

Université de Montréal

**Évaluation de la cytogénotoxicité humaine induite par
l'exposition à de faibles doses de benzo-a-pyrène, à
l'aide de biomarqueurs précoces.**

par

Fléchère Fortin

Département de pathologie et biologie cellulaire

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph. D.)

en Pathologie et biologie cellulaires

option cytogénétique

Avril 2011

© Fléchère Fortin, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Évaluation de la cytogénotoxicité humaine induite par l'exposition à de faibles doses de benzo-a-pyrène, à l'aide de biomarqueurs précoces

présentée par :

Fléchère Fortin

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Alain Verreault, président-rapporteur

Nicole Lemieux, directrice de recherche

Claude Viau, co-directeur

Jacques Paiement, membre du jury

Larissa Takser, examinatrice externe

Maja Krajinovic, représentante du doyen de la FESP

Résumé

Le benzo-a-pyrène (BaP) est un Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) cancérigène pour l'homme, qui contamine toutes les sphères de notre environnement. Son métabolite, le BaP-7,8-diol-9,10-époxyde (BPDE) est considéré comme son cancérigène ultime. Le BPDE se lie à l'ADN, formant des adduits qui doivent être réparés et qui seraient responsables des dommages à l'ADN et de la cancérogenèse induite par le BaP.

Les adduits BPDE-ADN et les dommages à l'ADN (bris simple-brin [BSB] à l'ADN, aberrations chromosomiques [AC], échanges entre chromatides-sœurs [ÉCS] et micronoyaux [MN]) ont été mesurés dans les lymphocytes humains exposés à de faibles concentrations de BaP, provenant de jeunes volontaires non-fumeurs et en santé. Suite à l'exposition au BaP, le niveau d'adduits BPDE-ADN et la fréquence des AC et des MN augmentent significativement, puis diminuent aux concentrations les plus élevées de BaP testées, suggérant une induction du métabolisme de phase II du BaP. Lors de la mesure des ÉCS, nous obtenons une courbe dose-réponse linéaire, indiquant la production d'un autre type de lésions devant être réparées par le système de réparation par recombinaison homologue. Ces lésions pourraient être des bris à l'ADN ou des bases oxydées (8-OH-dG), ce qui est suggéré par l'analyse des corrélations existant entre nos biomarqueurs.

Par ailleurs, la comparaison de la courbe dose-réponse des hommes et des femmes montre que des différences existent entre les sexes. Ainsi, les ÉCS, les AC et les MN sont significativement augmentés chez les hommes à la plus faible concentration de BaP, alors que chez les femmes cette augmentation, quoique présente, est non significative. Des différences interindividuelles sont également observées et sont plus importantes pour les adduits BPDE-ADN, les MN et les AC, alors que pour les ÉCS elles sont minimales. Les analyses statistiques effectuées ont permis d'établir que quatre facteurs (niveau d'exposition au BaP, adduits BPDE-ADN, fréquence des AC et nombre de MN par cellule micronucléée) expliquent jusqu'à 59 % de la variabilité observée dans le test des ÉCS, alors qu'aucun facteur significatif n'a pu être identifié dans le test des AC et des MN.

L'analyse du mécanisme de formation de nos biomarqueurs précoces permet de suggérer que les bris à l'ADN et les bases oxydées devraient être classées comme biomarqueurs de dose biologique efficace, au sein des biomarqueurs d'exposition, dans le continuum exposition-maladie du BaP, étant donné qu'ils causent la formation des biomarqueurs de génotoxicité (ÉCS, AC et MN). Par ailleurs, le test des AC et des MN ont permis de confirmer l'action clastogénique du BaP en plus de mettre en évidence des effets aneugènes affectant surtout la ségrégation des chromosomes lors de la division cellulaire. Ces effets aneugènes, reliés à l'étape de progression dans la cancérogenèse, pourraient être particulièrement importants puisque l'exposition au BaP et aux HAP est chronique et dure plusieurs années, voire des décennies. La compréhension des mécanismes régissant la formation des biomarqueurs étudiés dans cette étude, ainsi que des relations existant entre eux, peut être appliquée à de nombreux contaminants connus et émergents de notre environnement et contribuer à en évaluer le mode d'action.

Mots-clés : bris simple-brin à l'ADN; échanges entre chromatides-sœurs; aberrations chromosomique; micronoyaux; lymphocytes; adduits BPDE-ADN; benzo-a-pyrène-diol-époxyde; stress oxydatif; différences entre les sexes; différences interindividuelles.

Abstract

Benzo-a-pyrene (BaP) is a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) classified as carcinogenic to human, and is present throughout our environment. Metabolic activation of BaP leads to production of BaP-7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE), considered as its ultimate carcinogenic metabolite. BPDE can bind to DNA, forming BPDE-DNA adducts at the origin of BaP-induced DNA damage and carcinogenesis.

BPDE-DNA adducts and DNA damages (DNA single-strand breaks [SSBs], chromosomal aberrations [CAs], sister chromatid exchanges [SCEs] and micronuclei [MNs]) are measured in human lymphocytes exposed to low BaP concentrations, taken from non-smoking healthy young subjects. Following BaP exposure, BPDE-DNA adduct levels, as well as CA and MN frequencies raise significantly, and then decrease to the higher BaP concentrations tested, suggesting metabolic enzyme saturation or induction of BaP phase II metabolism. As for SCEs test, a linear dose response curve is obtained, suggesting that production of additional DNA lesions requiring homologous recombination repair may occur. These lesions could be DNA breaks or oxidized DNA bases (8-OH-dG), as indicated by correlation analysis performed between our biomarkers.

Additionally, when comparing the dose-response curves for men and women separately, some differences show up. Indeed, SCEs, CAs, and MNs are significantly increased in men at the lowest BaP concentration tested, while in women, this increase is present but not significant. Interindividual differences are also present and are more considerable for BPDE-DNA adducts, MNs and CAs, whereas they are very low for SCEs. Statistical analysis showed that four factors (BaP exposure level, BPDE-DNA adducts, CA frequency and number of MN per micronucleated cell) significantly explained up to 59 % of observed variability in SCE test, while no such factors could explain the observed variability in CA and MN test.

Following analysis of mechanisms underlying the formation of early biomarkers, we suggest a modification of the Exposure-Disease Continuum of BaP. We propose that DNA

breaks and oxidized DNA bases should be classified as biomarkers of biologically effective dose (part of the exposure biomarkers), as their presence are at origin of early biomarkers of genotoxicity (SCEs, CAs and MNs). On the other hand, CA and MN tests confirmed clastogenic properties of BaP, and highlighted aneugenic effects influencing mostly chromosome segregation during cell division. These aneugenic effects, linked to the progression step of carcinogenesis, could be of particular importance given that exposure to BaP and other PAHs (smoking, occupational exposure) are chronic and may last for decades. Understanding the mechanisms playing a role in early biomarkers formation, as well as the relations existing between them, can be largely applied in our environment to many known and emerging contaminants, thus contributing to characterize their mode of action.

Keywords : DNA single-strand breaks, sister chromatid exchanges, chromosomal aberrations, micronuclei, lymphocytes, BPDE-DNA adducts, benzo-a-pyrene-diol-epoxide, ozydative stress, sex differences, interindividual differences.

Table des matières

Résumé.....	iii
<i>Abstract</i>	v
Liste des tableaux.....	xvii
Liste des figures.....	xxi
Liste des abréviations et sigles.....	xxv
Nomenclature et liste des gènes et protéines.....	xxix
Remerciements.....	xxxv
Chapitre 1: Introduction.....	1
1. Les principes de cancérogenèse.....	2
1.1. La transformation cellulaire.....	2
1.1.1. Les étapes de la transformation cellulaire.....	3
1.1.2. Le nombre de touches génétiques nécessaires pour causer un cancer.....	4
1.1.3. L'épigénétique et le cancer.....	6
1.2. L'instabilité chromosomique et le cancer.....	7
1.2.1. Atteintes de la division cellulaire.....	9
1.2.1.1. L'aneuploïdie.....	11
1.2.1.2. La polyploïdie.....	13
1.2.2. Les atteintes à l'ADN et à ses bases.....	15
1.3. Les interactions gène-environnement dans le cancer.....	17

2.	Les biomarqueurs et la surveillance biologique.....	18
2.1.	Le continuum exposition-maladie.....	18
2.2.	Les modulations environnementale et génétique	21
2.3.	L'utilisation des biomarqueurs en surveillance des travailleurs et des populations	23
2.3.1.	La validation des biomarqueurs	23
2.3.2.	Les aspects éthiques entourant la surveillance biologique.....	24
3.	La cytogénétique et la cytogénotoxicité	26
3.1.	La cytogénétique humaine.....	26
3.1.1.	L'obtention des chromosomes	27
3.1.2.	Les principaux marquages et colorations.....	27
3.1.3.	La cytogénétique moléculaire	28
3.2.	La cytogénétique et la génotoxicologie : une évolution parallèle	29
3.3.	La génotoxicité et la cytogénotoxicité : objet et applications	30
3.3.1.	Les types d'agents toxiques évalués.....	31
3.3.1.1.	Les sources naturelles	31
3.3.1.2.	Les sources anthropiques	32
3.3.2.	La corrélation entre la génotoxicité et le potentiel de cancérogenèse dans l'évaluation des produits chimiques et pharmaceutiques.....	33
4.	Le benzo-a-pyrène, un hydrocarbure aromatique polycyclique cancérigène	36
4.1.	Les principales sources d'émission et d'exposition aux HAP au Canada.....	36
4.2.	L'exposition aux HAP en milieu de travail et de vie	38
4.2.1.	Les voies d'exposition.....	38

4.2.2.	L'exposition aux HAP au Québec et ailleurs dans le monde	43
4.2.2.1.	Les HAP et le BaP dans l'air ambiant et intérieur	43
4.2.2.2.	Les normes en milieu de travail	43
4.3.	L'exposition aux HAP et particulièrement au benzo-a-pyrène cause le cancer chez l'Homme	44
4.3.1.	Les données épidémiologiques.....	44
4.3.2.	Les HAP cancérogènes, la notion de BaP-équivalent et le facteur d'équivalence toxique.....	46
4.3.3.	La toxicocinétique des HAP.....	49
4.4.	Les mécanismes d'action du benzo-a-pyrène.....	50
4.4.1.	L'entrée du BaP dans la cellule.....	51
4.4.2.	Le métabolisme du BaP.....	55
4.4.2.1.	L'auto-induction du métabolisme du BaP par le composé parent et ses métabolites.....	55
4.4.2.2.	La voie des diol-époxydes.....	56
4.4.2.3.	La voie des quinones	60
4.4.2.4.	La voie du radical cation	60
4.4.3.	La formation des adduits BPDE-ADN.....	61
4.4.4.	Les altérations génétiques causées par le benzo-a-pyrène et la cancérogenèse.....	64
4.4.5.	Les altérations épigénétiques et les modifications de l'expression génique causées par le BaP	66
5.	Les tests d'étude de la cytogénotoxicité chez l'humain.....	67
5.1.	Les types de cellules utilisées en cytogénotoxicité	67
5.1.1.	Les cellules transformées ou d'origine tumorale	68

5.1.2.	Les cellules normales	69
5.2.	Les tests classiques de cytogénétique et leurs variantes.....	70
5.2.1.	Les aberrations chromosomiques	70
5.2.2.	Les échanges entre chromatides-sœurs	72
5.2.3.	Les micronoyaux	74
5.2.3.1.	L'analyse des micronoyaux couplée à l'hybridation <i>in situ</i> en fluorescence.....	76
5.3.	Les autres tests plus récents.....	77
5.3.1.	Les méthodes de mesure des adduits à l'ADN.....	77
5.3.2.	Les méthodes de mesure des bris à l'ADN	81
5.3.2.1.	La synthèse non programmée de l'ADN (UDS).....	81
5.3.2.2.	L'essai COMET	82
5.3.2.3.	L'essai EM-ISEL	83
5.4.	Les mécanismes de réparation à la base des aberrations vues en cytogénotoxicité	83
5.4.1.	La réparation des adduits à l'ADN et les bris simple-brin à l'ADN	84
5.4.1.1.	La réparation par excision des nucléotides (NER).....	85
5.4.1.2.	La réparation par excision de bases (BER).....	86
5.4.2.	La réparation des bris double-brin et les aberrations chromosomiques.....	88
5.4.3.	La réparation par recombinaison homologue (HRR) et les échanges entre chromatides-sœurs (ÉCS).....	92
5.4.4.	Les anomalies de la division cellulaire et les micronoyaux	96
6.	La cytogénotoxicité du benzo-a-pyrène et des HAP chez l'humain.....	97
6.1.	L'augmentation des aberrations chromosomiques	97

6.2.	L'augmentation des échanges entre chromatides-sœurs	98
6.3.	L'augmentation des micronoyaux sanguins	99
6.4.	Corrélations entre exposition et biomarqueurs cytogénétiques.....	99
6.5.	Les études où aucune augmentation d'un biomarqueur cytogénétique n'est observée	100
7.	L'étude <i>in vitro</i> de la cytogénotoxicité du benzo-a-pyrène chez l'humain.....	102
7.1.	Les adduits BPDE-ADN.....	103
7.2.	Les bris à l'ADN	103
7.3.	Les aberrations chromosomiques	104
7.4.	Les échanges entre chromatides-sœurs	104
7.5.	Les micronoyaux sanguins	105
Chapitre 2: Problématique, hypothèses de travail et objectifs		107
	Les hypothèses et objectifs du projet de recherche.....	109
	Les objectifs secondaires	111
Chapitre 3: Matériel et méthodes		113
1.	Les sujets.....	113
1.1.	Les critères de sélection.....	113
1.2.	L'éthique et le consentement.....	114
1.3.	L'identification des sujets.....	114
2.	La préparation du benzo-a-pyrène	115
3.	Les échantillons biologiques.....	115
3.1.	Les cellules sanguines	115

3.1.1.	Le prélèvement sanguin	115
3.1.2.	L'isolement des lymphocytes.....	116
3.1.3.	La culture et l'exposition au benzo-a-pyrène.....	116
3.1.4.	La récolte.....	117
3.1.4.1.	La récolte des lymphocytes isolés.....	117
3.1.4.2.	La récolte des chromosomes	117
3.1.4.3.	La récolte des cellules traitées à la cytochalasine B.....	117
3.2.	Les cellules urothéliales	118
3.2.1.	Le prélèvement.....	118
3.2.2.	L'isolement des cellules urothéliales présentes dans l'urine	118
4.	La mesure des biomarqueurs	119
4.1.	Les adduits BPDE-ADN	119
4.2.	Les bris simple-brin à l'ADN.....	120
4.3.	Les aberrations chromosomiques	121
4.4.	Les échanges entre chromatides-sœurs	122
4.5.	Les micronoyaux sanguins	123
4.6.	Le contenu des micronoyaux sanguins.....	123
4.7.	Les micronoyaux urinaires	125
5.	Les analyses statistiques	125
5.1.	Le devis de l'étude et les tests statistiques retenus.....	125
5.2.	Les analyses effectuées	129
5.2.1.	Les adduits BPDE-ADN	129
5.2.2.	Les bris simple-brin à l'ADN.....	130
5.2.3.	Les aberrations chromosomiques	130

5.2.4. Les échanges entre chromatides-sœurs	131
5.2.5. Les micronoyaux sanguins	132
5.2.6. Les micronoyaux urinaires	133
5.2.7. La variation interindividuelle	133
5.2.8. Les relations entre les biomarqueurs	133
 Chapitre 4: Les résultats.....	135
Article 1.....	137
Early biomarkers of genotoxicity and benzo-a-pyrene exposure in human lymphocytes. Part I: Aneugenic and clastogenic properties.	
Article 2.....	177
Early biomarkers of genotoxicity and benzo-a-pyrene exposure in human lymphocytes. Part II: Interindividual and sex differences, correlations between BaP-DNA adducts and early biomarkers of genotoxicity.	
Article 3.....	215
Optimizing urothelial cell preparation for the human urinary micronucleus assay.	
 Chapitre 5: Discussion générale.....	239
1. La courbe dose-réponse du benzo-a-pyrène varie en fonction du biomarqueur	240
2. Les hommes et les femmes ne répondent pas de la même façon à de faibles concentrations de benzo-a-pyrène.....	245
3. La variation interindividuelle observée change en fonction du biomarqueur.....	249
3.1. La modulation de la formation des biomarqueurs et la variation interindividuelle.....	252

3.1.1.	Les polymorphismes génétiques impliqués dans la formation des biomarqueurs génotoxiques précoces.....	253
3.1.2.	Les facteurs environnementaux influençant la formation des aberrations cytogénétiques	255
3.1.3.	Les interactions entre gènes et environnement modulent le niveau des biomarqueurs et contribuent à la variation interindividuelle	256
4.	Le benzo-a-pyrène produit de multiples effets sur les lymphocytes humains	257
4.1.	Les corrélations entre les biomarqueurs mesurés dans notre étude.....	257
4.2.	La formation et la réparation des adduits-BPDE-ADN.....	260
4.3.	Les bris simple-brin à l'ADN.....	265
4.4.	Les échanges entre chromatides-sœurs et la réparation par recombinaison homologue	268
4.5.	Les aberrations chromosomiques et les micronoyaux : effets clastogènes et aneugènes	272
4.5.1.	Les effets clastogènes du BaP	272
4.5.2.	Les effets aneugènes du BaP	274
4.5.3.	Les autres applications de l'étude du contenu des MN par la FISH	279
4.6.	La modification du continuum exposition-maladie du BaP	282
5.	Les objectifs secondaires de cette thèse.....	284
5.1.	Les micronoyaux urinaires	284
5.2.	L'analyse statistique des données provenant de plusieurs individus : le cas de l'essai EM-ISEL	286
Chapitre 6: Conclusion et perspectives.....		293
Bibliographie.....		301

Annexe I.....	xli
Puissance statistique obtenue lors de l'analyse par ANOVA à mesures répétées des deux indicateurs au test des échanges entre chromatides-sœurs.	
Annexe II.....	xliii
Modèles obtenus lors de l'analyse par régression linéaire multiple des biomarqueurs précoces, en tenant compte de la colinéarité existant entre certaines variables.	
Annexe III.....	xliv
Genotoxic effects of chromium(VI) and cadmium(II) in human blood lymphocytes using the electron microscopy <i>in situ</i> end-labeling (EM-ISEL) assay.	
Annexe IV.....	lxvii
Régression linéaire illustrant la contribution relative de chaque catégorie de signaux FISH à la somme de signaux énumérés lors de l'hybridation <i>in situ</i> en fluorescence des MNs avec une sonde pancentromérique, pour le contrôle négatif et la condition [BaP] = 5 µg/ml.	
Annexe V.....	lxix
Formulaire de consentement, projet CERFM-68(05)4#175	
Annexe VI.....	lxxix
Formulaire de consentement, projet CERFM-94(08)4#308	
Annexe VII.....	lxxxix
Questionnaire de sélection des sujets.	
Annexe VIII.....	xcI
Curriculum vitæ abrégé	
Index.....	xciii

Liste des tableaux

INTRODUCTION

Tableau I: BaP-équivalent et Facteur d'équivalence toxique (FÉT) de différents HAP et dérivés des HAP.....	46
Tableau II: Calcul de l'excès de risque de cancer (ERI) associé à un mélange d'air urbain. Les données sur la caractérisation du mélange sont tirées de Brits et coll. [2004]......	48
Tableau III: Proportion relative des différents diastéréoisomères de BPDE produits dans des lymphocytes/ monocytes humains ou de l'ADN isolé.	59
Tableau IV: Proportion relative de différents adduits BPDE-ADN formés <i>in vitro</i> ou dans des cellules en culture, en présence de BPDE, de BaP ou de BaP-7,8-diol.....	62
Tableau V: Intervalles de concentrations de BaP et de HAP mesurées dans l'air, ainsi que de 1-OH-pyrène mesuré dans l'urine, rapportés dans les études de travailleurs exposés aux HAP, pour lesquelles un biomarqueur cytogénétique a été analysé.	101

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Tableau VI: Coefficients de variation moyens, calculés pour tous les biomarqueurs précoces mesurés dans les lymphocytes humain de cette étude.	121
--	-----

ARTICLE 1

Table I: Frequency of micronuclei (MNs) (per 1000 binucleated cells) in human lymphocytes drawn from 20 subjects, <i>in vitro</i> exposed to benzo-a-pyrene.....	...163
Table II: Frequency of chromosome aberrations (CAs) (per 100 cells) in human lymphocytes drawn from 15 subjects, <i>in vitro</i> exposed to benzo-a-pyrene.164
Table III: FISH analysis of micronuclei (MNs), using a pancentromeric probe, for [BaP] = 0 µg/ml (negative control) and [BaP] = 5 µg/ml (exposed condition).....	...166
Supplemental Table IV: Cell cycle, nuclear division index (NDI) and mitotic index (MI) obtained in human lymphocytes <i>in vitro</i> exposed to benzo-a-pyrene.....	...167
Supplemental Table V: Frequency of micronuclei (MNs) in human lymphocytes drawn from 20 subjects, <i>in vitro</i> exposed to benzo-a-pyrene. 2000 BN cells were scored per condition, per subject.....	...168
Supplemental Table VI: Result of chromosome aberration (CA) test realised in human lymphocytes drawn from 15 subjects, <i>in vitro</i> exposed to benzo-a-pyrene. 200 cells were scored per condition, per subject.....	...172
Supplemental Table VII: Number of MNs recorded in each categorie: C-, C+, C ₁₋₂ + and C ₃₊ +, following pancentromeric FISH analysis of MNs present in lymphocytes drawn from 20 subjects, <i>in vitro</i> exposed to benzo-a-pyrene.175

ARTICLE 2

Table I: BaP-DNA adducts measured by CIA in human lymphocytes drawn from 24 subjects, <i>in vitro</i> exposed to benzo-a-pyrene. Results are expressed as adducts per 10^9 nucleotides.....	...206
Table II: Early genotoxic biomarkers measured in human lymphocytes drawn from healthy subjects, <i>in vitro</i> exposed to benzo-a-pyrene. Results expressed as means \pm SEM.....	...207
Table III: DNA single-strand breaks quantified in human lymphocytes drawn from 10 subjects, <i>in vitro</i> exposed to benzo-a-pyrene.208
Table IV: Partial correlation coefficients (controlling for exposure and sex) existing between the biomarkers studied in human lymphocytes <i>in vitro</i> exposed to benzo-a-pyrene. Pearson's correlation coefficients present between the biomarkers and BaP exposure are also presented.210
Supplemental Table V: Interindividual variation, calculated by dividing the maximal value by the minimal value for a given biomarkers' exposure condition, present during evaluation of early biomarkers of genotoxicity in human lymphocytes <i>in vitro</i> exposed to benzo-a-pyrene.....	...211
Supplemental Table VI: Mean sister chromatid exchanges (SCEs) per cell in human lymphocytes drawn from 16 subjects, <i>in vitro</i> exposed to benzo-a-pyrene.....	...213
Supplemental Table VII: Percentage of High Frequency SCE Cells (HFC) in human lymphocytes drawn from 16 subjects, <i>in vitro</i> exposed to benzo-a-pyrene.....	...214

ARTICLE 3

Table 1: Main morphological features of urothelial and squamous cells.....	...231
Table 2: Micronuclei analysis of urothelial cells in 10 subjects. Urine samples were fixed using Carnoy I and differentially stained using the Papanicolaou technique.231
Table 3: Reported urinary micronuclei frequencies (per 1000 analyzed cells) in control (unexposed) subjects.....	...232

DISCUSSION GÉNÉRALE

Tableau VII: Aperçu des applications de la FISH (sonde pancentromérique) ou du marquage anti-kinétochore sur micronoyaux, avec des composés aneugènes et clastogènes connus ou des composés en cours d'évaluation.	278
Tableau VIII: Quantification des particules d'or (IGP) dans la condition contrôle négatif ([BaP] = 0 µg/mL), pour les chromosomes et les noyaux analysés par EM-ISEL chez quelques sujets, en fonction du vieillissement des lames.....	288

Liste des figures

INTRODUCTION

Figure 1: Représentation schématique de la mitose.....	10
Figure 2: Schématisation d'une cassure chromatidienne et d'une cassure chromosomique.....	17
Figure 3: Continuum d'exposition- maladie placé dans le contexte d'une exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques.....	20
Figure 4: a) métaphase et b) caryotype en bande GTG d'un homme ayant une formule chromosomique normale à 46,XY.....	28
Figure 5: Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence sur des chromosomes (métaphase) ou des noyaux.....	30
Figure 6: Tendence observée dans les émissions de particules fines (PM _{2,5}) au Canada, en fonction des principaux types de sources.....	39
Figure 7: Proportion relative des principales sources d'émission de particules fines (PM _{2,5}) en 2007, au Canada.....	40
Figure 8: Tendence observée dans les émissions de benzo-a-pyrène au Canada, en fonction des principaux types de sources.....	41
Figure 9: Proportion relative des principales sources d'émission de benzo-a-pyrène en 2007, au Canada.....	42
Figure 10: Devenir du BaP dans la cellule.....	54
Figure 11: Principales voies métaboliques du benzo-a-pyrène.....	58
Figure 12: Schémas des quatre diastéréoisomères du BPDE et leur pourcentage de formation dans les lymphocytes sanguins; schémas des deux adduits générés par la réaction du diastéréoisomère majeur, le (+)- <i>anti</i> -BPDE, avec la guanine, en position N ²	59

Figure 13: Aberrations chromosomiques rencontrées lors de la réalisation du test des AC.....	71
Figure 14: Métaphase (F2) comportant 8 ÉCS	75
Figure 15: Principe de l'incorporation de BrdU durant la culture cellulaire destinée à la mise en évidence des ÉCS.....	73
Figure 16: Schéma simplifié de la voie de réparation par excision des nucléotides (NER).....	86
Figure 17: Schéma simplifié de la voie de réparation par excision de bases (BER).....	87
Figure 18: Formation d'un bris double-brin chromosomique et sa réparation incorrecte par le système NHEJ ou le système HRR.....	89
Figure 20: Principales anomalies chromosomiques pouvant être produites par réparation erronée des bris double-brin par le système NHEJ.....	90
Figure 20: Schéma simplifié de la réparation par recollage d'extrémités non homologues (NHEJ).....	95
Figure 22: Schéma simplifié de la réparation d'un bris double-brin par le système de réparation par recombinaison homologue (HRR).....	93
Figure 23: Résolution de la jonction de Holliday, une étape intermédiaire lors de la réparation par recombinaison homologue.....	94
Figure 23: Diagramme de Venn indiquant le nombre de cohortes de travailleurs présentant une augmentation d'AC, d'ÉCS, de MN ou de plusieurs d'entre eux.....	101

MATÉRIEL ET MÉTHODES

- Figure 24:** Illustration de la technique des micronoyaux par blocage de la cytotcinèse à l'aide de la cytochalasine B..... 124

ARTICLE 1

- Figure 1:** Histograms showing the dose-effect relationship observed in the analysis of human lymphocytes *in vitro* exposed to benzo-a-pyrene..... 161

ARTICLE 2

- Figure 1:** Histogram showing the dose-response relationships observed in BaP-DNA adducts measurements of human lymphocytes exposed *in vitro* to benzo-a-pyrene, for the group, as well as for women and men separately..... 205

ARTICLE 3

- Figure 1:** Representative examples of results obtained with various fixation and staining methods of cells present in voided urine samples, and subsequent identification of micronuclei in squamous and urothelial cells. 229

DISCUSSION GÉNÉRALE

- Figure 25:** Courbes dose-réponse obtenues lors de la mesure de nos biomarqueurs génotoxiques précoces induits par l'exposition de lymphocytes humains au benzo-a-pyrène..... 241
- Figure 26:** Devenir des lésions non réparées présentes dans le lymphocyte, en fonction des tours de cycle cellulaire post-exposition au BaP..... 270

Figure 27: Illustration des mécanismes de malségrégation distingués par la FISH avec deux sondes centromériques spécifiques de deux chromosomes, en orange et en vert.....	281
Figure 28: Proposition d'un nouveau continuum exposition-maladie pour les HAP/ BaP.....	283
Figure 29: Noyaux marqués par l'essai EM-ISEL, photographiés à un grossissement de 1400X.	289
Figure 30: Régression linéaire montrant la concordance existant entre la moyenne des particules d'or (IGP) quantifiées dans les noyaux et le moyenne des IGP quantifiée dans les chromosomes, pour une même lame.....	291

Liste des abréviations et sigles

8-OH-dG	8-oxo-désoxyguanosine
AC	Aberration chromosomique (<i>CA</i>)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ANOVA	Analyse de variance (<i>Analysis of Variance</i>)
Arg	Arginine
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	Adénosine triphosphate
BaP	Benzo-a-pyrène
[BaP]	Concentration de benzo-a-pyrène
BER	Réparation par excision de base (<i>base excision repair</i>)
BN	Cellule binucléée
BPDE	Benzo-a-pyrène-7,8-diol-9,10-époxyde
BrdU	5-bromo-2'-désoxyuridine
BDB	Bris double-brin (<i>DSB</i>)
BSB	Bris simple-brin (<i>SSB</i>)
C+	Contenant un signal centromérique
C-	Ne contenant aucun signal centromérique
C ₁₋₂ +	Contenant un ou deux signaux centromériques
C ₃₊ +	Contenant trois signaux centromérique ou plus
C _x +	Contenant un signal centromérique ou plus
CAS	<i>Chemical Abstracts Services</i>
CBMN	Test des micronoyaux par blocage de la cytotinèse
CERFM	Comité d'éthique de la faculté de médecine de l'Université de Montréal

CHF	Cellule à haute fréquence d'ÉCS (<i>HFC</i>)
CHU	Centre hospitalier universitaire
CIA	<i>Chemiluminescent ImmunoAssay</i>
CIN	Instabilité chromosomique (<i>chromosomal instability</i>)
CIRC	Centre International de Recherche sur le Cancer (<i>International Agency for Research on Cancer - IARC</i>)
CPD	Dimère cyclobutane de pyrimidines
CpG	Paire de nucléotides CG.
DAPI	4',6'-diamino-2-phénylindole
DELFA	<i>Dissociation-Enhanced Lanthanide FluoroImmunoAssay</i>
DMBA	9,10-diméthyl-1,2-benzanthracène
DMSO	Diméthyle sulfoxyde
dUTP	2'-désoxy,5'-triphosphate
DZ	Dizygote
ÉCS	Échange entre chromatides-sœurs (<i>SCE</i>)
ECVAM	Centre Européen de Validation des Méthodes Alternatives (<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>)
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EM-ISEL	Marquage terminal en microscopie électronique (<i>Electron microscopy in situ end-labeling</i>)
ERI	Excès de risque individuel
ERO	Espèces réactives de l'oxygène (<i>ROS</i>)
EROD	Éthoxyrésorufine- <i>O</i> -dééthylase
ERU	Excès de risque de cancer unitaire
ERU _i	Excès de risque de cancer unitaire par inhalation
FANC	Complexe Anémie de Fanconi
FISH	Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (<i>fluorescent in situ hybridization</i>)
FPG	Fluorescence Photolyse Giemsa
G-G	Greenhouse-Geisser

Gln	Glutamine
GUM	Groupe germanophone membre de la <i>European Environmental Mutagen Society</i> (<i>Gesellschaft für Umwelt-Mutationforschung</i>)
H-F	Huynh-Feldt
γ H2AX	Histone H2AX phosphorylée
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques (<i>PAH</i>)
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
HRR	Réparation par recombinaison homologue (<i>homologous recombination repair</i>)
HTLV-1	Virus T-lymphotropique 1 humain (<i>human T cell leukemia/lymphoma virus type 1</i>)
IBE	Indicateur biologique de l'exposition
IDN	Indice de division nucléaire (<i>NDI</i>)
IGP	Particules d'or (<i>immuno-gold particles</i>)
INRP	Inventaire national des rejets de polluants
ISCN	Système international de nomenclature en cytogénétique humaine (<i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>)
KCl	Chlorure de potassium
LMC	Leucémie myéloïde chronique
MI	Michigan
MD	Maryland
MIN	Instabilité des microsatellites (<i>microsatellite instability</i>)
MMR	Réparation des mésappariements (<i>mismatch repair</i>)
MMS	Méthyle méthanesulfonate
MN	Micronoyau
MNBN	Cellule binucléée contenant un ou des MN
MN _{IV}	Essai <i>in vivo</i> des micronoyaux dans la moelle osseuse des rongeurs
MNs	Micronoyau sanguin
MNu	Micronoyau urinaire
MZ	Monozygote

NC	Caroline du Nord (<i>North Carolina</i>)
NER	Réparation par excision de nucléotides (<i>nucleotide excision repair</i>)
NHEJ	Réparation par recollage d'extrémités non homologues (<i>non-homologous DNA end-joining</i>)
OCDE	Organisation de coopération et de développement économique (<i>OECD</i>)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé (<i>WHO</i>)
ON	Ontario
PAF	Polypose adénomateuse familiale
Ph ¹	Chromosome de Philadelphie, aussi appelé der(22)t(9;22)(q34;q11)
PHA	Phytohémagglutinine.
PM _{2,5}	Particules inhalables (<i>particulate matter</i>) ayant un diamètre inférieur à 2,5 µm
QC	Québec
RIA	<i>Radio-ImmunoAssay</i>
RT-PCR	Réaction de polymérase en chaîne effectuée avec la réverse transcriptase
SD	Écart-type (<i>standard deviation</i>)
SEM	Erreur-type de la moyenne (<i>standard error of the mean</i>)
SKY	Caryotype spectral (<i>spectral karyotyping</i>)
SSA	Réparation par appariement d'ADN simple-brin (<i>single-strand annealing</i>)
TCDD	2,3,7,8-tétrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine
UDS	Synthèse non-programmée d'ADN (<i>unscheduled DNA synthesis</i>)
UK	Royaume-Uni (<i>United Kingdom</i>)
UV	Rayons ultra-violet. Les rayons UVA ($\lambda = 320$ à 400 nm) et UVB ($\lambda = 290$ à 320 nm) affectent la peau, alors que les UVC ($\lambda = 100$ à 290 nm) ne l'endommagent pas.
v/v	Volume / volume
VPN	Valeur prédictive négative
VPP	Valeur prédictive positive

Nomenclature et liste des gènes et protéines

Le nom des gènes est écrit en italique et en capitales, alors que la protéine correspondante est écrite en caractères romains et généralement seule la première lettre est en capitale.

