6):124-144.
- Preston, R.J., Hoffmann, G.R., 2001.** « *Genetic toxicology* ». Casarett and Doull's Toxicology, The basic Science of Poisons, 6th ed, New York : McGraw-Hill, Monographie ISBN 0-07-134721-6, pp 321-350.
- Prevedouros, K., Brorstrom-Lunden, E., J.H.C, Jones, K.C, Lee, R.G., Sweetman, A.J., 2004.** « *Seasonal and long-term trends in atmospheric PAH concentrations : evidence and implication* ». Environmental Pollution **128**(1-2):17-27.
- Quéro, L., Giocanti, N., Hennequin, C., Favaudon, V., 2010.** « *Antagonistic interaction between bicalutamideTM(casodex®) and radiation in androgen-positive prostate LNCaP cells* ». The Prostate **70**(4):401-411

- Radack, K.**, Pinney, S., Livingston, G., **1995**. « *Sources of variability in the human lymphocyte micronucleus assay : a population-based study* ». Environmental and Molecular Mutagenesis **26**(1):26-36.
- Ramírez, M.J.**, Surrallés, J., Puerto, S., Creus, A., Marcos, R., **1997**. « *Aneugenic activity in human cultures lymphocytes. An overall study with colchicines using the micronucleus assay and fluorescence in situ hybridization techniques* ». Mutagenesis **12**(6):405-410.
- Ribas, G.**, Surrallés, J., Carbonell, E., Xamena, N., Creus, A., Marcos, R., **1996**. « *Genotoxicity of the herbicides alachlor and maleic hydrazide in cultured human lymphocytes* ». Mutagenesis **11**(3):221-227.
- Richard, F.**, Muleris, M., Dutrillaux, B., **1994**. « *The frequency of micronuclei with the X chromosome increases with age in human females* ». Mutation Research **316**:1-7.
- Robert, J.**, **2006**. *De la chimiothérapie classique à la chimiothérapie ciblée : les mécanismes de l'oncogénèse aux niveaux cellulaire et moléculaire*. Bulletin du Cancer **93**(hors-série):5-16.
- Rojas, M.**, Cascorbi, I., Alexandrov. E.K., Auburtin, G., Mayer, L., Kopp-Schneider, A., Roots, I., Bartsch, H., **2000**. « *Modulation of benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphism* ». Carcinogenesis **21**(1):35-41.
- Rooney, D.E.**, Czepulkowski, B.H., **1992**. « *Human Cytogenetics-A practical approach* ». Vol I, 2^{ème} éd. Monographie ISBN 0-19-963288-X, 274 pages.
- Rosefort, C.**, Fauth, E., Zankl, H., **2004**. « *Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay* ». Mutagenesis **19**(4):277-284.
- Rosnerova, A.**, Spatova, M., Schunck, C., Sram, R.J., **2011**. « *Automated scoring of lymphocyte micronuclei by the MetaSystems Metafer image cytometry system and its application in studies of human mutagen sensitivity and biodosimetry of genotoxin exposure* ». Mutagenesis **26**(1):169-175.
- RRSE - Réseau de Recherche en Santé Environnementale**, **2009**. Biomarqueurs. Page consultée le 03 novembre 2009 :
<http://www.rrse.ca/fr/recherche/biomarqueurs-intro.htm>.

- RSST** - Règlement sur la Santé et la Sécurité du Travail, **2007**. Règlement [S-2.1, r.19.01]. Éditeur officiel du Québec [RJ-510071]. Dernière mise à jour : 01 février 2011. Page consultée le 10 mars 2011.
http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=3&file=/S_2_1/S2_1R19_01.htm
- Rubin, H., 2001.** « *Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke : a bio-historical perspective with updates* ». Carcinogenesis **22**(12):1903-1930.
- Sadiq, M.F., Khabour, O.F., El-Shanti, H.E., Samawi, H.M., 2000.** « *The effect of trifluoperazine on the genotoxicity of bleomycin in cultured human lymphocytes* ». Drug and Chemical Toxicology **23**(2):361-369.
- Saeter, G., Lee, C.Z., Schwarze, P.E., Ous, S., Chen, D.S., Sung, J.L., Seglen, P.O., 1988.** « *Changes in ploidy distributions in human liver carcinogenesis* ». Journal of the National Cancer Institute **80**:1480-1485.
- Salama, S.A., Sierra-Torres, C.H., Oh, H.Y., Hamada, F.A., Au, W.W., 2001.** « *Variant metabolizing gene alleles determine the genotoxicity of benzo[a]pyrene* ». Environmental and Molecular Mutagenesis **37**:17-26.
- Sari-Minodier, I., Orsière, T., Nikoyan, A., De Méo, M., Botta, A., 2005.** *Applications de la biosurveillance*. Journées Nationales de Santé au Travail dans le BTP, Annales **28**:29-33.
- Sato, N., Mizumoto, K., Nakamura, M., Maehara, N., Minamishima, Y.A., Nishio, S., Nagai, E., Tanaka, M., 2001.** « *Correlation between centrosome abnormalities and chromosomal instability in human pancreatic cells* ». Cancer Genetics and Cytogenetics **126**:13-19.
- Saunders, W.S., Shuster, M., Huang, X., Gharaibeh, B., Enyenihi, A.H., Petersen, I., Gollin, S.M., 2000.** « *Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells* ». Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(1):303-308.
- Schell, C., Popp, W., Kraus, R., Vahrenholz, C., Norpoth, K., 1995.** « *³²P-postlabelling analysis of DNA adducts in different populations* ». Toxicology Letters **77**:299-307.

- Scherer, G., 2005.** « *Biomonitoring of inhaled complex mixtures - Ambient air, diesel exhaust and cigarette smoke* ». Experimental and Toxicologic Pathology **57**:75-110.
- Schmuck, G., Lieb, G., Wild, D., Schiffmann, D., Henschler, D., 1988.** . « *Characterization of an in vitro micronucleus assay with Syrian hamster embryo fibroblasts* ». Mutation Research **203**:397-404.
- Schrader, T.J., Boyes, B.G., Matula, T.I., Héroux-Metcalf, C., Langlois, I., Downie, R.H., 1998.** « *In vitro investigation of toxaphene genotoxicity in S. typhimurium and Chinese hamster V9 lung fibroblasts* ». Mutation Research **413**(2):159-168.
- Schwartz, D., 1993.** *Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes*. 4^{ème} édition. Médecine-Sciences Flammarion (Paris). Monographie ISBN 22557123268.
- Schwartz, J.L., Jordan, R., 1997.** « *Selective elimination of human lymphoid cells with unstable chromosome aberrations by p-53-dependent apoptosis* ». Carcinogenesis **18**:201-205.
- Shimada, T., Fujii-Kuriyama, Y., 2003.** « *Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1* ». Cancer Sciences **95**(1):1-6.
- Shimizu, N., Shimura, T., Tanaka, T., 2000.** « *Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei* ». Mutation Research **448**:81-90.
- Shinmura, K., Iwaizumi, M., Igarashi, H., Nagura, K., Yamada, H., Suzuki, M., Fukasawa, K., Sugimura, H., 2008.** « *Induction of centrosome amplification and chromosome instability in p53-deficient lung cancer cells exposed to benzo[a]pyrene diol epoxide(B[a]PDE)* ». Journal of Pathology **216**(3):365-374.
- Singh, N.P., Mc Coy, M.T., Tice, R.R., Sneider, L.L., 1988.** « *A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells* ». Experimental Cell Research **175**:184-191.
- Sjogren, M., Ehrenberg, L., Rannug, U., 1996.** « *Relevance of different biological assays in assessing initiating and promoting properties of polycyclic aromatic hydrocarbons with respect to carcinogenic potency* ». Mutation Research **358**(1):97-112.

- Slikker, W., Jr**, Andersen, M.E., Bogdanffy, M.S., Bus, J.S., Cohen, S.D., Conolly, R.B., David, R.M., Doerrler, N.G., Dorman, D.C., Gaylor, D.W., Hattis, D., Rogers, J.M., Woodrow Setzer, R., Swenberg, J.A., Wallace, K., **2004**. « *Dose-dependent transitions in mechanisms of toxicity* ». Toxicology and Applied Pharmacology **201**:203-225.
- Smithgall, T.E.**, Harvey, R.G., Penning, T.M., **1988**. « *Spectroscopic identification of o-quinones as the product of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol oxidation catalyzed by dihydrodiol dehydrogenase. A potential route of proximate carcinogen metabolism* ». Journal of Biological Chemistry **263**(4):1814-1820.
- Sonoda, E.**, Sasaki, M.S., Morrison, C., Yamaguchi-Iwai, Y., Takata, M., Takeda, S., **1999**. « *Sister chromatid exchanges are mediated by homologous recombination in vertebrate cells* ». Molecular and Cellular Biology **19**(7):5166-5169.
- Sram, R.J.**, Beskid, O., Binkova, B., Chvatalova, I., Lnenickova, Z., Milcova, A., Solansky, I., Tulupova, E., Bavorosa, H., Ocadlikova, D., Farmer, P.B., **2007**. « *Chromosome aberrations in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair genes polymorphisms* ». Mutation Research **628**:22-33.
- Stone, J.F.**, Sandberg, A.A., **1995**. « *Sex chromosome aneuploidy and aging* ». Mutation Research **338**:107-113.
- Straif, K.**, Baan, R., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Cogliano, V., **2005**. « *Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons* ». Lancet Oncology **6**:931-932.
- Ströck, N.**, **2006**. « *DNA Overview.png* » Dernière mise à jour : 08 février 2006. Page visitée le 04 octobre 2010 :
http://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_Overview.png
- Surowy, H.**, Rinckleb, A., Luedeke, M., Stuber, M., Wecker, A., Varga, D., Maier, C., Hoegel, J., Vogel, W., **2011**. « *Heritability of baseline and induced micronucleus frequencies* ». Mutagenesis **26**(1):111-117.
- Surrallés, J.**, Natarajan, A.T., **1997**. « *Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey* ». Mutation Research **392**(1-2):165-174.

- Surrallés, J.**, Jeppesen, P., Morrison, H., Natarajan, A.T., **1996**. « *Analysis of loss of inactive X chromosomes in interphase cells* ». *American Journal of Human Genetic* **59**:1091-1096.
- Taioli, E.**, Sram, R.J., Binkova, B., Kalina, I., Popov, T.A., Garte, S., Fanner, P.B., **2007**. « *Biomarkers of exposure to carcinogenic PAHs and their relationship with environmental factors* ». *Mutation Research* **620**:16-21.
- Tarantini, A.**, **2010**. *Modulation de la génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) en mélanges*. Thèse de doctorat, École doctorale en Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement (ED-ISCE), Rhône-Alpes.
- Tarantini, A.**, Maître, A., Lefebvre, E., Marques, M., Marie, C., Ravanat, J-L., Douki, T., **2009**. « *Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo(a)pyrene as a pure compound and in a complex mixtures* ». *Mutation Research* **671**:67-75.
- Thierens, H.**, Vral, A., Morthier, R., Aousalah, B., De Ridder, L., **2000**. « *Cytogenetic monitoring of hospital workers occupationally exposed to ionizing radiation using the micronucleus centromere assay* ». *Mutagenesis* **15**(3):245-249.
- Thierens, H.**, Vral, A., De Ridder, L., **1996**. « *A cytogenetic study of radiological workers: effect of age, smoking and radiation burden on the micronucleus frequency* ». *Mutation Research* **360**(2):75-82.
- Thomson, E.J.**, Perry, P.E., **1988**. « *Identification of micronucleated chromosomes : a possible assay for aneuploidy* ». *Mutagenesis* **3**:415-418.
- Till, M.**, Riebinger, D., Schmitz, H.J., Schrenk, D., **1999**. « *Potency of various polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of CYP1A1 in rat hepatocyte cultures* ». *Chemico-Biological Interactions* **117**:135-150.
- Toide, K.**, Yamazaki, H., Nagashima, R., Itoh, K., Iwano, S., Takahashi, Y., Watanabe, S., Kamataki, T., **2003**. « *Aryl hydrocarbon hydroxylase represents CYP1B1, and not CYP1A, in human freshly isolated white cells. Trimodal distribution of Japanese population according to induction of CYP1B1 mRNA by environmental dioxin* ». *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **12**(3):219-222.

- Tomanin, R.**, Ballarin, C., Nardini, B., Mastrangelo, G., Sarto, F., **1991**. « *Influence of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes by the cytokinesis-block method* ». Mutagenesis **6**(2):123-126.
- Tucker, J.D.**, Nath, J., Hando, J.C., **1996**. « *Activation status of the X chromosome in human micronucleated lymphocytes* ». Human Genetics **97**:471-475.
- Twardowska, I.**, Kolodziejczyk, A.M., **1998**. « *Benzo-a-pyrene in soils and ground water: Occurrences, sources, distribution. interrelation* » Toxicological and Environmental Chemistry **66**(1-4):127-144.
- van Delf, J.H.M.**, Steenwinkel, M-J.S.T., van Asten, J., G., de Vogel, N., Bruijntjes, T., C., D., M., Schouten, T., Cramers, P., Maas, L., van Herwijnen, M., H., van Schooten, F-J., Hopmans, P.,M.,J., **2001**. « *Biological monitoring the exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of coke oven workers in relation to smoking and genetic polymorphisms for GSTM1 and GSTT1* ». The Annals of Occupational Hygiene **45**(5):395-408.
- van Hummelen, P.**, Gennart, J.P., Buchet, J.P., Lauwerys, R., Kirsch-Volders, M., **1993**. « *Biological markers in PAH exposed workers and controls* ». Mutation Research **300**:231-239.
- Vian, L.**, Bichet, N., Gouy, D., **1993**. « *The in vitro micronucleus test on isolated human lymphocytes* ». Mutation Research **291**:93-102.
- Viau, C.**, **2008a**. *Interprétation des résultats de surveillance biologique*. Archives des Maladies Professionnelles et de l'Environnement **69**:315-319.
- Viau, C.**, **2008b**. *Les hydrocarbures aromatiques polycycliques, de la recherche à la prévention*. Bulletin d'information en santé environnementale (BISE), INSPQ **19**(5) :3
- Viau, C.**, Tardif R., **2003**. *Toxicologie. Environnement et santé publique. Fondements et pratiques*. Monographie ISBN : 2891301935, 274300603X (Tec & Doc), chap **5**:119-143.
- Viau, C.**, Hakizimana, G., Bouchard, M., **2000**. « *Indoor exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and carbon monoxide in traditional houses in Burundi* ». International Archives of Occupational and Environmental Health **73**(5):331-338.