Le nom des gènes et protéines correspond à la nomenclature prescrite par le *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* des États-Unis.

Nom du gène	Nom de la protéine (abrégé et complet)	Localisation chromosomique
<i>ABL1</i>	Abl – <i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>	9q34.1
<i>AHR</i>	AhR – <i>Aryl hydrocarbon receptor</i>	7p15
<i>APC</i>	Apc – <i>APC gene</i>	5q21-q22
<i>APEX1</i>	APEX1 – <i>APEX nuclease</i>	14p11.2
<i>ATR</i>	Atr – <i>Ataxia-telangiectasia and Rad3-related</i>	3q22-q24
<i>BCR</i>	Bcr – <i>Breakpoint cluster region</i>	22q11.21
<i>BLM</i>	Blm – <i>Bloom syndrome, RecQ helicase-like</i>	15q26.1
<i>BRCA1</i>	Brca1 – <i>Breast cancer 1</i>	17q21
<i>BRCA2</i>	Brca2 – <i>Brca2 gene (FANCD1)</i>	13q12.3
<i>BUB1B</i>	BubR1 – <i>Budding uninhibited by benzimidazoles 1 homolog beta1</i>	15q15
<i>CDH1</i>	Cadherin 1 – <i>e-cadherin</i>	16q22.1
<i>CDKN1A</i>	p21 – <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>	6p21.2
<i>CDKN2A</i>	p14 ^{ARF} – <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>	9p21
<i>COMT</i>	Comt – <i>Catéchol-<i>o</i>-méthyle transférase</i>	22q11.2
<i>CYP1A1</i>	Cyp1a1 – <i>Cytochrome P450, sous-famille I, polypeptide 1</i>	15q24.1
<i>CYP1B1</i>	Cyp1b1 – <i>Cytochrome P450, sous-famille I, polypeptide 1</i>	2p22-p21
<i>CYP2E1</i>	Cyp2E1 – <i>Cytochrome P450, sous-famille IIE</i>	10q23.4-qter

<i>DAPK1</i>	Dapk – <i>Death-associated protein kinase 1</i>	9q34.1
<i>EGFR</i>	Egfr – <i>Epidermal growth factor receptor</i>	7p12.1-p12.3
<i>EPHX1</i>	mEH – Époxyde hydrolase microsomiale	1q42.1
<i>ERCC2</i>	Ercc2 – <i>Excision-repair cross complementing defective in Chinese hamster 2</i>	19q13.2-q13.3
<i>ERCC6</i>	Ercc6 ou CSB - <i>Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6</i>	10q11.23
<i>ERCC8</i>	Ercc8 ou CSA – <i>Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 8</i>	5q12.1
<i>ESPL1</i>	Séparase – <i>Extra spindle poles-like 1</i>	12q13
<i>ESR1</i>	Esr1 – <i>Estrogen receptor 1</i>	6q25.1
<i>FEN1</i>	Fen1 – <i>Flap structure-specific endonuclease 1</i>	11q12
<i>GADPH</i>	Gadph – Glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase	12p13.31-p13.1
<i>GSTM1</i>	Gstm1 – Glutathione S-transférase Mu-1	1p13.3
<i>GSTP1</i>	Gstp1 – Glutathione S-transférase Pi-1	11q13
<i>GSTT1</i>	Gstt1 – Glutathione S-transférase Thêta-1	22q11.2
<i>GTF2H3</i>	Gtf2h3 ou TFIIH – <i>General transcription factor IIIH, polypeptide 3, 34 kDa</i>	12q24.31
<i>HPRT1</i>	Hprt1 – Hypoxantine guanine phosphoribosyltransférase 1	Xq26.2-q26.3
<i>HRAS</i>	Ras- <i>Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>	11p15.5
<i>LATS2</i>	Lats2 – <i>Large tumor suppressor, homolog of drosophila, 2</i>	13q11-q12
<i>LIG1</i>	Lig1 – <i>Ligase I, DNA, ATP-dependent</i>	19q13.3-q13.3
<i>LIG3</i>	Lig3 – <i>Ligase III, DNA, ATP-dependent</i>	17q11.2-q12
<i>LIG4</i>	Lig4 – <i>Ligase IV, DNA, ATP-dependent</i>	13q33-q34
<i>MDM2</i>	Mdm2 – <i>Mouse double minute 2 homolog</i>	12q14.3-q15
<i>MLH1</i>	Mlh1 – <i>MutL homolog 1</i>	3p21.3
<i>MRE11A</i>	Mre11a – <i>MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae)</i>	11q21
<i>MTHFR</i>	Mthfr – <i>Methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)</i>	1p36.3

<i>MTR</i>	Mtr – 5- α methyltetrahydrofolate-homocysteine S-methyltransferase	1q43
<i>MTRR</i>	Mtrr – 5-methyltetrahydrofolate- homocysteine methyltransferase reductase	5p15.31
<i>MYC</i>	Myc – Avian myelocytomatosis viral oncogene homolog	8q24.12-q24.13
<i>NAT2</i>	Nat2 – N-acétyltransferase 2	8p22
<i>NBN</i>	Nbn ou Nbs1 – nibrin or Nijmegen breakage syndrome 1	8q21
<i>NEIL1</i>	Neil1 – Nei endonuclease VIII-like 1	15q24.2
<i>NQO1</i>	Nqo1 – NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	16q22.1
<i>NQO2</i>	Nqo2 – NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2	6p25
<i>OGG1</i>	Ogg1 – 8- α -oxoguanine DNA glycosylase	3p26.1
<i>PARP1</i>	Parp1 – Poly(ADP)ribose polymérase 1	1q42
<i>PBX1</i>	Pbx1 – Pre-B-cell leukemia transcription factor 1	1q23
<i>POLB</i>	Pol β – polymerase (DNA directed), beta	8p11.2
<i>POLD4</i>	Pol δ – polymerase (DNA directed), delta 4	11q13
<i>POLE</i>	Pol ϵ – polymerase (DNA directed), epsilon	12q24.3
<i>POLM</i>	Pol μ – polymerase (DNA directed), mu	7p13
<i>POLK</i>	Polk - polymerase DNA kappa	5q13.1
<i>PTTG1</i>	Pttg1 ou Sécurine – Pituitary tumor-transforming gene 1	5q33
<i>RAD50</i>	Rad50 – RAD50 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	5q31
<i>RBI</i>	Rb - Retinoblastoma	13q14.1-q14.2
<i>RecQL</i>	RecQL – RecQ protein-like (DNA helicase Q1-like)	12p12
<i>POLR2A</i>	RNA pol II – Polymerase (RNA) II (DNA directed), polypeptide A, 220 kDa	17p13.1
<i>RAD23B</i>	Rad23b – yeast homolog of Rad23 B	Chromosome 9
<i>RPA1</i>	Rpa1 – Replication protein A1, 70 kDa	17p13.3
<i>RRM2B</i>	Rrm2b – Ribonucleotide reductase M2 B	8q23.1
<i>SMC1A</i>	Smc1A – Structural maintenance of chromosomes 1A	Xp11.22-p11.21

<i>SMC5</i>	<i>Smc5 – Structural maintenance of chromosomes</i>	9p21.11
<i>SMC6</i>	<i>Smc6 – Structural maintenance of chromosomes</i>	2p24.2
<i>TCF3</i>	<i>Tcf3 ou E2a – Transcription factor 3</i>	19p13.3
<i>TP53</i>	<i>p53 – Tumor protein p53</i>	17p13.1
<i>XPA</i>	<i>XPA – Xeroderma pigmentosum, complementation group A</i>	9q22.3
<i>XPC</i>	<i>XPC – Xeroderma pigmentosum, complementation group C</i>	3p25
<i>XRCC1</i>	<i>Xrcc1 – X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1</i>	19q13.2
<i>XRCC3</i>	<i>Xrcc3 ou Rad51 – X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3</i>	14q32.3
<i>XRCC5</i>	<i>Xrcc5 ou Ku86 – X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5 (double-strand-break rejoining)</i>	2q35
<i>XRCC6</i>	<i>Xrcc6 or Ku70 – X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6</i>	22q13.2

*La science? Après tout, qu'est-elle, sinon
une longue et systématique curiosité?*

André Maurois, extrait de *La Terre promise*.

Remerciements

Rédiger cette thèse marque pour moi l'achèvement d'une aventure en éducation, où j'ai d'abord reçu avant de redonner. Reçu de beaucoup d'enseignants et de professeurs, puis redonné comme professeure à mon tour. Certains enseignants et professeurs m'ont marquée plus que d'autre. Par exemple, Gérald Côté (6^{ième} année du primaire) et Laurent Héroux (enseignant du français au secondaire), qui m'ont transmis leur amour de notre langue et l'art de bien l'écrire et de composer. Également, il y a René Filiatrault (enseignant de la chimie au secondaire) et Marie-Françoise Gauthrin (professeure de microbiologie au CEGEP), qui ont élargi mon univers scientifique. De plus, deux personnes ont marqué, par leur approche pédagogique, ma propre formation comme professeure. Il s'agit des docteurs Nicole Lemieux et Claude Viau, mes directeurs de recherche. Chacun à leur façon, ils ont contribué à ma formation, faisant en sorte d'améliorer la façon dont, maintenant, je redonne ce que j'ai reçu de mon parcours éducatif, soit la passion, la curiosité, l'amour des mots bien choisis et des concepts bien expliqués.

À tous mes enseignants et mes professeurs, merci pour votre enseignement.

Rédiger cette thèse, c'est aussi un important tournant dans mon aventure scientifique qui a débuté durant mon enfance, avec une insatiable curiosité pour tout ce qui vit et qui existe. Maman, tu as déjà dit regretter de ne pas avoir pu me donner plus que ce que tu m'as donné. Ici encore je te le dis, n'aie pas de regrets. Tu m'as donné l'outil le plus important, l'amour de la lecture. Puis Papa et toi avez ouvert mon univers en remplissant la maison d'encyclopédies, de livres variés, touchant tous les aspects de la Vie, de l'Univers, de l'Histoire, dont la merveilleuse série «J'aimerais connaître...» que j'ai lue et relue si souvent! Cette insatiable curiosité s'est précisée à la fin du secondaire et au CEGEP, m'orientant vers la vie et ses mystères, vers la cellule et l'incroyable perfection de son fonctionnement, puis vers l'ADN et son habileté à nous façonner. Enfin, l'environnement a fait son entrée, modulant le message de l'ADN et rompant parfois la perfection avec laquelle les cellules travaillent, s'assemblent, se parlent... La Maladie s'est alors introduite dans mon parcours, avec ses composantes

généétiques et environnementales. Le besoin de comprendre la maladie, et plus particulièrement le cancer, s'est lui aussi installé et a pavé la voie vers la Recherche, puis vers ces études universitaires dont je complète maintenant le troisième cycle.

Un doctorat, cela ne se complète pas en criant «Ciseaux» ! Derrière le travail personnel qui est accompli, il y a le travail d'une équipe et le support d'un département, d'un Centre de recherche, d'un réseau... Le travail s'accompagne toujours de sacrifices personnels et familiaux. Ces sacrifices sont difficiles et demandent le support et l'appui de nombreuses personnes que je tiens à remercier ici. Mes remerciements sont nombreux et nombreuses sont également les personnes qui les méritent. À tous ceux et celles qui n'auront pas été nommés, sachez que je ne vous oublie pas. Sachez que vos mots d'encouragement, que l'intérêt porté à mes études m'ont été précieux.

Merci d'avoir été là.

Un premier remerciement particulier est adressé au docteur Nicole Lemieux du département de pathologie et biologie cellulaire de l'Université de Montréal. D'abord comme patronne, puis comme directrice de recherche et enfin comme mentor, Nicole m'a ouvert les portes de son laboratoire de cytogénétique humaine. J'y suis resté 14 ans... La passion de Nicole pour cette merveilleuse discipline m'a été transmise et m'a poussée à entreprendre mes études universitaires, du premier au troisième cycle.

Merci Nicole pour votre accueil, votre dévouement. Merci pour cette passion. Merci d'avoir cru que j'en étais capable et de me l'avoir dit. Merci pour votre engagement, pour les batailles menées pour moi et les autres étudiants du laboratoire. Merci de m'avoir laissée prendre mon temps pour accomplir ce travail. Merci de m'avoir montré que l'excellence était le niveau à atteindre. Nos nombreuses et diverses discussions demanderont à être poursuivies...

Je tiens à remercier le docteur Claude Viau, mon co-directeur de recherche au département de santé environnementale et santé au travail de l'Université de Montréal. Alors que sa spécialité entoure le devenir du benzo-a-pyrène dans des modèles animaux, ainsi que la surveillance environnementale et biologique d'individus exposés aux hydrocarbures aromatique polycycliques, il a bien voulu se lancer dans une nouvelle aventure avec Nicole et moi. L'aventure des dommages génétiques causés à des cellules humaines par une exposition au benzo-a-pyrène, un produit chimique qui cause le cancer. Merci docteur Viau de m'avoir initiée à cette nouvelle discipline, la toxicologie et d'avoir élargi mes horizons de recherche. Merci pour vos questions, votre support et pour les bonnes discussions que nous avons eues ensemble.

J'aimerais également remercier le docteur Yvette Bonvalot, biostatisticienne et épidémiologiste à Santé Canada et membre du département de santé environnementale et santé au travail de l'Université de Montréal. Yvette m'a initiée à l'art d'interroger les résultats afin de les faire parler de ce qu'ils signifient. Cet art des biostatistique m'accompagnera durant toute ma carrière, j'en suis certaine. Merci Yvette de m'avoir montrée à bien poser mes questions et de m'avoir poussée à chercher si les réponses obtenues étaient pleines de sens et comment il fallait les interpréter. Merci pour cette passion des chiffres cachés derrière la biologie et pour l'ouverture que tu m'as donné sur ce domaine. Nos séances de débroussaillage me manqueront!

Toute bonne chose a une fin et aussi un début! Je tiens donc à remercier ici le docteur Pierre Belhumeur du département de microbiologie et immunologie de l'Université de Montréal. Il m'a ouvert les portes de son laboratoire en 1994, alors que je terminais tout juste ma formation technique en Chimie-biologie. Merci Pierre de m'avoir donné ma première expérience en recherche universitaire et d'avoir suivi avec un réel intérêt mon cheminement, alors que j'avais quitté ton laboratoire depuis quelques années déjà.

Un grand merci va aussi à tous les étudiants du docteur Nicole Lemieux, que j'ai côtoyé comme technicienne ou comme étudiante.

Merci à Mélanie Beaulieu Bergeron, ma collègue de tous les cycles universitaires, ma bonne amie. Ta rigueur et ton esprit analytique ont fait de moi une meilleure scientifique. Merci Mélanie pour ton exemple et pour ton écoute durant toutes ces années. Nos chemins s'entrelaceront encore dans le futur, j'en suis certaine et je le souhaite!

Merci à Sophie Dubé qui m'a vue débiter mon baccalauréat en travaillant et qui m'a poussée à aller toujours plus loin, là où je le désirais.

Merci à Van Pham, qui a été un bel exemple de courage. Reprendre ses études dans la quarantaine, quand tes enfants sont grands et terminer une maîtrise en début de cinquantaine... C'est tout un exemple de persévérance que tu m'as donnée Van!

Merci également aux autres étudiants du laboratoire, Michel Assad, France Léveillé, François Depault, Martin DesGroseilliers et Marilena Cojocar. Vous avez été des étudiants formidables, c'était un plaisir de vous côtoyer et une source d'inspiration.

Merci aux professeurs et membres du personnel des départements de pathologie et biologie cellulaire et de microbiologie et immunologie qui m'ont entourée, questionnée et appuyée.

Je ne saurais passer sous silence l'importance de ma grande famille dans cette aventure. À mes nombreux neveux et nièces, dont plusieurs sont nés pendant mes études, vous avez été des rayons de soleil pour moi. Vous voir grandir si beaux a été une source d'inspiration de tous les instants. Plusieurs membres de ma famille proche et de ma belle-famille, notamment Maman et Papa, Francine, Marylène et Stéphane, Richère, Huguette et Michel, Serge, ainsi que Richelle et François m'ont offert un soutien de tous les instants.

Merci pour vos encouragements, pour votre compréhension lors de mes nombreuses absences. Merci d'avoir toujours été là.

Finalement, je conclus mes remerciements en m'adressant à Patrick Boulet, mon complice depuis 18 ans déjà, qui m'a vue étudier durant la majorité de nos années de vie commune. Patrick, mon ami, mon fiancé, mon homme chéri... Tu as depuis longtemps compris que pour moi, les études c'est la vie. Ce n'est peut-être pas toi qui as étudié durant toutes ces années, mais c'est toi qui as patienté durant tant de soirs de semaine, tant d'après-midis de week-end, patienté jusqu'à ce que je ferme mes livres et que je me consacre un peu à toi et à notre famille. Durant toutes ces heures, jamais tu ne m'as dit que je ne devais pas étudier, tu ne l'as même jamais pensé. Tu m'as épaulée tous les jours, ton appui était indéfectible et tu as défendu mon choix envers et contre tout!

Merci d'avoir toujours cru en moi.

Merci de m'avoir secouée aux moments où j'en avais besoin.

Merci pour tes précieux conseils, pour ton attitude de coach lorsqu'il fallait me motiver, m'aider à traverser les périodes plus difficiles.

Merci de m'avoir soutenue dans la réalisation de ce grand rêve.

Cette grande aventure s'achève pour moi et de nouveaux rêves nous attendent...

À nous de les réaliser!

Chapitre 1: Introduction

«Chromosomal studies have long promised to become a kind of visible chemistry.»
Cyril Dean Darlington, The problem of chromosome breakage: an introduction, Heredity 7 (1953) V–VIII.

Génotoxicologie et toxicogénétique, deux termes proches ayant leurs racines dans la génétique et la toxicologie, mais de sens différents. La *toxicogénétique* est proche de la pharmacogénétique, concernée par l'étude des variants génétiques, dits polymorphismes, qui sont impliqués dans les différences interindividuelles de réponse aux agents environnementaux potentiellement toxiques [Dideberg et Bours, 2005]. La *génotoxicologie*, quant à elle, est un champ de la toxicologie appliqué à l'identification et l'analyse des agents ayant une toxicité dirigée spécifiquement contre les acides nucléiques et capables de produire des dommages génétiques à des concentrations sous-toxiques. Ces agents sont dits *génotoxiques* ([Brusick et coll., 2007]. Mariage de la cytogénétique et de la toxicologie, cette thèse analysera principalement les dommages à l'ADN détectés à l'aide d'outils cytogénétiques, d'où l'appellation de dommages *cytogénotoxiques*. Ces outils cytogénétiques seront appliqués au cas du benzo-a-pyrène, un Hydrocarbure Aromatique Polycyclique (HAP) cancérigène.

1. Les principes de cancérogenèse

L'observation de mitoses aberrantes dans plusieurs cancers par David von Hansenmann en 1890 et l'intérêt de Theodor Boveri pour les anomalies des centrosomes, poussèrent ce dernier à suggérer, en 1914, différentes conséquences liées à un nombre anormal de chromosomes dans les cancers, dont les concepts qui allaient préfigurer les termes d'oncogènes et de suppresseurs de tumeurs employés aujourd'hui. Utilisé pour la première fois en 1916 par Ernest Tyzzer, le terme de « mutation somatique » appliqué au cas du cancer, lança une vague de recherches qui menèrent Ian Mackenzie et Peyton Rous, en 1944, à postuler l'existence de deux étapes primordiales dans la cancérogenèse chimique, « l'initiation » et « la promotion ». La confirmation de l'existence distincte de ces deux étapes allait venir 3 ans plus tard, avec les travaux de Isaac Berenblum et Philip Shubik sur 3 initiateurs (le benzo-a-pyrène, le 1,2,5,6-dibenzanthracène et le 9,10-diméthyl-1,2-benzanthracène) et un promoteur, l'huile de croton (composé actif : le phorbol) (Berenblum et Shubik, 1947; Knudson, 2001). L'application séquentielle de ces composés sur la peau de souris, incluant le promoteur, engendra la formation de néoplasmes observables après une période de latence presque identique pour les trois initiateurs (de 9,5 à 10,5 semaines), alors que l'application continue des initiateurs (sans promoteur) donne lieu à des périodes de latence allongées de 1,5 à 22 semaines supplémentaires.

1.1. La transformation cellulaire

L'apparition d'un néoplasme (défini comme étant une croissance cellulaire anormale relativement autonome et transmissible d'une cellule mère à ses cellules filles) chez un être humain peut avoir plusieurs causes. Des agents chimiques (exemples : aflatoxine B₁, benzo-a-pyrène, chrome, etc.), physiques (rayonnements gamma, UV, etc.), des virus (papillome humain de types 16 et 18, virus Epstein-Barr, etc.) et des facteurs génétiques hérités ou non (transmission d'un allèle muté de *RBI* ou de *TP53*, formation d'une translocation (9;22) impliquant les gènes *BCR* et *ABL*, etc.) peuvent ainsi transformer

une cellule normale en cellule immortelle, par un processus appelé la *transformation cellulaire*.

La transformation se manifeste par un phénotype cellulaire visible lorsque les cellules sont mises en culture [Hanahan et Weinberg, 2000] et dont les principales manifestations sont l'immortalité des cellules, la perte d'inhibition de contact, la croissance indépendante de l'ancrage, une indépendance relative aux facteurs de croissance, l'apparition de changements morphologiques et la formation de tumeurs chez la souris immunodéficiente (« *nude* »), suite à l'injection intradermique de cellules potentiellement tumorigènes.

Par ailleurs, cette transformation cellulaire s'accompagne de changements moléculaires, recoupant les changements cellulaires visibles en culture *in vitro* et reflétant six capacités nouvellement acquises [Larsen, 2005b] : une indépendance aux signaux de prolifération, une insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, l'acquisition d'une résistance à l'apoptose, un potentiel illimité de réplication, une stimulation de l'angiogenèse et un pouvoir d'invasion et de dissémination.

1.1.1. LES ÉTAPES DE LA TRANSFORMATION CELLULAIRE

Trois étapes majeures sont identifiées dans la transformation d'une cellule normale en cellule néoplasique : l'initiation, la promotion et la progression.

- *L'initiation* se caractérise par une altération permanente de l'ADN causée par l'exposition des cellules cibles à un cancérogène initiateur [Lacave, 2005]. Ce cancérogène provoque des adduits à l'ADN, modifie des bases par oxydation et/ou altère la structure fine de l'ADN en créant des ponts entre les brins ou entre les bases de l'ADN [Poirier, 2004]. Les altérations décrites, si elles ne sont pas réparées, se transformeront en mutations, délétions, cassures chromosomiques, etc. À cette étape, l'initiation peut devenir irréversible et se transmettra aux cellules filles. Cependant, à elle seule, elle n'est pas suffisante pour donner naissance à un néoplasme.

L'aflatoxine B₁, le benzo-a-pyrène, l'arsenic et le psoralène sont des exemples de produits chimiques initiateurs.

- La *promotion* doit obligatoirement suivre l'initiation pour donner naissance à un néoplasme. Les modifications cellulaires produites par les promoteurs sont généralement réversibles et n'altèrent pas directement l'ADN [Lacave, 2005]. Ils pourront cependant promouvoir la croissance des cellules initiées et contribuer à la formation de masses de cellules tumorales bénignes. Ainsi, les promoteurs peuvent modifier la transcription génique, la communication intercellulaire et le patron d'expression de protéines impliquées dans la croissance, la différenciation cellulaire et l'apoptose [Luch, 2005]. Le benzo-a-pyrène, la 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) et le 2-acétylamino-fluorène sont des exemples de produits chimiques promoteurs.
- Suite à l'initiation et la promotion, la cellule modifiée deviendra transformée et pourra poursuivre son parcours vers la néoplasie dans une troisième étape appelée *progression*. Cette progression se caractérise par l'apparition de nouvelles modifications génétiques et épigénétiques de la cellule transformée qui acquerra progressivement des capacités prolifératives et une longévité accrue [Knudson, 2001]. Une instabilité génétique et chromosomique sera souvent constatée durant cette phase.

Certains cancérogènes sont dits *complets* lorsque leur exposition répétée induit les trois étapes de la transformation cellulaire, alors qu'ils sont dits *incomplets* lorsque ce n'est pas le cas.

1.1.2. LE NOMBRE DE TOUCHES GÉNÉTIQUES NÉCESSAIRES POUR CAUSER UN CANCER

En 1953, C.O. Nordling constate que l'incidence de cancers (tous sites confondus) augmente avec l'âge suivant un facteur constant de un sixième (1/6) et postule que 7 mutations seraient probablement nécessaires à l'apparition d'un cancer [Nordling, 1953]. L'année suivante, Peter Armitage et Richard Doll étudient l'incidence spécifique de cancers

à différents sites et décrivent une relation mathématique à partir d'un graphique logarithmique de l'âge en fonction de l'incidence (I) : $\ln I = \ln k + (r-1) \ln t$ où la pente de la droite ainsi obtenue est égale à $r-1$. Cette expression mathématique permet d'estimer le nombre d'évènements r menant à la production d'un cancer reconnaissable, cela si aucun évènement ne donne d'avantage prolifératif aux cellules. Dans cet article, $r-1$ est estimé à 5 pour le cancer du côlon, ce qui nous donne $r = 6$. De plus, ils modèrent les propos de Nordling et suggèrent l'existence de facteurs qui pourraient accélérer ou ralentir la survenue du cancer, comme les sécrétions endocrines ou l'usage de la cigarette. Ils suggèrent également la présence de mutations spontanées ou apparues *in utero* pour expliquer le pic d'incidence des cancers pédiatriques (Armitage, 1954, réédité en 2004). L'introduction du concept de stades intermédiaires où les cellules ont un avantage de croissance, comme pour les carcinomes colorectaux, a permis de diminuer ce r . Par exemple, dans le cas de la polypose adénomateuse familiale (PAF), où les individus sont porteurs d'une mutation dans le gène *APC*, une pente de $r=5$ devrait être observée en raison de cette mutation héritée. Cependant, comme les polypes ont un avantage de croissance, la pente réelle est de 3-4 (Knudson, 2001).

La cytogénétique apporte une lumière différente quant à la question du nombre de touches. En 1960, Peter Nowell et David Hungerford qui travaillent sur des leucémies myéloïdes chroniques (LMC), découvrent la présence d'un chromosome du groupe G (21 ou 22) trop court. C'est le « chromosome de Philadelphie » (Ph^1), nommé ainsi en raison du nom de la ville où il est mis en évidence (Nowell et Hungerford, 1961; Nowell, 2007). En 1973, Janet Rowley montre que le Ph^1 est le chromosome 22 dérivé d'une translocation entre les chromosomes 9 et 22, puis dix ans plus tard, Heisterkamp et ses collaborateurs identifient l'oncogène *ABL* présent au point de cassure de cette translocation [Rowley, 1973; Heisterkamp et coll., 1983]. Cependant, la chasse aux oncogènes était déjà ouverte depuis plusieurs années, entre autres avec la découverte de la translocation (8;14) dans le lymphome de Burkitt provoquant l'activation du gène *MYC* [Dalla-Favera et coll., 1982]. Dans la leucémie myéloïde chronique et le lymphome de Burkitt, l'activation par translocation des oncogènes *ABL* et *MYC* fixent donc à une seule, le nombre de touche nécessaire à la transformation néoplasique des cellules cibles. Toutes ces observations menèrent à une définition plus formelle d'un oncogène : version modifiée d'un gène

normalement impliqué dans la croissance ou la prolifération cellulaire, dont l'altération conduit à un gain de fonction et qui agit de façon dominante (la modification d'une seule copie du gène est essentielle – [Larsen, 2005a]. Par ailleurs, si à l'examen caryotypique ces translocations semblent le seul changement intervenu, l'étude récente des changements de nombre de copies d'ADN dans les LMC, par l'utilisation des micropuces d'ADN (résolution de 1 mégabase), confirme que peu de changements cryptiques (inframicroscopiques) sont observables dans la phase chronique, alors que ces changements se multiplient dans les phases d'accélération et blastique [Hosoya et coll., 2006].

Pourtant, l'estimation du nombre de touches allait réserver encore quelques surprises avec l'étude d'une cinquantaine de cas sporadiques et familiaux de rétinoblastome par Alfred J Knudson en 1971. Il démontre alors que le nombre d'évènements nécessaires à la transformation néoplasique des rétinoblastes peut être estimé à deux. Séparément, Knudson et Comings [1973] postulent que les deux touches doivent se produire au sein d'un même gène, que ce soit par mutation ou délétion intragénique, délétion du gène entier ou perte du chromosome entier. Plus tard, une fois le gène *RBI* cloné, sa double inactivation dans le rétinoblastome est démontrée [Friend et coll., 1986]. Cette découverte met de l'avant l'importance des gènes suppresseurs de tumeurs dans le processus de transformation néoplasique et conduit à leur définition comme classe de gènes ayant une action récessive, pour lesquels la perte d'expression normale (par modification des deux copies du gène) est impliquée dans la transformation et/ou le développement néoplasique [Bignon et Uhrhammer, 2005].

Cependant, l'étude approfondie des tumeurs révèle que les deux copies de certains gènes suppresseurs de tumeurs ne sont pas toujours inactivées de façon conventionnelle. Une des deux copies ne présente ni délétion, ni mutation d'aucune sorte et pourtant la protéine correspondante est peu ou pas exprimée... L'étude des empreintes épigénétiques présentes sur l'ADN lève le voile sur un autre phénomène riche en enseignement.

1.1.3. L'ÉPIGÉNÉTIQUE ET LE CANCER

Introduit en 1940 par Conrad Hal Waddington pour décrire l'analyse des causes du développement (soit la raison pour laquelle une cellule a une destinée plutôt qu'une autre

durant le développement d'un organisme [Slack, 2002]), le terme *épigénétique* réfère aujourd'hui à l'étude des changements d'expression génique qui sont héréditaires et qui ne résultent pas d'une modification de la séquence d'un gène [Sadikovic et coll., 2008a]. Ces changements, héréditaires ou non, se présentent sous la forme de modifications covalentes des cytosines de l'ADN par méthylation, de modifications des histones, du remodelage de la chromatine (par acétylation ou autres changements réalisés par des processus faisant intervenir l'utilisation d'ATP) et de l'action des ARN non-codants, jouant tous un rôle important dans la régulation de l'expression génique.

Alors que la communauté scientifique découvre que la méthylation des cytosines présentes dans les îlots CpG des promoteurs de gènes les rend inactifs (Holliday 1987), l'équipe de Valerie Greger [1989] montre une hyperméthylation du promoteur du gène *RBI* chez un des 21 cas de rétinoblastomes étudiés. Plus tard, l'équipe d'Ohtani-Fujita [1993] démontre biochimiquement l'inactivation du gène *RBI* par hyperméthylation dans 16% de leurs cas de rétinoblastome unilatéral.

Ces travaux ouvrent la voie à plusieurs équipes qui rechercheront des gènes hyperméthylés dans les cellules cancéreuses. Sont ainsi identifiés des gènes régulateurs du cycle cellulaire (*CDKN1A*, *CDKN2A*), impliqués dans la réparation de l'ADN (*TP53*, *BRC1A*, *MLH1*), dans l'apoptose (*DAPK1*), la régulation hormonale (*ESR1*), la biodétoxification (*GSTP1*), les métastases (E-cadherin), etc. Dans tous les cas, cette hyperméthylation conduit à une perte de l'expression des gènes visés. Quoique certains gènes, comme *TP53*, soient méthylés dans plusieurs cancers, certains sont spécifiques d'un cancer donné, comme *GSTP1* qui est hyperméthylé dans 90% des cancers de la prostate. L'hypométhylation semble également être un phénomène important dans la progression tumorale, résultant en l'activation d'oncogènes comme *HRAS*, *MYC* et *EGFR* (revus dans [Sadikovic et coll., 2008a]).

1.2. L'instabilité chromosomique et le cancer

En plus d'être des éléments clés de l'étape d'initiation, les modifications génétiques et épigénétiques jouent un grand rôle dans la progression tumorale et dans l'instabilité génétique et chromosomique observée dans le cancer. Cette instabilité peut être causée par

des atteintes modifiant la ségrégation des chromosomes lors de la division cellulaire ou encore des atteintes altérant la stabilité du matériel génétique et sa composition intrinsèque.

Rappelons ici certains éléments clés de la division cellulaire somatique (la mitose) avant de poursuivre notre propos sur l'instabilité chromosomique observée dans le cancer. Les cellules en division procèdent à travers les quatre phases du cycle cellulaire afin de donner naissance à deux cellules filles (**Figure 1**, page 10).

- La *phase G₁* se caractérise par une croissance en taille de la cellule, avec une synthèse protéique élevée. Un seul centrosome (comportant deux centrioles) est présent dans la cellule et en fin de G₁, il se duplique. Le point de contrôle G₁/S doit être franchi avant l'entrée en phase S : p53 s'active en présence de lésions à l'ADN et la réparation de l'ADN se fait par excision des nucléotides (NER), par excision de base (BER), par appariement d'ADN simple-brin (SSA) ou encore par recollage d'extrémités non-homologues (NHEJ) [Sherbet, 2003].
- La *phase S* se caractérise par la réplication de l'ADN. Les chromatides-sœurs sont maintenues ensemble par des protéines de type cohésine. Les dommages à l'ADN entraînant un arrêt de la fourche de réplication sont résolus par recombinaison homologue (HRR). Cependant, certaines lésions, comme les sites abasiques, peuvent être outrepassées par des polymérase (η [eta] par exemple) ayant la capacité d'effectuer de la synthèse translésionnelle (*translesion synthesis* [Kokoska et coll., 2003]). Par ailleurs, la NER est encore fonctionnelle dans cette phase [Johansson et coll., 2004; Auclair et coll., 2008] et la NHEJ le serait également, dans certaines conditions bien spécifiques [Delacôte et Lopez, 2008].
- La *phase G₂* est une phase de préparation à la mitose. La réplication des régions de l'ADN ayant pris du retard, comme les sites fragiles, se termine. Les lésions survenues en phase S, ou encore celles qui ne sont pas réparées en phase G₁, sont maintenant réparées par NHEJ ou par HRR. De plus, les bases appariées incorrectement sont réparées par le système de réparation

des mésappariements (MMR) [Beucher et coll., 2009; Zhang et coll., 2009; Lieber et coll., 2010].

- Survient alors la *phase M*, durant laquelle les centrosomes se séparent et migrent aux pôles opposés de la cellule. L'enveloppe nucléaire se désassemble, l'ADN se compacte en chromosomes, la transcription s'arrête et les microtubules se polymérisent à partir du centre d'organisation des microtubules au sein des centrosomes, pour former le fuseau mitotique. Un complexe protéique s'assemble au niveau des centromères pour former les kinétochores et les microtubules s'y attachent. Lorsque tous les chromosomes sont correctement attachés au fuseau mitotique, la séparase clive les cohésines et les chromatides-sœurs se séparent : l'anaphase commence avec la migration des chromosomes aux deux pôles opposés de la cellule. Le sillon de clivage composé d'actine se forme et l'anneau ainsi formé se contracte afin de séparer le cytoplasme (la cytokinèse) et de générer deux cellules filles. Durant cette contraction, l'enveloppe nucléaire se réassemble et la transcription génique reprend [Karp, 2010].

1.2.1. ATTEINTES DE LA DIVISION CELLULAIRE

Les atteintes de la division cellulaire peuvent être dues à des anomalies présentes à plusieurs niveaux incluant l'intégrité et le fonctionnement du fuseau mitotique, la duplication des centrosomes et centrioles, la cohésion et la ségrégation des chromatides-sœurs, la stabilité des centromères et télomères, ainsi que la régulation des points de contrôles entourant la division cellulaire. Se produisant très rarement spontanément, ces anomalies peuvent être causées par des mutagènes altérant un gène impliqué dans ces voies ou encore des aneugènes interférant avec ces voies [Panigrahi et Pati, 2009]. Il en résultera une aneuploïdie (gain ou perte d'un ou plusieurs chromosomes entiers) ou une polyploïdie (gain ou perte d'un complément chromosomique (n) entier – chez l'homme $n= 23$ chromosomes). Si de nombreux mutagènes sont connus, les aneugènes reconnus sont rares : neuf d'entre eux ont été décrits dans la littérature dont l'acrylamide, la colcémide, la vinblastine et le diéthylstilbestrol [Aardema et coll., 1998].

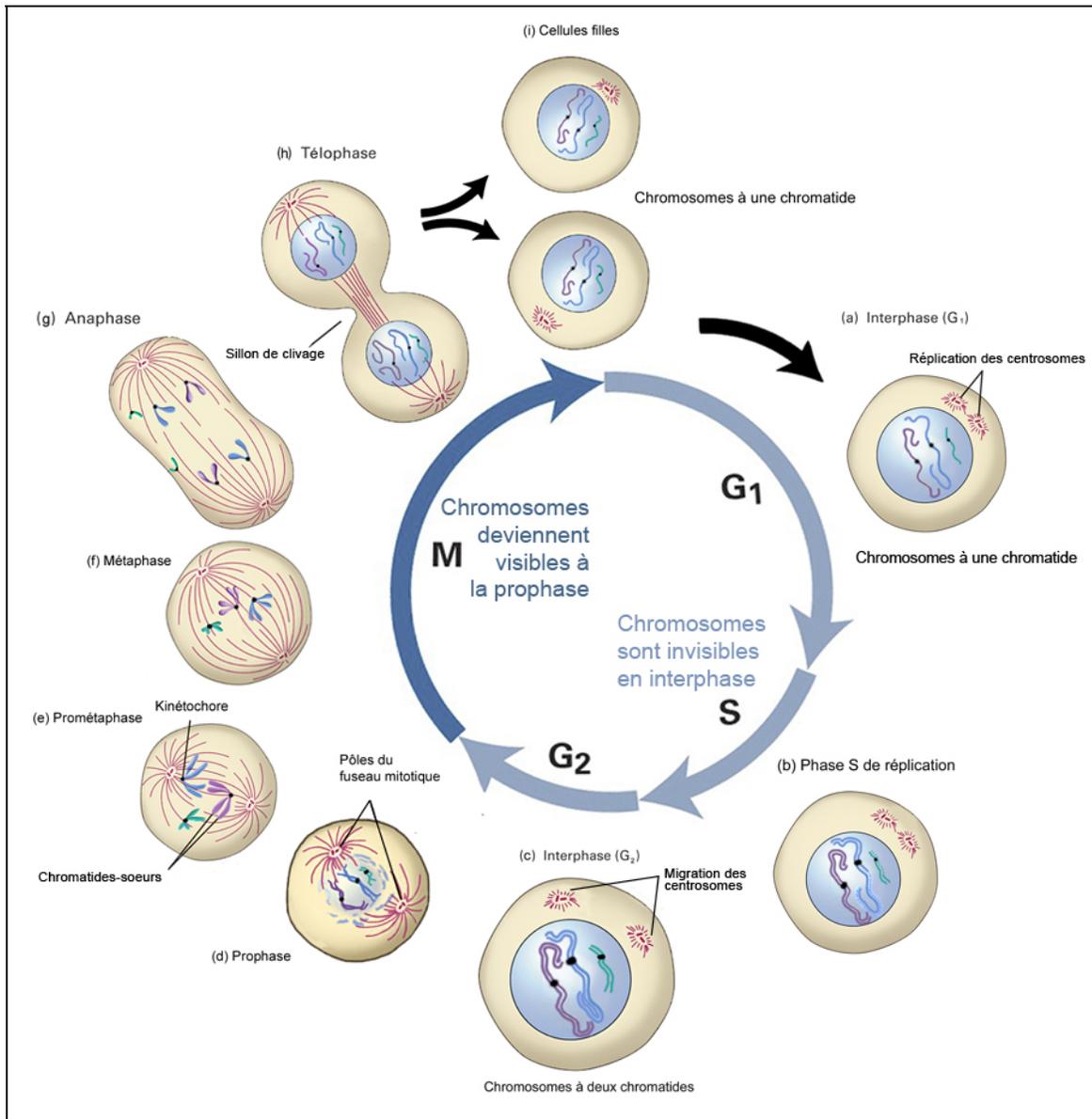


Figure 1: Représentation schématique de la mitose, préparée pour le cours PBC 6300 – Cytogénétique médicale. Inspiré de Lodish et coll. [2005].

1.2.1.1. *L'aneuploidie*

L'aneuploïdie est une caractéristique commune à de nombreux cancers comme les adénocarcinomes de la prostate, du sein et du côlon, le carcinome du poumon (autre que celui à petites cellules) et celui du col utérin [Storchova et Kuffer, 2008], ainsi que de certains cancers d'origine hématologique comme la leucémie à cellules T de l'adulte [Yasunaga et Jeang, 2009]. Si des cancers présentent un caryotype aneuploïde hautement anormal mais stable, d'autres présentent une instabilité chromosomique (CIN) engendrant la présence de formules chromosomiques diverses au sein d'une même tumeur [Chandhok et Pellman, 2009]. Cette aneuploïdie, lorsqu'elle est présente dans des lésions pré-néoplasiques, est fréquemment indicatrice d'un risque élevé de transformation maligne, ce qui, pour les tenants de la théorie de la cancérogenèse dirigée par l'aneuploïdie, est en faveur d'un rôle important dans l'initiation tumorale. Cette affirmation est appuyée par l'observation voulant que le niveau et le type d'instabilité génétique retrouvés dans une tumeur donnée soit fonction du cancérogène l'ayant initiée [Schneider et Kulesz-Martin, 2004].

Une corrélation entre aneuploïdie et cancer provient également de l'étude d'individus constitutionnellement aneuploïdes, comme les individus avec trisomie 21 (ayant trois chromosomes 21), les hommes avec le syndrome de Klinefelter (ayant deux chromosomes X et un chromosome Y) et les femmes avec le syndrome de Turner (ayant un seul chromosome X). Ces individus sont, respectivement, plus à risque de développer des leucémies, des cancers du sein et des gonadoblastomes, ainsi que des tumeurs de la crête neurale [Aardema et coll., 1998]. Cette augmentation du risque de cancer serait due à la sous- ou la surexpression de gènes portés par le chromosome impliqué dans l'aneuploïdie chez ces individus. Cependant, les implications d'une aneuploïdie vont au-delà du simple chromosome impliqué, comme le montrent les résultats d'une étude sur des cellules mammaires humaines artificiellement trisomiques [Upender et coll., 2004]. L'analyse des profils de transcription génique montre qu'en plus des gènes portés par le chromosome trisomique, de nombreux autres gènes situés sur d'autres chromosomes subissent une dérégulation transcriptionnelle majeure.

La perturbation du point de contrôle de l'assemblage du fuseau, par sous- ou surexpression des protéines impliquées, est une cause majeure d'aneuploïdie. À cette étape de la mitose, l'intégrité des microtubules et l'achèvement de l'alignement des chromosomes à la plaque équatoriale sont vérifiés. Plusieurs protéines sont impliquées dans ce point de contrôle, notamment les protéines Bub (1, 2 et 3), BubR1, Mad (1, 2 et 3) et Cenp-E. Leurs gènes sont mutés dans divers cancers (côlon, poumon, lymphomes), entraînant la sous-expression ou la surexpression de ces protéines [Rao et coll., 2009]. Notons qu'il existe des individus porteurs de mutation hétérozygote dans le gène *BUB1B*. Ces individus, atteints du syndrome d'aneuploïdie en mosaïque, sont à risque de développer des tumeurs pédiatriques (rhabdomyosarcome, tumeur de Wilms et leucémie) et présentent des aneuploïdies variées (principalement des monosomies et des trisomies) touchant jusqu'à 25% des cellules analysées [Holland et Cleveland, 2009; Rao et coll., 2009].

La perturbation de la cohésion entre les chromatides-sœurs, par surexpression des protéines séparase ou sécurine, peut aussi entraîner de l'aneuploïdie ou la transformation cellulaire [Holland et Cleveland, 2009]. Cette aneuploïdie est engendrée par une séparation prématurée des chromatides-sœurs, la présence de chromosomes retardataires et de ponts à l'anaphase [Panigrahi et Pati, 2009]. D'autres protéines impliquées dans cette voie, comme la cohésine Smc1A, ont été retrouvées mutées dans des cancers colorectaux présentant une CIN élevée [Barber et coll., 2008].

Des évènements de malségrégation chromosomique peuvent aussi se produire lorsque les deux kinétochores d'un chromosome s'attachent à des microtubules provenant du même pôle du fuseau. Cet attachement syntélique est généralement corrigé avant l'anaphase, mais s'il persiste, les deux chromatides-sœurs peuvent migrer vers le même pôle ou encore entraîner un retard dans la migration qui se manifestera par la formation d'un micronoyau [Holland et Cleveland, 2009]. À ce jour, aucune mutation spécifique n'a été identifiée, mais les tumeurs ayant un haut degré de CIN présentent également un taux élevé de chromosomes retardataires [Chandhok et Pellman, 2009].

Enfin, le rôle des centrosomes dans la génération d'aneuploïdie dans les cellules en voie de transformation ou cancéreuses n'est pas négligeable. Alors que deux centrosomes sont normalement présents dans la cellule en division, la présence de plus de deux centrosomes est souvent observée dans les cellules cancéreuses humaines et corrèle avec

l'aneuploïdie observée dans ces cellules et la progression tumorale [Godinho et coll., 2009]. Cependant, la division cellulaire demeure le plus souvent bipolaire, suite à un regroupement des centrosomes, quoiqu'une malségrégation soit fréquemment observée. En effet, l'imagerie en temps réel de mitoses multipolaires a montré que les cellules-filles formées sont le plus souvent non viables [Holland et Cleveland, 2009]. Par ailleurs, des études effectuées sur la transformation induite par le virus HTLV-1 causant la leucémie à cellules T de l'adulte, montrent qu'il induit une suramplification des centrosomes visible dans les lymphocytes sanguins périphériques. Ceux-ci ont un caryotype aneuploïde, mais ne sont pas transformés, suggérant que lorsque seuls des centrosomes supplémentaires sont présents, l'aneuploïdie précède la transformation cellulaire [Yasunaga et Jeang, 2009].

1.2.1.2. *La polyploïdie*

La polyploïdie est un phénomène se produisant naturellement dans l'organisme humain, lors du programme développemental des mégacaryocytes (précurseurs des plaquettes) avec un complément chromosomique pouvant atteindre $128n$, ou encore dans la formation du trophoblaste lors de la grossesse, dont le complément chromosomique peut atteindre $1000n$ [Edgar et Orr-Weaver, 2001]. Se produisant par endomitose ou par fusion cellulaire, la polyploïdie représente le stade terminal de différenciation de ces tissus. Par ailleurs, les cellules polyploïdes peuvent représenter de 0,5 à 20% des cellules d'un tissu normal humain, cette proportion variant entre les tissus [Storchova et Kuffer, 2008].

La tétraploïdie spontanée (complément chromosomique de $4n$) peut se produire de trois façons principalement : par fusion cellulaire (induite par certains virus), par glissement hors de la mitose (*mitotic slippage*) ou lors d'une cytokinèse avortée. Le glissement hors de la mitose se produit lors d'un arrêt prolongé du cycle cellulaire causé par une activation du point de contrôle de l'assemblage du fuseau. Durant cet arrêt, la cycline B est lentement dégradée jusqu'à ce qu'elle soit trop peu abondante pour maintenir la cellule en mitose. La cellule glisse alors hors de la mitose, sans anaphase ou cytokinèse et produit une cellule tétraploïde comportant un seul noyau et deux centrosomes [Ganem et coll., 2007]. Alternativement, une cellule en anaphase peut être incapable de compléter la division cellulaire lorsque le sillon de clivage est encombré par un chromosome retardataire. Cette

chromatine fera régresser le sillon de clivage et la cytokinèse avortera, résultant en une cellule tétraploïde comportant deux noyaux et quatre centrosomes [Shi et King, 2005].

La majorité des cellules devenues spontanément tétraploïdes arrêtent en phase G_1 du cycle cellulaire, mais cet arrêt n'est pas le fait de l'activation d'un quelconque «point de contrôle du contenu en ADN», dont l'inexistence est aujourd'hui largement démontrée. Cet arrêt serait plutôt causé par des agents stressants, comme les centrosomes supplémentaires, ou des dérangements au niveau du cytosquelette d'actine [Ganem et Pellman, 2007]. De plus, le glissement hors de la mitose causé par des dommages aux microtubules entraîne la translocation de la protéine Lats2 du centrosome vers le noyau, où son interaction avec Mdm2 entraîne l'activation de p53 [Aylon et coll., 2006] et subséquemment, l'arrêt en G_1 . Suite à cet arrêt, certaines cellules tétraploïdes seraient éliminées par apoptose, mais cela ne représenterait pas la majorité des cas, si l'on se fie à un modèle de cellules érythroleucémiques KS où deux fois plus de cellules tétraploïdes sont viables qu'apoptotiques [Decordier et coll., 2008]. Cependant, ce profil est inversé dans un modèle de cellules de carcinome du côlon RKO, où les cellules tétraploïdes sont trois fois plus nombreuses à entrer en apoptose [Castedo et coll., 2006]. Ceci suggère un devenir différent des cellules tétraploïdes, en fonction de leur origine. Finalement, comme les cellules tétraploïdes sont moins bien adaptées que leurs équivalentes diploïdes, leur accumulation dans l'organisme s'en trouverait compromise [Ganem et Pellman, 2007].

Une CIN est visible dans les cellules tétraploïdes et semble être inhérente à leur nature. Ainsi, les levures tétraploïdes présentent un taux élevé de pertes chromosomiques et de chromosomes réarrangés [Thorpe et coll., 2007]. Ayant le double d'ADN, les cellules tétraploïdes sont susceptibles de contenir également deux fois plus de dommages à l'ADN spontanés. Ainsi, une pression accrue sur les différents systèmes de réparation de l'ADN et une saturation possible de ces systèmes (démontrée dans les levures tétraploïdes) mèneraient à une augmentation des réarrangements chromosomiques [Storchova et Kuffer, 2008]. Par ailleurs, la présence de centrosomes supplémentaires dans les cellules tétraploïdes augmente la probabilité d'attachement syntélique des chromosomes et donc d'aneuploïdie : la géométrie du fuseau mitotique change alors que la longueur du fuseau demeure la même, mais il y a deux fois plus de chromosomes à séparer. Cet encombrement

mènerait également à une augmentation des cassures chromosomiques [Ganem et coll., 2007].

Par ailleurs, les cellules tétraploïdes démontrent une résistance plus grande à l'apoptose induite par une variété d'agent chimiothérapeutiques (cisplatine, oxaliplatine, camptothécine), ainsi que par les UVC et les rayons γ , comparativement à leurs consœurs diploïdes. Un gène dont la transcription est induite par p53 (*RRM2B*), serait à l'origine de cette résistance [Castedo et coll., 2006]. Finalement, le pouvoir cancérigène des cellules tétraploïdes proviendrait de l'effet tampon octroyé par le nombre accru de chromosomes normaux, dont la présence viendrait masquer les effets causés par des mutations qui seraient néfastes pour des cellules diploïdes [Ganem et coll., 2007]. Tous ces effets (arrêt prolongé en G1, résistance aux dommages à l'ADN, instabilité chromosomique) permettraient donc aux cellules tétraploïdes ayant échappé à l'apoptose de survivre plus longtemps, jusqu'à ce qu'une mutation critique engendre leur transformation.

1.2.2. LES ATTEINTES À L'ADN ET À SES BASES

Les atteintes à l'ADN peuvent être causées par des événements endogènes liés aux réactions chimiques se produisant naturellement avec l'eau et l'oxygène, ainsi que lors des processus cellulaires (réplication, respiration et phosphorylation oxydative, etc.), ou encore être causées par des événements environnementaux liés à l'exposition de l'organisme à des agents chimiques et physiques.

La production de sites abasiques par dépurination est spontanée et il est estimé qu'environ 18 000 lésions par jour sont ainsi produites dans une cellule diploïde humaine (Friedberg et coll., 2006). Ces lésions sont réparées par le système BER. Par ailleurs, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) lors de la phosphorylation oxydative ou du métabolisme aérobie mène à l'oxydation de la guanine (8-OH-dG) de l'ADN. Ces bases oxydées peuvent s'apparier à l'adénine, menant à des transversions. On estime qu'environ 1000 à 2000 bases 8-OHdG seraient produites de façon endogène par jour, qui sont réparées par le système BER ou, lorsque le mésappariement est effectué, par MMR [Friedberg et coll., 2006; Russo et coll., 2007].

Les lésions impliquant une liaison anormale aux bases de l'ADN sont causées par une variété d'agents. Ainsi, les rayonnements UV forment des photo-produits comme les dimères cyclobutane de pyrimidines (CPD), où une double liaison est établie entre deux pyrimidines adjacentes, ou encore les (6-4) pyrimidine- pyrimidone dans lesquelles une liaison simple se forme entre les carbones 6 et 4 des pyrimidines adjacentes. Généralement, les liaisons se font entre 2 thymines [Friedberg et coll., 2006]. Les photo-produits sont réparés par des photolyases qui vont directement éliminer les liaisons aberrantes ou sont retirés par le système NER.

Par ailleurs, différents types de produits chimiques forment des adduits à l'ADN : des agents alkylants qui ajouteront des groupements méthyles ou éthyles aux bases (comme le méthyle méthanesulfonate (MMS) ou l'éthyle-nitrosourée), des agents produisant des liaisons covalentes entre les deux brins ou au sein du même brin d'ADN (comme des psoralènes ou l'agent chimiothérapeutique cisplatine et ses dérivés) et des agents chimiques qui, après leur métabolisme, formeront des composés électrophiles très réactifs, comme l'aflatoxine B₁ (via son métabolite aflatoxine B₁-8,9-époxyde) et le benzo-a-pyrène (via, entre autres, son métabolite benzo-a-pyrène-7,8-diol-9,10-époxyde) (Friedberg et coll., 2006). Le cas spécifique du benzo-a-pyrène sera détaillé dans la section 4.4 (page 50) traitant de ses mécanismes d'action.

Également, les bris à l'ADN, qu'ils soient simple-brin ou double-brin, sont causés par une variété d'agents physiques et chimiques. Les rayons ionisants, naturellement présents dans notre environnement via l'exposition aux rayons cosmiques γ ou au radon dans nos demeures, et ceux générés suite à l'activité humaine, comme lors de la radiographie d'un membre, causent à la fois des bris simple- et double-brin à l'ADN. Ces bris peuvent être directs, résultant de l'absorption de l'énergie par l'ADN, ou indirects, via la formation d'ERO par radiolyse de l'eau. Des agents chimiques mimant l'effet des rayons ionisants existent également. Ces agents, utilisés en chimiothérapie, incluent la bléomycine et l'étoposide (qui causent principalement des bris double-brin à l'ADN), ainsi que la camptothécine (formant des bris simple-brin à l'ADN). Plusieurs métaux, comme le cadmium, causent également des bris simple-brin à l'ADN, suite à la production d'ERO lors de réactions de type Fenton ou suite à l'inhibition d'enzymes de réparation de l'ADN [Joseph, 2009].

Les agents chimiques et physiques de type clastogène, c'est-à-dire causant des bris à l'ADN, causent également des cassures chromosomiques. Ces cassures peuvent être de type «chromatidien», lorsque la lésion touche une des deux chromatides du chromosome, ou être de type «chromosomique», lorsque les deux chromatides du chromosome sont touchés au même locus (**Figure 2**, ci-contre). Les produits clastogènes causant majoritairement des cassures chromatidiennes (camptothécine, mitomycine C, UVC) sont dits «S-dépendants», puisqu'un passage par la phase S est obligatoire pour permettre la transformation des bris simple-brin en bris double-brin, puis l'apparition de la lésion. Une lésion chromosomique, quant à elle, sera formée par des agents clastogènes «S-indépendants» (étoposide, rayons ionisants γ , bléomycine), puisque les bris double-brin à l'ADN qui ne seront pas réparés, sont directement formés par l'agent [Natarajan et Palitti, 2008].

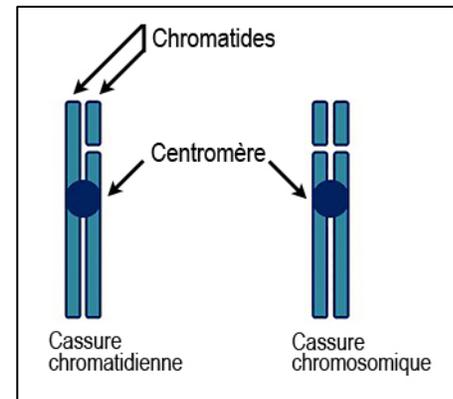


Figure 2: Schématisation d'une cassure chromatidienne et d'une cassure chromosomique.

1.3. Les interactions gène-environnement dans le cancer

Encore aujourd'hui, avoir le cancer est une question de destin ou de malchance pour certains individus. Cette vue, qui expliquait l'apparition du cancer dans le passé, est maintenant remplacée par une conception multidimensionnelle dans laquelle les facteurs intrinsèques (la génétique) et les facteurs extrinsèques (l'environnement) influencent l'apparition de la maladie. Les facteurs environnementaux, tels la nutrition, l'exposition à la maison ou au travail à des composés dangereux, certaines médications, les habitudes de vie et l'accès à des services médicaux, peuvent moduler notre risque de cancer. Ainsi, un rapport publié par l'école de médecine de Harvard en 1996 estimait que 50% des cancers pouvaient être prévenus. En prévention primaire, des modifications apportées à la diète, la pratique régulière d'exercice physique, la diminution ou l'arrêt de la consommation de tabac et d'alcool, l'usage d'écrans solaires et un suivi médical régulier, peuvent tous être effectués. En prévention secondaire, des examens plus spécifiques tels l'auto-examen des

seins, la mammographie régulière, l'examen de la peau ou la colonoscopie, pour n'en citer que quelques-uns, peuvent contribuer à réduire les risques [Giarelli et Jacobs, 2005].

Cependant, modifier les risques génétiques est beaucoup plus difficile et serait applicable, en prévention tertiaire, à la génération suivante. Ainsi, il serait possible de sélectionner des embryons ne portant pas une mutation à risque connue (par exemple au gène BRCA1 dans le cancer du sein) suite à un diagnostic préimplantatoire. Cependant, des enjeux éthiques importants entourent ce type de manipulation génétique. Actuellement, les recherches se concentrent surtout sur l'identification des facteurs de risques génétiques les plus importants pour certains cancers ou certaines expositions précises.

2. Les biomarqueurs et la surveillance biologique

Actuellement, dans l'établissement et le suivi des normes d'exposition, les valeurs admissibles découlent de l'exposition environnementale mesurée dans la zone respiratoire des travailleurs. Cependant, sachant que le volume respiratoire varie d'un poste de travail à un autre en fonction de l'activité physique du travailleur, sachant que l'exposition aux produits chimiques ne se fait pas uniquement par la voie respiratoire et sachant que la toxicocinétique est variable entre les individus, il devenait nécessaire de développer des marqueurs biologiques (ci-après appelés biomarqueurs) pouvant intégrer toutes ces variables [Manno et coll., 2010].

2.1. Le continuum exposition-maladie

Le développement de ces biomarqueurs s'inscrit dans le contexte du continuum exposition-maladie, tel que défini par Schulte en 1989. Ce continuum, ici placé dans le contexte d'une exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), permet la recherche de biomarqueurs qui sont reliés à l'exposition, ainsi que de biomarqueurs reliés à la maladie causée par cette exposition, mais apparaissant de façon suffisamment précoce

pour permettre d'effectuer de la prévention [Manno et coll., 2010] – **Figure 3**, page 20). Les biomarqueurs sont classifiés en trois catégories : les biomarqueurs d'exposition, les biomarqueurs d'effet et les biomarqueurs de susceptibilité [Duffus et coll., 2007]. Des exemples de ces biomarqueurs ainsi que de leurs applications sont donnés en relation avec l'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques.

- Les *biomarqueurs d'exposition* peuvent être divisés en deux catégories : les biomarqueurs de dose interne et de dose biologique efficace.
 - Comme biomarqueurs de dose interne, certains métabolites des HAP sont actuellement utilisés et validés ou en cours de validation : le 1-OH-pyrène, les 1,6- et 1,8-pyrène-dione et divers métabolites hydroxylés (3- et 6-OH-chrysène, 1- et 2-OH-phénanthrène, 3-OH-benzo-a-pyrène, 2- et 9-OH-fluorène, etc.) [Bouchard et coll., 2009; Rossella et coll., 2009; Aquilina et coll., 2010; Campo et coll., 2010]. L'intérêt de ce type de biomarqueur est qu'il permet d'intégrer toutes les voies d'exposition et de tenir compte de la variation interindividuelle de la toxicocinétique du composé parent. De plus, il intègre toutes les sources d'exposition, quoique cela puisse être un désavantage lorsque l'exposition environnementale est importante et que l'on souhaite quantifier uniquement l'exposition en milieu de travail [Manno et coll., 2010].
 - Le biomarqueur de dose biologique efficace le plus utilisé est la mesure des adduits à l'ADN, qu'ils soient spécifiques du benzo-a-pyrène (adduits BPDE-ADN) ou représentent tous les adduits de cette classe (adduits HAP-ADN). Représentant la quantité de métabolite cancérigène atteignant sa cible, les adduits HAP-ADN intègrent autant l'exposition, l'absorption, la distribution et le métabolisme des HAP, que la capacité de l'individu à réparer ces lésions [Wild, 2009].
- Les *biomarqueurs d'effet* touchent autant les altérations biochimiques ou génétiques précoces, que celles résultants d'une adaptation physiologique à une exposition ou une maladie (par exemple le changement de la capacité pulmonaire d'un individu souffrant d'emphysème causé par la cigarette). Les biomarqueurs de génotoxicité

représentent un important groupe de biomarqueurs d'effet biologiques précoces. Ces biomarqueurs incluent les bris à l'ADN (détectables par les essais COMET et UDS), les 8-OH-dG, les aberrations chromosomiques, les micronoyaux et les échanges entre chromatides-sœurs [Bonassi et coll., 2005; Manno et coll., 2010]. Ces biomarqueurs d'effet précoces intègrent le plus souvent toutes les sources d'exposition à des produits génotoxiques, ce qui diminue leur spécificité. Toutefois leur sensibilité demeure assez élevée en raison de leur niveau de base très faible dans la population générale.

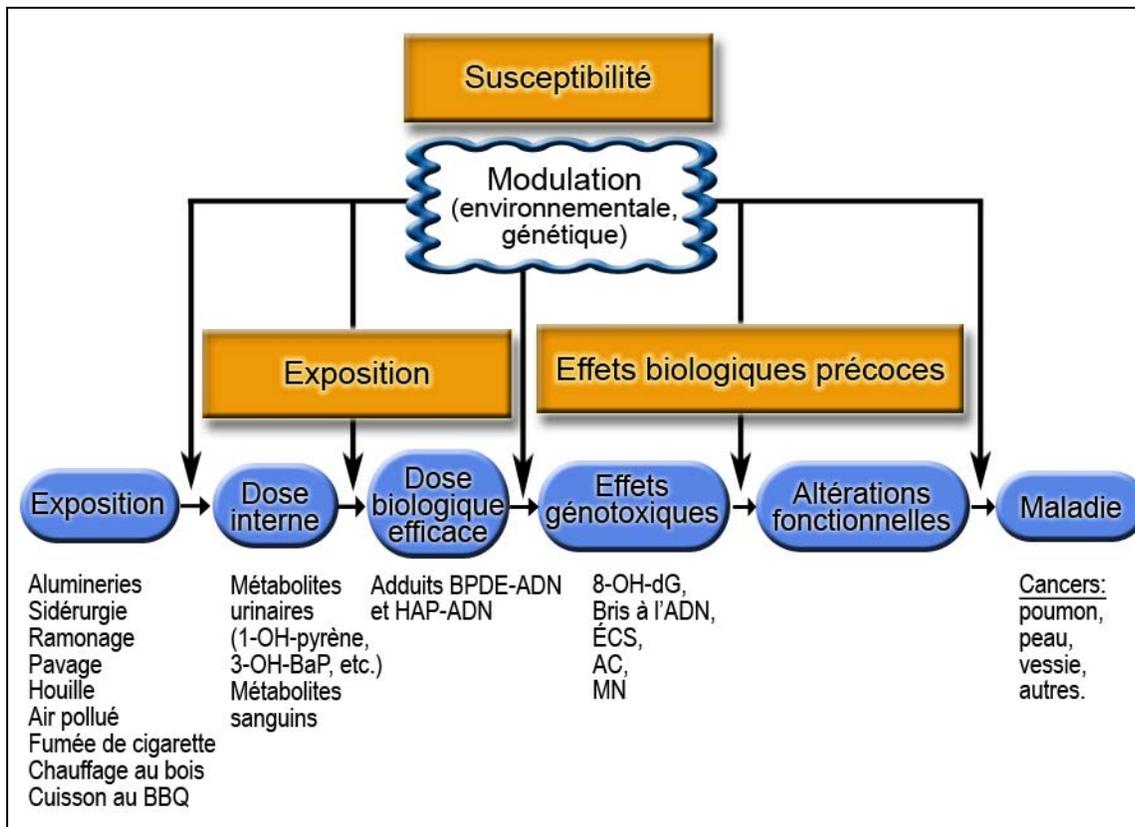


Figure 3: Continuum d'exposition- maladie placé dans le contexte d'une exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. D'après Manno et coll. [2010].