- Voët, D., Voët, J.G., 2005.** Biochimie. 2ème édition. Monographie ISBN : 2-8041-4795-9, 1583 pages.
- Vral, A., Fenech, M., Thierens, H., 2011.** « *The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionizing radiation exposure* ». Mutagenesis **26**(1):11-17.
- Wang, G., Jia, M., Zhao, S., Li, J., 1999.** . « *A study on the relationship between lymphocyte micronucleus rates and blood plasma benzo(a)pyrene levels in coking workers* ». Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi **33**(1):40-42. Article écrit en chinois résumé en anglais publié par PubMed
- Warshawsky, D., Livingston, G.K., Fonouni-Fard, M., LaDow, K., 1995.** « *Induction of micronuclei and sister chromatid exchanges by polycyclic and N-heterocyclic aromatic hydrocarbons in cultured human lymphocytes* ». Environmental and Molecular Mutagenesis **26**:109-118.
- Weiss, J., Olsen, L.D., Haring Sweeney, M., 2004.** « *Asphalt (bitumen)* ». International Program on Chemical Safety, IPCS **59**:44-45.
- Wogan, G.N., Hecht, S.S., Felton, J.S., Conney, A.H., Loeb, L.A., 2004.** « *Environmental and chemical carcinogenesis* ». Seminars in Cancer Biology **14**:473-486.
- Wojda, A., Zietkiewicz, E., Witt, M., 2007.** « *Effects on age and gender on micronucleus and chromosome nondisjunction frequencies in centenarians and younger subjects* ». Mutagenesis **22**(3):195-200.
- Wojda, A., Witt, M., 2003.** « *Manifestations of ageing at the cytogenetic level* ». Journal Applied in Genetics **44**(3):383-399.
- Wolff, H.A., Hennies, S., Herrmann, M.K., Rave-Fränk, M., Eickelmann, D., Virsik, P., Jung, K., Schirmer, M., Ghadimi, M., Hess, C.F., Hermann, R.M., Christiansen, H., 2011.** « *Comparison of the micronucleus and chromosome aberration techniques for the documentation of cytogenetic damage in radiochemotherapy-treated patients with rectal cancer* ». Strahlenther Onkologie **187**(1):52-58.
- Yedjou, C.G., Tchounwou, C.K., Haile, S., Edwards, F., Tchounwou, P.B., 2010.** « *N-acetyl-cysteine protects against DNA damage associated with lead toxicity in HepG2 cells* ». Ethnicity and Disease **20**(1)S1:101-103.
- Yüzbaşıoğlu, D., Çelik, M., Yılmaz, S., Ünal, F., Aksoy, H., 2006.** « *Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes* ». Mutation Research **604**:53-59.

- Zhang, L-J.**, Shin, E.S., Yu, Z-X., Li, S-B., **2007**. « *Molecular genetic evidence of Y chromosome loss in male patients with hematological disorders* ». Chinese Medical Journal **120**(22):2002-2005.
- Zhu, J.** Abbruzzese, J.L., Izzo, J., Hittelman, W.N., Li, D., **2005**. « *AURKA amplification, chromosome instability, and centrosome abnormality in human pancreatic carcinoma cells* ». Cancer Genetics and Cytogenetics **159**(1):10-17.
- Zijno, A.**, Leopardi, P., Marcon, F., Crebelli, R., **1996**. « Sex chromosome loss and non-disjunction in women : analysis of chromosome segregation in binucleated lymphocytes ». Chromosoma **104**:461-467.

ANNEXES

ANNEXE I

Tableau XVI : Compilation des données brutes de l'analyse des MN pour les différentes conditions d'exposition au BaP chez les sujets féminins sur un total de 2000 cellules par sujet.

Sujet # (Sexe/ Âge)	[BaP] µg/mL	Nombre de MN par cellule						
		0	1	2	3	4	5	6
1 (F/ 34)	0	1979	21	-	-	-	-	-
	0,1	1978	21	1	-	-	-	-
	1	1978	20	2	-	-	-	-
	5	1961	38	1	-	-	-	-
	10	1935	61	4	-	-	-	-
2 (F/ 30)	0	1995	4	-	1	-	-	-
	0,1	1995	5	-	-	-	-	-
	1	1990	10	-	-	-	-	-
	5	1978	21	1	-	-	-	-
	10	1980	18	1	1	-	-	-
3 (F/ 30)	0	1982	18	-	-	-	-	-
	0,1	1970	30	-	-	-	-	-
	1	1962	37	1	-	-	-	-
	5	1975	24	1	-	-	-	-
	10	1985	14	1	-	-	-	-
4 (F/ 29)	0	1985	14	1	-	-	-	-
	0,1	1976	24	-	-	-	-	-
	1	1954	43	2	1	-	-	-
	5	1937	58	3	2	-	-	-
	10	1970	30	-	-	-	-	-
5 (F/ 21)	0	1986	13	1	-	-	-	-
	0,1	1987	13	-	-	-	-	-
	1	1974	22	2	-	2	-	-
	5	1975	23	2	-	-	-	-
	10	1974	25	1	-	-	-	-

(Suite de l'Annexe I)

Tableau XVI (suite)

Sujet # (Sexe / Âge)	[BaP] µg/mL	Nombre de MN par cellule						
		0	1	2	3	4	5	6
6 (F/ 29)	0	1979	21	-	-	-	-	-
	0,1	1980	18	1	1	-	-	-
	1	1972	23	4	1	-	-	-
	5	1965	31	2	2	-	-	-
	10	1977	21	1	1	-	-	-
7 (F/ 27)	0	1960	39	-	1	-	-	-
	0,1	1961	34	4	-	-	1	-
	1	1938	52	8	-	2	-	-
	5	1935	58	6	1	-	-	-
	10	1957	39	2	1	1	-	-
8 (F/ 23)	0	1991	9	-	-	-	-	-
	0,1	1991	9	-	-	-	-	-
	1	1978	21	-	-	-	1	-
	5	1976	24	-	-	-	-	-
	10	1957	43	-	-	-	-	-
9 (F/ 23)	0	1975	21	3	1	-	-	-
	0,1	1958	36	6	-	-	-	-
	1	1958	35	5	1	-	1	-
	5	1952	39	9	-	-	-	-
	10	1966	31	2	-	-	1	-
10 (F/ 22)	0	1981	18	1	-	-	-	-
	0,1	1972	25	1	1	1	-	-
	1	1972	27	-	1	-	-	-
	5	1962	36	1	1	-	-	-
	10	1955	39	6	-	-	-	-

ANNEXE II

Tableau XVII : Compilation des données brutes de l'analyse des MN pour les différentes conditions d'exposition au BaP chez les sujets masculins pour un total de 2000 cellules par sujet.

Sujet # (Sexe/ Âge)	[BaP] µg/mL	Nombre de MN par cellule						
		0	1	2	3	4	5	6
11 (M/ 29)	0	1977	23	-	-	-	-	-
	0,1	1966	31	3	-	-	-	-
	1	1961	39	-	-	-	-	-
	5	1956	42	2	-	-	-	-
	10	1976	22	1	1	-	-	-
12 (M/ 30)	0	1998	2	-	-	-	-	-
	0,1	1997	3	-	-	-	-	-
	1	1997	3	-	-	-	-	-
	5	1994	6	-	-	-	-	-
	10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
13 (M/ 28)	0	1978	20	2	-	-	-	-
	0,1	1968	32	-	-	-	-	-
	1	1970	27	1	1	-	-	1
	5	1969	29	2	-	-	-	-
	10	1973	27	-	-	-	-	-
14 (M/ 21)	0	1969	30	1	-	-	-	-
	0,1	1969	25	4	1	1	-	-
	1	1958	40	2	-	-	-	-
	5	1953	41	5	1	-	-	-
	10	1967	31	2	-	-	-	-
15 (M/ 29)	0	1984	16	-	-	-	-	-
	0,1	1971	26	3	-	-	-	-
	1	1967	31	-	2	-	-	-
	5	1970	28	2	-	-	-	-
	10	1977	19	4	-	-	-	-

(Suite de l'Annexe II)

Tableau XVII (suite).

Sujet # (Sexe/ Âge)	[BaP] µg/mL	Nombre de MN par cellule						
		0	1	2	3	4	5	6
16 (M/ 30)	0	1973	26	1	-	-	-	-
	0,1	1964	31	4	1	-	-	-
	1	1965	32	1	2	-	-	-
	5	1969	28	3	-	-	-	-
	10	1974	24	2	-	-	-	-
17 (M/23)	0	1991	9	-	-	-	-	-
	0,1	1986	14	-	-	-	-	-
	1	1986	14	-	-	-	-	-
	5	1980	20	-	-	-	-	-
	10	1976	24	-	-	-	-	-
18 (M/ 26)	0	1976	23	1	-	-	-	-
	0,1	1964	33	2	1	-	-	-
	1	1966	28	4	2	-	-	-
	5	1956	34	5	2	2	1	-
	10	1954	42	4	-	-	-	-
19 (M/ 23)	0	1971	24	5	-	-	-	-
	0,1	1974	23	2	1	-	-	-
	1	1963	29	6	1	-	1	-
	5	1962	34	3	-	-	1	-
	10	1957	39	3	1	-	-	-
20 (M/ 28)	0	1983	17	-	-	-	-	-
	0,1	1981	18	1	-	-	-	-
	1	1969	28	3	-	-	-	-
	5	1960	36	4	-	-	-	-
	10	1961	38	1	-	-	-	-

ANNEXE III

Tableau XVIII : Test non paramétrique des rangs signés de Wilcoxon pour la comparaison de la fréquence de MN en fonction de la concentration de BaP par rapport au contrôle pour les deux sexes et le groupe entier.

Conditions comparées	Ctl-BaP01	Ctl-BaP1	Ctl-BaP5	Ctl-BaP10	BaP5-BaP10
Femmes					
Z	1,718 ^a	2,599 ^a	2,810 ^a	2,703 ^a	0,631 ^b
Signification asymptotique (<i>p</i>)	0,086	0,009	0,005	0,007	0,528
Hommes					
Z	2,497 ^a	2,805 ^a	2,803 ^a	2,666 ^a	2,257 ^b
Signification asymptotique (<i>p</i>)	0,013	0,005	0,005	0,008	0,024
Groupe entier					
Z	3,040 ^a	3,809 ^a	3,922 ^a	3,744 ^a	1,730 ^a
Signification asymptotique (<i>p</i>)	0,002	0,000	0,000	0,000	0,084

^a Basée sur les rangs positifs

^b Basée sur les rangs négatifs

Ctl = contrôle

BaP01 = concentration de BaP à 0,1 µg/mL

BaP1 = concentration de BaP à 1 µg/mL

BaP5 = concentration de BaP à 5 µg/mL

BaP10 = concentration de BaP à 10 µg/mL

(Suite à la page suivante)

(Suite de l'Annexe III)

Tableau XIX : Test non paramétrique des rangs signés de Wilcoxon pour la comparaison de la fréquence des cellules micronucléées (%) en fonction de la concentration de BaP.

Conditions comparées	Ctl-BaP01	Ctl-BaP1	Ctl-BaP5	Ctl-BaP10	BaP5-BaP10
Femmes					
Z	1,540 ^a	2,599 ^a	2,803 ^a	2,601 ^a	0,764 ^b
Signification asymptotique (<i>p</i>)	0,123	0,009	0,005	0,009	0,445
Hommes					
Z	2,497 ^a	2,805 ^a	2,803 ^a	2,668 ^a	1,365
Signification asymptotique (<i>p</i>)	0,013	0,005	0,005	0,008	0,172
Groupe entier					
Z	2,797 ^a	3,809 ^a	3,921 ^a	3,703 ^a	1,389 ^a
Signification asymptotique (<i>p</i>)	0,005	0,000	0,000	0,000	0,165

^a Basée sur les rangs positifs^b Basée sur les rangs négatifs

Tableau XX : Test non paramétrique des rangs signés de Wilcoxon pour la comparaison du nombre de MN par micronucléée en fonction de la concentration de BaP.

Conditions comparées	Ctl-BaP01	Ctl-BaP1	Ctl-BaP5	Ctl-BaP10	BaP1-BaP10
Femmes					
Z	0,140	1,784	1,364 ^a	0,711 ^a	1,478 ^b
Signification asymptotique (<i>p</i>)	0,889	0,074	0,173	0,477	0,139
Hommes					
Z	1,680 ^a	2,366 ^a	2,240 ^a	0,980 ^a	1,400 ^b
Signification asymptotique (<i>p</i>)	0,093	0,018	0,025	0,327	0,161
Groupe entier					
Z	1,344 ^a	2,817 ^a	2,438 ^a	1,231 ^a	2,025 ^b
Signification asymptotique (<i>p</i>)	0,179	0,005	0,015	0,218	0,043

^a Basée sur les rangs positifs^b Basée sur les rangs négatifs

ANNEXE IV

Tableau XXI : Nombre de MN répertoriés dans chaque catégorie, présentés pour chacun des sujets de l'étude et pour les deux conditions testées.

Sujet # (Sexe/Âge)	[BaP] = 0 µg/mL				[BaP] = 5 µg/mL			
	MN C-	MN C+	MN C ₁₋₂ +	MN C ₃ +	MN C-	MN C+	MN C ₁₋₂ +	MN C ₃ +
1 (F/34)	3	20	13	7	5	37	8	29
2 (F/30)	1	8	1	7	4	10	4	6
3 (F/30)	1	14	5	9	1	14	4	10
4 (F/29)	3	4	0	4	3	15	2	13
5 (F/21)	7	8	1	7	4	14	3	11
6 (F/29)	5	9	3	6	5	27	3	24
7 (F/27)	-	10	5	5	6	15	4	11
8 (F/23)	8	6	3	3	6	20	5	15
9 (F/23)	5	4	2	2	12	12	8	4
10 (F/22)	6	16	4	12	6	20	3	17
11 (M/29)	6	3	2	1	5	12	1	11
12 (M/30)	-	2	1	1	3	16	6	10
13 (M/28)	-	3	1	2	2	19	4	15
14 (M/21)	-	8	-	8	5	30	5	25
15 (M/29)	4	4	-	4	4	10	-	10
16 (M/30)	4	7	3	4	6	13	4	9
17 (M/23)	3	10	4	6	3	20	5	15
18 (M/26)	14	11	5	6	5	26	3	23
19 (M/23)	1	6	1	5	11	27	7	20
20 (M/28)	3	8	-	8	13	11	1	10

C- = aucun signal centromérique

C+ = un signal centromérique ou plus

C₁₋₂+ = 1 à 2 signaux centromériques

C₃+ = 3 signaux centromériques et plus

ANNEXE V

Tableau XXII : Test des proportions pour la catégorie MN C+ effectué pour les deux sexes et le groupe entier

	k_0	k_5	n_0	n_5	p_0	p_5	k	n	p	pq	Z	Signification unilatérale droite (p)
Femmes	99	184	138	236	0,7174	0,7797	283	374	0,7567	0,1841	1,354	0,088†
Hommes	62	184	97	241	0,6392	0,7635	246	338	0,7278	0,1981	2,323	0,01*
Groupe entier	161	368	235	477	0,6851	0,7715	529	712	0,7430	0,1910	2,480	0,007**
† $p < 0,1$					* $p < 0,05$			** $p < 0,01$				

Tableau XXIII : Test des proportions pour la catégorie MN C₃₊ effectué pour les deux sexes et le groupe entier.

	k_0	k_5	n_0	n_5	p_0	p_5	k	n	p	pq	Z	Signification unilatérale droite (p)
Femmes	62	140	99	184	0,6263	0,7609	202	283	0,7138	0,2043	2,389	0,008**
Hommes	45	148	62	184	0,7258	0,8043	193	246	0,7846	0,1690	1,301	0,149
Groupe entier	107	288	161	368	0,6646	0,7826	395	529	0,7467	0,1891	2,872	0,003**
** $p < 0,01$												

ANNEXE VI

Formulaire de consentement

Nous vous invitons à bien lire ce formulaire et à poser des questions avant d'y apposer votre signature.