- Les *biomarqueurs de susceptibilité* visent à expliquer les différences existant dans la population, en termes de toxicocinétique et de toxicodynamique. En contribuant à la compréhension du rôle des différentes isoformes des enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques sur la biotransformation et la biodétoxification,

les biomarqueurs de susceptibilité pourraient expliquer les différences interindividuelles observées dans les signes cliniques d'une toxicité, ou encore expliquer la diversité des données de surveillance biologique obtenues au sein d'un groupe de travailleurs [Manno et coll., 2010]. Par ailleurs, l'étude des polymorphismes de ces enzymes ainsi que des enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN, peut s'avérer importante dans la mesure où ces polymorphismes moduleraient l'expression des dommages génétiques mesurés avec les biomarqueurs de génotoxicité [Bonassi et coll., 2005]. Plus de détails concernant ces biomarqueurs de susceptibilité sont donnés dans la prochaine section.

2.2. Les modulations environnementale et génétique

De plus en plus d'études parlent de chimio-prévention, c'est-à-dire de la possibilité de contrer les effets génotoxiques des HAP cancérigènes, notamment du benzo-a-pyrène, par la consommation de certains aliments ou de certaines substances retrouvées principalement dans les plantes. Ainsi, les catéchines (un type de polyphénol) extraites de l'écorce de l'hamamélis, une plante médicinale, inhiberaient la génotoxicité du BaP dans les cellules HepG2 par induction de CYP1A1, en plus de contribuer à la conjugaison du BPDE au glutathion par la GST [Dauer et coll., 2003]. Par ailleurs, la quercétine (présente dans les pommes, les oignons, le brocoli et certaines noix) inhibe significativement la formation d'adduits BPDE-ADN et le stress oxydatif induit par le peroxyde, dans les lymphocytes humains traités *in vitro*. De plus, la consommation de jus riches en quercétine (jus de bleuet-pomme) durant quatre semaines augmente significativement la capacité antioxydante du sang et diminue de 11 % les adduits BPDE-ADN induits par l'exposition au BaP, le tout mesuré *ex vivo* [Wilms et coll., 2005].

Certains produits retrouvés dans les plantes ont également des effets importants sur l'expression d'enzymes de phase I et II. C'est notamment le cas de certains composés phénolés retrouvés dans les plantes, lorsqu'ils sont appliqués sur la peau de souris. L'acide procatéchuique (un antioxydant naturel retrouvé dans l'écorce des agrumes) et l'acide chlorogénique (présent dans le brocoli et les pommes de terre), augmentent l'activité des

enzymes aryl hydroxylase, glutathion-transférase et UDP-glucuronyl transférase, toutes des enzymes sous le contrôle des facteurs de transcription AhR et Nrf2 [Kohle et Bock, 2007; Yeager et coll., 2009], et inhibent la formation des adduits BPDE-ADN dans la peau [Szaefer et coll., 2004]. Globalement, les études de chimio-prévention expliquent pourquoi la consommation variée et en grande quantité de fruits et légumes, ainsi que de thé (vert ou noir), sont associés à une diminution du risque de cancer.

La modulation génétique des effets génotoxiques de substances chimiques est abordée via l'étude des polymorphismes d'enzymes impliquées dans le métabolisme des xénobiotiques et la réparation de l'ADN. Les principaux polymorphismes associés au niveau de base des aberrations chromosomiques (AC), des échanges entre chromatides-sœurs (ÉCS) et des micronoyaux (MN) seront abordés, ainsi que ceux en lien avec l'exposition au tabac [Norppa, 2004].

- Un niveau de base plus élevé d'AC a été observé dans les lymphocytes des individus ne présentant aucune activité de l'enzyme GSTT1 (GSTT1-nul), ayant une activité N-acétyl-transférase lente (NAT2 lent), ayant une faible activité époxyde hydrolase (mEH faible), ayant l'allèle m1 du gène *CYP1A1* ou étant homozygotes pour l'allèle sauvage du gène *XRCCI*, au codon 280. Par ailleurs, l'exposition à la fumée de tabac a été associée à un niveau accru d'AC chez les individus GSTT1-nul, GSTM1-nul, chez les NAT2 rapides et chez ceux ayant une activité intermédiaire ou élevée de l'enzyme mEH.
- En ce qui a trait aux ÉCS, un niveau de base plus élevé est retrouvé chez les individus GSTT1-nul ou GSTM1-nul. Quant à l'effet du tabac, il s'en trouve augmenté chez les individus porteurs des allèles Gln/Gln ou Gln/Arg au codon 399 du gène *XRCCI* ou étant hétérozygotes pour les allèles m1, m2 ou m4 du gène *CYP1A1*, alors que l'effet de GSTM1-nul est controversé.
- Pour les MN sanguins, les individus présentant une activité de l'enzyme GSTM1 ou ceux ayant les allèles associés à une activité réduite de deux enzymes impliquées dans le métabolisme des folates (*MTHFR* allèle TT au codon 677 et *MTRR* allèle GG au codon 66), présentent un niveau de base plus élevé. L'effet du tabac serait surtout modulé par l'activité NAT2 rapide.

2.3. L'utilisation des biomarqueurs en surveillance des travailleurs et des populations

La surveillance biologique se définit comme étant la mesure contrôlée et répétée de biomarqueurs dans les fluides corporels et les tissus prélevés chez des sujets exposés à des agents chimiques et physiques dans leur environnement de travail ou de vie [Manno et coll., 2010]. L'utilisation de ces biomarqueurs en santé au travail varie beaucoup d'une région du globe à une autre, pour des raisons économiques et médicales, mais également en raison des différences culturelles, éthiques et sociales existant entre les peuples. Par exemple, le rôle et l'utilisation de la surveillance biologique sont particulièrement différents en Europe et aux États-Unis. Étant un outil très important pour la surveillance médicale en Europe (on n'a qu'à penser à la spécialité de médecine du travail en France), la surveillance biologique est plutôt liée à l'hygiène industrielle aux États-Unis [Manno et coll., 2010]. Cependant, pour une surveillance biologique efficace, la validation des biomarqueurs utilisés doit être effectuée.

2.3.1. LA VALIDATION DES BIOMARQUEURS

Cette validation vise à évaluer les qualités intrinsèques du biomarqueur, ainsi qu'à évaluer ses techniques d'échantillonnage et d'analyse. Lors de la validation d'un biomarqueur, les qualités suivantes doivent être considérées : la période d'intégration de l'exposition (par exemple la demi-vie d'un métabolite, le temps nécessaire à la réparation d'une lésion dans les lymphocytes), la sensibilité et la spécificité du biomarqueur, l'importance des variations intra- et interindividuelles, le niveau de base dans la population, la connaissance des facteurs confondants (co-exposition, diète, habitudes de vie, etc.) et l'existence d'une relation dose-réponse entre le biomarqueur et l'exposition auquel on souhaite la relier. Parmi les propriétés touchant la technique proprement dite, il faut connaître les contraintes liées à l'échantillonnage du spécimen biologique (caractère invasif du prélèvement, stabilité du biomarqueur dans le spécimen), connaître les sources de contamination possible (particulièrement dans le cas de la mesure de la substance inchangée), évaluer la simplicité de la méthode, son application en routine, sa vitesse et sa standardisation possible (automatisation de certaines étapes) [Scherer, 2005].

Parmi les biomarqueurs d'exposition et d'effet relatifs aux HAP, la validation du 1-OH-pyrène a été complétée avec succès [Brandt et Watson, 2003; Scherer, 2005], alors que celle des MN est en cours. La validation technique du test des MN est complétée [Corvi et coll., 2008] et les qualités intrinsèques de ce biomarqueur le rendent attrayant [Fenech et coll., 2003; Fenech, 2007]. L'existence d'une relation dose-réponse avec l'exposition occupationnelle et environnementale aux HAP demeure toutefois à établir [Brandt et Watson, 2003], bien que plusieurs études montrent une augmentation de la fréquence des MN chez les travailleurs. Ces études seront décrites dans la section sur la cytogénotoxicité du benzo-a-pyrène et des HAP chez l'humain (section 0, page 97).

2.3.2. LES ASPECTS ÉTHIQUES ENTOURANT LA SURVEILLANCE BIOLOGIQUE

Comme l'utilisation de la surveillance biologique est grandissante pour prévenir l'apparition d'effets néfastes liés à certaines expositions sur la santé des travailleurs, une attention particulière est portée aux aspects scientifiques, éthiques et sociaux entourant leur usage. Les enjeux visent l'évaluation personnelle du risque, la communication des résultats (et toute la question de la confidentialité l'entourant), ainsi que la mise en pratique des résultats obtenus dans le domaine de la santé au travail [Manno et coll., 2010]. La perception des avantages et des limites de cette approche préventive peut également être très différente entre les chercheurs, les professionnels de la santé, les travailleurs, les syndicats et les employeurs [Caux et coll., 2005] et il est nécessaire d'en tenir compte dans l'élaboration d'une stratégie de surveillance biologique.

- *Consentement à la surveillance biologique.* Le consentement libre et éclairé des travailleurs doit être obtenu pour effectuer de la surveillance biologique [Manno et coll., 2010]. Cependant, le travailleur ne peut pas prendre seul la décision de subir un test biologique. En effet, l'employeur a l'obligation morale de commander une surveillance biologique s'il croit que ses travailleurs sont à risque. Mais la peur d'une discrimination à l'emploi, d'un bris de confidentialité, d'une assurabilité moindre, peuvent tous entraîner le refus de participer à la surveillance biologique de tout un groupe de

travailleur. Une nécessité s'impose : une meilleure communication entre les chercheurs, les travailleurs, les syndicats et les employeurs [Caux et coll., 2005].

- *Évaluation personnelle du risque.* La nature même de certains biomarqueurs (comme les MN) demande que leur analyse soit faite en groupe et non sur une base individuelle. De plus, certains indicateurs biologiques de l'exposition (IBE) ont été développés, comme dans le cas des cellules à haute fréquence d'ÉCS et du 1-OH-pyrène mesuré dans l'urine : par exemple, on évite une augmentation du pourcentage de cellules à haute fréquence d'ÉCS chez 95 % des travailleurs, lorsque leur taux de 1-OH-pyrène urinaire est inférieur à 2,7 µg/g de créatinine [Buchet et coll., 1995]. L'utilisation de ces IBE a une valeur utile lorsqu'ils sont analysés sur la base d'un groupe seulement. Il est donc nécessaire d'évaluer le risque personnel d'un travailleur en le référant à son groupe d'appartenance, plutôt que sur la base de ses résultats individuels [Manno et coll., 2010].
- *Confidentialité des résultats.* Les données de surveillance biologique doivent être traitées comme toutes les autres données du dossier médical du travailleur. Ceci implique que toute diffusion devrait se faire uniquement avec le consentement explicite de celui-ci. De plus, la communication des résultats aux travailleurs devrait être obligatoirement faite, même si des incertitudes demeurent quant à leur interprétation [Manno et coll., 2010]. À cet effet, il est nécessaire d'éduquer les travailleurs afin qu'ils comprennent mieux les concepts sous-jacents aux biomarqueurs utilisés [Caux et coll., 2005]. Par ailleurs, les employeurs et les syndicats devraient recevoir uniquement les résultats collectifs, afin de ne pas violer la confidentialité des résultats [Manno et coll., 2010].
- *Discrimination au travail.* L'utilisation de la surveillance biologique, par le biais de l'utilisation de biomarqueurs de susceptibilité, ne devrait pas mener à une discrimination à l'emploi [Manno et coll., 2010]. La réalisation de tests pré-emploi ou la stigmatisation basée sur le genre ou l'ethnie doivent

être particulièrement surveillés. De même, la justification d'une relocalisation au sein de l'entreprise sur la base d'une susceptibilité génétique ne devraient pas se faire au détriment d'une amélioration des conditions et de l'environnement de travail [Caux et coll., 2005].

3. La cytogénétique et la cytogénotoxicité

Découverts en 1842 par von Nageli, les chromosomes sont nommés ainsi en raison de leur capacité à être colorés (du grec *chromo*, coloré et *soma*, corps) par von Waldeyer en 1888 [Fukui, 2009]. Au début du vingtième siècle, Theodor Boveri démontre que les chromosomes sont les vecteurs de l'hérédité et en 1953, James D. Watson et Francis Crick, qui découvrent la structure de l'acide désoxyribonucléique, font le lien entre l'ADN et sa fonction de support de l'information génétique [Watson, 1984].

3.1. La cytogénétique humaine

La découverte par Tijo et Levan en 1956 que le nombre exact de chromosomes dans les cellules somatiques humaines est 46, donne naissance à la cytogénétique. Les découvertes s'accumulent rapidement, avec l'annonce de Jérôme Lejeune en 1959, que les patients atteints du syndrome de Down ont trois chromosomes 21 [Lejeune et coll., 1959], suite au superbe travail de culture cellulaire et de préparations chromosomiques effectué par Marthe Gautier sur des biopsies de peau [Gautier, 2009]. Toujours en 1959, Charles E. Ford et ses collaborateurs découvrent que les femmes atteintes du syndrome de Turner n'ont qu'un seul chromosome X, alors que Patricia A. Jacobs montre que les hommes ayant le syndrome de Klinefelter ont deux chromosomes X et un chromosome Y [Gilgenkrantz et Rivera, 2003]. C'est le début de la cytogénétique médicale.

3.1.1. L'OBTENTION DES CHROMOSOMES

Les chromosomes sont obtenus de toute cellule en division, qu'elle soit spontanée ou induite. Les lignées de cellules animales transformées ou d'origine tumorale sont fréquemment utilisées pour obtenir des chromosomes. Les cellules HepG2, provenant d'un carcinome du foie humain et les cellules CHO du hamster sont des exemples de lignées cellulaires fréquemment employés en toxicologie. Chez l'humain, les cellules spontanément en division généralement utilisées pour l'analyse chromosomique sont les fibroblastes obtenus par biopsie de la peau ou du fascia, les amniocytes obtenus suite à une amniocentèse, et les cellules tumorales provenant de biopsie de masses ou de liquides tumoraux. Cependant, les cellules les plus faciles à obtenir sont les lymphocytes, obtenus par une ponction de sang périphérique. Ces cellules ne sont pas spontanément en division, mais celle-ci est induite par un mitogène, la phytohémagglutinine (PHA) [Moorhead et coll., 1960]. La transformation blastique est effective après environ 24 heures et la culture peut être poursuivie pour 24 à 72 heures supplémentaires, en fonction des techniques cytogénétiques employées.

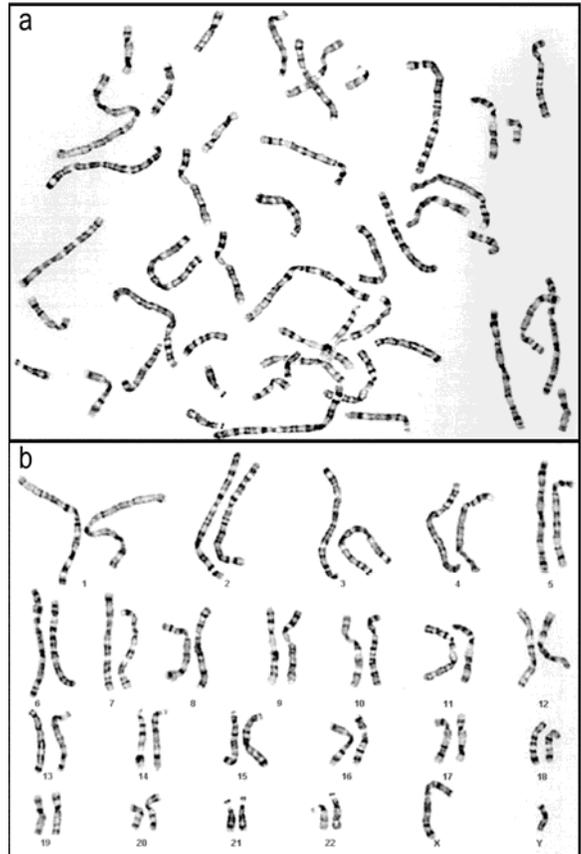


Figure 4: a) métaphase et b) caryotype en bande GTG d'un homme ayant une formule chromosomique normale à 46,XY. Gracieuseté de Nicole Lemieux, Université de Montréal et CHU Sainte-Justine.

3.1.2. LES PRINCIPAUX MARQUAGES ET COLORATIONS

Suite à la culture, les cellules sont récoltées, fixées et étalées sur des lames microscopiques en vue d'en faire l'analyse. Les analyses effectuées suite à une coloration des chromosomes au Giemsa, utilisé parce qu'il permet une coloration de haute qualité de

la chromatine et de la membrane nucléaire [Barcia, 2007], sont faites à l'aide d'un microscope photonique. L'utilisation du Giemsa seul, sans autre traitement préalable, permettra de voir la morphologie du chromosome et de détecter la présence de cassures touchant une ou les deux chromatides du chromosome (**Figure 2**, page 17). Cette coloration simple est utilisée pour effectuer le test des AC. Lorsqu'une analyse caryotypique est demandée, un marquage des chromosomes est effectué afin de pouvoir identifier chacun des chromosomes présents dans les cellules en métaphase (**Figure 4a**, page 27). Les chromosomes sont dénombrés et analysés afin de rechercher les anomalies de nombre ou de structure pouvant être présents. Le marquage des chromosomes le plus usuel est le marquage en bandes GTG [Seabright, 1971]. Le caryotype en bandes GTG peut ainsi être préparé à partir de métaphases préalablement marquées (**Figure 4b**, page 27). Ce marquage permet une bonne discrimination de tous les chromosomes.

L'ajout de BrdU durant la culture des cellules permettra de mettre en évidence certaines structures chromosomiques, comme les ÉCS. Ces ÉCS (**Figure 14**, page 72) seront visibles suite à la photolyse de l'ADN et la coloration des chromosomes au Giemsa [Perry et Wolff, 1974] et pourront être dénombrés.

3.1.3. LA CYTOGÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE

En 1970, Pardue et Gall mettent au point l'hybridation *in situ* de séquences d'ADN répétées (séquences α -satellites présentes autour des centromères), puis en 1981, Malcolm et coll. adaptent cette technique pour localiser les premiers gènes (β -globine), des séquences uniques présentes sur les chromosomes [Ferguson-Smith, 2008]. Depuis, la cytogénétique, devenue moléculaire, n'a cessé de trouver de nouvelles applications. L'hybridation *in situ* en fluorescence (la FISH) utilisant des sondes ADN fluorescentes et reconnaissant des cibles variées permet une grande flexibilité dans une multitude d'applications. Les sondes utilisées reconnaissent des régions hétérochromatiques contenant de l'ADN à séquence répétée, comme les centromères et les télomères, ou des régions euchromatiques contenant de l'ADN dit «à séquence unique», reconnaissant de façon spécifique un gène ou un ensemble de gènes. Parmi les sondes les plus utilisées en génotoxicologie, nous retrouvons les sondes centromériques, reconnaissant le centromère

d'un chromosome de façon spécifique, la sonde pancentromérique, reconnaissant tous les centromères, la peinture chromosomique, reconnaissant un chromosome entier de façon spécifique et la sonde pantélomérique, reconnaissant les télomères présents sur tous les chromosomes (**Figure 5**, page 30).

3.1. La cytogénétique et la génotoxicologie : une évolution parallèle

Alors que les premiers syndromes chromosomiques humains sont découverts en 1959, la première publication sur les aberrations chromosomiques (AC) causées par l'exposition d'un individu à un agent physique, les rayonnements ionisants, est présentée à la communauté scientifique l'année suivante [Tough et coll., 1960]. Des publications portant sur les aberrations chromosomiques causées par des agents chimiques apparaissent rapidement avec l'exposition à la moutarde azotée en 1961, puis à d'autres agents cytostatiques utilisés en chimiothérapie de 1962 à 1967. Par conséquent, une liste de plus de 200 produits chimiques capables de produire des AC chez l'humain est dressée à la fin des années 1960 [Garcia-Sagredo, 2008]. Le terme clastogénique (du grec *clastos*, brisé) est alors proposé pour faire référence à ces agents capables de causer des AC.

L'avènement des techniques de cytogénétique moléculaire, particulièrement la FISH, entraîne leur application également en génotoxicologie. Si l'utilité de la FISH pour détecter des réarrangements stables (tels des translocations) dans le cadre du test des AC est démontrée [Beskid et coll., 2007; Sram et coll., 2007a], son utilisation demeure limitée en raison du coût et du temps associés à son utilisation. Pour plusieurs auteurs, ce n'est pas une alternative au test des AC conventionnel. Cependant, l'utilisation de la FISH interphasique (technique faite sur des noyaux interphasiques), combinée au test des MN est plus prometteuse. Cette application sera discutée avec plus de détails dans la section 5.2.3.1 (page 76).

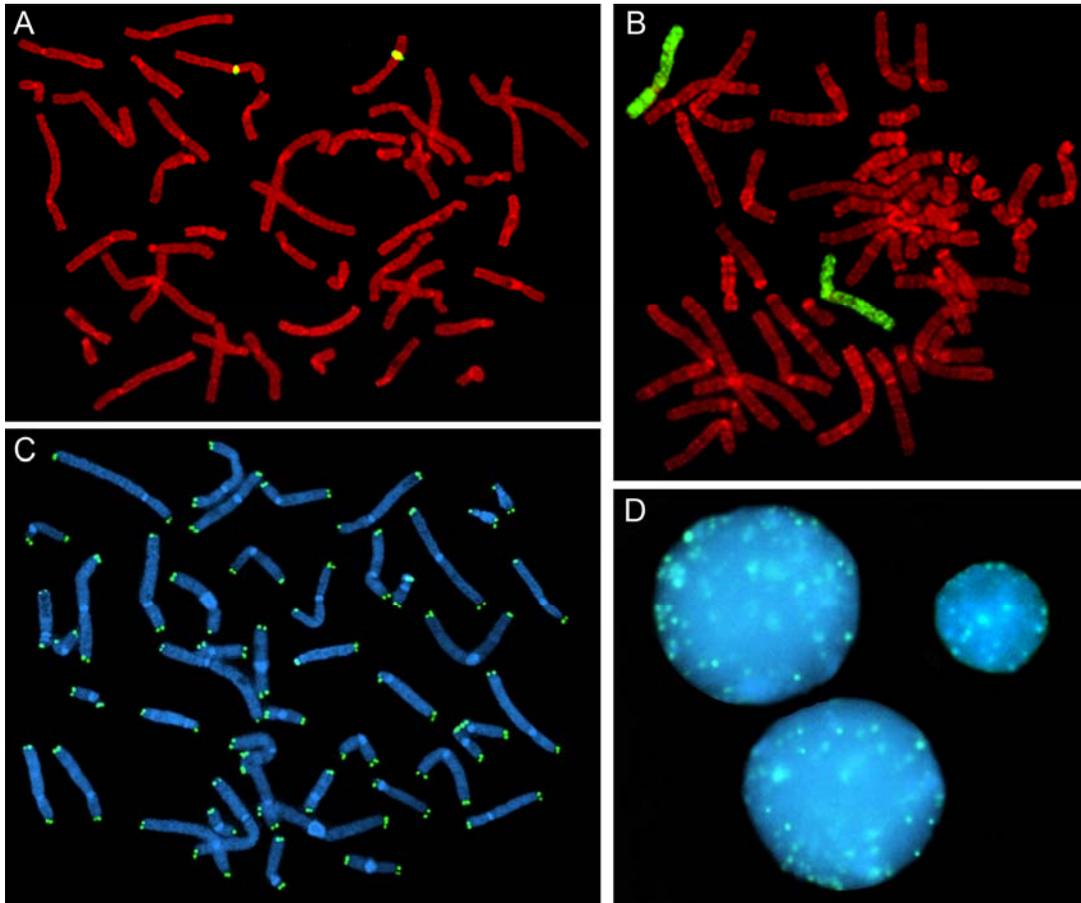


Figure 5: Hybridation *in situ* en fluorescence sur des chromosomes (métaphase) ou des noyaux. A) sonde reconnaissant les centromères du chromosome X, hybridée sur une métaphase; B) peinture chromosomique reconnaissant les chromosomes X, hybridée sur une métaphase; C) sonde pantélomérique, reconnaissant les télomères situés à l'extrémité de tous les chromosomes; D) sonde pancentromérique reconnaissant tous les centromères, hybridée sur une cellule binucléée comptant un gros micronoyau, lors du test des micronoyaux sanguins. Gracieuseté de Nicole Lemieux, Université de Montréal et CHU Sainte-Justine.

3.2. La génotoxicité et la cytogénotoxicité : objet et applications

L'utilisation d'une batterie de tests pour détecter la mutagénicité des composés chimiques auxquels sont exposés les humains est proposée dès les années 1970. Une première batterie de quatre tests est proposée par Bochkov et ses collaborateurs [1976]; puis un sous-comité de l'*United Kingdom Environmental Mutagen Society* recommande des modifications à cette première batterie de tests. Les tests recommandés identifient les mutations ponctuelles chez les bactéries, les mutations dans des cellules de mammifères (*in*

vitro), les dommages chromosomiques évalués dans des cellules de mammifères (*in vitro*) et chez l'animal. De nombreux organismes nationaux et internationaux raffinent cette stratégie dans les années 1980, en fonction des agents testés et du type de contact ou de la consommation par l'homme de ces agents [Garcia-Sagredo, 2008]. Finalement, Cimino [2006] révisé ces diverses stratégies nationales et internationales, insistant sur le fait que trois tests devraient être utilisés : un test de mutation génique bactérien (le test Ames de réversion de *Salmonella typhimurium* est le plus courant), un test *in vitro* utilisant des cellules de mammifères pour la détection de mutations géniques ou d'AC et, souvent, un test *in vivo* pour détecter les effets chromosomiques (le test *in vivo* des MN sur la moelle osseuse de rongeurs est couramment utilisé dans l'industrie pharmaceutique). Récemment, l'utilisation du test des MN a été approuvée et ajoutée à la panoplie de tests *in vitro* sur des cellules de mammifères [Eastmond et coll., 2009].

3.2.1. LES TYPES D'AGENTS TOXIQUES ÉVALUÉS

3.2.1.1. *Les sources naturelles*

Parmi les agents toxiques d'origine naturelle se retrouvent les différents types de rayonnements. Ils comprennent les rayonnements d'origine cosmique (rayons gamma et UV – 17% du rayonnement naturel au sol), les rayonnements émis par le radon (50%) et les minéraux présents dans le sol comme l'uranium et le thorium (20%), ainsi que le rayonnement émis à l'intérieur de notre organisme par l'eau et les aliments (13% - Santé Canada, 2007). L'étude de l'effet de ces rayonnements sur le matériel génétique a été et est encore l'objet de nombreuses recherches [Garcia-Sagredo, 2008]. Parmi les avancées effectuées à l'aide d'outils cytogénétiques, notons la dosimétrie de l'irradiation effectuée par le décompte des chromosomes dicentriques chez des individus potentiellement ou accidentellement exposés à des rayonnements ionisants [Rodrigues et coll., 2005].

L'exposition à divers produits chimiques émis lors d'événements naturels, comme les feux de forêt ou les explosions volcaniques, sont aussi d'intérêt. Cependant, comme ces mêmes composés (hydrocarbures aromatiques polycycliques, sulfure d'hydrogène, etc.) peuvent également être de source anthropique, ils seront discutés dans cette section.

3.2.1.2. *Les sources anthropiques*

Les produits chimiques introduits dans l'environnement par l'homme sont très nombreux et sont présents à différents niveaux. Que l'on parle de produits à usage industriel et de leurs sous-produits, de cosmétiques, d'additifs alimentaires ou de produits pharmacologiques, ils sont omniprésents.

Ainsi, parmi les 838 drogues pharmaceutiques en vente aux États-Unis et/ou en Europe et au Japon, dont l'usage clinique prévu est continu pendant au moins six mois, ou dont l'usage est intermittent mais fréquent, 366 n'ont jamais été testées pour leur génotoxicité ou leur potentiel de cancérogenèse. Une bonne proportion de ces drogues ont été approuvées avant que les lignes de conduites actuelles ne soient en vigueur et la loi ne prescrit pas la nécessité de les re-tester [Brambilla et Martelli, 2009].

Concernant les additifs alimentaires, 3911 sont réglementés par la FDA aux États-Unis (EAFUS 2010). Sur les 2827 actuellement utilisés, 2217 d'entre eux présentent des informations toxicologiques complètes, alors que pour les 608 additifs restants, la recherche de données toxicologiques dans la littérature n'a pas encore débuté. Finalement, 1058 additifs réglementés ne sont pas utilisés dans le secteur alimentaire, alors que 28 ont été bannis de la liste des additifs autorisés.

En ce qui a trait aux ingrédients contenus dans les cosmétiques, ils ne sont pas sujets à une approbation par la FDA avant leur mise en marché, sauf s'ils contiennent du goudron (comme dans les shampoings anti-pelliculaires médicamenteux) ou certains colorants (29 colorants sont approuvés et 36 autres sont permis avec restriction) (FDA 2000). Cependant, les cosmétiques ne doivent pas contenir certains ingrédients dont l'usage est risqué pour la santé humaine, comme le chloroforme, les chlorures de vinyle et de méthylène, les complexes de zirconium, ou encore des sous-produits bovins susceptibles de véhiculer l'encéphalopathie spongiforme bovine (communément appelée maladie de la vache folle).

Finalement, plusieurs de composés utilisés, transformés en milieu de travail, ainsi que leurs sous-produits, sont sujets aux lois et normes entourant la santé et la sécurité en milieu de travail et sont susceptibles d'être testés en génotoxicité. Parmi les organismes de régulation, citons l'*Occupational Safety and Health Administration* aux États-Unis, l'*European Agency for Safety and Health at Work* en Europe, le Centre canadien d'hygiène

et de sécurité au travail au Canada. Au Québec, la Commission de la santé et de la sécurité du travail règlemente l'usage d'environ 700 substances en milieu de travail [2011].

3.2.2. LA CORRÉLATION ENTRE LA GÉNOTOXICITÉ ET LE POTENTIEL DE CANCÉROGÈNE DANS L'ÉVALUATION DES PRODUITS CHIMIQUES ET PHARMACEUTIQUES

Une étude publiée en 2009 a référencé 472 drogues pharmaceutiques commercialisées pour lesquelles des données sur la génotoxicité ou le potentiel de cancérogenèse sont disponibles [Brambilla et Martelli, 2009]. 315 d'entre elles ont été testées pour les deux aspects. Une drogue est considérée comme génotoxique lorsque des résultats positifs sont obtenus à au moins un des tests effectués (test de mutagenicité de Ames, tests cytogénétiques *in vivo* ou *in vitro*, essai de lymphome murin et test de mutation génique au locus *hprt*). De même, une drogue est considérée comme cancérogène lorsque l'incidence de formation d'une tumeur à un site donné est augmentée chez l'un ou l'autre sexe d'une des espèces testées (généralement le rat et la souris, mais également le lapin, le chien ou le singe). Les résultats des deux types de tests sont concordants dans environ 60 % des cas (36,8 % classifiés comme non génotoxiques- non cancérogènes et 23,5 % comme génotoxiques- cancérogènes). Pour les 23,8 % non génotoxiques- cancérogènes, 71/75 ont donné des résultats négatifs à au moins deux tests de génotoxicité, supportant un mode d'action épigénétique pour ces produits.

Récemment la même équipe a cherché à savoir si l'utilisation de tests examinant les lésions de l'ADN (adduits, bris à l'ADN (principalement par l'essai COMET ou l'essai UDS (*unscheduled DNA synthesis*)) sont utiles dans l'évaluation du potentiel de cancérogenèse des drogues pharmaceutiques [Brambilla et coll., 2010]. Sur 146 drogues testées pour les lésions à l'ADN et le potentiel de cancérogenèse, une concordance de 63,1 % a été trouvée pour les bris à l'ADN, alors qu'elle est de 47,3% pour l'essai UDS. Quant aux adduits, ils ont été trop peu quantifiés pour en tirer des résultats valables. Globalement, l'étude des lésions de l'ADN a été aussi bonne pour prédire le potentiel de cancérogenèse d'une drogue que les tests de génotoxicité conventionnels. Cependant, dans quelques cas, des lésions de l'ADN ont été mises en évidence pour des drogues qui donnent des résultats

négatifs en génotoxicité et positifs en ce qui a trait à leur potentiel de cancérogenèse. Les auteurs considèrent donc qu'il est utile d'évaluer les lésions de l'ADN, en plus des trois tests de génotoxicité standards.

Concernant la cancérogenèse d'un composé, il est intéressant de déterminer les valeurs prédictives positive et négative (les VPP et VPN, respectivement) d'un test ou d'un ensemble de tests, afin d'en évaluer les capacités prédictives. En effet, si un résultat négatif est obtenu à un test *in vitro* comme le test de mutagénicité de Ames, cela sera considéré comme suffisant pour indiquer l'absence de mutagénicité de ce composé [Combes et coll., 2007]. Par contre, l'obtention d'un résultat positif doit être corroborée par un essai animal, classiquement l'essai *in vivo* des micronoyaux (MN_{IV}) dans la moelle osseuse des rongeurs. La capacité du test MN_{IV} à discriminer entre cancérogènes et non-cancérogènes dans le sous-groupe de composés ayant généré un résultat positif au test de mutagénicité de Ames a été évaluée récemment par Benigni et coll. [2010]. Ainsi, le test MN_{IV} montre une faible sensibilité (49 %) dans ce sous-groupe, générant donc une importante quantité de faux-négatifs, ce qui est visible avec la faible VPP du test : 17%. Par contre, les résultats positifs au test MN_{IV} sont assez fiables, avec une VPP de 94 % et une spécificité de 79 %, indiquant que peu de faux-positifs sont identifiés avec ce test.

Toutefois, l'utilisation du test MN_{IV} ne permet pas d'accroître notablement la performance obtenue avec le test de mutagénicité de Ames seul [Benigni et coll., 2010]. Ceci a conduit à la recherche d'alternatives plus performantes permettant d'identifier un nombre plus important de cancérogènes en combinant le test de mutagénicité de Ames à un autre test *in vitro*. Alors que le test Ames identifie correctement 318 composés cancérogènes sur 541 (sensibilité de 60 %) [Kirkland et coll., 2005], l'ajout du test *in vitro* des micronoyaux permet d'en identifier près d'une centaine de plus et d'atteindre une sensibilité de 73 % [Kirkland et coll., 2011].

Pour ce qui est des valeurs prédictives positives et négatives des biomarqueurs de génotoxicité chez l'humain, celles-ci n'ont été rapportées, dans la littérature, que dans un seul cas, principalement parce qu'une norme de référence (ou *gold standard*) n'a jamais été établie pour un phénotype donné avec ces biomarqueurs. Par exemple, dans le cas des micronoyaux, si le phénotype recherché est le cancer (tous types confondus), l'établissement d'une norme de référence nécessite qu'un critère (ou un ensemble de

critères) permette de distinguer les «malades» des «non malades» lorsque ce biomarqueur est utilisé. Pour ce faire, un seuil d'anormalité doit être fixé pour une personne non-malade, au moment où le test est réalisé. Actuellement, sauf pour cette étude particulière qui sera décrite plus bas [El-Zein et coll., 2008], ce seuil n'a pas encore été déterminé, ni même l'indicateur précis à utiliser pour fixer ce seuil.

Dans la littérature, un excès de risque de cancer à tous les sites et, plus spécialement, pour les cancers de la vessie et du tractus gastro-intestinal, a été retrouvé chez les individus ayant une fréquence élevée de MN au moment où ils ont été testés (étude rétrospective) [Bonassi et coll., 2007]. Ces individus avaient une fréquence de MN située dans les tertiles médian et supérieur de la population étudiée. Les risques relatifs (et intervalles de confiance à 95 %) rapportés dans cette étude sont de 1,84 (1,28-2,66) et de 1,53 (1,04-2,25) pour les tertile médian et supérieur, respectivement. Cependant, cet excès de risque de cancer ne permet pas d'établir une norme de référence qui permette de faire la distinction entre malades et non malades, sur la base de la fréquence des MN. La même réflexion s'applique au cas des AC, où un niveau de base élevé d'AC est associé à un risque accru de cancer, autant dans les tertiles médian que supérieur [Norppa et coll., 2006]. Les risques relatifs (et intervalles de confiance à 95 %) rapportés dans cette étude sont de 1,55 (1,07-2,26) et de 1,71 (1,17-2,50) pour les tertiles médian et supérieur, respectivement.

Des travaux récents permettent cependant d'entrevoir que l'établissement à moyen terme d'une telle norme de référence pourrait être possible dans le cas du test des MN. Ainsi, dans une étude de type cas- témoins, le test des MN est réalisé chez des sujets contrôles (ou non malades) et des patients atteints d'un cancer du poumon [El-Zein et coll., 2008]. Les MN sont dénombrés dans des lymphocytes non traités, ainsi que dans des lymphocytes traités avec la nitrosamine 4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (plus communément appelé le NNK). En incluant un ensemble d'indicateurs (micronoyaux dans les cellules binucléées, micronoyaux dans les cellules mononucléées, ponts nucléoplasmiques et bourgeonnements nucléaires), une VPP de 98,7 % et une VPN de 95,6 % ont été obtenus, spécifiquement pour ce cancer. Des études supplémentaires effectuées avec d'autres types de cancers sont toutefois requises afin mieux apprécier le potentiel d'application plus large de cet ensemble d'indicateurs comme norme de référence au test des MN.

4. Le benzo-a-pyrène, un hydrocarbure aromatique polycyclique cancérigène

I ssus de la combustion incomplète des matières organiques, comme les produits pétroliers, le gaz naturel, le bois, les aliments et le tabac [ASTDR, 2008], les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des composés hydrophobes, comportant plusieurs cycles benzéniques (aussi appelés cycles aromatiques). Les HAP comportant 2 à 4 cycles benzéniques sont généralement sous forme gazeuse, quoiqu'ils puissent s'adsorber à la surface des particules fines présentes dans l'air [Ramamurthi et Chuang, 1997]. Le pyrène est le membre le plus connu des HAP gazeux. Les autres HAP, comportant 5 cycles benzéniques et plus, sont émis sous forme solide et s'adsorbent à la surface des particules fines présentes dans l'air.

4.1. Les principales sources d'émission et d'exposition aux HAP au Canada

Les sources anthropiques de HAP sont nombreuses, autant dans les secteurs industriels (alumineries, sidérurgies, extraction et transformation des combustibles fossiles, industrie du pavage de l'asphalte, etc.), que dans les secteurs non-industriels et résidentiels (incinération des déchets, crématoriums, usage de la cigarette, cuisson des aliments, combustion du bois de chauffage, etc.). Les sources naturelles des HAP sont principalement les feux de forêt et les éruptions volcaniques [Environnement Canada, 2010; Miller et Ramos, 2001]. Par ailleurs, les HAP se retrouvent également dans l'eau (adsorbés sur des sédiments) et sur les aliments, lors de la cuisson ou par dépôt des HAP sur les fruits ou légumes qui seront consommés [Doornaert et coll., 2003].

Lors de mesures de la qualité de l'air, les HAP sont classés dans le groupe des particules inhalables (fines) d'un diamètre inférieur ou égal à 2,5 μM ($\text{PM}_{2,5}$). Les $\text{PM}_{2,5}$ sont un mélange de gouttelettes et de solides en suspension dans l'air, composés d'acides (nitrates et sulfates), de produits chimiques organiques (HAP et autres), de métaux, de particules de poussière et de sol [USEPA, 2008]. Ces particules peuvent être émises

directement ou résulter de réactions secondaires. Par exemple, les industries d'extraction primaire de cuivre et les alumineries émettent du dioxyde de soufre (SO₂) qui, par combinaison avec l'oxygène et l'eau présents dans l'atmosphère, produiront des sulfates. Au Canada, les émissions de PM_{2,5} sont comptabilisées annuellement par l'Inventaire national des rejets de polluants (INRP). Entre 1985 et 2007, la majorité des émissions de PM_{2,5} provient de sources à ciel ouvert, comme les chantiers de construction, les routes (pavées ou non) et les opérations liées à l'agriculture (**Figure 6**, page 39). La deuxième plus importante source canadienne de PM_{2,5} est naturelle et principalement liée aux feux de forêt. Toutes les autres sources (industrielle, non-industrielle, transport, etc.) se partagent le dernier quart des émissions. De façon plus particulière, la combustion du bois (secteur résidentiel) représente à elle seule environ 9 % des émissions de PM_{2,5}, année après année (**Figure 7**, page 40).

Les émissions de benzo-a-pyrène (BaP), doivent obligatoirement être déclarées à l'INRP à chaque année. Les données disponibles depuis 1990 montrent que la principale source de BaP au Canada est naturelle, avec environ 50% des émissions totales (**Figure 8**, page 41). La deuxième source en importance est industrielle, les alumineries en étant le plus grand émetteur en 2007 (**Figure 9**, page 42). On note que leurs émissions ont diminué d'environ 5 fois entre 1990 et 2006 (**Figure 8**, page 41), en bonne partie grâce aux changements de procédés utilisés lors de la transformation primaire de l'aluminium, passant du procédé d'électrolyse Söderberg à l'utilisation d'anodes pré-cuites [Lavoué et coll., 2007]. Dans le secteur de la sidérurgie, les diminutions d'émission de BaP observées sont surtout dues à la fermeture de nombreuses compagnies minières au Canada [Environnement Canada, 2010].

Quant à la combustion du bois (secteur résidentiel), il représente là aussi, la majeure partie du secteur non-industriel, année après année (**Figure 7**, page 40 et **Figure 9**, page 42). Finalement, grandes émettrices de PM_{2,5}, les sources à ciel ouvert émettent des quantités négligeables de benzo-a-pyrène et autres HAP, en comparaison avec les autres sources [Environnement Canada, 2010].

4.2. L'exposition aux HAP en milieu de travail et de vie

4.2.1. LES VOIES D'EXPOSITION

Les HAP sont absorbés par trois voies principales, en fonction du type d'exposition auquel un individu est soumis :

- *Par voie pulmonaire*, lorsque l'exposition se fait par l'air pollué (émissions des pots d'échappement des véhicules dans l'air ambiant ou air pollué de l'environnement de travail), la fumée de cigarette (primaire ou secondaire), etc.
- *Par voie orale*, lors de la consommation d'aliments contaminés (grillés, fumés, etc.) et lorsqu'on avale des sécrétions pulmonaires contenant des particules auxquelles des HAP sont adsorbés.
- *Par voie cutanée*, suite au dépôt de particules contenant des HAP sur la peau et au passage de ceux-ci à travers la peau, en raison de leur liposolubilité.

Des mesures de protection personnelle destinées aux travailleurs exposés aux HAP ont été mises en place afin de les protéger de leurs effets délétères, comme le port de masques, vêtements de protection et gants, ainsi que l'utilisation de crème barrière. Cependant, la meilleure protection demeure la prévention. C'est pourquoi le Règlement sur la Santé et la Sécurité du Travail demande que l'exposition aux HAP et plus spécifiquement au BaP soit réduite au minimum techniquement possible (RSST [2011], sections IV et V). Ainsi, il faut éviter au maximum l'émission de poussières et aérosols en prévoyant, par exemple, une aspiration le plus près possible de la source d'émission de HAP, utiliser des produits exempts ou contenant moins de HAP lorsque c'est possible, etc. Une hygiène corporelle et vestimentaire très stricte doit aussi être observée avant le repas, avant d'aller aux toilettes et à la fin du quart de travail [Brondeau et coll., 1997].

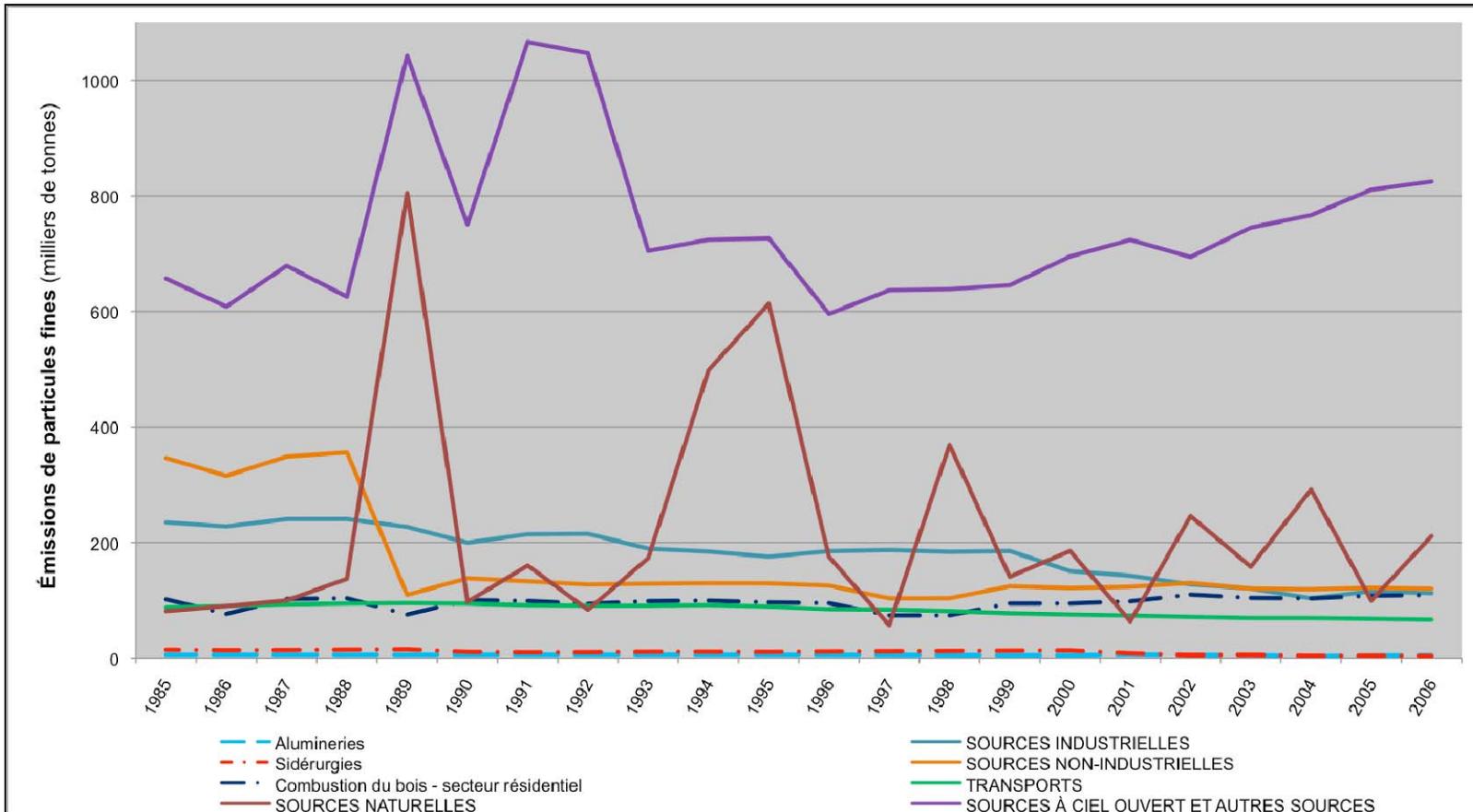


Figure 6: Tendence observée dans les émissions de particules fines (PM_{2,5}) au Canada, en fonction des principaux types de sources. Trois secteurs d'intérêt (alumineries, sidérurgies et combustion du bois –secteur résidentiel) sont indiquées en pointillé. Source des données : Environnement Canada, 2010.

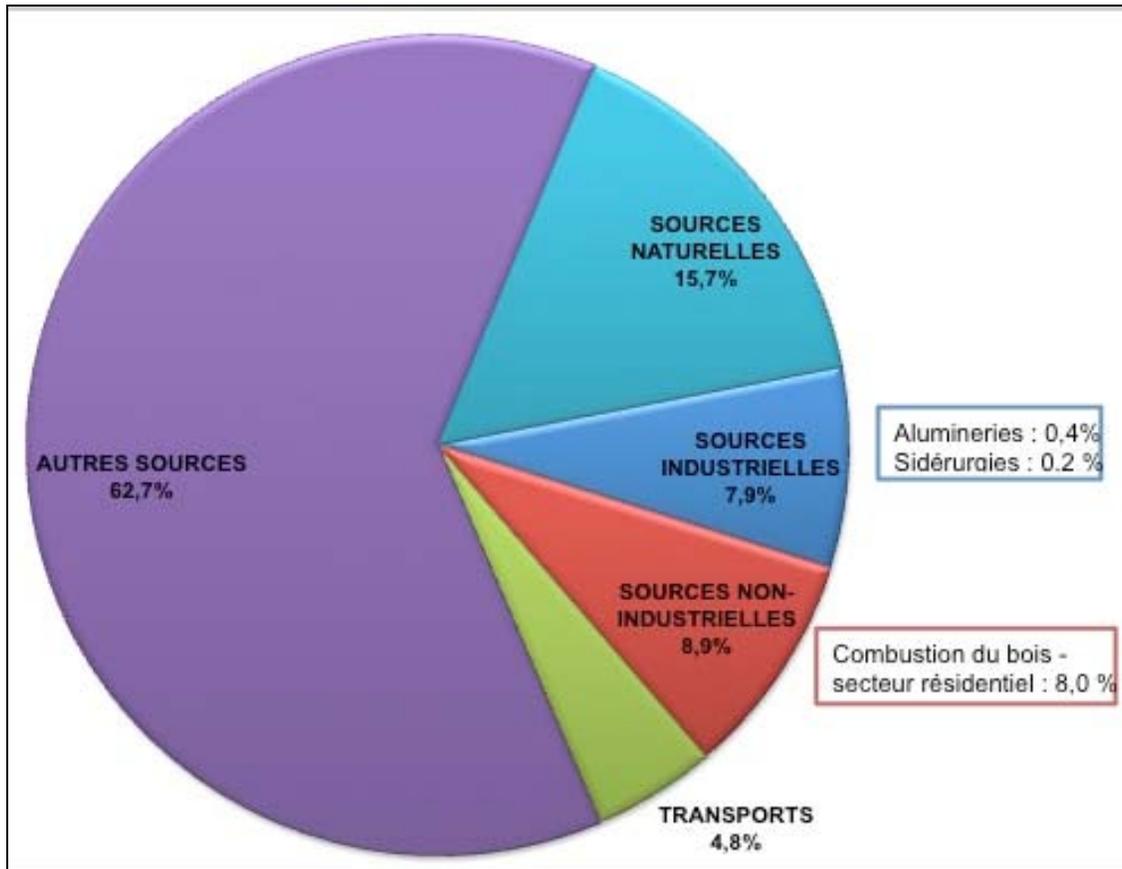


Figure 7: Proportion relative des principales sources d'émission de particules fines (PM_{2,5}) en 2007, au Canada. L'apport net en PM_{2,5} des trois secteurs d'intérêt est indiqué dans les encadrés. Source des données : Environnement Canada, 2010.

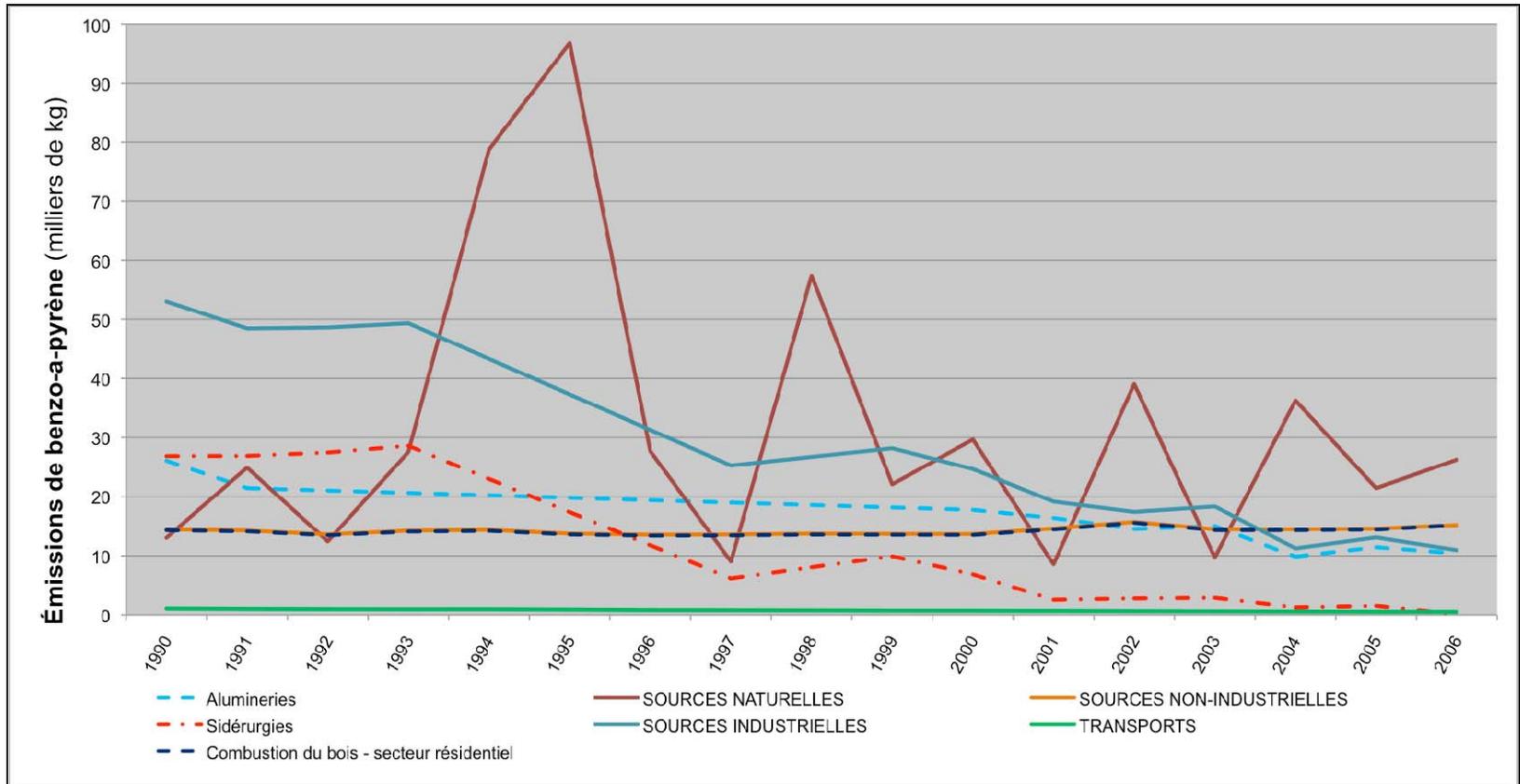


Figure 8: Tendence observée dans les émissions de benzo-a-pyrène au Canada, en fonction des principaux types de sources. Trois secteurs d'intérêt (alumineries, sidérurgies et combustion du bois –secteur résidentiel) sont indiquées en pointillé. Source des données : Environnement Canada, 2010.

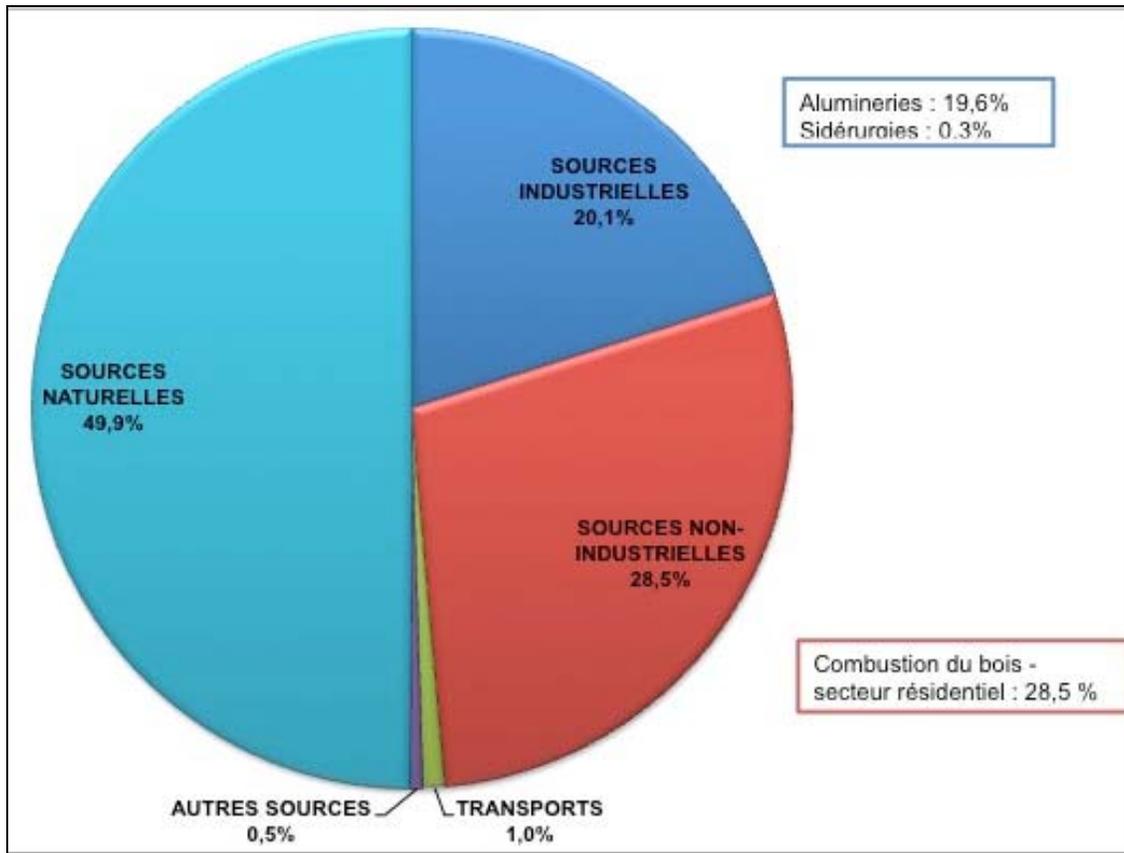


Figure 9: Proportion relative des principales sources d'émission de benzo-a-pyrène en 2007, au Canada. L'apport net en benzo-a-pyrène des trois secteurs d'intérêt est indiqué dans les encadrés. Source des données : Environnement Canada, 2010.

4.2.2. L'EXPOSITION AUX HAP AU QUÉBEC ET AILLEURS DANS LE MONDE

4.2.2.1. *Les HAP et le BaP dans l'air ambiant et intérieur*

La mesure des HAP présents dans l'air ambiant varie de façon générale en fonction de la saison (été vs hiver), ainsi qu'en fonction du lieu géographique (rural vs urbain). Ainsi, à Londres, des concentrations de HAP variant entre 0,05 et 1 ng/m³ d'air sont retrouvés en été, alors qu'en hiver, un taux cinq fois supérieur est atteint [Prevedouros et coll., 2004]. En République Tchèque, les variations saisonnières rapportées pour la capitale Prague, montrent trois fois plus de HAP et quatre fois plus de BaP en hiver qu'en été [Sram et coll., 2007b]. En Pologne, dans la région de la Silésie (une des régions les plus polluées de la planète), une mesure du BaP dans l'air a été rapportée à 3,7 ng/m³ l'été et 43,4 ng/m³ l'hiver, alors que dans la région contrôle rurale de la ville de Bialystok, les taux sont respectivement de 0,3 et 7,2 ng/m³ l'été et l'hiver [Motykiewicz et coll., 1998]. Au Québec, une étude récente effectuée l'automne et l'hiver à Baie-Comeau montre que les résidents vivant à proximité de l'aluminerie (moins de 1 km) sont exposés à des concentrations atmosphériques de BaP variant entre 0,02 et 25 ng/m³, alors que les résidents de la région contrôle (vivant à plus de 11 km) sont plus faiblement exposés (0,02 à 0,3 ng/m³) [Bouchard et coll., 2009].

Lorsque l'air ambiant est de piètre qualité, cela peut entraîner une dégradation de l'air intérieur, étant donné que la ventilation des édifices et résidences est généralement assurée par un apport d'air extérieur [Persily et Hewett, 2010]. Afin de limiter l'exposition des occupants des résidences, Santé Canada [2008] recommande de s'assurer que les appareils de combustion (poêles à bois et à charbon) soient installés et entretenus de façon adéquate et qu'ils fonctionnent dans des conditions d'aération satisfaisantes. De plus, il est recommandé que toute exposition à la fumée de tabac soit évitée à l'intérieur.

4.2.2.2. *Les normes en milieu de travail*

En milieu de travail, les concentrations de HAP et de BaP sont strictement réglementées, en raison de l'exposition chronique des travailleurs. Voici un aperçu des

normes en vigueur au Québec, aux États-Unis et en Allemagne. Généralement, ces normes sont établies pour des quarts de travail de 8 heures par jour, 40 heures par semaine.

- *Au Québec*, la valeur d'exposition moyenne pondérée au BaP est fixée à $0,005 \text{ mg/m}^3$ [RSST 2011]. Cependant, l'exposition à cette substance doit être réduite au minimum et sa recirculation est interdite.
- *Aux États-Unis*, la norme d'exposition aux HAP est fixée à $0,2 \text{ mg/m}^3$ (HAP dits «totaux» – gaz ambiants captés sur un filtre et solubilisés dans le benzène) [ATSDR, 1995].
- *En Allemagne*, la norme d'exposition au BaP est fixée à $0,005 \text{ mg/m}^3$ (production, chargement et déchargement au voisinage des fours à coke) et à $0,002 \text{ mg/m}^3$ dans tous les autres postes de travail [Brondeau et coll., 1997].

4.3. L'exposition aux HAP et particulièrement au benzo-a-pyrène cause le cancer chez l'Homme

En 1775, Percivall Pott, un chirurgien londonien, observe des lésions néoplasiques présentes sur la peau du scrotum des ramoneurs et suggère que la présence persistante de suie à cet endroit serait la cause de ces lésions. Cette observation est la première suggérant un lien entre l'exposition aux HAP et l'apparition d'un cancer [Luch, 2005].

4.3.1. LES DONNÉES ÉPIDÉMIOLOGIQUES

La dernière méta-analyse effectuée par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC), afin de caractériser les HAP, fournit un intéressant résumé des données épidémiologiques liant l'exposition aux HAP au cancer. Voici un aperçu des expositions étudiées, par site de cancer [IARC-CIRC, 2008].

- *Cancer du poumon* : Un excès de cas ou de risque de cancer a été associé à la production de gaz naturel à partir de la houille, à la production de coke (particulièrement pour les travailleurs travaillant près des fourneaux), au pavage et au couvrage de toiture (utilisation de bitume et de goudron), au

créosotage, à la production d'aluminium, à la production d'électrodes de carbone et au ramonage de cheminées et autres expositions à la suie.

- *Cancer de la peau* : Un excès de cas ou de risque de cancer a été associé à la distillation du goudron de houille, au créosotage et au ramonage de cheminées.
- *Cancer de la vessie* : Un excès de cas ou de risque de cancer a été associé à la production de gaz naturel à partir de la houille, au créosotage et à la production d'aluminium.
- *Autres cancers* : Une association entre le carcinome rénal et la production de coke a été rapportée dans plusieurs études cas-témoins. Par ailleurs, la production de gaz naturel à partir de la houille a été associée aux cancers de l'estomac et colorectal dans une cohorte allemande. De plus, une augmentation de l'incidence de leucémies et lymphomes, ainsi que de cancers du pancréas ont été rapportés chez des travailleurs de l'industrie de l'aluminium. Finalement, une incidence accrue de cancers de l'œsophage et de leucémies et lymphomes a été retrouvée dans une grande cohorte de ramoneurs suédois.

Ces études épidémiologiques, ainsi que les études effectuées *in vitro* ou chez l'animal ont conduit le CIRC à déclarer que des évidences suffisantes de cancérogenèse (groupe 1) existent pour les expositions occupationnelles suivantes : la production de gaz naturel à partir de la houille, la production de coke, la production d'aluminium, la distillation du goudron de houille, le travail en tant que ramoneur et le travail en tant que paveur et couvreur s'il y a utilisation de goudron. De plus, la production d'électrodes de carbone, ainsi que la créosote sont probablement cancérogènes pour l'homme (groupe 2A).

4.3.2. LES HAP CANCÉROGÈNES, LA NOTION DE BAP-ÉQUIVALENT ET LE FACTEUR D'ÉQUIVALENCE TOXIQUE

Ce rapport du CIRC (2008) a également évalué la cancérogenèse des HAP, classant les différents composés dans différents groupes en fonction des évidences sur leur potentiel cancérogène. Quinze HAP ont été classés comme cancérogènes pour l'homme :

- *Groupe 1 – Cancérogène pour l'homme* : le benzo-a-pyrène.
- *Groupe 2A – Probablement cancérogène pour l'homme* : le cyclopenta-c,d-pyrène, le dibenz-a,h-anthracène et le dibenzo-a,l-pyrène.
- *Groupe 2B – Possiblement cancérogène pour l'homme* : le benz-j-aceanthrylène, le benz-a-anthracène, le benzo-b-fluoranthène, le benzo-j-fluoranthène, le benzo-k-fluoranthène, le benzo-c-phenanthrène, le chrysène, le dibenzo-a,h-pyrène, le dibenzo-a,i-pyrène, l'indeno-1,2,3-cd-pyrène et le 5-méthylchrysène.

Comme le HAP le plus étudié est le benzo-a-pyrène, il sert d'étalon de comparaison pour établir le potentiel cancérogène des autres HAP. Différentes tables de potentiel cancérogène existent dans la littérature; en voici deux : les BaP-équivalents pour la voie pulmonaire uniquement et le Facteur d'Équivalence Toxique (FÉT) pour les voies orale et pulmonaire (**Tableau I**, ci-bas [Doornaert et coll., 2003]).

Tableau I: BaP-équivalent et Facteur d'équivalence toxique (FÉT) de différents HAP et dérivés des HAP. Le benzo-a-pyrène, avec des valeurs fixées à 1, sert d'étalon de comparaison.