Titre du projet :

Évaluation de la fréquence des micronoyaux et détermination de leur contenu suite à une exposition *in vitro* au benzo-a-pyrène : comparaison entre les lymphocytes sanguins et les cellules urothéliales chez l'humain.

Nom du ou des chercheur(s) :

a) Chercheur principal :

Nicole LEMIEUX, Ph.D.

Professeure agrégée au département de pathologie et biologie cellulaire

Université de Montréal

Co-directrice du laboratoire de diagnostic clinique en cytogénétique au département de Pathologie et chercheure affiliée au Centre de recherche, CHU Sainte-Justine.

b) Étudiantes responsables du projet :

Thi Cam Van PHAM

Étudiante à la maîtrise

Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal

Département de pathologie et Centre de recherche, CHU Sainte-Justine.

Fléchère FORTIN

Étudiante au doctorat

Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal

Département de pathologie et Centre de recherche, CHU Sainte-Justine.

Nature de la participation :

Un prélèvement de sang veineux et un échantillon d'urine provenant de la deuxième miction de la journée vous seront demandés.

Description du projet :

Le benzo-a-pyrène (BaP) est un hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP) dont la capacité à induire le cancer est connue chez l'humain. Les HAPs sont émis lors de la combustion incomplète des matières organiques, sous forme de mélanges complexe contenant des centaines de composés. Les émissions de HAPs peuvent être environnementales (fumée de cigarettes, feux de forêt, cuisson sur feu de bois ou au barbecue, etc) ou occupationnelles (comme les industries de transformation primaire de l'aluminium). La communication donnée par le Ministère du Développement Durable de l'Environnement et des Parcs mentionne qu'au Québec, c'est la combustion du bois de chauffage qui représente la plus grande source de production de HAPs. Cependant, en milieu de travail ce sont les travailleurs de l'industrie de l'aluminium qui sont les plus touchés.

Actuellement, 15 HAPs sont considérés comme pouvant induire le cancer et le BaP est utilisé modèle. Il sert de produit de référence auquel sont comparés les autres HAPs potentiellement cancérigènes. Pour être éliminé dans l'urine, le BaP doit être biotransformé dans la cellule en un composé instable et très réactif qui se liera au glutathion ou à d'autres molécules. Il peut aussi s'inactiver en se liant à l'ADN, causant des lésions qui pourraient mener à l'apparition de certains cancers, notamment de la vessie ou du scrotum chez les travailleurs. Ces lésions de l'ADN sont visibles lors de l'examen microscopique des cellules. Cependant, ce ne sont pas tous les individus exposés qui développeront ultimement un cancer. En évaluant différentes méthodes de détection, l'étude des lésions de l'ADN causées par ce produit pourrait nous permettre de déterminer certains éléments du profil des individus plus à risque de développer un cancer, pour ainsi faire de la prévention.

Le projet a comme objectif de déterminer si une variation de la réponse génotoxique existe entre les individus dont les lymphocytes ont été (ou non) exposés *in vitro* au

benzo-a-pyrène. Une analyse par cytogénétique moléculaire des lésions permettra de comprendre le mécanisme qui les a causés. De plus, l'analyse des cellules présentes dans l'urine permettra de voir s'il existe une différence dans les lésions de l'ADN présentes dans ces cellules et dans les lymphocytes sanguins non exposés au produit toxique.

Ce projet de recherche est d'ordre fondamental et est subventionné par La société des pathologistes de l'Hôpital Sainte-Justine.

20 participants seront recrutés pour cette étude.

Vulgarisation des termes pertinents dans le formulaire

ADN : Molécule qui renferme toutes les informations génétiques transmissibles qui dirigent les activités des cellules de notre corps. L'ADN fournit une série d'instructions déterminant les caractères héréditaires d'une personne, tels que la couleur de ses yeux ou son groupe sanguin.

Cellules urothéliales : Ce sont des cellules formant le tissu de recouvrement de la surface et des cavités internes des voies urinaires.

Glutathion : C'est un composé présent dans les cellules qui forme aisément des liaisons avec des produits chimiques, afin d'aider le corps à les éliminer dans l'urine.

In vitro : expérience de laboratoire où l'échantillon est traité après le prélèvement dans des tubes de culture, par opposition à des échantillons pris chez des individus qui ont été préalablement exposés (*in vivo*).

Lymphocytes : C'est une variété de globules blancs qui ont pour fonction de nous protéger contre les microbes étrangers qui pourraient entrer dans notre corps.

Micronoyau : C'est un petit noyau qui est séparé du noyau de la cellule et qui contient une partie du matériel génétique. Il est formé suite à des dommages à l'ADN.

Réponse génotoxique : C'est l'ensemble des dommages qui sont causés à notre ADN par un produit toxique. Ces dommages peuvent être réparés par des enzymes de réparation.

Procédures :

Par la suite, un rendez-vous sera pris au département de microbiologie et immunologie de l'Université de Montréal. Il est à noter que les sujets ne doivent pas avoir consommé d'alcool dans les 24 heures précédant le prélèvement. Une étudiante responsable du projet vous accompagnera pour effectuer cette prise de sang conventionnelle. Le rendez-vous est pris en matinée ou en après-midi selon vos disponibilités. Il pourrait y avoir une attente de quelques minutes à une demi-heure avant le prélèvement qui sera effectué par une technologue médicale d'expérience. Un garrot élastique vous sera posé sur le haut de l'avant-bras, le pli de votre coude sera nettoyé avec de l'alcool avant de commencer le prélèvement du sang.

Le sang sera prélevé (environ 20ml) dans 2 petits tubes héparinés. Ces tubes seront identifiés avec un numéro codé afin d'assurer la confidentialité et seront remis à la personne-ressource qui vous accompagnera. Le prélèvement de sang hépariné sera séparé en deux parties :

- Une partie sera directement mis en culture dans le milieu requis et exposé au benzo-a-pyrène (BaP). Ces cellulesensemencées serviront à réaliser le test des micronoyaux. Les préparations cellulaires ainsi obtenues seront étalées sur des lames de microscope afin d'effectuer les analyses requises.
- Les lymphocytes seront isolés à partir de ce qui restera de l'autre partie de l'échantillon sanguin. L'ADN du sujet sera extrait à partir des lymphocytes isolés et servira aux études de génotypage des enzymes de biotransformation et de réparation de l'ADN.

Lors du prélèvement sanguin, un flacon stérile et pré-identifié ainsi que quelques lingettes nettoyantes vous seront remis pour le prélèvement d'urine. Les instructions

concernant ce prélèvement vous seront données et un rendez-vous sera pris pour la remise de l'échantillon d'urine. À la réception de l'échantillon, les cellules présentes dans l'urine seront isolées et étalées sur des lames de microscope afin de réaliser les analyses requises.

Il est possible que certains sujets soient rappelés pour un deuxième prélèvement en cas d'échec lors de la préparation des échantillons et de la culture des cellules.

Avantages et bénéfices :

Vous ne retirerez aucun bénéfice personnel en participant au projet de recherche. Cependant, nous espérons que les résultats obtenus nous permettront de faire avancer les connaissances au sujet de la génotoxicité du benzo-a-pyrène et des autres molécules du même genre, et éventuellement, d'en faire profiter la société. Sur simple demande, nous vous transmettrons les résultats de cette recherche, une fois l'étude terminée.

Risques et inconvénients :

Risques physiques

Bien que les prises de sang ne causent pas de problèmes pour la grande majorité des gens, elles peuvent entraîner des ecchymoses (bleus), une petite douleur au point de piqûre ou des étourdissements chez certains individus.

Les prélèvements urinaires ne causent pas de problème pour la grande majorité des individus. Les femmes peuvent parfois ressentir un certain inconfort lié à la miction dans un contenant de prélèvement.

Risques socio-économiques

Peu de risques socio-économiques sont associés au projet de recherche. Un des risques est lié à la divulgation des résultats à des tiers.

Compensation :

Si, par suite de votre participation à cette étude, il survenait un incident attribuable à l'intervention médicale requise, il n'y a pas d'autre type de compensation prévu que ce qui est normalement couvert par la Régie de l'assurance-maladie du Québec. Cependant, en signant le présent formulaire, vous ne renoncez à aucun des droits garantis par la loi.

Critères d'exclusion :

Sont exclues de la présente étude, les fumeurs (occasionnel ou habitué), ex-fumeurs depuis moins d'un an, ayant pris des drogues (douces ou dures) dans les 6 derniers mois, ayant subi une radiographie dans les 3 derniers mois, prenant des médicaments sur une base régulière (exception faite des contraceptifs), ayant subi un traitement de radiothérapie ou de chimiothérapie, ou ayant été exposé à des produits chimiques de façon importante. La consommation d'alcool durant les 24 heures précédant le prélèvement sanguin entraînera un report du moment où seront effectués les prélèvements.

Confidentialité

Sécurité des données

Les chercheurs s'engagent à respecter la confidentialité des données et échantillons recueillis. Tous les renseignements obtenus sur vous et les résultats de la recherche seront traités de façon strictement confidentielle. Les échantillons ainsi que les renseignements seront codés. Les données d'analyse seront conservées dans un dossier séparé du dossier contenant vos renseignements nominatifs. Votre dossier sous étude sera sous la responsabilité du Dre Nicole Lemieux et gardé au laboratoire de cytogénétique moléculaire de l'Université de Montréal. Les questionnaires sur la santé et ainsi que les formulaires de consentement seront conservés sous clé; les résultats aux tests seront codés et conservés dans des fichiers informatisés dont le code d'accès est connu des chercheurs seulement.

Par ailleurs, les résultats de cette étude, rendus anonymes, pourront être publiés ou communiqués par d'autres moyens, mais aucune information pouvant vous identifier ne sera alors révélée.

Accès de tiers aux résultats

À moins d'une autorisation expresse de votre part, d'une ordonnance de la Cour ou de la loi, vos résultats personnels ne seront pas accessibles à des tiers tels qu'un employeur, un organisme gouvernemental, un assureur ou une institution d'enseignement. Il en sera de même pour votre conjoint, les autres membres de votre famille et votre médecin.

Par ailleurs, aux fins de vérifier la saine gestion de la recherche, il est possible qu'un membre du comité d'éthique consulte vos données de recherche.

Utilisation secondaire des données et échantillons

Les données et échantillons recueillis au cours de cette étude serviront uniquement à cette étude. Aucune analyse supplémentaire ne sera effectuée sur les échantillons qui auront été traités au laboratoire.

Conservation des données

Les données seront conservées pour une durée de sept (7) ans dans un dossier distinct du dossier du volontaire. Ces dossiers seront conservés, séparément, sous clé au laboratoire du Dre Nicole Lemieux au département de pathologie et biologie cellulaire de l'Université de Montréal. Les informations nominatives et génétiques contenues dans ces dossiers ne seront accessibles qu'aux chercheurs responsables et associés à ce projet. Lors de la publication des résultats, l'identité des participants ne sera dévoilée en aucun cas. Les informations ne pourront être envoyées à une autre personne que si le participant donne son consentement. Ces dossiers seront détruits 7 ans après la fin du projet.

Conservation des échantillons d'ADN

- *Identification de l'échantillon*

Nous protégerons la confidentialité des échantillons en leur assignant un code spécifique. Votre échantillon d'ADN ne sera pas identifié, mais ce code permettra de vous lier à l'échantillon. Le décodage ne peut cependant être fait que par le chercheur principal ou par une personne déléguée par ce dernier.

- *Durée de conservation*

Des échantillons de votre ADN seront conservés à l'Université de Montréal, sous la responsabilité du Dre Nicole Lemieux, jusqu'à 10 années après la fin du projet de recherche. Après cette période, tous les échantillons seront détruits.

Éventualité d'une suspension de l'étude :

La participation à cette étude peut être interrompue par le chercheur s'il croit que c'est dans l'intérêt du participant ou pour toutes autres raisons.

Liberté de participation et liberté de retrait de l'étude :

Votre participation à cette étude est tout à fait volontaire. Vous êtes donc libre d'accepter ou de refuser d'y participer et vous pouvez vous retirer de l'étude en tout temps, sans que cela n'affecte les traitements auxquels vous avez droit ni ne nuise aux relations avec votre médecin (et autres intervenants).

Advenant le cas où vous vous retiriez de cette étude, toutes vos données, questionnaire, formulaire de consentement, échantillons d'ADN et lames de microscopie préparées, seront détruits.

Indemnité :

Les frais de déplacement ou de stationnement seront remboursés, s'il y a lieu, sur présentation d'une pièce justificative. Aucune autre indemnité n'est prévue pour participer à ce projet de recherche.

Personnes-ressources :

Si vous désirez des renseignements supplémentaires au sujet du déroulement de ce projet de recherche ou pour nous communiquer tout changement d'adresse, vous pouvez contacter le Dre Nicole Lemieux durant le jours ouvrables au numéro de téléphone : 514-343-6309 ou encore Mesdames Thi Cam Van Pham (étudiante à la maîtrise) ou Fléchère Fortin (étudiante au doctorat), durant les jours ouvrables au numéro de téléphone : 514-343-6111, poste 5116.

Vous pouvez communiquer avec le Bureau de l'ombudsman de l'Université de Montréal pour obtenir des renseignements éthiques ou faire part d'un incident ou formuler des plaintes ou des commentaires au (514) 343-2100.

Adhésion au projet et signatures :

J'ai lu et compris le contenu du présent formulaire. Je certifie qu'on me l'a expliqué verbalement. J'ai eu l'occasion de poser toutes les questions concernant ce projet de recherche et on y a répondu à ma satisfaction. Je certifie qu'on m'a laissé le temps voulu pour réfléchir et prendre ma décision. Je sais que ma participation à ce projet est tout à fait volontaire, que je suis libre d'y participer. Je sais être libre de me retirer en tout temps sans que cela nuise aux relations avec mon médecin ou tout autre intervenant et sans préjudice d'aucune sorte.