HAP et dérivés des HAP	FÉT	BaP-équivalent
<i>Benzo-a-pyrène</i>	<i>1</i>	<i>1</i>
Acénaphène	0,001	--
Acénaphylène	0,001	--
Anthracène	0,01	--
Benz-a-anthracène	0,1	0,1
Benzo-b-fluoranthène	0,1	0,1

Benzo-g,h,i-perylène	0,01	--
Benzo-j-fluoranthène	--	0,1
Benzo-k-fluoranthène	0,1	0,1
Chrysène	0,1	0,01
Coronène	0,001	--
Cyclopenta-c,d-pyrène	0,1	--
Dibenz-a,c-anthracène	0,1	--
Dibenz-a,h-anthracène	1	--
Dibenz-a,h-acridine	--	0,1
Dibenz-a,j-acridine	--	0,1
7H-dibenzo-c,g-carbazole	--	1
Dibenzo-a,e-pyrène	--	1
Dibenzo-a,h-pyrène	--	10
Dibenzo-a,i-pyrène	--	10
Dibenzo-a,l-pyrène	--	10
1,6-Dinitropyrène	--	10
1,8-Dinitropyrène	--	1
Fluoranthène	0,001	--
Fluorène	0,001	--
Indéno-1,2,3-cd-pyrène	0,1	0,1
5-Méthylchrysène	--	1
Naphtalène	0,001	--
1-Nitropyrène	--	0,1
4-Nitropyrène	--	0,1
6-Nitrochrysène	--	10
2-Nitrofluorène	--	0,01
Phénanthrène	0,001	--
Pyrène	0,001	--

Ces indicateurs du potentiel de cancérogenèse s'utilisent suite à la caractérisation du mélange de HAP auxquels les sujets sont exposés. Afin de déterminer le risque cancérogène associé à l'exposition à un mélange de HAP, ce mélange doit tout d'abord être

caractérisé. Par la suite, les concentrations de chacun des HAP mesurés sont normalisées avec leur propre FET et la somme est multipliée par la valeur seuil de BaP entraînant un excès de risque de cancer unitaire (ERU) de 1 sur 1 million (1×10^{-6}) (voir l'équation suivante). Dans cette équation, la valeur de FÉT peut être substituée par le BaP-équivalent. L'ERU_{BaP} établi pour une exposition au BaP par la voie orale (ERU_{oral}) est de 0,2 mg/kg/d et pour une exposition par inhalation (ERU_{inhalation}) elle est de $1,1 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\text{m}^3$.

$$ERI_{\text{mélange}} = (FET_{\text{HAP1}} \times [\text{HAP1}] + FET_{\text{HAP2}} \times [\text{HAP2}] + \dots + FET_{\text{HAPn}} \times [\text{HAPn}]) \times ERU_{\text{BaP}}$$

ERI_{mélange} : Excès de risque individuel associé au mélange étudié

[HAP1], [HAP2], [HAPn] : concentration de chaque HAP présent dans le mélange étudié

Voici une application de ces deux indicateurs (FÉT et BaP-équivalent) à un mélange de HAP prélevé en milieu urbain et caractérisé par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (**Tableau II**, ci-bas). Le calcul de l'excès de risque de cancer (ERI) montre que l'exposition chronique à ce mélange d'air urbain pourrait être associée à un excès de risque de cancer de 0,3274 cas ou 0,3859 cas par million de cas de cancer (évaluation par FÉT ou par BaP-équivalent, respectivement).

Tableau II: Calcul de l'excès de risque de cancer (ERI) associé à un mélange d'air urbain. Les données sur la caractérisation du mélange sont tirées de Brits et coll. [2004]. Pour chaque HAP mesuré dans le mélange, la normalisation par les FÉT et BaP-équivalent est calculée.

HAP	Concentration dans l'air (ng/m^3)	Normalisation FÉT (ng/m^3)	Normalisation BaP-équivalent (ng/m^3)
Benzo-a-pyrène	0,2065	0,2065	0,2065
Acénaphthène	0,7277	0,0007277	--
Anthracène	0,1557	0,001557	--
Benzo-a-anthracène	0,3622	0,03622	0,03622
Benzo-b-fluoranthène	0,6228	--	0,06228

Benzo-e-pyrène	0,4163	--	--
Benzo-g,h,i-perylène	0,5178	0,005178	--
Benzo-k-fluoranthène	0,1557	0,01557	0,01557
Chrysène	0,4163	0,004163	0,004163
Fluoranthène	0,4163	0,0004163	--
Fluorène	0,2572	0,0002572	--
Indéno-1,3,4-cd-pyrène	0,2606	0,02606	0,02606
Phénanthrène	0,5720	0,000572	--
Pyrène	0,4129	0,0004129	--
Concentration totale (ng/m ³)	5,5	0,2976	0,3508
ERI	--	0,3274 x 10⁻⁶	0,3859 x 10⁻⁶

4.3.3. LA TOXICOCINÉTIQUE DES HAP

L'utilisation des modèles animaux (rat et souris principalement) chez lesquels du BaP a été administré par plusieurs voies a permis de comprendre la toxicocinétique du BaP et de l'extrapoler aux HAP. Ces études sont nécessaires afin de comprendre pourquoi certains tissus (comme le poumon et la peau) sont les cibles néoplasiques des HAP, alors que d'autres (comme le foie) ne semblent pas affectés. Les analyses toxicocinétiques permettent donc d'évaluer l'effet des diverses voies d'absorption sur la distribution corporelle des HAP et, suite au métabolisme, d'évaluer les différentes voies d'excrétion.

Suite à son administration intraveineuse chez le rat, le BaP est rapidement distribué dans tout l'organisme. En 2 heures, des concentrations maximales de BaP sont retrouvées dans les poumons, la peau, les reins, le foie et le tissu adipeux. Ces concentrations décroissent rapidement dans la peau, les reins et le foie, alors que les poumons et le tissu adipeux en conservent une proportion plus importante [Marie et coll., 2010]. D'ailleurs, le tissu adipeux et le tissu mammaire sont considérés comme étant des tissus de stockage du BaP et autres HAP à 4 ou 5 cycles benzéniques [Brondeau et coll., 1997]. Trois à quatre heures après administration intragastrique, le BaP est retrouvé dans les canaux lymphatiques thoraciques. De plus, une inhalation de BaP radiomarqué par le rat montre une absorption rapide à travers l'épithélium pulmonaire, ainsi qu'une large distribution qui

début dans les 2 heures post-exposition : les reins, le foie et les ganglions lymphatiques thoraciques contiennent des quantités significatives de BaP, alors que le cerveau et la rate en contiennent peu [Brondeau et coll., 1997]. Finalement, le BaP traverse la barrière placentaire et ses métabolites sont retrouvés dans le sang et le cortex de rats dont la mère a inhalé du BaP durant le deuxième trimestre de gestation [Wu et coll., 2003].

L'excrétion du BaP et de ses métabolites est majoritaire dans les fèces, alors que l'élimination par voie urinaire est quantitativement mineure. Ainsi, 80 à près de 100 % de la dose de BaP administrée chez la souris est éliminée dans les fèces (rapporté par [Bouchard et Viau, 1997]). Une étude récente effectuée chez le rat a montré qu'environ 0,5 % du BaP administré par voie intraveineuse est retrouvé inchangé dans les fèces après 72 h, alors que le 3-OH-BaP est y fortement excrété, représentant environ 13 % de la dose administrée. L'excrétion urinaire de ce métabolite en représente uniquement 0,2 % [Marie et coll., 2010]. Même si l'excrétion urinaire est moindre, l'étude des métabolites qu'on y retrouve demeure des plus pertinentes, en raison de la facilité à recueillir l'urine dans les populations humaines exposées.

La quantité et la vitesse à laquelle les différents métabolites du BaP sont excrétés dans l'urine dépend beaucoup des voies d'administration et aussi du métabolite lui-même. Ainsi, l'excrétion du 3-OH-BaP et du 4,5-diol-BaP sont quantitativement semblables lorsque le BaP est administré par voie orale ou par intraveineuse, alors qu'ils sont moindre lorsqu'appliqués sur la peau. Par comparaison, le 9-OH-BaP est excrété en quantité plus élevée après une administration orale, qu'après application sur la peau ou par intraveineuse [Bouchard et Viau, 1997]. La même étude montre également que le pic d'excrétion des métabolites se produit plus rapidement lorsque le BaP est administré par voie orale ou par intraveineuse (après 24 h), alors qu'une application cutanée voit son pic d'excrétion apparaître après 24 à 48 h.

4.4. Les mécanismes d'action du benzo-a-pyrène

Les actions du BaP sur la cellule sont nombreuses et vont varier en fonction du type cellulaire, puisque les capacités métaboliques de chaque type de cellules sont variables. Les cellules les plus étudiées sont les cellules hépatiques, plus particulièrement la lignée

humaine d'hépatoblastome HepG2. Des études utilisant, entre autres, les cellules pulmonaires humaines ou de hamster (V79), les kératinocytes humains et les lymphocytes et monocytes humains ont aussi été publiées.

4.4.1. L'ENTRÉE DU BAP DANS LA CELLULE

Le benzo-a-pyrène entre dans la cellule, par diffusion à travers la membrane plasmique, en raison de sa lipophilie (**Figure 10**, voie 1, page 54). Une étude de la répartition du BaP dans les cellules hépatiques de rat, réalisée en microscopie confocale, montre qu'il se répartit rapidement dans les membranes cytoplasmique, nucléaire, du réticulum endoplasmique, des mitochondries, des lysosomes et, de façon particulièrement importante, du Golgi, alors qu'on en retrouve très peu dans le noyau, la matrice mitochondriale et les lysosomes [Barhoumi et coll., 2000]. Dans cette étude, la distribution cellulaire du BaP est complétée en quatre heures et reste constante jusqu'à 16 h durant.

Au contact de la cellule, le BaP peut accomplir ses actions au niveau de trois cibles différentes :

1. *La liaison avec les jonctions communicantes (gap junctions)*, qui sont situées dans la membrane plasmique (**Figure 10**, voie 1, page 54).

La liaison du BaP avec les jonctions communicantes a été mise en évidence suite à l'observation de l'inhibition de la communication intercellulaire dans des cellules adhérentes exposées à divers HAP [Weis et coll., 1998; Barhoumi et coll., 2000; Blaha et coll., 2002; Sharovskaja et coll., 2004]. Ainsi, parmi les HAP cancérigènes, seuls quatre d'entre eux inhibent significativement la communication intercellulaire : le 5-méthylchrysène, le benzo-c-anthracène, le cyclopenta-cd-pyrène et le BaP, dans un modèle de cellules épithéliales hépatiques WB-F344 de rat [Blaha et coll., 2002]. En fait, cette étude montre que ce sont surtout les HAP non cancérigènes qui sont les meilleurs inhibiteurs de la communication intercellulaire.

Cette inhibition se produit très rapidement après l'exposition des cellules (30 min) et est maximale une à quatre heures post-exposition [Weis et coll., 1998; Barhoumi et coll., 2000; Blaha et coll., 2002], ce qui suggère que la métabolisation des HAP ne serait pas

essentielle à l'apparition de cet effet. Ceci est démontré par Sharovskaja et coll. [2004] qui utilisent des cellules d'hépatome de rat G27 exposées au BaP et au 5-méthylchrysène pour une ou 24 heures, ce qui conduit à une inhibition significative de la communication intercellulaire. Comme les cellules G27 ne peuvent métaboliser les HAP, ceci démontre que l'effet inhibiteur est causé par le HAP parent (non métabolisé).

Les jonctions communicantes sont importantes pour moduler le niveau de calcium intracellulaire et moduler les oscillations de calcium induites par les hormones. Une exposition à 4 ou 10 μM BaP des cellules hépatique de rat appelées Clone 9, entraîne une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire, ainsi qu'une diminution du potentiel membranaire, tous compatibles avec l'inhibition de la communication intercellulaire qui avait déjà été notée [Barhoumi et coll., 2000].

2. *La liaison avec le récepteur AhR* présent dans le cytoplasme (**Figure 10**, voie 2, page 54).

Le récepteur AhR est présent dans le cytoplasme sous forme de trimère, lié à deux protéines HSP90. Suite à la liaison du BaP à AhR, les protéines HSP90 se dissocient du AhR et le nouveau complexe BaP-AhR migre au noyau, où il se liera à la protéine ARNT. Une étude récente a démontré que la migration de ce complexe vers le noyau nécessite l'activation de la voie calmoduline/calmoduline kinase, suite à une élévation du calcium intracellulaire, dans les cellules mammaires MCF-7 [Monteiro et coll., 2008]. L'hétérodimère AhR-ARNT se fixera à l'ADN sur les éléments de réponse à AhR (XRE) qui sont situés dans le promoteur d'un grand nombre de gènes dont le CYP1A1 et le CYP1B1 [Miller et Ramos, 2001].

En ce qui concerne l'expression de ces enzymes dans le lymphocyte humain, les ARNm du AhR et de la ARNT sont retrouvés dans les lymphocytes humains isolés et non cultivés provenant de 20 sujets et leur expression est fortement corrélée entre elles ($R = 0,90$; $p < 0,0001$) et corrélée avec l'expression de CYP1A1 retrouvée chez ces mêmes sujets ($p < 0,006$ pour ARNT et CYP1A1 et $p = 0,022$ pour AhR et CYP1A1) [Siest et coll., 2008]. Les détails de l'induction enzymatique qui résultera de la liaison du BaP avec AhR seront discutés dans la section 4.4.2.1 (page 55) portant sur le métabolisme du BaP.

3. *Le métabolisme du BaP par les enzymes du cytochrome p450 et les enzymes de phase II, présentes dans le réticulum endoplasmique (Figure 10, voie 3, page 54).*

Les enzymes du cytochrome P450 nécessaires au métabolisme du BaP appartiennent à la famille des CYP1, dont trois membres sont connus : CYP1A1, qui est prédominant dans le poumon, CYP1A2 qui est prédominant dans le foie et CYP1B1 qui est présent dans les autres tissus de l'organisme, dont le rein, la glande mammaire, la prostate et les lymphocytes périphériques [Luch, 2005; Shimada, 2006]. L'inductibilité de ces trois enzymes par le BaP et d'autres HAP a été déterminée chez la souris et montre généralement que les CYP les moins présents de façon constitutive, sont les plus induits. Ainsi, dans le foie où CYP1A2 est le plus présent, CYP1A1 est induit d'environ 17 à 21 fois par le BaP, alors que CYP1B1 et CYP1A2 ne sont presque pas induits [Shimada et coll., 2003]. Par ailleurs, cette différence d'inductibilité a également été observée chez les asiatiques. En effet, leurs lymphocytes présentent un niveau de base de CYP1B1 plus élevé que le niveau de base de CYP1A1, mais leur taux d'induction par le benz-a-anthracène est nettement différent, avec 4,7 fois pour CYP1B1 et 45,8 fois pour CYP1A1. Malgré cette importante inductibilité, CYP1A1 demeure nettement moins abondant que CYP1B1 avec, respectivement, 2,4 unités et 36 unités enzymatiques présentes [Lin et coll., 2003]. Quant à mEH, dont l'activité époxyde hydrolase est essentielle à la formation du BaP-7,8-diol, son ARNm a été détecté avec une abondance assez élevée dans les lymphocytes humains [Krovat et coll., 2000]. En ce qui concerne les enzymes de phase II, il a été possible, dans les lymphocytes humains isolés et non cultivés provenant de 20 sujets, de détecter la présence d'ARNm des enzymes suivantes : GSTP1 (chez tous les sujets), GSTT1 (chez 17/20 sujets) et GSTM1 (chez 4/20 sujets) [Siest et coll., 2008]. Certains ARNm ont été quantifiés par RT-PCR dans les lymphocytes de 10 donneurs et montrent une faible abondance constitutive de *CYP1A1* (2 à 6×10^4 molécules/ μg d'ARN total), alors que *mEH* est plus abondant (0,8 à $3,6 \times 10^5$ molécules/ μg d'ARN total). [Krovat et coll., 2000]. *CYP1A2* a également pu être détecté (0,7 à 15,5 nMol/ nMol GADPH), mais son niveau d'ARNm ne corrèle pas avec le niveau d'activité de cette enzyme [Haas et coll., 2005].

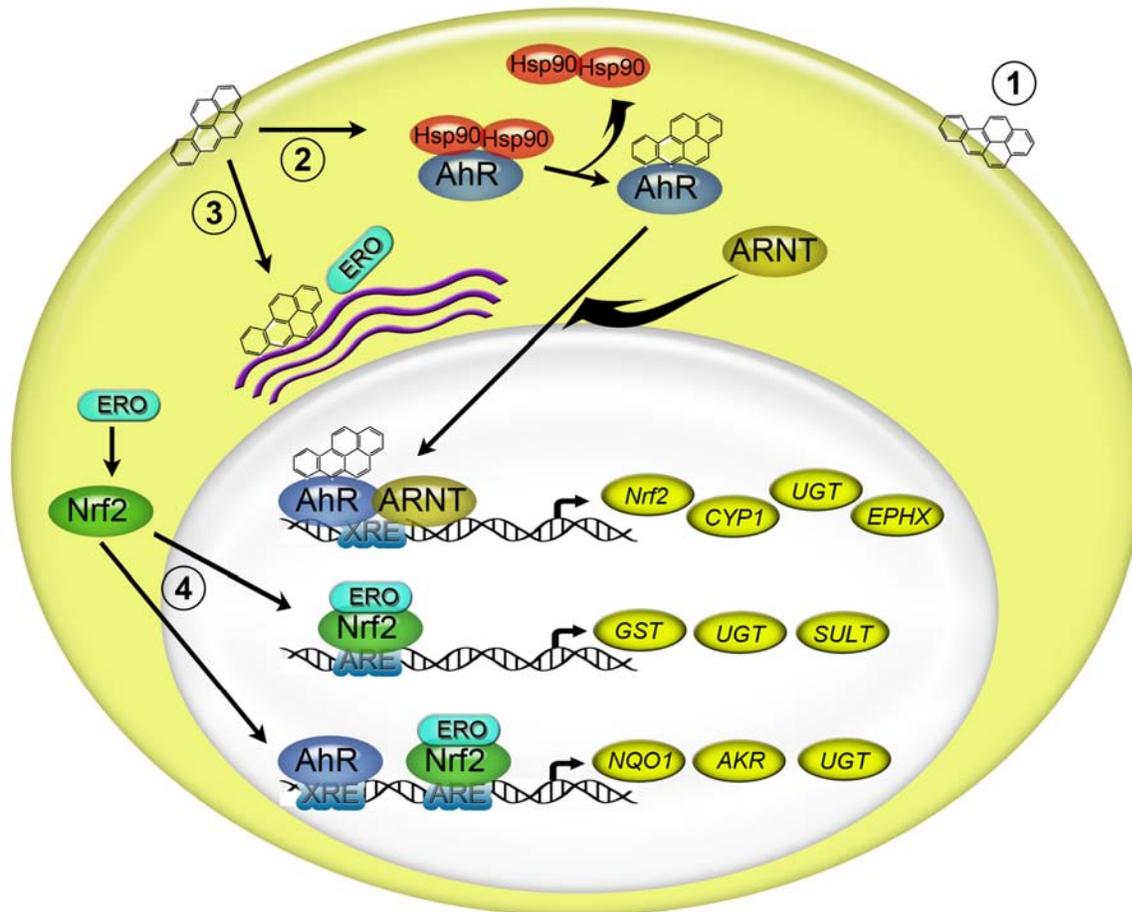


Figure 10: Devenir du BaP dans la cellule.

Voie 1) Entrée du BaP par diffusion à travers la membrane cytoplasmique et liaison avec les jonctions communicantes.

Voie 2) Liaison du BaP avec le récepteur cytoplasmique AhR, translocation au noyau suite à la liaison avec ARNT et induction de la transcription de certains gènes codant pour des enzymes de phase I et pour le facteur de transcription *NRF2*.

Voie 3) Biotransformation du BaP dans le réticulum endoplasmique et production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO).

Voie 4) Stabilisation du facteur de transcription Nrf2 par les ERO et induction subséquente de la transcription de gènes codant pour des enzymes de phase II. XRE : élément de réponse aux xénobiotiques. ARE : élément de réponse aux anti-oxydants. AKR : aldo kéto réductase.

4.4.2. LE MÉTABOLISME DU BaP

Le métabolisme du BaP a pour but de rendre ce composé hydrophobe suffisamment hydrophile pour être excrété. Via différentes étapes d'oxydation, d'hydrolyse et de conjugaison mettant en jeu des enzymes de phase I et de phase II, le BaP sera biotransformé, puis excrété dans les fèces et dans l'urine, tel que discuté plus haut. Afin de faciliter sa biotransformation, le BaP va participer à sa propre métabolisation par un mécanisme d'auto-induction des enzymes de phase I, alors que ses métabolites induiront la production d'enzymes de phase II. L'auto-induction métabolique du BaP sera d'abord abordée, puis les trois principales voies métaboliques du BaP seront discutées.

4.4.2.1. *L'auto-induction du métabolisme du BaP par le composé parent et ses métabolites*

Comme nous l'avons vu dans la section 4.4.1, la liaison du BaP avec le récepteur cytoplasmique AhR entraînera la transcription d'une batterie de gènes impliqués dans le métabolisme de phase I (**Figure 10**, voie 2, page 54), soit les enzymes du cytochrome P450 (*CYP1A1* et *CYP1B1*; *CYP1A2* étant inductible dans quelques types cellulaires seulement – [Okino et coll., 2007]), certaines UDP-glucuronyl transférases (*UGT1A1* et *UGT1A9*), la *COX-2* [Kraemer et coll., 1992; Chang et coll., 2007], ainsi que le facteur de transcription *NRF2* [Kohle et Bock, 2007]. Cette induction enzymatique explique le délai de 12 h qui est nécessaire avant d'atteindre le niveau maximal des métabolites 3-OH-BaP, BaP-7,8-diol et BaP-7,8-dione dans les cellules pulmonaires [Jiang et coll., 2007].

La biotransformation du BaP ayant débuté, des quinones et des ERO commenceront à être produites (**Figure 10**, voie 3, page 54). Les ERO iront stabiliser la protéine Nrf2, qui pourra alors agir comme facteur de transcription [Jiang et coll., 2007] (**Figure 10**, voie 4, page 54). La batterie de gènes induite par Nrf2 est surtout liée au métabolisme de phase II et inclut les glutathion-S-transférases (*GSTM1*, *GSTT1*, *GSTP1*), d'autres UGT (*UGT2B34*, *UGT2B35*) et des sulfotransférases (*SULT1A1*) [Kohle et Bock, 2007; Yeager et coll., 2009]. Certains gènes dépendront de la liaison concertée de AhR et Nrf2 pour leur

induction, comme *NQO1*, certaines isoformes d'AKR et plusieurs UGT (*UGT1A8*, *UGT1A10*) [Kalthoff et coll., 2010].

Les quinones comme la BaP-7,8-dione, la BaP-1,6-dione et la BaP 3,6-dione, peuvent activer trois voies de signalisation, tel que démontré dans les cellules épithéliales mammaires MCF-10A [Burchiel et coll., 2007] et dans les cellules hépatiques HepG2 [Burczynski et Penning, 2000] :

- *Activation de la voie AhR-dépendante* médiée par des gènes comportant des sites de liaison XRE. Cette activation a été constatée suite à la détection des ARNm de *HMOX1*, *CYP1A1*, *CYP1B1*, *EPHX1* (époxyde hydrolase), *NQO1* et *NQO2*.
- *Activation de la voie du stress oxydatif* médiée par des gènes comportant des sites de liaison à Nrf2 (ARE). Une augmentation des ARNm de *HMOX1*, *NQO1*, *UGT1A9*, *SLC7A11* et de plusieurs membres de la famille des *AKR* a été observée.
- *Activation de la voie EGFR*, entraînant une prolifération et une survie accrue des cellules mammaires.

Les gènes activés par les quinones semblent avoir pour fonction de compléter la biotransformation du BaP (s'il est encore présent) par transcription des *CYP1*, de dériver le métabolisme vers la production de quinones (par transcription de plusieurs *AKR*) et de les détoxifier par réduction (*NQO1* et *NQO2*) ou par conjugaison (*UGT1A9* et *SLC7A11*). La BaP-7,8-dione est le meilleur inducteur des deux premières voies [Burczynski et Penning, 2000]. La BaP-3,6-dione semble plutôt spécifique de la voie de AhR et la BaP-1,6-dione, qui est celle produisant le plus d'ERO, serait plutôt spécifique de la voie du stress oxydatif [Burchiel et coll., 2007].

4.4.2.2. *La voie des diol-époxydes*

La première étape de la biotransformation du BaP fait intervenir une oxydation de la double liaison située entre les carbones 2-3, 4-5, 7-8 ou 9-10, pour former des oxydes (**Figure 11**, page 58). Cette première oxydation est réalisée par les enzymes *CYP1A1*,

CYP1B1 ou, minoritairement, CYP1A2, en fonction du tissu où se produit la réaction. L'action de l'époxyde hydrolase (mEH) transformera ces oxydes en diols. C'est la deuxième oxydation subie par le BaP-7,8-diol qui le transformera en BaP-7,8-diol-9,10-époxyde (BPDE), un composé hautement réactif pouvant former des adduits avec les protéines cellulaires, l'hémoglobine (revu dans [Boysen et Hecht, 2003]) ou encore avec l'ADN. Cette deuxième oxydation serait le plus souvent réalisée, encore une fois, par les enzymes du groupe CYP1 [Xue et Warshawsky, 2005; Shimada, 2006]. Cependant, dans certains tissus comme le poumon, la glande mammaire et les os, l'action concertée du BaP-7,8-diol et des œstrogènes entraîne l'induction de la COX-2 [Tsai et coll., 2004; Miller et coll., 2005; Chang et coll., 2007], qui est capable d'oxyder le BaP-7,8-diol en BPDE [Wiese et coll., 2001]. En plus de métaboliser le BaP-7,8-diol, la COX-2 mène à la prolifération des ostéoblastes et augmente le pouvoir invasif des cellules cancéreuses mammaires. Ces effets sont inhibés par des inhibiteurs sélectifs de la COX-2, de AhR et/ou du récepteur aux œstrogènes [Tsai et coll., 2004; Miller et coll., 2005; Chang et coll., 2007].

La biotransformation du BaP, qui est un composé planaire, mène toujours à la formation de diastéréoisomères (stéréoisomères de conformation qui ne sont pas des images miroir l'un de l'autre), puisque les métabolites formés peuvent être placés au-dessus ou en-dessous du plan occupé par le BaP. Ainsi, deux diastéréoisomères différents de BaP-7,8-diol seront formés, les (+)-BaP-7,8-diol et (-)-BaP-7,8-diol. Leur seconde oxydation entraînera donc la formation de 4 diastéréoisomères de BPDE, les isomères *syn* et *anti* de chacun des BaP-7,8-diols de départ (voir le (-)-*syn*-BPDE et le (-)-*anti*-BPDE dans la **Figure 12**, page 59).

Le taux de formation relatif de chacun des quatre diastéréoisomères de BPDE produits a son importance, puisque les adduits à l'ADN qu'ils formeront n'ont pas la même efficacité de réparation par le système NER. Or, dans une rare étude sur le métabolisme du BaP dans les lymphocytes et monocytes humains (**Tableau III**, page 59 et **Figure 12**, page 59), une caractérisation par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) des tétrols hydrolysés a permis de déterminer qu'environ 85 % du BPDE produit est le (+)-*anti*-BPDE, 7 à 10 % le (+)-*syn*-BPDE, 3% le (-)-*anti*-BPDE et moins de 2 % le (-)-*syn*-BPDE

[Okano et coll., 1979]. Les mêmes tendances ont été observées *in vitro* sur de l'ADN isolé exposé à du BaP en présence d'activateur métabolique S9 qui a été extrait de microsomes de rat exposé au 3-méthylcholanthrène [Xue et Warshawsky, 2005]. Sans effectuer de quantification précise, les études récentes vont également dans le même sens, avec une formation et une détection prédominantes de (+)-*anti*-BPDE, autant en culture cellulaire que dans les lymphocytes de travailleurs exposés aux HAP [van Agen et coll., 1997; Pavanello et coll., 1999; Melendez-Colon et coll., 2000; Boysen et Hecht, 2003; Marie et coll., 2008].

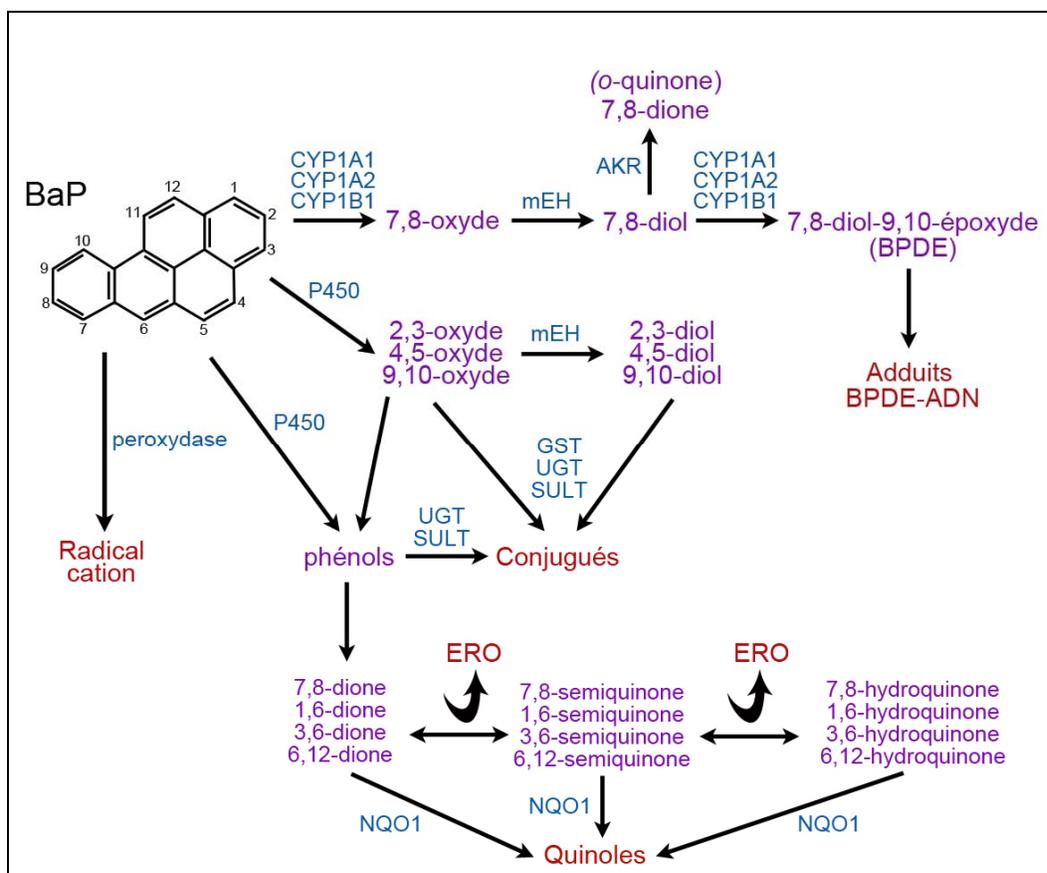


Figure 11: Principales voies métaboliques du benzo-a-pyrène. Les enzymes sont écrites en bleu, les métabolites intermédiaires en violet et les produits finaux en rouge. P450 : l'enzyme du CYP450 responsable de la formation des métabolites phénolés et du radical cation n'est toujours pas identifiée.

Tableau III: Proportion relative des différents diastéréoisomères de BPDE produits dans des lymphocytes/ monocytes humains ou de l'ADN isolé.

	(+)- <i>anti</i> -BPDE	(+)- <i>syn</i> -BPDE	(-)- <i>anti</i> -BPDE	(-)- <i>syn</i> -BPDE
Lymphocytes/ monocytes humains exposés au BaP [Okano et coll., 1979]	85 %	7-10 %	3 %	2 %
ADN isolé en présence de BaP et de S9 [Xue et Warshawsky, 2005]	85 %	4,5 %	0,5 %	10 %

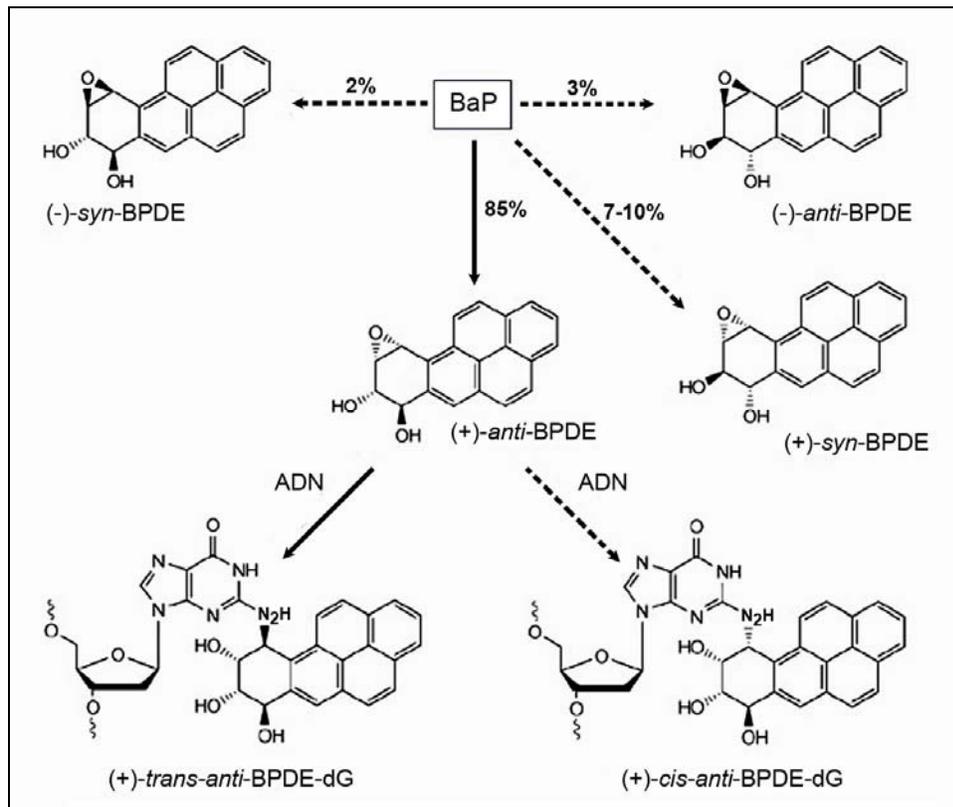


Figure 12: En haut : schémas des quatre diastéréoisomères du BPDE et leur pourcentage de formation dans les lymphocytes sanguins, ainsi que, en bas, schémas des deux adduits générés par la réaction du diastéréoisomère majeur, le (+)-*anti*-BPDE, avec la guanine, en position N².