Je soussigné(e) accepte de participer à cette étude.

Nom du participant

Signature du participant

Date

Adresse : _____

Numéro de téléphone : _____

Je certifie a) avoir expliqué au signataire les termes du présent formulaire de consentement; b) lui avoir clairement indiqué qu'il reste à tout moment libre de mettre un terme à sa participation au présent projet et que je lui remettrai une copie signée du présent formulaire.

Nom du Chercheur

Signature du chercheur

Date

Informations de type administratif :

- L'original du formulaire sera conservé au laboratoire de cytogénétique moléculaire du Dre Nicole Lemieux, au pavillon Roger-Gaudry de l'Université de Montréal et une copie signée sera remise au participant.
- Le projet de recherche et le présent formulaire de consentement ont été approuvés par le CERFM le 04 juin 2008.
- No de référence : CERFM94(08)4#308.

ANNEXE VII

Questionnaire de sélection des sujets

Date de naissance :	Âge :	
Sexe :	F	M
Avez vous subi une radiographie (dentaire, membre etc) dans les derniers 3 mois?	Oui	Non
Prenez-vous des médicaments (anovulants ou autres) sur une base régulière? Si oui, lesquels?	Oui	Non
Consommation de cigarettes Êtes vous :	Fumeur	Non-fumeur
	Ex-fumeur	Depuis combien de mois?
Avez-vous consommé des drogues douces (ex : mari, hash etc) ou dures (ex : coke, héroïne etc) dans les derniers 6 mois?	Oui	Non
Avez-vous déjà subi un traitement de radiothérapie ou de chimiothérapie?	Oui	Non
Avez-vous consommé de l'alcool durant les 24 dernières heures?	Oui	Non

Si vous avez répondu OUI à une de ces questions, vous n'êtes pas admissibles à cette étude.

Code du sujet sélectionné :

ANNEXE VIII

Publication d'article

Fortin F, Pham TCV, Bonvalot Y, Viau C, Lemieux N. *Aneugenic and clastogenic properties of benzo-a-pyrene assessed by genotoxic biomarkers in human lymphocytes.*

Soumis au journal Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis le 02 février 2011.

Contribution des auteurs à cet article

Madame Fléchère Fortin a préparé le plan et réalisé 50 % des expérimentations. Elle a effectué les analyses statistiques sous la direction de la biostatisticienne, le Dre Yvette Bonvalot, et a également écrit le manuscrit. Thi Cam Van Pham a réalisé l'autre 50 % des expérimentations. Les Docteurs Claude Viau et Yvette Bonvalot ont participé à la révision du manuscrit. Le Dre Nicole Lemieux, en qualité de directrice, supervise la rédaction du manuscrit.

Aneugenic and clastogenic properties of benzo-a-pyrene assessed by genotoxic biomarkers in human lymphocytes

Fléchère Fortin^{a,c,d}, Thi Cam Van Pham^{a,c,d}, Yvette Bonvalot^{b,e}, Claude Viau^b, Nicole Lemieux^{a,c,d}

^a Département de pathologie et biologie cellulaire; Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

^b Département de santé environnementale et santé au travail, Chaire d'analyse et de gestion des risques toxicologiques, Université de Montréal, C.P. 6128, Succursale Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3J7

^c Département de pathologie, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, 3175, chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal, Québec, Canada, H3T 1C5.

^d Centre de recherche, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, 3175, chemin de la Côte-Sainte-Catherine, Montréal, Québec, Canada, H3T 1C5.

^e Programme de la santé environnementale, Santé Canada, 1001 rue Saint-Laurent ouest, Longueuil, Québec, Canada, J4K 1C7.

Abstract

Benzo-a-pyrene (BaP) is a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) classified as carcinogenic to human. Metabolic activation of BaP leads to production of many metabolites forming adducts with DNA, and being at origin of BaP-induced DNA damages, mutagenesis and carcinogenesis. They can be detected in human lymphocytes exposed *in vivo* or *in vitro* to BaP or PAHs. Human blood lymphocytes cultures established from 20 subjects were exposed to BaP (0.1, 1, 5 and 10 µg/ml) for 24 h, then washed and cultivated without BaP for an additional 24 h. Micronuclei (MNs) and chromosome aberrations (CAs) were analysed for the subjects in all conditions. Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) analysis of MNs using a pancentromeric probe was also done to assess MN content. Significantly increased formation of MNs and CAs were observed starting at the lowest BaP concentration tested (0.1 µg/ml – $p < 0.01$), with a decrease after exposure to 10 µg/ml BaP, suggesting a saturation of metabolic activation or DNA repair enzymes. Sex differences were present regarding the dose-response relationships, as men presented significantly increased MN and CA frequencies at [BaP] = 0.1 µg/ml, while women showed non-significant increases. Besides, FISH analysis of MNs showed that BaP-induced MNs mostly contain centromeres, and specifically three or more centromeres ($p < 0.01$). Linear regression analysis also indicated that BaP exposure led to formation of MNs containing an increasing number of centromeric signals ($R = 0.67$; $p = 0.0023$). Our study confirms a clastogenic effect of BaP with CA and MN tests, associated with initiation stage of chemical carcinogenesis. More importantly, FISH-coupled MN assay strongly suggest an aneugenic effect of BaP, linking its exposure to progression stage of carcinogenesis. Given that BaP and PAH exposures usually last for decades, this could be particularly important, and need to be confirmed in further environmental and occupational studies.

Highlights

- MN and CA increase in human lymphocytes caused by benzo-a-pyrene exposure
- Important interindividual variation in MN and CA numbers after in vitro exposure
- Benzo-a-pyrene in human lymphocytes caused a clastogenic effect
- Micronuclei content analysed by FISH with pancentromeric probe
- Most micronuclei contain three or more centromeres suggesting also aneugenic effect

Keywords

Benzo-a-pyrene, micronuclei assay, chromosome aberration test, human lymphocyte, aneugen, clastogen.

Abbreviations

PAH, polycyclic aromatic hydrocarbon; BaP, benzo-a-pyrene, MNs, micronuclei; CAs, chromosome aberrations; FISH, fluorescent *in situ* hybridization; BN, binucleated cell; MNBN, micronucleated BN cell (containing one or more micronuclei); C- MN, MN containing no centromere; C+ MN, MN containing one or more centromeres; C₁₋₂+ MN, MN containing one or two centromeres; C₃₊+ MN, MN containing 3 or more centromeres.

1. Introduction

Benzo-a-pyrene (BaP) is a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) produced during the incomplete combustion of organic matter and is ubiquitously present in our environment. PAHs are common contaminants of ambient air through cigarette smoke and air pollution, as well as a food contaminant, produced during food broiling. Occupational exposure occurs in coal gasification and aluminium production industries, as well as during use of coal tar, asphalt and mixtures of coal-tar pitch, and is associated with lung, skin and bladder cancer [1]. Currently, 15 PAHs are classified as carcinogenic to human by the International Agency for Research on Cancer (groups 1, 2A and 2B), and BaP is a prototypical member of this class of carcinogenic PAHs [1].

Metabolic activation of BaP leads to the production of many metabolites, such as quinones and BaP 7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE), the latter considered as its most carcinogenic metabolite. BPDE can bind to DNA, forming adducts that will be removed mainly by nucleotide excision repair [2]. Besides, BaP quinone metabolites can form stable and depurinating adducts with DNA, and can be redox-cycling, thus generating reactive oxygen species, which will oxidize DNA bases, generating 8-oxo-2'-deoxyguanosine [3]. These adducts are at the origin of BaP induced DNA damages, mutagenesis and carcinogenesis [4], and their levels are augmented in occupationally exposed individuals presenting increased levels of cytogenetic biomarkers such as chromosome aberrations (CAs) and micronuclei (MNs) [5,6]. In order to evaluate quantitatively these DNA damages, biological monitoring is commonly realized in human lymphocytes, used as surrogate tissue, as they are considered to reflect damage present in target tissues [7].

As for human lymphocytes, *in vitro* exposure to BaP will produce metabolites, such as BPDE and quinones, which can be quantified [8]. In the same way, expression of genes involved in BaP metabolism induction (AhR, ARNT) and in phase I and phase II (CYP1A1 and GSTP1) [9], as well as proof of inducibility of CYP1A1 in benzanthracene treated lymphocytes [10], all suggest that human lymphocytes could be a good model to study the *in vitro* genotoxicity of BaP. Indeed, a significant production of MNs was found in lymphocytes treated with up to 15 µg/ml BaP for long exposure periods (72 and 64 h) with or without S9 metabolic activating system [11,12]. As for CAs, a significant increase was

seen in lymphocytes treated with up to 10 µg/ml BaP, for 24 or 48 h [13,14] or treated directly with BPDE [15,16]. However, use of high BaP concentrations (12.5 - 62.5 µg/ml for 48 h) failed to induce significant MNs increase and was explained by the absence of S9 [17].

MN and CA tests can be used to define the mode of action of a particular compound. MNs originate mainly from chromosome fragments or whole chromosome lagging at anaphase during cell division. These two types of MNs reflect, respectively, clastogenic and aneugenic events occurring in cells stressed by various agents [18]. As for CAs, chromatid- and chromosome-type aberrations are produced by S-dependent and S-independent agents, respectively [19], and reflect clastogenic events. However, detection of polyploid cells and endoreduplication during CA analysis could also indicate the ability of a chemical to induce numerical aberrations [20]. Following the evaluation of the MN test by the GUM (a German speaking section of the European Environmental Mutagen Society) and the ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods) [21,22], BaP has been classified as a clastogen. However, reported MN studies on PAH or BaP did not evaluate content of MNs using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) with pancentromeric probe, which could distinguish between clastogenic and aneugenic events [23,24].

Our study was designed to evaluate genotoxicity of BaP at low concentrations (0.1 – 10 µg/ml), with a short exposure period of 24 h followed by a 24 h post-exposure period. We used MNs and CAs as genotoxicity endpoints, and FISH-coupled MN assay using a pancentromeric probe to assess MN content. These assays were also used to evaluate the clastogenic and aneugenic properties of BaP.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Twenty subjects (ten women and ten men), aged between 20 and 30 years (mean: 26.6 years), were carefully selected to minimize their exposure to PAHs and other known genotoxic agents. All were healthy non-smokers, with no radiography or illicit

drug use in the last three months, taking no medication on a regular basis (except for hormones such as contraceptives and thyroid replacement hormone therapy), never been diagnosed with a genomic instability syndrome and never received a chemo- or radiotherapy. Also, subjects were required to take no alcohol 24 hours prior to blood draw. This research was approved by the research ethics board of our institution (reference number CERFM-94(08)4#308) and all subjects provided informed consent to participate in this study. For micronuclei assay, 20 subjects participated and were given the technique codes MN1 to MN20. For the chromosome aberration test, 15 subjects had adequate chromosome preparations and were given the technique codes CA1 to CA15.

2.2. Chemicals

A benzo-a-pyrene (BaP) stock solution (CAS number: 50-32-8, Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON, Canada) was prepared by dissolving the powder in sterile 100% DMSO (cell culture grade, Sigma-Aldrich Canada Ltd) to reach a final concentration of 12.5 mg/ml. Daughter stock solutions of 1.25 and 0.125 mg/ml were prepared from initial BaP stock solution. All BaP stock solutions were sterile filtered and kept in aluminium-covered microtubes to prevent light degradation. Cytochalasin B (CAS number: 14930-96-2, Sigma-Aldrich Canada Ltd) was dissolved in sterile 100% DMSO to reach a stock concentration of 2.14 mg/ml and kept in aluminium-covered conical tube to prevent light degradation [25].

2.3. Cell cultures, harvest and staining

Peripheral blood cultures were established using standard cytogenetic procedures [26]. Briefly, 0.35 ml blood was added to 5 ml RPMI 1640 medium supplemented with 10 % fetal bovine serum, 1 % phytohemagglutinin, 2 mM glutaMAX™-I and 0.1 % gentamycin (all from Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON, Canada). Duplicate cultures were established for all conditions and all subjects. Cells were incubated at

37°C for 24 h before BaP exposure. BaP was then added to cultures to reach final concentrations of 0.1 – 1 – 5 and 10 µg/ml (0.4 – 4 – 20 and 40 µM respectively). Sterile DMSO (0.08% - final concentration) was used as a negative control. After a 24h exposure period, cells were washed twice with Hank's balanced salt solution (Invitrogen Canada Inc.) to remove the test compound, then reincubated in supplemented RPMI medium without BaP for 24 h.

Cytokinesis-block MN assay was done following Fenech [18], with minor changes. Six µg/ml cytochalasin-B was added to the cultures for the last 24 h of culture, before cell harvest. Cells were centrifuged, resuspended in 0.075M KCl (Sigma-Aldrich Canada Ltd), incubated for 5 minutes at room temperature, centrifuged and fixed twice in Carnoy I (methanol: glacial acetic acid – 3:1 v/v, Fisher Scientific Company, Ottawa, ON, Canada). Finally, cells were spread on precleaned microscope slides (Fisher Scientific Company) and Giemsa staining was realized with freshly filtered 2% Giemsa diluted in Gurr's pH 6.8 buffer (both from Invitrogen Canada Inc.).

For the CA test, colcemid (0.1 mg/ml – Invitrogen Canada Inc.) was added to cultures 2 h prior harvesting to arrest cells in metaphase. Cells were centrifuged, resuspended in 0.075M KCl, incubated for 8 minutes at 37°C, and then fixed three times in Carnoy I. Finally, metaphases were spread on ice-cold precleaned microscope slides, and Giemsa staining was realized with freshly filtered 3 % Giemsa diluted in Gurr's pH 6.8 buffer.

2.4. Micronuclei (MN) assay

For Cytokinesis-block MN assay, all 20 subjects were analysed. For each culture (two cultures per condition, per subject), 1000 binucleated (BN) cells with well preserved cytoplasm were analysed at 1000x magnification on a Leica Laborlux microscope (Leica Microsystems Canada Inc., Richmond Hill, ON, Canada). BN cells were selected and MNs were analysed following the Fenech criteria [18]. Also, nuclear division index (NDI) was determined for all BaP conditions, by scoring the number of

cells containing one, two, three or four nuclei on 1000 viable cells, as described in Fenech [18]. All slides were analysed by the same observer.

2.5. Chromosome Aberration (CA) test

For CA test, 15 subjects (eight women and seven men) were analysed. Only subjects with adequate chromosome preparations were chosen for CA analysis. For each culture (2 cultures per condition, per subject), 100 well spread metaphases were analysed at 1000x magnification on Leica Laborlux and Aristoplan microscopes (Leica Microsystems Canada Inc.). Chromosome number, gaps, breaks and complex aberrations were recorded. Cells with 46 ± 2 chromosomes were chosen for CA analysis, as prescribed by OECD guideline 473 for the *In vitro* mammalian chromosome aberration test [20]. Cells with chromosome losses and gains were also recorded ($43 \leq \text{chromosomes} \leq 49$, triploid and tetraploid cells, as well as endoreduplications). All microscopic analyses were done by two observers, one duplicate culture per observer, for all subjects.

2.6. FISH-coupled MN assay

A pancentromeric probe (Cambio, Cambridge, UK) was used to assess the centromeric (Cen) content of MNs for both the negative control and the [BaP] = 5 $\mu\text{g/ml}$ conditions. For each subject, a slide for both conditions was stained with Giemsa; all MNs present in BN cells were preselected, and their positions carefully recorded on a Leica Aristoplan dual photonic/ fluorescence microscope (Leica Microsystems Canada Inc.) before hybridization. After destaining with Carnoy I, slides were treated with RNase A and pepsin (both from Sigma-Aldrich Canada Inc.) to remove endogenous RNA and cytoplasmic proteins. This step ensured an optimal penetration of the probe during hybridization, and thus an optimal visualization of Cen signals in MNs. Hybridization was performed following manufacturer's instructions and slides were counterstained with DAPI (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) before

microscopic analysis. Positions of preselected MNs were retrieved and number of Cen signals were recorded, for both the negative control and the [BaP] = 5 µg/ml condition. Only MNs where the FISH signals were clearly visible and homogeneously dispersed within the BN cell were analysed.

2.7. Statistical analysis

Statistics were performed using the SPSS 17.0 software for Windows (SPSS inc. Chicago, IL, USA). Results are expressed as means ± standard error of the mean (SEM) and *p*-values less than 0.05 were considered statistically significant.

Cytostatic effect of BaP was determined by analysis of the NDI with the non-parametric Wilcoxon signed-Rank test for related samples. For the dose-response relationship of MNs, the tested indicators were: frequency of MN in BN cells, frequency of micronucleated BN cells (MNBN), and number of MN per MNBN cell. For the dose-response relationship of CAs, tested indicators were: frequencies of CA, of cells presenting one or more CA (CA cells), and of cells with chromosome losses and gains. CA and CA cell frequencies were analysed with or without gaps. All dose-response indicators were analysed with the Wilcoxon signed-Rank test. Sex differences were investigated using two approaches. First, women and men samples were compared for every dose and indicators (MNs and CAs) with the Student's *t*-test for independent samples. Second, dose-response relationships for all indicators were analyzed for women and men separately with the Wilcoxon signed-Rank test, and were then compared to each other.

For analysis of MN content by FISH, two approaches were used. First, MNs were classified for the two conditions (negative control and [BaP] = 5 µg/ml) in four categories, as suggested by Iarmarcovai et al. [24]: C- MN (0 Cen signal), C+ MN (1 or more Cen signals), C₁₋₂+ MN (1-2 Cen signals) and C₃₊+ MN (3 or more Cen signals). The two-proportion *z*-test for independent samples was used to test if proportion of C+ MN and of C₃₊+ MN were higher following BaP exposure, when compared to negative control, for the whole group, as well as women and men separately. Second, MNs were

classified in 18 FISH categories, according to the number of Cen signals present in FISH-analysed MNs (1, 2, 3, ..., 18 Cen signals). Maximal threshold of 18 Cen signals was experimentally fixed. Large MNs containing more than 18 signals were rarely seen and were excluded as their diameter exceeded $1/3^{\text{rd}}$ of the mean diameter of the main nuclei [18]. Relative contribution of each FISH category to the sum of Cen signals enumerated were calculated for the two conditions and a linear regression analysis was performed. A statistical comparison was performed on the linear regression coefficients to confirm the difference existing between the negative control and [BaP] = 5 µg/ml.

3. Results

3.1. Micronuclei (MN) analysis

Individual results for MN assay are presented in Supplemental Table 5 (Table 5S), while group mean values are in Table 1. An interindividual variation was present among the subjects with spontaneous ([BaP] = 0 µg/ml) MN frequencies per 1000 BN cells ranging from 3.5 to 21 for women, and from 1 to 17 for men (Table 5S), with a mean MN frequency of 9.9 ± 1.2 for the group (Table 1). While women showed an increase when compared to men, it was non-significant. On the other hand, analysis of NDI showed a significant decrease when cells were exposed to 10 µg/ml BaP, compared to negative control (NDI = 1.59 and 1.72 respectively; $p < 0.05$).

Following BaP exposure, significant increases in MN and MNBN frequencies were observed, starting at [BaP] = 0.1 µg/ml ($p < 0.01$ – see Table 1). Maximal MN and MNBN frequencies were observed at [BaP] = 5 µg/ml, followed by a decrease at [BaP] = 10 µg/ml. As seen in Fig. 1, this decrease was significant only for MN frequency, when compared to [BaP] = 5 µg/ml, for men ($p < 0.05$ – Fig. 1A), while the group showed only a moderate non-significant decrease ($p < 0.1$ - Fig. 1B). The third MN assay indicator used in this study, the number of MN per MNBN cell, also increased following BaP exposure, being significant and maximal at [BaP] = 1 µg/ml ($p < 0.01$ – see Table 1). It slowly decreased at higher BaP concentrations, being

significant for the group at [BaP] = 10 µg/ml, when compared to [BaP] = 1 µg/ml ($p < 0.05$ - Fig. 1C).

Direct comparison of women and men samples in all BaP-tested conditions and for all MN assay indicators (MN and MNBN frequencies, number of MN per MNBN cell), showed no significant sex differences. However, dose-response relationships for MN and MNBN frequencies were different for the two sexes. Women behaved differently at [BaP] = 0.1 µg/ml, as they showed a moderate non-significant increase ($p < 0.1$ - Table 1) in MN frequency and no MNBN frequency increase, while men showed significant increases for both indicators ($p < 0.05$).

3.2. Chromosome Aberration (CA) analysis

Individual results for CA test are presented in Supplemental Table 6 (Table 6S), while group mean values are in Table 2. An interindividual variation was present among the subjects with spontaneous CA frequency (without gaps, Table 6S) ranging from 1 to 10 for women, and from 0 to 4 for men, with a mean CA frequency (without gaps, Table 2) of 1.6 ± 0.3 for the group. The spontaneous CA frequency (without gaps) was significantly lower in men, when compared to women ($1.1 \pm 0.3\%$ vs $2.1 \pm 0.8\%$; $p < 0.05$ - Table 2).

BaP exposure caused mainly gaps and chromatid breaks (Table 6S), but chromosome breaks and complex aberrations were also recorded. Significant increases in cells presenting chromosome losses and gains were seen, starting at [BaP] = 0.1 µg/ml (group: $p < 0.05$ - Table 2). Furthermore, significant increases in CA cells and CA frequency (with and without gaps) were observed, starting at [BaP] = 0.1 µg/ml (group: $p < 0.01$). Maximal percentage of CA and CA cell frequencies were observed at [BaP] = 5 µg/ml, followed by a slight decrease at [BaP] = 10 µg/ml (see Table 2). The CA cell decrease was moderate (non-significant) when compared to [BaP] = 5 µg/ml (group: $p < 0.1$ - Fig. 1D). Inclusion or exclusion of gaps during statistical analysis did not change shape of the dose-effect relationships.

Direct comparison of women and men samples in all BaP-tested conditions and for CA assay indicators (CA cells and CA frequency), showed no significant sex differences. On the other hand, dose-response relationship for CA frequency (without gaps – Table 2) was different for the two sexes. Women behaved differently at [BaP] = 0.1 µg/ml, as they showed a moderate non-significant ($p < 0.1$) increase in CA frequency (without gaps), while men showed a significant increase ($p < 0.05$).

3.3. FISH-coupled MN analysis

For the first approach, classification of FISH results in four categories (C-, C+, C₁₋₂+ and C₃₊+ MNs) for each subjects are presented in Supplemental Table 7 (Table 7S), while group results are presented in Table 3. Our results show that BaP-induced MNs were mostly C+ MN ($p < 0.01$ – Table 3). Also, subdivision of C+ MN into two categories (C₁₋₂+ and C₃₊+ MN) revealed a proportional increase of MNs containing three or more centromeric signals (C₃₊+ MN), following BaP exposure ($p < 0.01$ – Table 3). Furthermore, sex analysis showed that women and men behaved differently (see Table 3): women's MNs are mostly C₃₊+ MNs ($p < 0.01$), while in men these C₃₊+ MNs are non-significantly increased ($p < 0.1$). However, there were no significant differences between the sexes regarding the proportions of C+ and C₃₊+ MNs (see Table 3).

For the second approach, the relative contribution of each FISH category to the sum of Cen signals enumerated were calculated for the two exposure conditions ([BaP] = 0 µg/ml and [BaP] = 5 µg/ml – Table 4). Linear regression analysis (Fig. 2) showed a significant positive correlation between these parameters, related to BaP exposure ($R = 0.67$; $R^2 = 0.45$; $p = 0.0023$). In addition, comparison of the linear regression curves for negative control and [BaP] = 5 µg/ml conditions showed that they were statistically different ($p < 0.001$ – Fig. 2).

4. Discussion

4.1. Genotoxicity of BaP

Genotoxic activity of BaP was assessed following a 24 h *in vitro* exposure of human lymphocytes to four BaP concentrations, and a 24-h post-exposure period without BaP. This exposure period was chosen because longer periods already resulted in significant genotoxic responses [12-14]. Also, a post-exposure period was included to permit expression of S-dependent damages in CA test [19], and to avoid possible interactions between BaP and cytochalasin-B. Two cytogenetic biomarkers, MNs and CAs were selected to study the dose-response relationship and to explore sex differences in genotoxic responses to BaP.

A significant cytostatic effect of BaP was found in lymphocytes exposed to [BaP] = 10 µg/ml. However, the observed NDI at [BaP] = 10 µg/ml (1.59) is above the lower threshold value of 1.3 cited by Fenech [18], indicating that viability of exposed cells was adequate, and did not compromise results of our genotoxicity testing. However, our results reveal a trend towards a reduction in viability of human lymphocytes with increasing BaP exposure that is in line with an observed decrease in mitotic rate of cultured human lymphocytes exposed to 12.5 - 62.5 µg/ml BaP, reported by Vian et al. [17]. This could be related to a saturation of DNA repair enzymes [27] or to activation of p53, resulting in apoptosis of cells presenting excessive DNA damage [28].

Significant induction of MNs and CAs were observed at all BaP conditions tested, for all tested indicators (Tables 1 and 2). Also, decreases in MN and CA frequencies were observed after exposure to [BaP] = 10 µg/ml, when compared to [BaP] = 5 µg/ml (Fig. 1). This could explain in part the apparent «non-genotoxicity» of BaP observed by Vian et al. [17] and Elhajouji et al. [29], where a 48 h exposure to 12.5 - 150 µg/ml BaP, without metabolic activator S9, resulted in no MN increase. Interestingly, an analog situation had been reported by Van Hummelen et al. [30], where higher exposed workers of a coke oven plant presented less MNs than medium exposed workers. Another explanation for this phenomenon is that there could be less CA- or MN-inducing lesions following high BaP exposure, such as DNA adducts, probably caused

by saturation of metabolic activation enzymes [27]. This saturation would lead to production of less BPDE and consequently to formation of less BPDE-DNA adducts [2]. Indeed, a saturation of CYP1A1 enzyme was observed in rat hepatocytes *in vitro* exposed to benzo-a-pyrene for 48 h, as the dose-response curve of 7-ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD) activity showed a downward slope at higher BaP concentrations [31]. Furthermore, an analog dose-response curve was observed by Binkova et al. [32] in human lung fibroblasts, where less DNA adducts were observed at 1 µg/ml BaP, when compared to 0.25 µg/ml.

Also, as results are mostly presented for groups in literature, sex differences were investigated. We found a significantly lower spontaneous CA frequency (without gaps - Table 2) in men, compared to women. Indeed, men presented less chromosome breaks and complex aberrations than women (Table 6S: 7 % of all aberrations in men compared to 35 % in women; two-proportion *z*-test for independent samples, $p < 0.05$). However, these differences in spontaneous CAs were probably related to our small sample size, as large cohort studies on control populations did not report sex differences [33, 34].

Although large population studies showed no sex differences in spontaneous MN frequency in children [35], a pilot study performed in Czech Republic [36] reported a significantly higher MN frequency in girls exposed to air pollution, when compared to boys. On the other hand, a sex difference in adults is well documented for MN frequency, as a significantly increased MN frequency (spontaneous and induced) has been reported repeatedly in women and is associated with age [37]. However, in our cohort, direct comparison of all MN and CA indicators, between men and women following BaP exposure of blood lymphocytes (Student's *t*-test for independent samples) did not reveal significant sex differences (Tables 1 and 2), even if these indicators are increased in women. The non-significant increase in MN frequency (spontaneous and induced) in our study, could be related to our narrow age range (20 – 30 years), as cohorts with a larger age ranges present significantly increased MN frequency in women [37]. Also, we cannot exclude an effect of our sample size, as already mentioned.

Finally, when analyzing the dose-response relationships, an increased sensitivity of men to low BaP concentrations seems highlighted by MN and CA tests. Indeed, MN and MNBN frequencies (Table 1), as well as CA frequency (without gaps – Table 2) were significantly increased at [BaP] = 0.1 µg/ml in our male subjects ($p < 0.05$), while females did not present such increases. However, presence of this phenomenon in PAH exposed individuals can hardly be assessed and compared, as occupational studies are mostly realized in male cohorts and only few environmental exposure studies examine the effect of sex on genotoxic biomarkers.

4.2. BaP is an Aneugen and a Clastogen

In our study, exposure to BaP induced mainly formation of gaps and chromatid breaks (Table 6S). This is in line with the type of aberrations produced by BPDE in human lymphocytes [38] and classification of BaP as a S-dependent agent by Natarajan and Paliti [19]. Moreover, significant increase of CAs in our study supports classification of BaP as a clastogen compound. This classification was realized after review of literature by the GUM group and based on reported significant induction of CA and MN by BaP, in various cell systems [21]. In the same way, our study also reports an increased MN frequency, as already mentioned (Table 1). On the other hand, we observed a significant increase in percentage of cells with chromosome losses and gains after BaP exposure, maximal at [BaP] = 5 µg/ml (group: $p < 0.001$ – Table 2). More, using FISH-coupled MN assay, we found that exposure to [BaP] = 5 µg/ml induced most frequently formation of MNs containing one or more centromeres (group: 77.1 % compared to 68.5 %; $p < 0.01$ – Table 3). Further categorization revealed that those C⁺ MNs contained 3 or more centromeres in a significantly increased proportion, compared to the negative control (group: 78.3 % compared to 66.5 %; $p < 0.01$ – Table 3). These findings were further confirmed by linear regression analysis of the number of Cen signals present in FISH-analysed MNs (Table 4 and Fig. 2), showing that BaP exposure led to formation of MNs containing an increasing number of Cen signals ($p = 0.0023$). These results show that BaP has also an aneugenic effect on human lymphocytes, and this effect is observed similarly in men and in women (Table 3).