4.4.2.3. *La voie des quinones*

L'oxydation du BaP par les enzymes de type CYP1 génère plusieurs oxydes (BaP-2,3-oxyde, BaP-4,5-oxyde et BaP-9,10-oxyde) qui seront convertis en phénols par une enzyme du cytochrome P450 non identifiée (**Figure 11**, page 58), puis, par oxydation avec de l'air, métabolisés en quinones [Miller et Ramos, 2001; Shimada, 2006]. Par ailleurs, le BaP-7,8-diol peut être converti en BaP-7,8-dione par des enzymes de la famille des aldo kétéo réductases (les AKR). Chez l'humain les isoformes AKR1A1 et 1C1 à 1C4 sont les plus importantes [Jiang et coll., 2007] et vont oxyder divers métabolites cancérigènes (*proximate carcinogen*), comme le BaP-7,8-diol, en *o*-quinones [Xue et Warshawsky, 2005]. Toutefois, la BaP-3,6-dione serait métabolisée directement à partir du BaP, et non suite à la formation de 3-OH-BaP dans les cellules broncho-alvéolaires d'origine épithéliale H358, et possiblement par l'action d'une peroxydase non inductible comme la COX-1 [Jiang et coll., 2007].

Comme les autres quinones produites, la BaP-7,8-dione va entrer dans un cycle d'oxydoréduction, alternant entre les formes hydroquinones, semiquinones et *o*-quinones, et générer des ERO (principalement des radicaux superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl (OH^{\cdot}) et du peroxyde). Ce cycle d'oxydoréduction pourra être interrompu grâce à l'enzyme NQO1, qui les réduira en quinoles [Miller et Ramos, 2001; Shimada, 2006], ou encore suite à la conjugaison des quinones avec le glutathion [Flowers-Geary et coll., 1993]. Les ERO produites pourront toutefois provoquer des dommages oxydatifs à l'ADN, notamment par oxydation des guanines, pour former des 8-OH-dG. Par ailleurs, les quinones pourraient se lier directement à la guanine et former des adduits dépurinants qui seraient liés aux sites abasiques fréquemment retrouvés [Xue et Warshawsky, 2005; Park et coll., 2006].

4.4.2.4. *La voie du radical cation*

La troisième voie de biotransformation impliquerait l'oxydation monoélectronique du BaP par une ou des peroxydases cellulaire [Xue et Warshawsky, 2005; Shimada, 2006]. Il n'a pas été possible, jusqu'à présent, d'identifier précisément la peroxydase cellulaire qui formerait des radicaux cations [Shimada, 2006]; mais plusieurs études suggèrent que cette peroxydase, constitutivement présente, pourrait être la prostaglandine synthase 1, aussi

appelée COX-1 [Smith et coll., 1991; Jiang et coll., 2007]. Les radicaux cations produiraient des adduits instables ayant une forte tendance à dépuriner. Toutefois, ces radicaux n'ont pas été détectés directement dans des extraits provenant de cellules exposées au BaP [Marie et coll., 2008], quoique des adduits dépurinés du BaP ont été détectés dans l'urine de fumeurs et de femmes exposées à la fumée de charbon [Casale et coll., 2001].

4.4.3. LA FORMATION DES ADDUITS BPDE-ADN

La liaison du BPDE à l'ADN est un processus extrêmement rapide et entraîne la formation d'une liaison covalente entre le carbone 10 du BPDE et le nucléotide. Le BPDE se lie préférentiellement à l'azote 2 de la guanine (N²-dG –**Figure 12**, page 59) et se lie également à l'azote 6 de l'adénine (N⁶-dA). Dans l'étude de Xue et Warshawsky [2005], les proportions relatives d'adduits à la guanine et à l'adénine sont sensiblement les mêmes pour chacun des quatre diastéréoisomères du BPDE, suite à une réaction *in vitro* entre de l'ADN isolé et du BPDE (**Tableau IV**, page 62). Cependant, lorsque le BPDE est ajouté aux cellules en cultures, ces proportions d'adduits liés à la guanine (dG) ou à l'adénine (dA) varient d'un type cellulaire à l'autre. En effet, dans les cellules de carcinome pulmonaire incubées avec du (+)-*anti*-BPDE, les adduits dG sont majoritaires, alors que lorsqu'elles sont incubées avec du (-)-*anti*-BPDE, ce sont les adduits dA qui prédominent [Dreij et coll., 2005]. Dans le cas des cellules hépatiques HepG2 et des kératinocytes HaCat, l'ajout du BPDE à ces cellules entraîne la formation prédominante d'adduits dG (75 %), en comparaison avec les adduits dA (25 %) [Marie et coll., 2008]. Toutefois, lorsque les cellules en culture doivent métaboliser le BaP ou son cancérigène proche (*proximate carcinogen*) le BaP-7,8-diol, le taux de formation des adduits BPDE-dG ou BPDE-dA dépend de la capacité métabolique des cellules impliquées. Ainsi, des adduits BPDE-dA sont détectés dans les cellules hépatiques HepG2, mais sont indétectables dans les kératinocytes HaCaT et dans les cellules broncho-alvéolaires H358 [Ruan et coll., 2007; Marie et coll., 2008]. En résumé, l'adduit BPDE-ADN préférentiellement formé suite à l'exposition de cellules au BaP ou à son métabolite BaP-7,8-diol est le *trans*-(+)-*anti*-BPDE-dG, pour tous les types cellulaires étudiés. La présence d'adduits BPDE-dA semble limitée aux hépatocytes, probablement en raison de leur capacité métabolique accrue permettant une formation d'adduits environ 1000 fois plus élevée, à concentration de BaP

Tableau IV: Proportion relative de différents adduits BPDE-ADN formés *in vitro* ou dans des cellules en culture, en présence de BPDE, de BaP ou de BaP-7,8-diol.

[Xue et Warshawsky, 2005]	<i>(+)-anti</i> -BPDE		<i>(-)-anti</i> -BPDE		<i>(+)-syn</i> -BPDE		<i>(-)-syn</i> -BPDE	
Réaction <i>in vitro</i> entre de l'ADN et du BPDE	dG	dA	dG	dA	dG	dA	dG	dA
	95	5	85	15	83	17	89	11
[Dreij et coll., 2005]	<i>(+)-anti</i> -BPDE				<i>(-)-anti</i> -BPDE			
Cellules épithéliales de carcinome pulmonaire A549 traitées au BPDE	<i>trans</i> -dG	<i>cis</i> -dG	<i>trans</i> -dA	<i>cis</i> -dA	<i>trans</i> -dG	<i>cis</i> -dG	<i>trans</i> -dA	<i>cis</i> -dA
	95	0,5	3	1,5	15	10	65	10
[Marie et coll., 2008]	Cellules HepG2				Cellules HaCat			
Cellules hépatiques HepG2 ou kératinocytes HaCat traitées au BPDE ou au BaP	Traitées au BPDE		Traitées au BaP		Traitées au BPDE		Traitées au BaP	
	dG	dA	dG	dA	dG	dA	dG	dA
	75	25	80	20	75	25	100	nd
[Ruan et coll., 2007]	<i>trans</i> - <i>(+)-anti</i> -BPDE-dG	<i>cis</i> - <i>(+)-anti</i> -BPDE-dG	<i>cis/trans</i> - <i>(+)-syn</i> -dG	<i>trans</i> - <i>(-)-anti</i> - ou <i>cis</i> - <i>(-)-anti</i> -dG	BPDE-dA			
Cellules broncho-alvéolaires H358 :								
Traitées avec BaP	82-88 %	3-4 %	8-14 %	nd	nd			
Traitées avec ±BaP-7,8-diol	67-72 %	3-4 %	24-30 %	nd	nd			

nd: non détectable

égale, que dans les kératinocytes [Marie et coll., 2008]. Ce biais de détection des adduits BPDE-dA en faveur des hépatocytes, pourrait également être le reflet des limites de détection des techniques actuelles.

La présence des adduits dans l'ADN entraîne des changements dans la conformation de la double hélice et dans l'appariement des bases azotées [Hess et coll., 1997]. Ces changements auront également une influence sur la vitesse de réparation de ces adduits par la NER.

- L'adduit *trans*-(±)-*anti*-BPDE-dG s'intercale avec une torsion minime dans le sillon mineur de l'ADN et ne dérange pas les liaisons hydrogènes. En termes de réparation par la NER, l'adduit *trans*-(-)-*anti*-BPDE-dG est le moins efficacement réparé de tous les adduits de conformation *trans*, probablement parce qu'il perturbe très peu la conformation de l'ADN, ce qui le rend peu reconnaissable par les protéines du système NER [Custer et coll., 1999].
- L'adduit *cis*-dG déplace la guanine dans le sillon mineur de l'ADN, entraînant une torsion sévère de l'hélice et une perte de l'appariement approprié entre le dG et le dC de l'autre brin. Il est très efficacement réparé par la NER [Hess et coll., 1997].
- Les adduits *trans*-dA et *cis*-dA s'intercalent dans le sillon majeur, mais ne sont pas placés parallèlement à celui-ci, ce qui cause une torsion dans l'hélice. C'est l'adduit *cis*-dA qui est le plus rapidement réparé [Dreij et coll., 2005].

4.4.4. LES ALTÉRATIONS GÉNÉTIQUES CAUSÉES PAR LE BENZO-A-PYRÈNE ET LA CANCÉROGENÈSE

Les adduits BPDE-ADN sont surtout réparés par le système NER. Cependant, il existe des disparités dans l'efficacité de ce système, autant en fonction des divers adduits détectés, qu'en fonction de leur position dans le génome. Par exemple, pour le gène *TP53*, les dimères de thymidine formés par l'exposition aux UV sont réparés à 80 % après 24 h lorsqu'ils ne sont pas situés dans des points chauds mutationnels, alors que les points chauds (codons 151, 177 et 196 par exemple) sont réparés à moins de 33 % durant la même période [Tornaletti et Pfeifer, 1994]. Quant aux adduits BPDE-ADN, les adduits de conformation *cis* sont dix fois plus efficacement réparés que les adduits *trans*, ceux de conformation (+) l'étant également plus que les (-) [Hess et coll., 1997]. Cette différence de réparation expliquerait le pouvoir cancérigène du *trans*-BPDE, alors que le *cis*-BPDE ne l'est pas [Rubin, 2001].

Étant difficilement réparé par la NER, l'adduit *trans*-(-)-*anti*-BPDE-dG, de même que les autres adduits non-détectés, devront être réparés par d'autres systèmes de réparation. Lorsque la NER est non fonctionnelle, la synthèse translésionnelle (TLS) se charge de faire la répllication de la région contenant l'adduit. Dans le cas des adduits *trans*-(\pm)-*anti*-BPDE-dG [Zhang et coll., 2002], ce mécanisme demande dans un premier temps, l'insertion d'un nucléotide sur le brin opposé à l'adduit. Cette insertion est effectuée par la polymérase η qui insère le plus souvent une adénine à la place d'une cytosine, causant une erreur d'appariement. De plus, ce type d'adduit augmente dramatiquement le taux d'insertion de thymine et de guanine. Au final, le bon nucléotide, une cytosine, est très rarement inséré. Suite à l'insertion du nucléotide, la deuxième étape consiste à faire une incision en 5' de l'adduit, puis à répliquer le brin comportant cet adduit. Cette étape est effectuée par la polymérase κ . Dans les cellules de mammifères déficientes en NER, le recrutement nécessairement accru de la TLS entraîne une augmentation du taux de mutation de près de quatre fois [Lagerqvist et coll., 2008].

La réparation par TLS se traduit donc par des transversions $G \rightarrow T$, mutations qui sont caractéristiques de l'exposition aux HAP [Luch, 2005]. Dans le cas du cancer du poumon des fumeurs, l'analyse des mutations du gène *TP53* qui y sont retrouvées, montre

que dans les codons 157, 248 et 273, des cytosines sont mutées en adénines, ce qui indique que les transversions $G \rightarrow T$ se sont produites sur le brin non-transcrit du gène. De plus, les cytosines adjacentes (faisant partie d'un îlot CpG) sont toujours méthylées, suggérant une formation accrue d'adduits BPDE-dG dans ce contexte [Rodin et Rodin, 2005]. Cette situation a déjà été décrite dans le cas du gène *K-ras* au codon 14, dont la méthylation de la cytosine adjacente augmente fortement la formation d'adduits BPDE-ADN [Hu et coll., 2003]. Cependant, cette méthylation présente au codon 14 n'a aucun effet sur la formation des adduits au codon 12, suggérant que d'autres facteurs sont à l'œuvre dans ce codon, dont possiblement le taux de réparation par la NER. Il est intéressant de noter que la transversion $G \rightarrow T$ du codon 12 de *K-ras* est la seule mutation de ce gène retrouvée dans 90 % des cancers pancréatiques, 50 % des cancers du côlon et plus de 30 % des cancers du poumon des fumeurs [Hu et coll., 2003].

Les adduits BPDE-ADN ne sont pas les seuls adduits causés par l'exposition au BaP. En effet, la voie des quinones, avec le stress oxydatif qu'elle génère, engendre des bases oxydées, dont la plus étudiée est le 8-OH-dG, qui résultent en la production de transversions $G \rightarrow T$ [Park et coll., 2006]. De plus en plus d'évidences lient le stress oxydatif généré par les *o*-quinones et les 8-OH-dG à l'étiologie du cancer pulmonaire et certains les considèrent même comme des cancérogènes spécifiques à ce site [Rodin et Rodin, 2005]. Dans des conditions où le cycle d'oxydoréduction est actif, les *o*-quinones sont jusqu'à 80 fois plus mutagènes que le (\pm)-*trans*-BPDE [Yu et coll., 2002]. Cette mutagénicité est considérablement réduite par des anti-oxydants et est presque abolie par l'utilisation combinée de catalase et de superoxyde dismutase [Yu et coll., 2002], qui vont spécifiquement inactiver le peroxyde et les radicaux superoxyde, respectivement.

Actuellement, deux vues s'opposent quant à l'effet principal de l'exposition à la fumée de tabac sur l'étiologie du cancer du poumon : est-ce que la fumée cause des mutations bien spécifiques dans les points chauds des gènes suppresseurs de tumeurs comme le *TP53* ou est-ce que la fumée agit en sélectionnant ces mutations? De plus en plus d'arguments sont en faveur de la seconde hypothèse [Rubin, 2001; Rodin et Rodin, 2005].

4.4.5. LES ALTÉRATIONS ÉPIGÉNÉTIQUES ET LES MODIFICATIONS DE L'EXPRESSION GÉNIQUE CAUSÉES PAR LE BaP

Peu d'études ont ciblé spécifiquement les effets épigénétiques du BaP sur les cellules en culture. Cependant, la présence de tels effets est suggérée par l'observation, dans des cellules murines en culture, que la présence d'un adduit BPDE-dG au sein d'un CpG inhibe la méthylation de cet îlot par des méthyltransférases [Wilson et Jones, 1984]. Plus récemment, le traitement au BaP des cellules de carcinome mammaire MCF-7, T47-D et HCC1806 n'a pas montré de changement global de méthylation, mais plutôt des changements localisés (sites hypo- ou hyperméthylés). En effet, l'hypométhylation de gènes et d'éléments répétés SINE ont été retrouvés. L'une de ces régions, localisée en 16p13.3, inclut le gène suppresseur de tumeurs *TSC2*, faisant partie de la voie de signalisation de mTOR et de Wnt [Sadikovic et Rodenhiser, 2006] et qui pourrait être impliqué dans l'étiologie du carcinome rénal.

Par ailleurs, la poursuite de l'étude sur les cellules de carcinome mammaire MCF-7 a montré que l'exposition au BaP entraîne des changements au niveau de l'acétylation des histones tout au long du génome [Sadikovic et coll., 2008b]. Ainsi, une hypoacétylation des promoteurs de gènes associés à la méthylation a été mise en évidence. De plus, une hyperacétylation des promoteurs, couplée d'une augmentation de l'expression génique, de gènes associés à la machinerie transcriptionnelle, à la croissance cellulaire et à la biotransformation du BaP (*CYP1B1*) est observée. Dans une autre étude cherchant à déterminer quels étaient les gènes exprimés suite à une exposition au BaP, les profils obtenus avec les cellules MCF-7 et HepG2 ont été comparés [Hockley et coll., 2007]. Les auteurs ont montré que les gènes spécifiquement modulés par le BaP visent le métabolisme du BaP, le transport cellulaire, le transport des électrons, la signalisation dans la voie de réponse au stress oxydatif et contiennent en majorité des sites de liaison à AhR dans leur promoteur. Par ailleurs, les gènes spécifiquement modulés suite aux effets génotoxiques causés par le BPDE touchent la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, le métabolisme des xénobiotiques, l'organisation de la chromatine; tous contiennent des sites de liaison à p53 dans leur promoteur.

5. Les tests d'étude de la cytogénotoxicité chez l'humain

Effectués à partir d'échantillons biologiques prélevés chez des individus exposés ou à partir de cellules exposées *in vitro*, ces tests visent à quantifier les dommages présents sur l'ADN, à évaluer l'efficacité des systèmes de réparation et à comprendre le mécanisme d'action des agents étudiés. Les prélèvements biologiques utilisés comprennent principalement les cellules sanguines, de la muqueuse jugale, ainsi que celles qui sont présentes dans l'urine. Quant aux cellules utilisées, elles sont très souvent transformées ou d'origine tumorale, quoique l'utilisation de cellules primaires normales (principalement le lymphocyte sanguin dans le cas de la surveillance biologique) se répande de plus en plus.

5.1. Les types de cellules utilisées en cytogénotoxicité

Les cellules d'origine animale les plus utilisées sont les cellules de hamster chinois, provenant de l'ovaire (CHO-K1; 24 chromosomes) et du poumon (V79; 22-23 chromosomes). Les cellules fibroblastiques V79-MZ (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, États-Unis, numéro CCL-93 – aussi appelées V79-4) sont celles dont découlent toutes les autres cellules V79, obtenues par transfection de divers vecteurs. Comme les cellules V79-MZ sont dépourvues d'activité aryl hydroxylase et de glutathion transférase, elles sont modifiées au besoin, pour permettre l'expression des enzymes de phase I ou de phase II désirées. Les cellules d'origine humaine sont également très utilisées, car elles permettent une application des résultats obtenus à l'Homme plus aisée, ainsi qu'une meilleure compréhension des particularités de notre espèce. Ce sont ces cellules qui seront discutées plus en détail dans cette section.

5.1.1. LES CELLULES TRANSFORMÉES OU D'ORIGINE TUMORALE

La lignée cellulaire humaine la plus utilisée dans les études de cytogénotoxicité est la lignée HepG2, d'origine hépatique. Isolée à partir d'un carcinome hépatocellulaire prélevé chez un adolescent de 15 ans d'origine caucasienne, cette lignée a l'avantage de posséder toutes les enzymes nécessaires à la biotransformation et à la biodétoxification de la majorité des produits chimiques testés (ATCC, numéro HB-8065).

En ce qui a trait aux cellules d'origine mammaire, les cellules MCF-10A, MCF-7, MDA-MB-231 et T47D sont les plus courantes. Les cellules MCF-10A sont des cellules épithéliales naturellement transformées, prélevées chez une femme de 36 ans caucasienne (ATCC, numéro CRL-10317). Les cellules MCF-7 sont des cellules épithéliales dérivées d'un adénocarcinome prélevé chez une femme caucasienne de 69 ans, exprimant le récepteur aux œstrogènes (ATCC, numéro HTB-22). Les cellules MDA-MB-231 sont des cellules épithéliales dérivées d'un adénocarcinome prélevé chez une femme caucasienne de 51 ans (ATCC, numéro HTB-26). Les cellules T47-D sont des cellules épithéliales dérivées d'une effusion pleurale chez une femme de 54 ans ayant un carcinome ductal infiltrant. Elles expriment le récepteur aux œstrogènes et à la progestérone et possèdent des jonctions communicantes (*gap junctions*) (ATCC, numéro HTB-133).

En ce qui concerne les modèles de peau, la lignée de kératinocytes HaCaT, est fréquemment utilisée. Elle s'est spontanément transformée *in vitro* suite à une biopsie de peau histologiquement normale prélevée chez un homme caucasien de 62 ans (Cell Line Services (CLS), Eppelheim, Allemagne, numéro 300493).

Quelques lignées broncho-alvéolaires sont également utilisées, notamment les lignées H358 et BEAS-2B. La plus souvent utilisée pour des études sur le BaP est la lignée H358 provenant d'un carcinome broncho-alvéolaire, prélevé chez un homme. Elle est de type épithélial et est tumorigénique (ATCC, numéro CRL-5807). Une autre lignée, la BEAS-2B, a été transformée *in vitro* par le virus SV-40 à partir de spécimens normaux prélevés par nécropsie et est composée de cellules épithéliales bronchiques [van Agen et coll., 1997].

5.1.2. LES CELLULES NORMALES

Les cellules normales les plus couramment utilisées sont les globules blancs (lymphocytes/ monocytes) humains, obtenus par ponction de sang veineux. Elles sont mises en culture à partir du sang complet ou après isolement sur gradient de Ficoll. Ces cellules étant en phase G₀ du cycle cellulaire, il sera nécessaire de les stimuler avec un mitogène, comme la phytohémagglutinine (PHA), pour effectuer des analyses chromosomiques. La stimulation mitogénique opérée par la PHA entraîne la transformation lymphoblastique des lymphocytes T par activation du récepteur T antigénique [Chilson et Kelly-Chilson, 1989]; 95 % des cellules transformées sont des lymphocytes T, les 5 % restant étant des B activés suite à la sécrétion de médiateurs solubles par les T [Ohta et coll., 1985; Knuutila et Kovanen, 1987]. Les intérêts principaux des lymphocytes humains en toxicologie résident dans le fait qu'ils sont génétiquement stables, présentent un caryotype le plus souvent normal et, au niveau cellulaire, ont toutes leurs voies de signalisation fonctionnelles, notamment en ce qui a trait à la réponse aux dommages à l'ADN. Les lymphocytes T et B ont une sensibilité différentes face aux agents chimiques et physiques, et ceci est en partie dû au fait que les T sont des réparateurs rapides, alors que les B sont des réparateurs lents [Boerrigter et Vijg, 1991; Miller, 1991]. De plus, elles sont métaboliquement compétentes pour biotransformer et détoxifier des produits chimiques comme les hydrocarbures aromatique polycycliques (HAP), en raison de la présence des enzymes de la famille CYP1A, de l'époxyde hydrolase et autres enzymes nécessaires, tel que détaillé dans la section 4.4.1 (page 51).

Les cellules souches et les cellules embryonnaires provenant de plusieurs tissus, notamment du foie et du poumon, font lentement leur entrée en toxicologie; leur utilisation, bien que limitée actuellement, semble prometteuse [Binkova et coll., 2000; Gerbal-Chaloin et coll., 2010]. De plus, l'utilisation de cellules normales mammaires, provenant de tissus retirés chirurgicalement, permet d'étudier la variation interindividuelle dans la réponse à un stress génotoxique directement sur le tissu d'intérêt [Keshava et coll., 2005]. Finalement, de plus en plus de compagnies développent des systèmes de culture de cellules primaires humaines, provenant de la peau (kératinocytes, fibroblastes), de l'épithélium de la vessie, du foie, des muscles, de l'os, etc. (CELLnTEC Advanced Cell Systems en Suisse, PromoCell GmbH, en Allemagne, ATCC aux États-Unis).

5.2. Les tests classiques de cytogénétique et leurs variantes

Depuis les toutes premières années de la cytogénétique humaine, les développements qu'elle a connus se sont répercutés autant en clinique qu'en génotoxicologie humaine. Plusieurs des tests classiques de cytogénétique sont maintenant utilisés dans le développement du médicament [Brambilla et Martelli, 2009], dans l'évaluation biologique des dispositifs médicaux [ISO, 2003], dans l'évaluation des risques génotoxiques posés par des agents chimiques [OECD, 1986, 1997, 2009], ou encore en surveillance biologique. Ces tests classiques sont le test des aberrations chromosomiques (AC), le test des échanges entre chromatides-sœurs (ÉCS) et le test des micronoyaux sanguins (MNs).

Depuis quelques années, les AC et les MN sont considérés comme des biomarqueurs de risque de cancer. En effet, un niveau de base élevé d'AC est associé à un risque accru de cancer. Ce lien a été montré pour plusieurs cancers, mais une association plus forte a été observée avec ceux du tractus gastro-intestinal [Norppa et coll., 2006]. Un niveau de base élevé de MNs (tertile supérieur) est également associé à un risque accru de cancers à tous les sites et, plus spécialement, pour les cancers de la vessie et du tractus gastro-intestinal. De plus, ces derniers avaient été détectés 12 à 15 ans après la première analyse cytogénétique qui avait classifié ces individus comme appartenant au groupe ayant une fréquence élevée de MN [Bonassi et coll., 2007].

5.2.1. LES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES

Aussi appelé test des cassures, le test des AC demande la préparation de chromosomes pour être réalisé. À cause de leur stabilité caryotypique et de leur faible nombre de chromosomes, les cellules CHO-1K sont les cellules animales le plus souvent utilisées, alors que les lymphocytes sanguins sont les cellules humaines les plus courantes pour faire ce test. Les cellules doivent idéalement être récoltées après 1 à 1,5 tour de cycle cellulaire post-exposition (1 tour étant : 16 h pour les CHO-1K; 24 h pour les lymphocytes humains [ATCC 2010; Rooney et Czepulkowski, 1992a], afin que les lésions produites

aient le temps de s'exprimer [Natarajan et Palitti, 2008]. Ainsi, pour effectuer la surveillance biologique de l'exposition d'individus, une culture lymphocytaire de 48 h est préconisée. Par contre, pour une exposition *in vitro*, la culture durera le plus souvent 72 h.

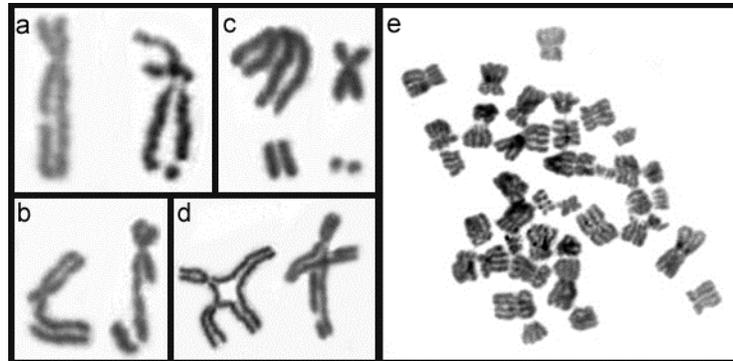


Figure 13: Aberrations chromosomiques rencontrées lors de la réalisation du test des AC. a) Lacune chromatidienne; b) cassure chromatidienne; c) cassure chromosomique; d) figure tétraradiale (à gauche) et figure triradiale (à droite); e) endomitose (aussi appelée endoreduplication).

Après la récolte des chromosomes, les préparations sont colorées au Giemsa, ce qui donne une coloration dite « solide » aux chromosomes, afin de mieux en visualiser les lacunes (*gaps*) et les cassures. Par ailleurs, l'utilisation du marquage en bandes GTG permettra d'identifier avec plus de précision les délétions, les inversions, les translocations, les insertions et autres remaniements complexes. L'analyse chromosomique doit se faire sur au moins 200 métaphases par condition testée. Les métaphases doivent contenir $2n \pm 2$ chromosomes, soit de 44 à 48 chromosomes pour les lymphocytes humains [OECD, 1997]. Lors de l'analyse, les lacunes, les différents types d'aberrations structurales, les endomitoses et cellules polyploïdes (**Figure 13**, ci-haut) doivent être répertoriées avec suffisamment de détail pour distinguer la présence d'un type particulier d'aberration (ISCN 2009), comme par exemple les chromosomes dicentriques dans le cas d'exposition aux rayonnements [Krishnaja et Sharma, 2004; Hamza et Mohankumar, 2009]. L'analyse des

AC ainsi effectuée permet de distinguer principalement les cassures chromatidiennes et chromosomiques, ainsi que certaines aberrations structurales comme les figures triradiales et quadriradiales, les anneaux, les dicentriques, les délétions terminales et certaines translocations (**Figure 19**, page 90). Cependant, certaines aberrations impliquant des fragments très petits ou ne modifiant pas de façon évidente la forme des chromosomes, ne peuvent être mis en évidence. C'est pourquoi le couplage du test des AC avec la FISH est de plus en plus populaire [Sram et coll., 2007b]. En ce qui concerne les cellules polyploïdes et les endomitoses, leur augmentation serait indicative d'une perturbation des processus mitotiques [OECD, 1997] et demanderait à être confirmée.

5.2.2. LES ÉCHANGES ENTRE CHROMATIDES-SŒURS

Le test des ÉCS est presque toujours réalisé avec des lymphocytes humains ou avec des cellules CHO-K1, lorsque des cellules animales sont désirées. La mise en évidence des ÉCS demande l'incorporation de BrdU dans l'ADN lors de sa réplication, durant deux phases S consécutives, avant la récolte des chromosomes. Dans le cas des cultures lymphocytaires humaines, le BrdU est mis dans le milieu de culture durant 24 à 48 h (jusqu'à 72 h dans certaines études), le choix de la durée semblant le plus souvent une question d'expérience dans le laboratoire où la technique est effectuée.

Suite à la récolte des chromosomes, la révélation des ÉCS se fait par la technique FPG (*fluorescence - photolyse - Giemsa*) adaptée de Perry et Wolff [1974], dans laquelle une photolyse du brin d'ADN contenant du BrdU est effectuée avant la coloration des chromosomes au Giemsa (**Figure 14**, ci-contre. Cette technique permet de faire la distinction entre les cellules ayant effectué un seul tour de cycle en présence de BrdU (génération F1), de celles qui ont effectué deux tours (génération F2) ou encore trois tours ou plus (génération F3) (**Figure 15**, page 73).



Figure 14: Métaphase (F2) comportant 8 ÉCS (pointés avec des flèches).

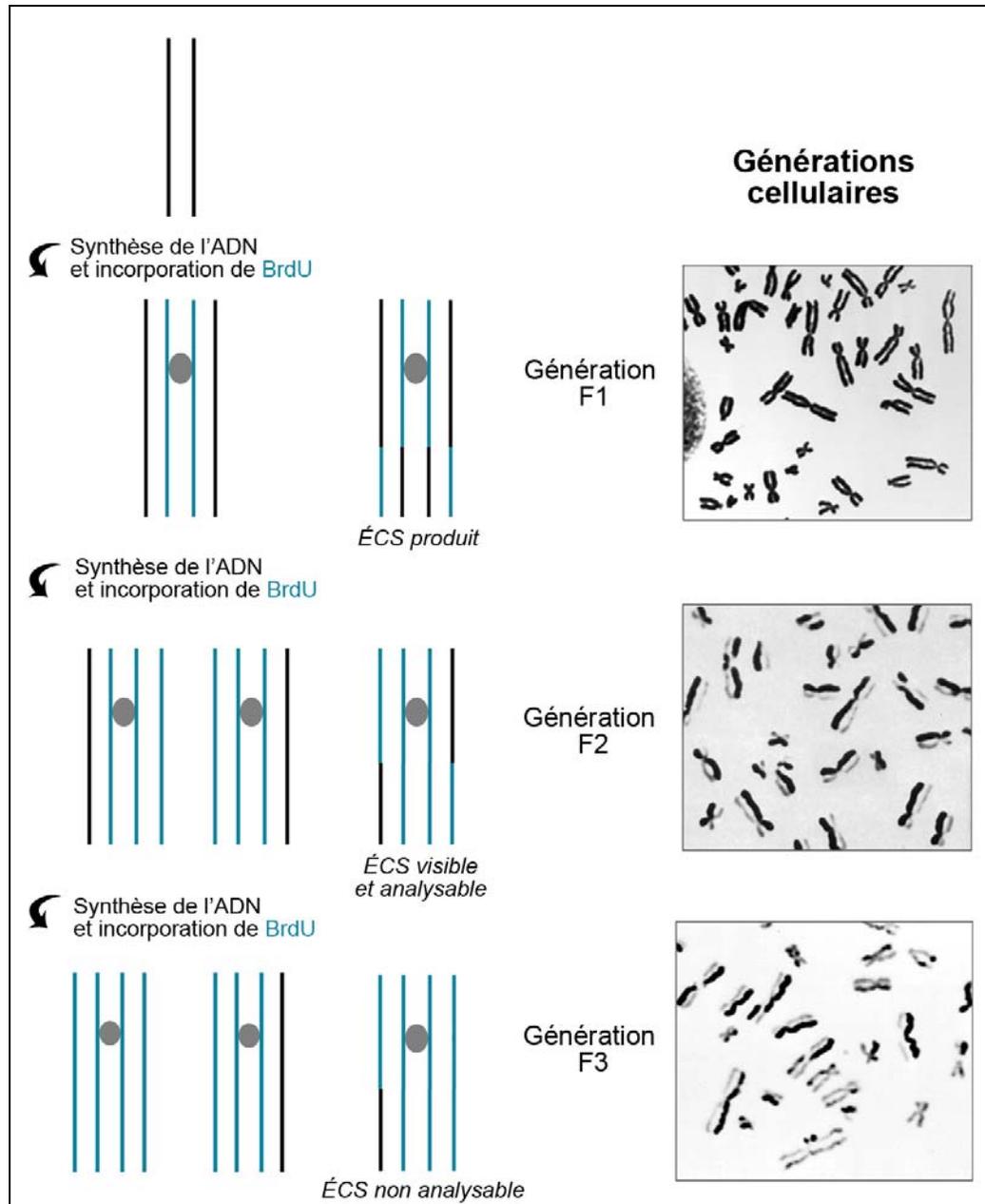


Figure 15: Principe de l'incorporation de BrdU durant la culture cellulaire destinée à la mise en évidence des ÉCS. Les métaphases des générations F1, F2 et F3 sont illustrées.