As most MNs produced by BaP contain 3 or more centromeres in our study, this could be related to an impairment at the centrosome level [39]. Indeed, Shinmura et al. [40] found that BPDE exposure of a p53-deficient lung cancer cell line induced an excessive centrosome duplication following a prolonged S-phase arrest, and subsequently, chromosome instability appearance. On the other hand, our results also support the findings of Matsuoka et al. [41] on a V79-MZ hamster cell line. They found that in BaP-treated cells (1.25 to 10 µg/ml for 24 h), distribution of chromosome number ranged from a diploid to a tetraploid number. Interestingly, these cells contain no detectable aryl hydrocarbon hydroxylase activity, suggesting a direct action of unmetabolized BaP on cellular components, probably on the cytoskeleton. Further analyses showed presence of spindle disturbances (incomplete spindles, multipolar spindles and lagging chromosomes) immediately after BaP exposure, as well as appearance of hyperdiploidy in V79-MZ cells cultured up to five months after exposure [42].

In chemical carcinogenesis, BaP is recognized as an initiator, through formation of highly mutagenic BPDE-DNA adducts. Moreover, clastogenic events participate in initiation, as chromosomal breaks favor formation of chromosome aberrations, important for generation of transformed cells [43]. Using pancentromeric FISH on MNs, our results show that BaP-induced MNs contain centromeres, strongly suggestive of an aneugenic effect. As these MNs mostly contain three or more centromeres, genetic consequences of MN malsegregation events are aggravated. Taking into consideration that BaP also caused chromosome losses and gains, our results combined with the work of Shinmura et al. [40] and Matsuoka et al. [41,42] now link BaP exposure to chromosome number changes, spindle disturbances and aneuploidy. Carcinogen-induced aneugenic events, by producing chromosome number changes, could favor selection of cells containing particular mutations important for neoplastic progression [44].

5. Conclusion

When analyzing dose-response relationships of men and women separately with CAs and MNs, we found that they behaved differently at lower BaP concentrations, in opposition to the other statistical approach traditionally used in literature. Whether this sex difference really exists remains to be explored further, using more biomarkers and subjects, and also in population studies designed to answer this specific question.

Additionally, clastogenic activity of BaP in normal (untransformed) human cells was confirmed by our results. And most importantly, FISH-coupled MN assay showed that most BaP-induced MNs contained three or more centromeres, also suggesting an aneugenic effect on human lymphocytes. As pancentromeric FISH-coupled MN assay as been realized in a limited number of human *in vivo* (welders, pathologists, cancer patients) [45-48] and *in vitro* studies (paclitaxel, vinblastine, cyclophosphamide) [49-51], use of increased proportion of C⁺ MN and/or C₃⁺ MN as biomarkers of aneugenic activity must be validated. Together with karyotypic changes, spindle disturbances and centrosome duplication, our results provide additional evidences that BaP could play a role in the progression step of carcinogenesis. Involvement of BaP and other PAH in progression needs to be confirmed in studies involving humans environmentally or occupationally exposed to PAH, particularly using FISH-coupled MN assay. This might be of particular importance given that exposure to BaP and other PAHs (smoking, occupational exposure) are chronic and may last for decades.

Acknowledgments

The authors wish to thank all subjects for their cooperation while participating in this study. This work was supported by the département de pathologie et biologie cellulaire de l'Université de Montréal [to N.L.], the Fonds de la Recherche en Santé du Québec [to F.F.] and the Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine / Fondation des Étoiles [to F.F.].

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- [1] K. Straif, R. Baan, Y. Grosse, B. Secretan, F. El Ghissassi, V. Cogliano, Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Lancet Oncology* 6 (2005) 931-932.
- [2] K.P. Miller, K.S. Ramos, Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons, *Drug Metab. Rev.* 33 (2001) 1-35.
- [3] J.H. Park, A.B. Troxel, R.G. Harvey, T.M. Penning, Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) o-quinones produced by the aldo-keto-reductases (AKRs) generate abasic sites, oxidized pyrimidines, and 8-oxo-dGuo via reactive oxygen species, *Chem. Res. in Toxicol.* 19 (2006) 719-728.
- [4] T. Shimada, Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons, *Drug Metab. Pharmacokinet.* 21 (2006) 257-276.
- [5] L. Donbak, E. Rencuzogullari, A. Yavuz, M. Topaktas, The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey, *Mutat. Res.* 588 (2005) 82-87.
- [6] A.L. Liu, W.Q. Lu, Z.Z. Wang, W.H. Chen, W.H. Lu, J. Yuan, P.H. Nan, J.Y. Sun, Y.L. Zou, L.H. Zhou, C. Zhang, T.C. Wu, Elevated levels of urinary 8-hydroxy-2 - deoxyguanosine, lymphocytic micronuclei, and serum glutathione S-transferase in workers exposed to coke oven emissions, *Environ. Health Perspect.* 114 (2006) 673-677.
- [7] D. Cavallo, C.L. Ursini, B. Rondinone, S. Iavicoli, Evaluation of a suitable DNA damage biomarker for human biomonitoring of exposed workers, *Environ. Mol. Mutag.* 50 (2009) 781-790.
- [8] P. Okano, H.N. Miller, R.C. Robinson, H.V. Gelboin, Comparison of benzo(a)pyrene and (-)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene metabolism in human blood monocytes and lymphocytes, *Cancer Res.* 39 (1979) 3184-3193.
- [9] G. Siest, E. Jeannesson, J.B. Marteau, A. Samara, B. Marie, M. Pfister, S. Visvikis-Siest, Transcription factor and drug-metabolizing enzyme gene expression in lymphocytes from healthy human subjects, *Drug Metab. Dispos.* 36 (2008) 182-189.

- [10] P. Lin, S.W. Hu, T.H. Chang, Correlation between gene expression of aryl hydrocarbon receptor (AhR), hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt), cytochromes P4501A1 (CYP1A1) and 1B1 (CYP1B1), and inducibility of CYP1A1 and CYP1B1 in human lymphocytes, *Toxicol. Sci.* 71 (2003) 20-26.
- [11] Y.H. Cho, H.W. Chung, The effect of extremely low frequency electromagnetic fields (ELF-EMF) on the frequency of micronuclei and sister chromatid exchange in human lymphocytes induced by benzo(a)pyrene, *Toxicol. Lett.* 143 (2003) 37-44.
- [12] D. Warshawsky, G.K. Livingston, M. Fonouni-Fard, K. LaDow, Induction of micronuclei and sister chromatid exchanges by polycyclic and N-heterocyclic aromatic hydrocarbons in cultured human lymphocytes, *Environ. Mol. Mutagen.* 26 (1995) 109-118.
- [13] K. Hastak, N. Lubri, S.D. Jakhi, C. More, A. John, S.D. Ghaisas, S.V. Bhide, Effect of turmeric oil and turmeric oleoresin on cytogenetic damage in patients suffering from oral submucous fibrosis, *Cancer Lett.* 116 (1997) 265-269.
- [14] G.S. Guven, M. Guven, H. Onaran, T. Ulutin, S. Hacıanefioglu, Individual sensitivity to cytogenetic effects of benzo[alpha]pyrene in cultured human lymphocytes: Influence of glutathione S-transferase M1 genotype, *Genet. Mol. Biol.* 29 (2006) 142-147.
- [15] X. Wu, J. Gu, C.I. Amos, H. Jiang, W.K. Hong, M.R. Spitz, A parallel study of in vitro sensitivity to benzo[a]pyrene diol epoxide and bleomycin in lung carcinoma cases and controls, *Cancer* 83 (1998) 1118-1127.
- [16] P. Xiong, M.L. Bondy, D. Li, H. Shen, L.E. Wang, S.E. Singletary, M.R. Spitz, Q. Wei, Sensitivity to benzo(a)pyrene diol-epoxide associated with risk of breast cancer in young women and modulation by glutathione S-transferase polymorphisms: a case-control study, *Cancer Res.* 61 (2001) 8465-8469.
- [17] L. Vian, N. Bichet, D. Gouy, The in vitro micronucleus test on isolated human lymphocytes, *Mutat. Res.* 291 (1993) 93-102.
- [18] M. Fenech, Cytokinesis-block micronucleus cytome assay, *Nat. Protoc.* 2 (2007) 1084-1104.
- [19] A.T. Natarajan, F. Palitti, DNA repair and chromosomal alterations, *Mutat. Res.* 657 (2008) 3-7.

- [20] OECD, Test No. 473: In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test, OECD Publishing, Paris, 1997.
- [21] B. Miller, F. Potter-Locher, A. Seelbach, H. Stopper, D. Utesch, S. Madle, Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the in vitro micronucleus test. *Gesellschaft für Umwelt-Mutations-forschung, Mutat. Res.* 410 (1998) 81-116.
- [22] R. Corvi, S. Albertini, T. Hartung, S. Hoffmann, D. Maurici, S. Pfuhler, J. van Benthem, P. Vanparys, ECVAM retrospective validation of in vitro micronucleus test (MNT), *Mutagenesis* 23 (2008) 271-283.
- [23] H. Norppa, G.C. Falck, What do human micronuclei contain?, *Mutagenesis* 18 (2003) 221-233.
- [24] G. Iarmarcovai, S. Bonassi, I. Sari-Minodier, M. Baciuchka-Palmaro, A. Botta, T. Orsiere, Exposure to genotoxic agents, host factors, and lifestyle influence the number of centromeric signals in micronuclei: a pooled re-analysis, *Mutat. Res.* 615 (2007) 18-27.
- [25] D. Dabrowska, A. Kot-Wasik, J. Namiesnik, Stability studies of selected polycyclic aromatic hydrocarbons in different organic solvents and identification of their transformation products, *Pol. J. Environ. Stud.* 17 (2008) 17-24.
- [26] N. Lemieux, R. Drouin, C.L. Richer, High-resolution dynamic and morphological G-bandings (GBG and GTG): a comparative study, *Hum. Genet.* 85 (1990) 261-266.
- [27] W. Slikker, Jr., M.E. Andersen, M.S. Bogdanffy, J.S. Bus, S.D. Cohen, R.B. Conolly, R.M. David, N.G. Doerr, D.C. Dorman, D.W. Gaylor, D. Hattis, J.M. Rogers, R. Woodrow Setzer, J.A. Swenberg, K. Wallace, Dose-dependent transitions in mechanisms of toxicity, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 201 (2004) 203-225.
- [28] M. Gomez-Lazaro, F.J. Fernandez-Gomez, J. Jordan, p53: Twenty five years understanding the mechanism of genome protection [Review], *J. Physiol. Biochem.* 60 (2004) 287-307.

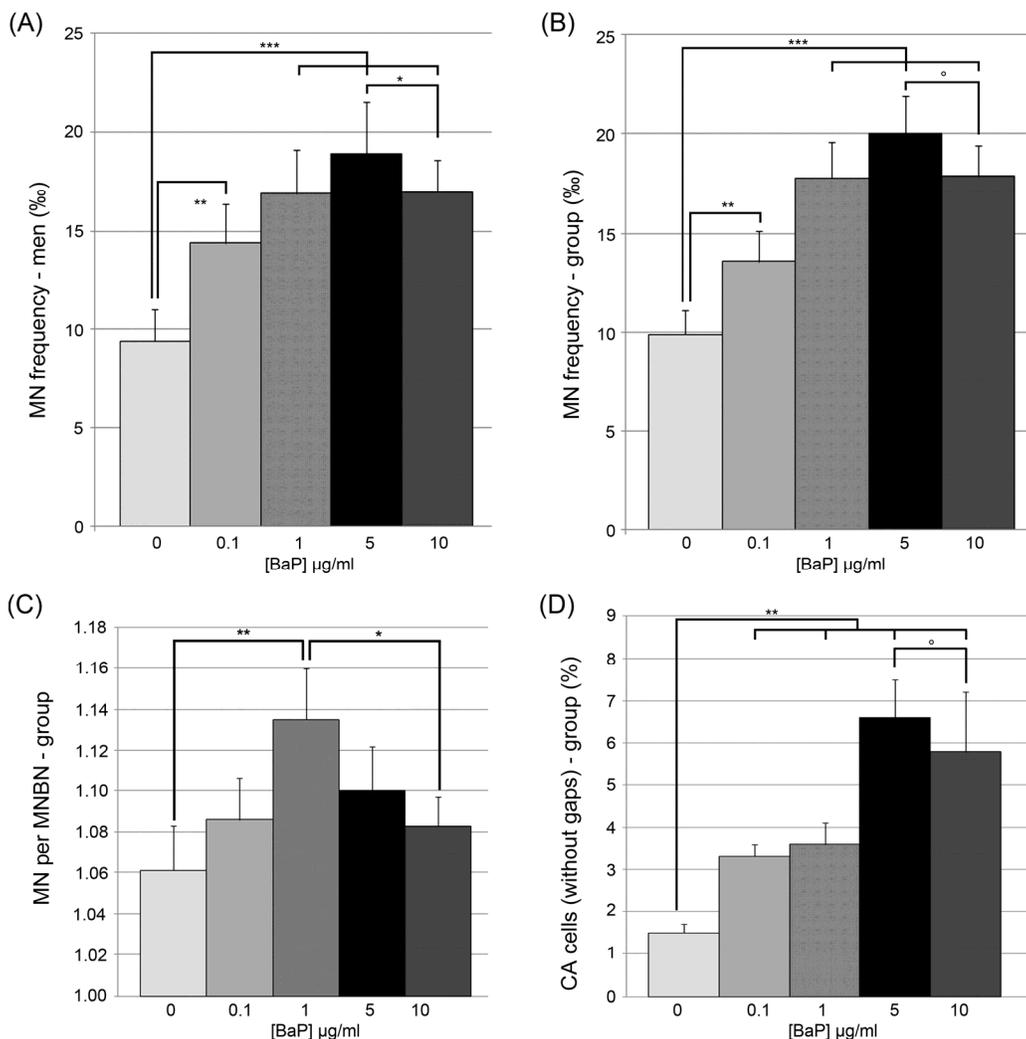
- [29] A. Elhajouji, A.P. Santos, P. Van Hummelen, M. Kirsch-Volders, Metabolic differences between whole blood and isolated lymphocyte cultures for micronucleus (MN) induction by cyclophosphamide and benzo[a]pyrene, *Mutagenesis* 9 (1994) 307-313.
- [30] P. Van Hummelen, J.P. Gennart, J.P. Buchet, R. Lauwerys, M. Kirsch-Volders, Biological markers in PAH exposed workers and controls, *Mutat. Res.* 300 (1993) 231-239.
- [31] M. Till, D. Riebniger, H.J. Schmitz, D. Schrenk, Potency of various polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of CYP1A1 in rat hepatocyte cultures, *Chem.-Biol. Interact.* 117 (1999) 135-150.
- [32] B. Binkova, Y. Giguere, P. Rossner, Jr., M. Dostal, R.J. Sram, The effect of dibenzo[a,1]pyrene and benzo[a]pyrene on human diploid lung fibroblasts: the induction of DNA adducts, expression of p53 and p21(WAF1) proteins and cell cycle distribution, *Mutat. Res.* 471 (2000) 57-70.
- [33] S. Bonassi, C. Bolognesi, A. Abbondandolo, R. Barale, P. Bigatti, L. Camurri, L. Dalpra, M. De Ferrari, A. Forni, C. Lando, Influence of sex on cytogenetic end points: evidence from a large human sample and review of the literature, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 4 (1995) 671-679.
- [34] V. Kasuba, K. Sentija, V. Garaj-Vrhovac, A. Fucic, Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from control individuals, *Mutat. Res.* 346 (1995) 187-193.
- [35] N. Holland, A. Fucic, D.F. Merlo, R. Sram, M. Kirsch-Volders, Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables, *Mutagenesis* 26 (2011) 51-56.
- [36] M. Pedersen, P. Vinzents, J.H. Petersen, J.C. Kleinjans, G. Plas, M. Kirsch-Volders, M. Dostal, P. Rossner, O. Beskid, R.J. Sram, D.F. Merlo, L.E. Knudsen, Cytogenetic effects in children and mothers exposed to air pollution assessed by the frequency of micronuclei and fluorescence in situ hybridization (FISH): a family pilot study in the Czech Republic, *Mutat. Res.* 608 (2006) 112-120.

- [37] M. Fenech, S. Bonassi, The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes, *Mutagenesis* 26 (2011) 43-49.
- [38] X. Wu, S.M. Lippman, J.J. Lee, Y. Zhu, Q.V. Wei, M. Thomas, W.K. Hong, M.R. Spitz, Chromosome instability in lymphocytes: a potential indicator of predisposition to oral premalignant lesions, *Cancer Res.* 62 (2002) 2813-2818.
- [39] G. Iarmarcovai, A. Botta, T. Orsiere, Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy, *Toxicol. Lett.* 166 (2006) 1-10.
- [40] K. Shinmura, M. Iwaizumi, H. Igarashi, K. Nagura, H. Yamada, M. Suzuki, K. Fukasawa, H. Sugimura, Induction of centrosome amplification and chromosome instability in p53-deficient lung cancer cells exposed to benzo[a]pyrene diol epoxide (B[a]PDE), *J. Pathol.* 216 (2008) 365-374.
- [41] A. Matsuoka, M. Ozaki, K. Takeshita, H. Sakamoto, H.R. Glatt, M. Hayashi, T. Sofuni, Aneuploidy induction by benzo[a]pyrene and polyploidy induction by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in Chinese hamster cell lines V79-MZ and V79, *Mutagenesis* 12 (1997) 365-372.
- [42] A. Matsuoka, K. Matsuura, H. Sakamoto, M. Hayashi, T. Sofuni, Spindle disturbances induced by benzo[a]pyrene and 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene in a Chinese hamster cell line (V79-MZ) and the stability of the numerical chromosome aberrations that follow, *Mutat. Res.* 419 (1998) 1-12.
- [43] A.G. Knudson, Two genetic hits (more or less) to cancer, *Nat. Rev. Cancer* 1 (2001) 157-162.
- [44] B.L. Schneider, M. Kulesz-Martin, Destructive cycles: the role of genomic instability and adaptation in carcinogenesis, *Carcinogenesis* 25 (2004) 2033-2044.
- [45] G. Iarmarcovai, I. Sari-Minodier, T. Orsière, M. De Meo, P. Gallice, C. Bideau, D. Iniesta, J. Pompili, J.L. Berge-Lefranc, A. Botta, A combined analysis of XRCC1, XRCC3, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and centromere content of micronuclei in welders, *Mutagenesis* 21 (2006) 159-165.
- [46] T. Orsière, I. Sari-Minodier, G. Iarmarcovai, A. Botta, Genotoxic risk assessment of pathology and anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde by use of

- personal air sampling and analysis of DNA damage in peripheral lymphocytes, *Mutat. Res.* 605 (2006) 30-41.
- [47] G. Iarmarcovai, M. Ceppi, A. Botta, T. Orsière, S. Bonassi, Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis, *Mutat. Res.* 659 (2008) 274-283.
- [48] M. Baciuchka-Palmaro, T. Orsière, F. Duffaud, I. Sari-Minodier, J. Pompili, L. Bellon, M. De Méo, L. Digue, R. Favre, A. Botta, Acentromeric micronuclei are increased in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients, *Mutat. Res.* 520 (2002) 189-198.
- [49] L. Digue, T. Orsière, M. De Méo, M.G. Mattei, D. Depetris, F. Duffaud, R. Favre, A. Botta, Evaluation of the genotoxic activity of paclitaxel by the in vitro micronucleus test in combination with fluorescent in situ hybridization of a DNA centromeric probe and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in human T-lymphocytes, *Environ. Mol. Mutag.* 34 (1999) 269-278.
- [50] R. Huber, K. Salassidis, U. Kulka, H. Braselmann, M. Bauchinger, Detection of centromeres in vinblastine- and radiation-induced micronuclei of human lymphocytes using FISH with an alpha satellite pancentromeric DNA probe, *Environ. Mol. Mutag.* 27 (1996) 105-109.
- [51] F. Darroudi, C.M. Meijers, V. Hadjidekova, A.T. Natarajan, Detection of aneugenic and clastogenic potential of X-rays, directly and indirectly acting chemicals in human hepatoma (Hep G2) and peripheral blood lymphocytes, using the micronucleus assay and fluorescent in situ hybridization with a DNA centromeric probe, *Mutagenesis* 11 (1996) 425-433.

Legend to Fig. 1 :

Histograms showing the dose-effect relationship observed in the analysis of human lymphocytes *in vitro* exposed to benzo-a-pyrene. (A) Significant decrease of MN frequency observed in men between BaP 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$ conditions ($p < 0.05$). (B) Moderate (non-significant) decrease of MN frequency observed in the group between BaP 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$ conditions ($p < 0.1$). (C) Significant decrease of MN per MNBN observed in the group between BaP 1 and 10 $\mu\text{g/ml}$ conditions ($p < 0.01$). (D) Moderate (non-significant) decrease of CA cells (without gaps) observed in the group between BaP 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$ conditions ($p < 0.1$). Means \pm SEM are shown. $^{\circ} p < 0.1$; $* p < 0.05$; $** p < 0.01$; $*** p < 0.001$ (Wilcoxon signed rank test for paired samples).



Legend to Fig. 2 :

Linear regression of the relative contribution of each FISH category to the sum of Cen signals enumerated in FISH-analysed MNs, for the negative control and BaP 5 µg/ml conditions (data presented in Table 4). Gray line represents linear regression of negative control condition and black line represents linear regression of BaP 5 µg/ml. Statistical comparison of regression curves (negative control vs BaP 5 µg/ml) show that they are significantly different ($p < 0.001$).

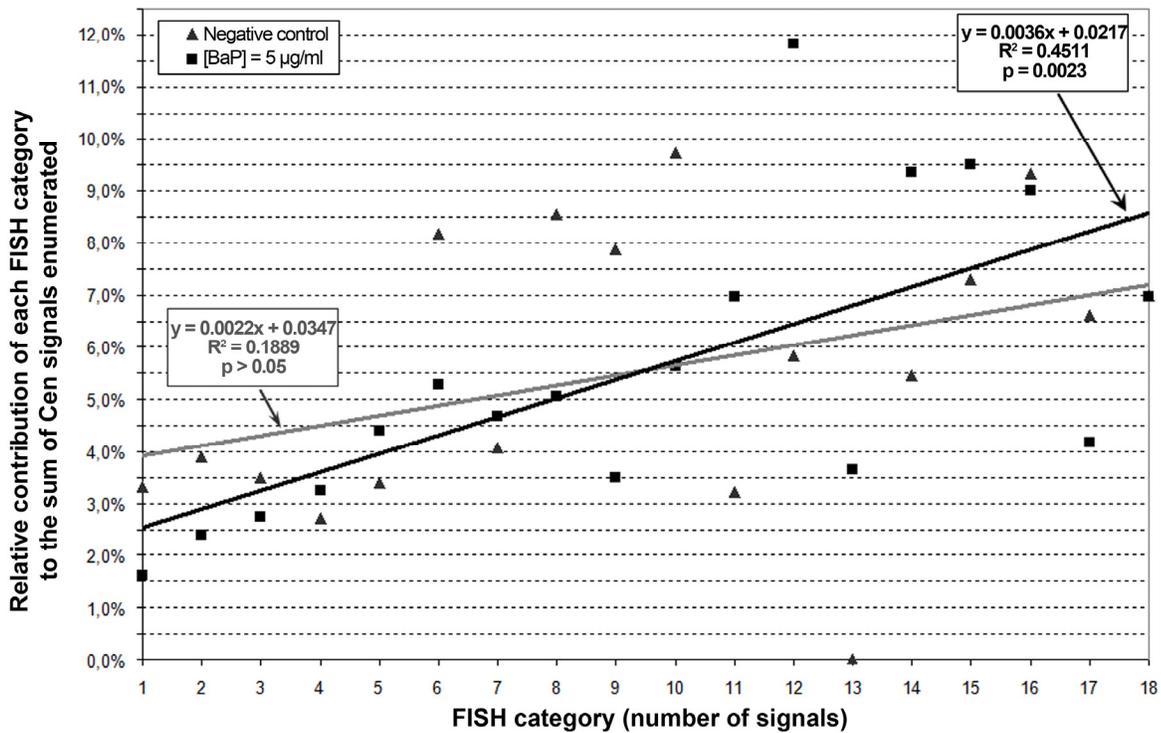


Table 1

Frequency of micronuclei (MNs) (per 1000 binucleated cells) in human lymphocytes drawn from 20 subjects, *in vitro* exposed to benzo-a-pyrene.

Indicators	BaP concentrations ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	0.1	1	5	10
BN ^a cells analysed					
Group	40 000	40 000	40 000	40 000	38 000
Women	20 000	20 000	20 000	20 000	20 000
Men	20 000	20 000	20 000	20 000	18 000
MN frequency (%)					
Group	9.9 \pm 1.2	13.6 \pm 1.5**	17.8 \pm 1.8***	20.0 \pm 1.9***	17.9 \pm 1.5***
Women	10.4 \pm 1.8	12.8 \pm 2.3 [†]	18.8 \pm 2.9**	21.1 \pm 3.0**	18.7 \pm 2.5**
Men	9.4 \pm 1.6	14.4 \pm 2.0*	16.9 \pm 2.2**	18.9 \pm 2.6**	17.0 \pm 1.6**
MNBN ^b frequency (‰)					
Group	9.3 \pm 1.0	12.3 \pm 1.3**	15.6 \pm 1.5***	17.9 \pm 1.6***	16.6 \pm 1.4***
Women	9.6 \pm 1.6	11.6 \pm 1.9	16.2 \pm 2.3**	19.2 \pm 2.5**	17.2 \pm 2.4**
Men	8.9 \pm 1.4	13.0 \pm 1.7*	14.9 \pm 1.9**	16.6 \pm 2.0**	15.8 \pm 1.5**
MN per MNBN					
Group	1.061 \pm 0.022	1.086 \pm 0.020	1.135 \pm 0.025**	1.100 \pm 0.022*	1.083 \pm 0.014
Women	1.084 \pm 0.040	1.076 \pm 0.029	1.147 \pm 0.033 [†]	1.086 \pm 0.020	1.092 \pm 0.021
Men	1.037 \pm 0.018	1.097 \pm 0.029 [†]	1.124 \pm 0.037*	1.114 \pm 0.040*	1.074 \pm 0.020

Results are presented as means \pm SEM, for the whole group, as well as women and men separately.

p-values are presented for negative control vs BaP exposure.

[†] p < 0.1 * p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

^a BN: Binucleated cell

^b MNBN: Micronucleated BN cell (containing one or more micronuclei)

Table 2

Frequency of chromosome aberrations (CAs) (per 100 cells) in human lymphocytes drawn from 15 subjects, *in vitro* exposed to benzo-a-pyrene.

Indicators	BaP concentrations ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	0.1	1	5	10
Metaphases analysed					
Group	3000	3000	3000	2600	800
Women	1600	1600	1600	1400	400
Men	1400	1400	1400	1200	400
CA frequency (- gaps ^a) (%)					
Group	1.6 \pm 0.3	3.6 \pm 0.5**	4.4 \pm 0.8**	7.5 \pm 1.0**	6.9 \pm 1.6
Women	2.1 \pm 0.5	3.8 \pm 0.5 [†]	5.4 \pm 1.4*	7.9 \pm 1.6*	8.0 \pm 3.5
Men	1.1 \pm 0.3	3.4 \pm 0.8*	3.2 \pm 0.8*	7.1 \pm 1.4*	5.8 \pm 0.8
CA frequency (+ gaps ^a) (%)					
Group	3.4 \pm 0.4	6.0 \pm 0.7**	7.2 \pm 1.1**	11.7 \pm 1.3**	10.8 \pm 2.4 [†]
Women	3.8 \pm 0.6	6.3 \pm 0.9*	8.6 \pm 1.9*	12.1 \pm 2.0*	13.0 \pm 4.5
Men	2.9 \pm 0.4	5.7 \pm 1.2*	5.6 \pm 1.0*	11.2 \pm 1.7*	8.5 \pm 2.0
CA cells ^b (- gaps) (%)					
Group	1.5 \pm 0.2	3.3 \pm 0.3**	3.6 \pm 0.5**	6.6 \pm 0.9**	5.8 \pm 1.4 [†]
Women	1.8 \pm 0.3	3.5 \pm 0.3*	4.1 \pm 0.7*	7.2 \pm 1.5*	7.0 \pm 3.0
Men	1.1 \pm 0.3	3.0 \pm 0.5*	2.9 \pm 0.7*	5.9 \pm 1.1*	4.5 \pm 0.5
CA cells (+ gaps) (%)					
Group	3.1 \pm 0.3	5.1 \pm 0.5**	6.0 \pm 0.7**	9.5 \pm 1.0***	8.6 \pm 2.0 [†]
Women	3.2 \pm 0.4	5.2 \pm 0.4*	6.6 \pm 1.0*	10.0 \pm 1.7*	11.0 \pm 3.5
Men	2.9 \pm 0.4	5.0 \pm 0.9*	5.2 \pm 0.9*	8.9 \pm 1.2*	6.3 \pm 1.3
Chromosome losses/ gains ^c (%)					
Group	0.21 \pm 0.06	0.57 \pm 0.13*	0.57 \pm 0.09*	0.87 \pm 0.14***	0.25 \pm 0.02

Results are presented as means \pm SEM, for the whole group, as well as women and men separately.

p-values are presented for negative control vs BaP exposure.

[†] p < 0.1 * p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

^a – gaps: without gaps; + gaps: with gaps

^b Percentage of cells presenting one or more CAs

^c Cells with $43 \leq$ chromosomes ≤ 49

Table 3

FISH analysis of micronuclei (MNs), using a pancentromeric probe, for [BaP] = 0 µg/ml (negative control) and [BaP] = 5 µg/ml (exposed condition).

	BaP (µg/ml)	MNs analyzed	C- MN ^a	C+ MN ^b	C+MN (%)	C ₁₋₂ + MN ^c	C ₃₊ + MN ^d	C ₃₊ + MN (%)
Group	0	235	74	161	68.5	54	107	66.5
	5	477	109	368	77.1 **	80	288	78.3 **
Women	0	138	39	99	71.7	37	62	62.6
	5	236	52	184	78.0 †	44	140	76.1 **
Men	0	97	35	62	63.9	17	45	72.6
	5	241	57	184	76.3 **	36	148	80.4 †

The number of C-, C+, C₁₋₂+ and C₃₊+ MNs, and percentages of C+ and C₃₊+ MNs are presented for the whole group, as well as women and men separately. Percentages of C+ and C₃₊+ MNs present in the [BaP] = 5 µg/ml condition were compared to the negative control condition using the two-proportion z-test.

^a C- MN: MN containing no centromere

^b C+ MN: MN containing one or more centromeres

^c C₁₋₂+ MN: MN containing one or two centromeres

^d C₃₊+ MN: MN containing 3 or more centromeres

† p < 0.1 ** p < 0.01

Table 4

Number of micronuclei (MNs) analysed by FISH with a pancentromeric probe and number of Cen signals enumerated, per FISH category; relative contribution of each FISH category to the sum of Cen signals enumerated, for [BaP] = 0 µg/ml (negative control) and [BaP] = 5 µg/ml (exposed condition).

FISH Category ^a	[BaP] = 0 µg/ml			[BaP] = 5 µg/ml		
	MNs analysed	Cen signals enumerated	Relative contribution of Cen signals	MNs analysed	Cen signals enumerated	Relative contribution of Cen signals
1	34	34	3.31 %	46	46	1.62 %
2	20	40	3.89 %	34	68	2.39 %
3	12	36	3.50 %	26	78	2.74 %
4	7	28	2.72 %	23	92	3.24 %
5	7	35	3.40 %	25	125	4.40 %
6	14	84	8.17 %	25	150	5.28 %
7	6	42	4.09 %	19	133	4.68 %
8	11	88	8.56 %	18	144	5.07 %
9	9	81	7.88 %	11	99	3.48 %
10	10	100	9.73 %	16	160	5.63 %
11	3	33	3.21 %	18	198	6.97 %
12	5	60	5.84 %	28	336	11.82 %
13	0	0	0 %	8	104	3.66 %
14	4	56	5.45 %	19	266	9.36 %
15	5	75	7.30 %	18	270	9.50 %
16	6	96	9.34 %	16	256	9.01 %
17	4	68	6.61 %	7	119	4.19 %
18	4	72	7.00 %	11	198	6.97 %
<i>Sum</i>	<i>161</i>	<i>1028</i>	<i>100 %</i>	<i>368</i>	<i>2842</i>	<i>100 %</i>

^a MNs were classified by FISH categories, according to the number of Cen signals present after hybridization.

Supplemental Table 5

Frequency of micronuclei (MNs) in human lymphocytes drawn from 20 subjects, *in vitro* exposed to benzo-a-pyrene. 2000 BN cells were scored per condition, per subject.

Technique Subject/ Age	Code/ BaP (µg/ml)	MN frequency (‰)	MNBN ^a frequency (‰)	MN per MNBN
MN1/ F1 ^b / 30	0	10.5	10.5	1.000
	0.1	11.5	11	1.045
	1	12	11	1.091
	5	20	19.5	1.026
	10	34.5	32.5	1.061
MN2/ F2/ 30	0	3.5	2.5	1.000
	0.1	2.5	2.5	1.000
	1	5	5	1.000
	5	11.5	11	1.045
	10	11.5	10	1.150
MN3/ F3/ 30	0	9	9	1.000
	0.1	15	15	1.000
	1	19.5	19	1.026
	5	13	12.5	1.040
	10	8	7.5	1.067
MN4/ F4/ 29	0	8	7.5	1.067
	0.1	12	12	1.000
	1	25	23	1.087
	5	35	31.5	1.111
	10	15	15	1.000
MN5/ F5/ 21	0	7.5	7	1.071
	0.1	6.5	6.5	1.000
	1	17	13	1.308
	5	13.5	12.5	1.080
	10	13.5	13	1.038
MN6/ F6/ 29	0	10.5	10.5	1.000
	0.1	11.5	10	1.150
	1	17	14	1.214
	5	20.5	17.5	1.171
	10	13	11.5	1.130
MN7/ F7/ 27	0	21	20	1.050
	0.1	23.5	19.5	1.205
	1	38	31	1.226
	5	36.5	32.5	1.123
	10	25	21.5	1.163
MN8/ F8/ 23	0	4.5	4.5	1.000
	0.1	4.5	4.5	1.000
	1	13	11	1.182

	5	12	12	1.000
	10	21.5	21.5	1.000
MN9/ F9/ 23	0	15	12.5	1.200
	0.1	24	21	1.143
	1	26.5	21	1.262
	5	28.5	24	1.187
	10	20	17	1.176
MN10/ F10/ 22	0	10	9.5	1.053
	0.1	17	14	1.214
	1	15	14	1.071
	5	20.5	19	1.079
	10	25.5	22.5	1.133
MN11/ M1 ^b / 29	0	11.5	11.5	1.000
	0.1	18.5	17	1.088
	1	19.5	19.5	1.000
	5	23	22	1.045
	10	13.5	12	1.125
MN12/ M2/ 30	0	1	1	1.000
	0.1	1.5	1.5	1.000
	1	1.5	1.5	1.000
	5	3	3	1.000
	10	nd	nd	nd
MN13/ M3/ 28	0	12	11	1.091
	0.1	16	16	1.000
	1	19	15	1.267
	5	16.5	15.5	1.064
	10	13.5	13.5	1.000
MN14/ M4/ 21	0	16	15.5	1.032
	0.1	20	15.5	1.290
	1	22	21	1.048
	5	27	23.5	1.149
	10	17.5	16.5	1.061
MN15/ M5/ 29	0	8	8	1.000
	0.1	16	14.5	1.103
	1	18.5	16.5	1.121
	5	16	15	1.067
	10	13.5	11.5	1.174
MN16/ M6/ 30	0	14	13.5	1.037
	0.1	21	18	1.167
	1	20	17.5	1.143
	5	17	15.5	1.097
	10	14	13	1.077
MN17/ M7/ 23	0	4.5	4.5	1.000
	0.1	7	7	1.000
	1	7	7	1.000
	5	10	10	1.000
	10	12	12	1.000
MN17/ M8/ 26	0	12.5	12	1.042

	0.1	20	18	1.111
	1	21	17	1.235
	5	31.5	22	1.432
	10	25	23	1.087
MN19/ M9/ 23	0	17	14.5	1.172
	0.1	15	13	1.154
	1	24.5	18.5	1.324
	5	22.5	19	1.284
	10	24	21.5	1.116
MN20/ M10/ 28	0	8.5	8.5	1.000
	0.1	10	9.5	1.053
	1	17	15.5	1.097
	5	22	20	1.184
	10	20	19.5	1.116

^a MNBN: Binucleated cells (BN) with one or more micronuclei

^b F: female; M: male.

Supplemental Table 6

Result of chromosome aberration (CA) test realised in human lymphocytes drawn from 15 subjects, *in vitro* exposed to benzo-a-pyrene. 200 cells were scored per condition, per subject.

Technique Code/ Subject/ Age	BaP (µg/ml)	CA types				Losses/ gains ^d	CA cells (- gaps ^e)	CA cells (+ gaps ^e)	CAs (- gaps)	CAs (+ gaps)
		gap	chtb ^a	chr ^b	cplx ^c					
CA1/ F1 ^f / 30	0	6	3	-	-	1	3	7	3	9
	0.1	12	8	-	-	1	8	14	8	20
	1	2	6	-	-	-	6	8	6	8
	10	9	6	2	-	-	8	15	9	17
CA2/ F2/ 25	0	2	4	2	-	1	5	7	6	8
	0.1	6	10	2	1	-	10	13	14	20
	1	7	11	1	-	-	10	17	19	12
	5	19	18	4	1	2	24	33	24	42
CA3/ F4/ 28	0	11	18	5	-	-	20	29	23	35
	0.1	2	3	-	-	-	3	5	3	5
	1	2	8	-	-	-	8	9	8	10
	5	8	7	4	1	5	11	18	13	21
CA4/ F5/ 21	0	2	3	-	-	-	3	5	3	5
	0.1	2	8	-	-	-	8	9	8	10
	1	4	2	-	-	1	2	6	2	6
	5	8	7	4	1	5	11	18	13	21
CA5/ F6/ 29	0	7	2	-	-	1	2	9	2	9
	0.1	6	7	-	-	1	7	12	7	13
	1	12	21	4	1	1	11	21	26	38
	5	7	5	-	1	4	8	12	10	17
CA6/ F7/ 27	0	1	3	-	-	-	3	4	3	4
	0.1	4	5	1	1	-	7	10	7	11
	1	8	10	5	-	-	12	17	15	23
	5	7	9	5	-	1	14	20	14	21
CA7/ F11/ 29	0	4	3	3	-	-	6	10	6	10
	0.1	3	6	1	-	1	7	10	7	10
	1	6	11	3	-	1	13	17	14	20
	5	7	6	1	1	3	8	14	9	15
CA8/ F12/ 29	0	3	3	7	-	-	6	7	10	13
	0.1	4	4	1	-	-	5	9	5	9
	1	6	5	2	-	3	7	13	7	15
	5	6	21	8	1	-	27	32	31	37
CA9/ M1 ^f / 28	0	2	1	-	-	-	1	3	1	3
	0.1	3	4	-	-	3	4	7	4	7
	1	3	5	-	-	1	5	7	5	8
	5	6	10	-	-	-	9	12	10	16
CA9/ M1 ^f / 28	0	-	3	-	-	-	-	3	-	3
	0.1	2	-	1	1	2	2	4	2	4
	1	2	1	-	1	-	1	4	1	3

CA10/ M2/ 28	10	3	7	3	-	-	8	10	10	13
	0	3	2	-	-	-	2	5	2	5
	0.1	4	1	-	-	4	1	5	1	5
	1	5	5	-	-	-	5	9	5	10
	5	5	8	-	-	-	7	12	8	13
CA11/ M3/ 28	10	8	11	2	-	-	10	15	13	21
	0	6	2	-	-	1	2	8	2	8
	0.1	9	9	4	-	2	9	17	13	22
	1	5	7	3	-	2	7	11	10	15
CA12/ M4/ 21	5	8	7	5	1	2	8	16	12	20
	0	2	3	-	-	1	3	5	3	5
	0.1	6	9	1	-	-	10	15	10	16
	1	8	6	2	-	2	8	15	8	15
CA13/ M5/ 29	5	13	16	3	1	1	19	25	22	33
	0	4	3	-	-	1	3	6	1	7
	0.1	4	7	-	-	2	7	10	7	11
	1	3	1	1	-	-	2	5	2	5
	5	11	7	5	-	-	11	17	12	23
CA14/ M6/ 30	0	3	1	-	-	-	1	4	1	4
	0.1	2	4	1	-	-	5	7	5	7
	1	5	6	1	-	-	7	12	7	12
	5	6	8	-	-	-	8	12	8	14
CA15/ M7/ 23	0	5	3	1	-	-	4	9	4	9
	0.1	6	6	3	-	-	8	12	9	15
	1	6	8	2	2	2	11	17	12	18
	5	8	16	6	1	2	18	25	23	31

^a chtb: chromatid break

^b chrb : chromosome break

^c cplx: complex abnormality. Includes dicentric chromosome, ring chromosome, triradial and quadriradial figures.

^d Losses/ gains: cells with chromosome losses or gains ($43 \leq \text{chromosomes} \leq 49$).

^e - gaps: without gaps; + gaps: with gaps

^f F: female; M: male

Supplemental Table 7

Number of MNs recorded in each categorie: C-, C+, C₁₋₂+ and C₃₊+, following pancentromeric FISH analysis of MNs present in lymphocytes drawn from 20 subjects, *in vitro* exposed to benzo-a-pyrene.

Technique Code/ Subject/ Age	BaP (µg/ml)	C- MN ^a	C+ MN ^b	C ₁₋₂ + MN ^c	C ₃₊ + MN ^d
MN1/ F1 °/ 30	0	3	20	13	7
	5	5	38	8	30
MN2/ F2/ 30	0	1	8	1	7
	5	4	10	4	6
MN3/ F3/ 30	0	1	14	5	9
	5	1	15	4	11
MN4/ F4/ 29	0	3	4	0	4
	5	3	17	2	15
MN5/ F5/ 21	0	7	8	1	7
	5	4	14	3	11
MN6/ F6/ 29	0	5	9	3	6
	5	5	27	3	24
MN7/ F7/ 27	0	0	11	5	6
	5	6	15	4	11
MN8/ F8/ 23	0	8	6	3	3
	5	6	20	5	15
MN9/ F9/ 23	0	5	4	2	2
	5	12	12	8	4
MN10/ F10/ 22	0	6	16	4	12
	5	6	20	3	17
MN11/ M1 °/ 29	0	6	3	2	1
	5	5	12	1	11
MN12/ M2/ 30	0	0	2	1	1
	5	3	16	6	10
MN13/ M3/ 28	0	0	3	1	2
	5	2	19	4	15
MN14/ M4/ 21	0	0	9	0	9
	5	5	30	5	25

MN15/ M5/ 29	0	4	4	0	4
	5	4	10	0	10
MN16/ M6/ 30	0	4	7	3	4
	5	6	13	4	9
MN17/ M7/ 23	0	3	10	4	6
	5	3	21	5	16
MN18/ M8/ 26	0	14	13	5	8
	5	5	26	3	23
MN19/ M9/ 23	0	1	6	1	5
	5	11	27	7	20
MN20/ M10/ 28	0	3	8	0	8
	5	13	11	1	10

^a C- MN: MN containing no centromere

^b C+ MN: MN containing one or more centromeres

^c C₁₋₂+ MN: MN containing one or two centromeres

^d C₃₊+MN: MN containing 3 or more centromeres

^e F: female; M: male