L'analyse est effectuée sur des métaphases comportant $2n \pm 2$ chromosomes, soit de 44 à 48 chromosomes pour les lymphocytes humains. Un minimum de 25 métaphases F2 est analysé par condition, divisées également parmi les cultures en duplicata préparées, s'il y a lieu [ISO, 2003] et le nombre d'ÉCS par métaphase y est compté. Avec le test des ÉCS, il est également possible d'évaluer l'index de prolifération cellulaire (IP). Cet index nous donne une indication de la vitesse du cycle cellulaire, c'est-à-dire du nombre de tours de cycles effectués durant la période de temps où le BrdU a été ajouté. Par exemple, dans un échantillon où le BrdU a été mis durant les 72 heures de la culture, les cellules ont effectué en moyenne 2,45 tours de cycles [Major et coll., 2001]. La comparaison de l'IP obtenu dans les conditions contrôle et exposées permet de savoir si un ralentissement du cycle cellulaire est associé à l'exposition au produit d'intérêt. Ce ralentissement est généralement associé à un arrêt transitoire de la progression dans le cycle cellulaire, causé par des dommages à l'ADN nécessitant une réparation immédiate.

5.2.3. LES MICRONOYAUX

Le test des micronoyaux (MN) peut être effectué sur tous les types de cellules, qu'elles soient adhérentes (HepG2, CHO-1K, V79, etc.) ou en suspension (lymphocytes) [Fenech, 2007]. Lors de sa mise au point initiale, ce test était une variante de la technique standard d'obtention des chromosomes [Obe et coll., 1975]. Cependant, la mise au point de la variante du test des MN utilisant la cytochalasine B par Fenech et Morley [1985] allait ouvrir la voie à une utilisation accrue de ce test et à sa validation et son approbation pour évaluer la génotoxicité des produits chimiques par l'OCDE [2009]. La cytochalasine B est une mycotoxine qui agit en empêchant la polymérisation de l'actine du cytosquelette. Elle inhibe la formation de l'anneau contractile constituant le sillon de clivage en télophase [MacLean-Fletcher et Pollard, 1980], bloquant ainsi la cytokinèse. Dans la culture lymphocytaire, la cytochalasine B est ajoutée durant les 24 dernières heures de la culture [Fenech, 2007]. Les cellules qui auront complété un tour de cycle cellulaire contiendront deux noyaux, alors que celles qui auront progressé plus rapidement auront trois ou quatre noyaux. Les cellules les plus lentes, ainsi que celles qui n'auront pas été stimulées par la PHA auront un seul noyau.

Après la récolte des cellules, l'analyse est effectuée sur un minimum de 1000 cellules binucléées par culture, 2 cultures distinctes par condition, en suivant les critères établis par Fenech (2007). Les critères détaillés seront indiqués dans le chapitre Matériel et Méthodes, section 4.5, page 123. Brièvement, les cellules binucléées doivent avoir conservé leur cytoplasme et avoir deux noyaux de taille semblable pour être analysées. Quant aux MN, ils doivent être présents dans le cytoplasme de la cellule binucléée analysée, leur diamètre n'excédant pas le tiers du diamètre des noyaux principaux. Leur coloration doit avoir la même intensité que celle des noyaux et ils ne doivent pas y être accolés ou superposés. Les cellules comportant des MN sont dénombrées, ainsi que le nombre de MN qu'elles contiennent.

Bien que l'analyse des MN soit fréquemment réalisée sur les lymphocytes sanguins, l'utilisation de cellules épithéliales afin d'y mesurer la fréquence de MN, représente un avantage important en raison du fait qu'elles sont très souvent le tissu cible de cancers. En effet, les cellules urothéliales provenant de l'épithélium bordant la vessie, sont les cellules cibles du cancer de la vessie. De même, les cellules de la muqueuse jugale sont la cible du cancer de la bouche/ de la gorge et les cellules du col utérin sont la cible du carcinome du col utérin [Majer et coll., 2001]. Comme ces cellules épithéliales sont relativement facile d'accès, la présence de micronoyaux dans ces cellules est considérée comme un biomarqueur potentiellement intéressant [Majer et coll., 2001]. La surveillance biologique des cellules épithéliales buccales et de la vessie a été particulièrement effectuée dans des cas de contamination de l'eau de boisson à l'arsenic dans certains secteurs de la Chine et de l'Inde. En effet, une augmentation significative et importante de la fréquence de MN dans les cellules buccales et urothéliales (de l'ordre de 2,5 à 10 fois plus que le contrôle) a été observée dans les populations dont l'eau de boisson était fortement contaminée à l'arsenic [Tian et coll., 2001; Basu et coll., 2002; Basu et coll., 2004; Ghosh et coll., 2006]. Par ailleurs, une augmentation de la fréquence des MN retrouvée dans les cellules buccales de fumeurs ou de personnes chiquant le tabac ou le bétel a été notée et a montré une association forte avec la présence de cancers de la cavité buccale chez ces individus [Majer et coll., 2001]. En ce qui a trait à l'exposition aux HAP, les résultats obtenus ont été contradictoires. En effet, une augmentation des MN urinaires a été retrouvée chez des travailleurs de l'industrie du pavage [Murray et Edwards, 2005], alors qu'une telle

augmentation n'a pas été rapportée chez des travailleurs affectés aux fours à coke [van Delft et coll., 2001].

5.2.3.1. *L'analyse des micronoyaux couplée à l'hybridation in situ en fluorescence*

L'analyse conventionnelle des MN permet de détecter l'effet génotoxique associé à l'exposition à une substance donnée. Toutefois, ainsi réalisé, ce test ne permet pas d'étudier les causes de cette génotoxicité. L'analyse des MN par FISH, en utilisant des sondes centromériques et des peintures chromosomiques, permet d'aller étudier ces causes et de déterminer le contenu des MN [Norppa et Falck, 2003]. À la base, deux phénomènes peuvent entraîner la formation de MN : des cassures chromosomiques touchant une seule ou les deux chromatides, qui formeront des fragments acentriques pouvant être inclus dans un MN (événement clastogène); ou encore des dysfonctionnements de l'appareil mitotique qui empêcheront un ou des chromosomes de migrer correctement vers le pôle de la cellule et dont le retard fera en sorte qu'ils soient intégrés à un MN (événement aneugène) [Iarmarcovai et coll., 2006].

La première sonde utilisée pour caractériser le contenu des MN a été la sonde pancentromérique, une sonde reconnaissant tous les centromères [Migliore et coll., 1993]. En détectant la présence d'un ou plusieurs centromères dans les micronoyaux, une distinction entre les événements aneugènes et clastogènes est possible. Cette distinction a été confirmée par l'étude de clastogènes connus comme la mitomycine C et le diépoxybutane [Vlachodimitropoulos et coll., 1997; Colognato et coll., 2007], ainsi que des aneugènes avérés comme la griséofulvine et le taxol [Mattiuzzo et coll., 2006; Colognato et coll., 2007]. Cependant, afin de caractériser un peu plus les événements aneugènes, la distinction entre MN contenant un seul signal centromérique et MN contenant plusieurs signaux centromériques commence à se faire. Ainsi, l'exposition au formaldéhyde chez les pathologistes est associée à une présence accrue de MN contenant un seul signal centromérique, suggérant que ces MN résultent d'une non-disjonction à l'anaphase [Orsiere et coll., 2006], alors que l'utilisation du paclitaxel est associée à un accroissement de MN contenant plus d'un signal centromérique [Digue et coll., 1999], signe d'une perturbation plus importante de la machinerie mitotique [Iarmarcovai et coll., 2007b]. Il a récemment été

suggéré que les MN contenant un ou deux signaux centromériques soient distingués de ceux en contenant trois ou plus, puisque les premiers pourraient contenir les deux chromatides d'un même chromosome [Kirsch-Volders et coll., 2002]. Cette distinction a été faite lors d'une méta-analyse et, chez des soudeurs, n'a pas montré de différence notable entre la fréquence de MN comportant un ou deux signaux centromériques et ceux en comportant trois [Iarmarcovai et coll., 2007b]. Par ailleurs, ce type d'étude n'a jamais été réalisé suite à une exposition *in vitro* ou *in vivo* au BaP ou aux HAP.

Finalement, l'utilisation de sondes multi-couleurs de type SKY (*spectral karyotyping*) pour étudier le contenu des MN est rapportée. Ce type de sonde permet d'identifier, en une seule hybridation, les 24 chromosomes humains (1 à 22, X et Y), chacun se voyant attribuer un code de couleur spécifique par le système d'analyse d'image. Dans les deux études rapportées, les micronoyaux sont spontanément formés dans des lymphocytes humains et contiennent majoritairement un seul chromosome [Komae et coll., 1999; Leach et Jackson-Cook, 2001].

5.3. Les autres tests plus récents

5.3.1. LES MÉTHODES DE MESURE DES ADDUITS À L'ADN

Un grand nombre de composés chimiques peuvent produire des adduits à l'ADN. Par exemple, il est possible d'identifier l'adduit aflatoxine B₁-guanine (mesuré dans l'urine comme biomarqueur de l'apport en aflatoxine B₁ dans la diète [cancérogène produit par des moisissures de type *Aspergillus*; peut contaminer les aliments]), l'adduit N²-éthyl-dG produit par réduction d'adduits dérivés de l'acétaldéhyde (serait possiblement un biomarqueur de la génotoxicité de l'éthanol) et les adduits BPDE-ADN et HAP-ADN [Farmer et Singh, 2008].

Les méthodes permettant de mesurer les adduits à l'ADN existent depuis environ 25 ans. Applicables autant à l'analyse d'adduits générés par réaction sur de l'ADN isolé (typiquement de l'ADN de thymus de veau), qu'à l'analyse d'adduits générés suite à une exposition *in vitro* de cellules en culture à un composé unique, le vrai défi pour ces méthodes réside dans la capacité à détecter et à identifier des adduits produits *in vivo*, lors

d'expositions à des mélanges complexes de différents composés [Himmelstein et coll., 2009]. Les principales méthodes de détection et d'identification des adduits sont le post-marquage des adduits au ^{32}P , les immuno-essais et l'immunohistochimie (utilisant toutes deux des anticorps spécifiques) et la spectrométrie de masse. De plus, une modification de l'essai COMET, initialement utilisé pour détecter les bris à l'ADN (voir section 5.3.2.2, page 82), pourrait s'avérer utile pour détecter les 8-OH-dG. La méthode de choix lorsqu'il s'agit d'identifier des adduits, est la spectrométrie de masse.

Les différentes méthodes de détection des adduits ont une sensibilité d'environ 0,1 à 1 adduit par 10^8 nucléotides normaux. Ce seuil de détection peut augmenter lorsque la quantité d'ADN disponible pour la quantification est plus faible que la quantité optimale de la technique utilisée [Farmer et Singh, 2008]. Voici un bref aperçu des différentes méthodes, avec leurs forces et leurs faiblesses.

- *Le post-marquage au ^{32}P .* Cette méthode a été décrite initialement par Randerath et coll. [1981] et demande la digestion préalable de l'ADN en nucléotides et leur enrichissement, par extraction au *n*-butanol par exemple. Par la suite, ces nucléotides (portant ou non un adduit) sont marqués à leur extrémité 5' avec de l'ATP- ^{32}P , par l'enzyme T4 polynucléotide kinase. Les nucléotides marqués sont ensuite séparés par chromatographie en couche mince ou par HPLC [Himmelstein et coll., 2009]. Par comparaison avec des standards, il est possible d'obtenir des informations sur la structure des adduits ainsi marqués. De plus, il est possible de quantifier les adduits afin d'établir la proportion relative de chacun d'entre eux dans l'échantillon analysé [Farmer et Singh, 2008]. Toutefois, la principale faiblesse de cette technique réside dans la non-spécificité du marquage au ^{32}P , particulièrement dans le cas d'expositions humaines où différents types d'adduits sont présents dans l'ADN des individus testés [Himmelstein et coll., 2009]. Cette méthode, lorsque couplée à la chromatographie en couche mince, est la plus sensible, nécessitant seulement 1 à 10 μg d'ADN pour générer des résultats. Par ailleurs, aucun équipement coûteux n'est nécessaire pour la réaliser [Poirier, 2004].

- *La détection fluorimétrique des adduits après hydrolyse.* Mise au point par Alexandrov et coll. [1992], elle tire avantage du fait que certains adduits peuvent émettre de la fluorescence. Après leur séparation par HPLC, les molécules sont excitées avec une source de photons, comme un laser ou des ultra-violets [Farmer et Singh, 2008]. La fluorescence émise est captée et, en fonction de la longueur d'onde d'émission, permet l'identification de l'adduit. Parmi les adduits ainsi détectable se retrouvent les adduits de l'aflatoxine B₁ et des HAP [Himmelstein et coll., 2009]. De 20 à 100 µg d'ADN sont nécessaires avec cette méthode.
- *Les techniques immunologiques.* Développées depuis la fin des années 1970, les techniques immunologiques de détection des adduits se sont diversifiées considérablement. La mise au point de l'immunoessai RIA (*Radio-ImmunoAssay* - [Poirier et coll., 1977]) fut rapidement suivi par l'ELISA compétitif (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* - [Hsu et coll., 1981]), le DELFIA (*Dissociation-Enhanced Lanthanide FluoroImmunoAssay* - [Schoket et coll., 1993]) et, plus récemment, le CIA (*Chemiluminescent ImmunoAssay* - [Divi et coll., 2002]). L'application *in situ* des ces essais (l'immunohistochimie) fut réalisée pour la première fois par Hsu et coll. [1997] sur des cellules exfoliées buccales et urothéliales. Les immunoessais ont de nombreux avantages dans la détection des adduits. Ils sont faciles à réaliser, peu coûteux, et peuvent aisément être réalisés avec un haut débit, par l'utilisation de plaques à 96 puits [Poirier, 2004]. Leur sensibilité est élevée, mais dépend surtout des caractéristiques de l'anticorps utilisé et c'est pour cette raison qu'une quantité variable d'ADN (entre 1 et 200 µg) est nécessaire pour une détection efficace des adduits [Himmelstein et coll., 2009]. Comme tous les types d'adduits n'ont pas d'anticorps spécifiquement dirigés contre eux, une réaction croisée peut se produire avec des produits chimiques analogues, rendant ces anticorps spécifiques d'une classe de produits chimiques. C'est notamment le cas pour l'anticorps destiné à détecter les adduits BaP-ADN, lequel peut également détecter les adduits formés par les autres HAP [Himmelstein et coll., 2009]. Pour les essais

réalisés en milieu liquide (CIA, DELFIA et ELISA), la quantification se fait à l'aide d'une courbe standard [Divi et coll., 2002], alors que l'immunohistochimie est plutôt qualitative. Elle est cependant réalisée sur des coupes de tissus, ce qui permet de faire l'analyse cellule par cellule et ainsi de localiser le type cellulaire portant les adduits [Hsu et coll., 1997; Farmer et Singh, 2008].

- *L'essai COMET*. Une modification de l'ADN par l'enzyme ADN formamidopyrimidine glycosylase permet de détecter spécifiquement les bases oxydées (dont les 8-OH-dG), plutôt que les bris à l'ADN. Cette technique modifiée a été rapportée pour la première fois par Collins et coll. [1993]. Cependant, des précautions particulières doivent être prises afin d'éviter d'oxyder l'ADN durant sa préparation, augmentant artificiellement la quantité de bases oxydées dans l'échantillon [Farmer et Singh, 2008].
- *La spectrométrie de masse couplée à un HPLC*. Utilisée depuis les années 1960, la chromatographie en phase gazeuse, couplée à un spectromètre de masse permet de séparer les constituants d'un mélange en fonction de leur poids moléculaire et de les identifier [Holman et coll., 1966]. De loin la plus spécifique, cette technique de détection des adduits est cependant la plus coûteuse, nécessitant du matériel très onéreux, ainsi que la synthèse d'adduits qui serviront de standards lors de la détection [Farmer et Singh, 2008; Marie et coll., 2008]. Cependant, la spécificité obtenue est maintenant comparable aux autres techniques, grâce aux avancées technologiques majeures des dernières années, comme l'utilisation de spectromètres de masse en mode tandem (SM/SM), l'utilisation d'un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par matrice et un analyseur de temps de vol (MALDI-TOF), etc. servant à identifier ces adduits [Farmer et Singh, 2008]. L'avantage majeur de cette classe de techniques est qu'elles permettent une analyse structurale inégalée des adduits. Cependant, des quantités importantes d'ADN peuvent être nécessaires (entre 10 et 500 µg), en fonction de l'équipement utilisé [Marie et coll., 2008].

5.3.2. LES MÉTHODES DE MESURE DES BRIS À L'ADN

Plusieurs méthodes différentes permettent de mesurer les bris à l'ADN. Certaines sont réalisées sur un ensemble de cellules et vont analyser le comportement hydrodynamique de l'ADN et déduire le nombre de BSB par comparaison avec un échantillon témoin. Les méthodes suivantes font partie de ce groupe : la sédimentation de l'ADN sur gradient de sucrose et l'éluion alcaline de l'ADN fixé sur une membrane [Ahnstrom, 1988]. Ces techniques ont progressivement laissé la place à d'autres méthodes permettant l'analyse de cellules isolées, comme la synthèse non-programmée d'ADN (UDS) et l'essai COMET. L'essai EM-ISEL, développé dans notre laboratoire il y a une quinzaine d'année [Assad et coll., 1997], fait également partie de ce groupe.

5.3.2.1. *La synthèse non programmée de l'ADN (UDS)*

La synthèse non programmée de l'ADN (UDS) se produit *in vivo* et *in vitro* dans les cellules qui ne sont pas dans un état actif de prolifération. Cette synthèse se produit en réponse à l'action de composés produisant des dommages à l'ADN. Le développement de la méthode permettant de visualiser cette synthèse non-programmée fut réalisé par Segal et coll. [1976] qui étudiaient la réparation de l'ADN de spermatozoïdes de souris. L'UDS est un test radioactif, généralement réalisé sur les hépatocytes, mais également sur d'autres cellules en culture comme les fibroblastes et les cellules épithéliales mammaires et ovariennes [Madle et coll., 1994; Latimer et coll., 2008; Limsirichaikul et coll., 2009]. Ce test permet de détecter l'incorporation de nucléotides radio-marqués lors de la réparation par NER. La détection se fait par autoradiographie et demande le comptage des grains d'argent déposés sur les films exposés durant 5 à 7 jours [Valentin-Severin et coll., 2004].

Cette méthode est utilisée comme outil de diagnostic et de recherche pour des maladies génétiques affectant ce système de réparation, comme le *Xeroderma pigmentosum* [Limsirichaikul et coll., 2009]. En ce qui a trait à l'évaluation du potentiel génotoxique des produits chimiques, l'UDS fait partie des tests approuvés pour évaluer les dommages à l'ADN produits *in vivo* suite à l'administration du composé d'intérêt [Brambilla et coll., 2010]. En raison de l'utilisation de la radioactivité et du long délai nécessaire pour

visualiser les résultats, cette méthode ne plaît pas à tous et ne s'est pas répandue dans tous les laboratoires. C'est pourquoi le récent développement d'une version non-radioactive de cet essai pourrait être très intéressant [Limsirichaikul et coll., 2009]. La validation de cette variante devrait être suivie avec attention.

5.3.2.2. *L'essai COMET*

L'essai COMET est ainsi nommé en raison de l'allure de comète prise par les cellules contenant des bris à l'ADN, lors de leur visualisation au microscope à fluorescence. Cette essai a été mis au point en 1984 par Ostling et Johanson et s'effectue sur des cellules isolées qui sont en suspension dans une fine couche de gel d'agarose déposé sur une lame microscopique. Les cellules sont d'abord lysées afin de libérer les noyaux, puis l'ADN est soumis à un traitement à pH 13 qui va dérouler entièrement l'ADN. Les sites abasiques seront convertis en bris simple-brin durant cette opération. Par la suite, les lames contenant les noyaux traités sont soumises à un champ d'électrophorèse. Les molécules d'ADN les plus petites (donc provenant de cellules contenant plus de bris), vont migrer plus rapidement dans le gel que les plus grandes molécules (peu brisées). Après une étape de neutralisation, les lames sont colorées au DAPI et visualisées au microscope à fluorescence [Tice et coll., 2000]. Cette méthode est applicable à tous les types de cellules et ne demande pas de culture préalable, ce qui en fait un intéressant test de surveillance biologique. Cet essai est utilisé dans tous les milieux : en écotoxicologie marine et des sols, en situation d'exposition *in vivo* ou *in vitro*, utilisant autant des cellules animales qu'humaines, etc. Le très grand nombre d'entrées dans PubMed avec les termes COMET et *genotoxicity* (plus de 1200), est un reflet de la très grande popularité de cet essai.

L'essai COMET permet d'évaluer l'intensité des dommages à l'ADN des cellules exposées, en comparaison avec les cellules non exposées (bris simple- et double-brin, sites abasiques, intermédiaires de réparation, tous confondus). Ce test est actuellement en cours de validation pour être utilisé en surveillance biologique et en analyse des risques génotoxiques [Moller, 2006; Burlinson et coll., 2007]. Au Québec, il est encore peu utilisé et est actuellement mis au point au laboratoire des biomarqueurs de l'Institut national de la santé publique du Québec. Par ailleurs, une proposition de ligne de conduite serait

actuellement en cours d'écriture au sein de l'OCDE, pour l'utilisation de l'essai COMET comme test visant à évaluer la génotoxicité d'un composé chimique (OECD 2010).

5.3.2.3. *L'essai EM-ISEL*

L'essai EM-ISEL a été mis au point au laboratoire du Dre Nicole Lemieux de l'Université de Montréal il y a une quinzaine d'années [Assad et coll., 1997; Assad et coll., 1999]. Cet essai permet de détecter spécifiquement les bris simple-brin à l'ADN et les sites abasiques en trois étapes successives. Premièrement, les bris et sites abasiques sont amplifiés par l'action de l'exonucléase III qui a une activité exonucléasique 3' → 5'. Deuxièmement, une synthèse de l'ADN par le fragment Klenow de la polymérase I incorpore des dUTP couplés à la biotine dans l'ADN néo-synthétisé. Et finalement, les nucléotides marqués sont détectés par un anticorps anti-biotine couplé à de l'or colloïdal. Les particules d'or utilisées ont un diamètre moyen de 10 nm et peuvent être visualisées en microscopie électronique à transmission [Depault et coll., 2006] (Annexe 1, Figure 1, page lxiii). L'analyse de l'EM-ISEL est effectuée sur des microphotographies prises au microscope électronique à transmission. Dans notre laboratoire, l'essai EM-ISEL fut utilisé pour évaluer la génotoxicité de divers biomatériaux et produits toxiques : alliage nichel-titane, acier inoxydable, CdCl₂, K₂CrO₄, ainsi que différentes espèces de nickel [Assad et coll., 1997; Assad et coll., 1999; M'Bemba-Meka et coll., 2005; Depault et coll., 2006].

5.4. Les mécanismes de réparation à la base des aberrations vues en cytogénotoxicité

Les aberrations détectées avec les tests de cytogénotoxicité sont causées par une variété de lésions, incluant les bris simple- et double-brin, les bases modifiées (comme la 8-OH-dG) et les bases portant des adduits. De plus, des atteintes cellulaires au fuseau mitotique et au système régulant le point de contrôle de la phase M peuvent aussi entraîner des aberrations cytogénotoxiques. Les mécanismes impliqués dans la formation de ces lésions, avec une attention particulière aux lésions causées par l'exposition au BaP, seront présentés dans cette section. Tel que mentionné dans la section 1.2 (page 7), les systèmes

de réparation actifs durant la phase G₁ et G₂ sont la réparation par excision des nucléotides (NER), par excision de base (BER) et par recollage d'extrémités non homologues (*non-homologous DNA end-joining* ou NHEJ). Durant la phase S, c'est la réparation par recombinaison homologue (HRR) qui est la plus active, avec la réparation des bases mal appariées (MMR). L'activité de la NHEJ, de la NER et la synthèse translésionnelle le sont également.

5.4.1. LA RÉPARATION DES ADDUITS À L'ADN ET LES BRIS SIMPLE-BRIN À L'ADN

La présence d'adduits à l'ADN entraîne l'activation de multiples systèmes de réparation qui s'orchestreront en fonction de l'étape du cycle cellulaire dans laquelle se trouve la cellule, de l'endroit dans le génome où est situé l'adduit, ainsi que de sa nature et de sa stabilité. La réparation de l'ADN qui s'ensuit produit un certain nombre de bris simple-brin (BSB) à l'ADN qui seront présents de façon transitoire dans l'ADN, comme intermédiaires de réparation [Bergoglio et Magnaldo, 2006]. Par ailleurs, des BSB à l'ADN peuvent aussi être générés lors du métabolisme du BaP, en réaction à la formation des ERO (discuté dans la section 0, page 55). Les systèmes de réparation NER et BER seront traités ici.

Parmi les intéressantes questions toujours ouvertes à propos des bris à l'ADN et de leur réparation se trouvent celle-ci : l'induction des bris est-elle la même dans l'euchromatine active où la chromatine est ouverte, que dans l'euchromatine inactive et l'hétérochromatine, où la chromatine est beaucoup plus condensée? La présence de γ H2AX (histone variante H2AX phosphorylée) a longtemps été considérée comme un marqueur de la présence de bris à l'ADN. Des études de co-localisation de γ H2AX avec certaines protéines contenues dans les foci de réparation semblent suggérer que ces foci se retrouveraient surtout dans l'euchromatine active. Cependant, de plus en plus d'évidences pointent vers l'absence de γ H2AX dans l'hétérochromatine, non en raison de l'absence de bris, mais en raison de la compaction qui y est présente [Falk et coll., 2010]. Une autre intéressante question demande si les bris à l'ADN sont réparés sur le lieu même de leur formation ou sont déplacés vers des sous-compartiments nucléaires comparables à des

échoppes spécialisées en réparation. Cette dernière option expliquerait du même coup les erreurs de recollage du NHEJ. Plusieurs études mènent à rejeter l'hypothèse des échoppes de réparation, cependant, les mouvements causés par la décondensation de la chromatine, requise pour effectuer la réparation, de même que le fait que les domaines occupés par les différents chromosomes s'interpénètrent, expliqueraient les erreurs de recollage [Falk et coll., 2007; Trinkle-Mulcahy et Lamond, 2008]. Il ne faut cependant pas oublier que la majorité des événements de réparation par NHEJ conservent intacte la séquence initiale de l'ADN [Lieber et coll., 2010].

5.4.1.1. *La réparation par excision des nucléotides (NER)*

Ce système de réparation élimine les adduits causés par divers produits chimiques (aflatoxine B₁, HAP, certains agent alkylants comme la cyclophosphamide, etc.) et chimiothérapeutiques comme le cisplatine (causant des liaisons covalentes inter- ou intra-brins). La NER retire également les photo-produits causés par les UV et les agents mimant l'action des UV.

La NER comporte deux voies qui diffèrent au niveau de la reconnaissance de la lésion (**Figure 16**, page 86). Il y a la TC-NER qui est couplée à la transcription et qui reconnaît les lésions présentes sur le brin activement transcrit des gènes. Cette reconnaissance se fait quand la RNA polymérase II est bloquée par la lésion. Les protéines CSA et CSB vont aller retirer cette RNA polymérase et recruter XPA ainsi que les facteurs nécessaires à l'ouverture du brin d'ADN, faisant partie du complexe transcriptionnel TFIIH.

La seconde voie est la GC-NER qui reconnaît les lésions situées partout ailleurs dans le génome. Le complexe comprenant les protéines p48, p127 et XPC reconnaît les lésions, puis XPA et le complexe transcriptionnel TFIIH sont recrutés. En deuxième étape, il y a ouverture de l'ADN, puis excision d'un fragment d'une longueur de 27 à 29 nucléotides, contenant la lésion. Finalement, l'ADN polymérase δ ou ϵ synthétise le nouveau brin d'ADN, puis la ligature est effectuée. La réparation des adduits BPDE-ADN est réalisée par les deux voies de la NER, en fonction de leur localisation dans le génome [Braithwaite et coll., 1998].

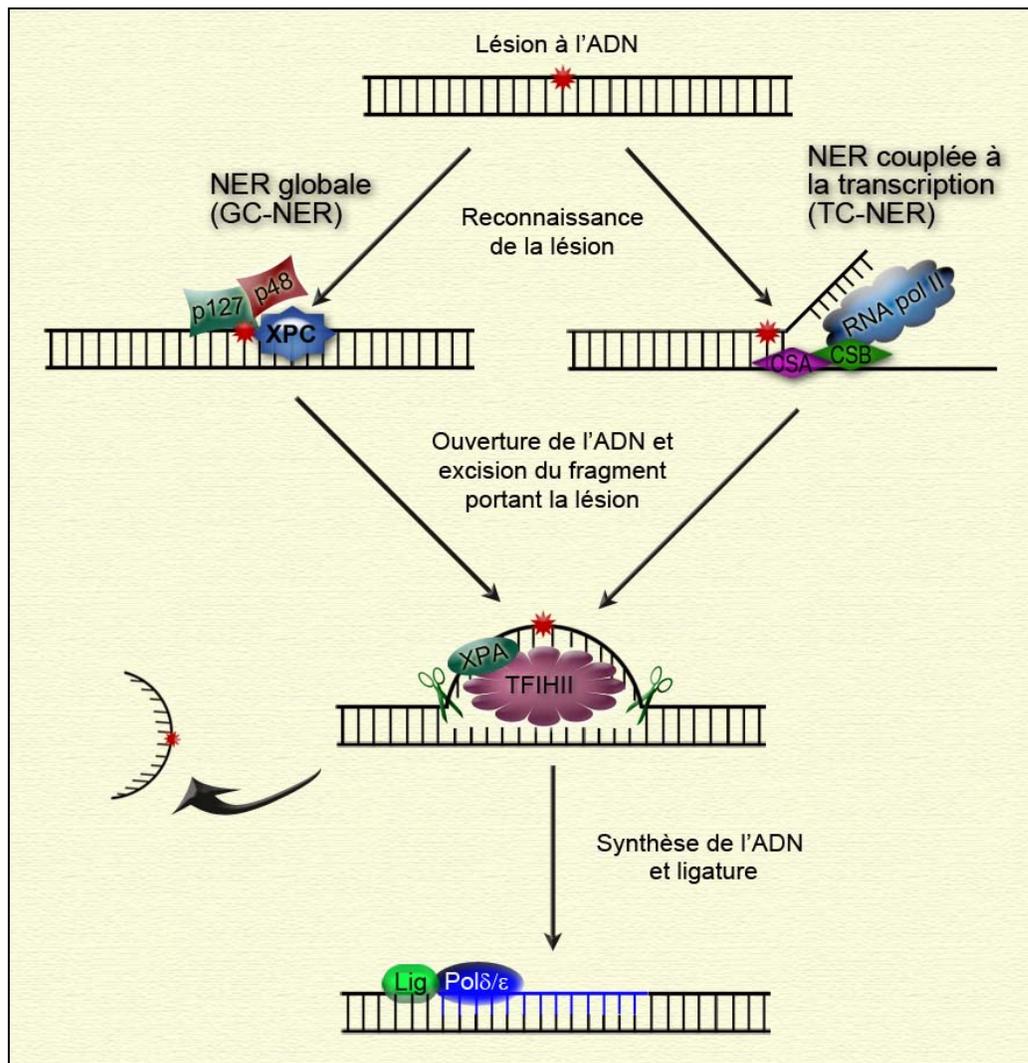


Figure 16: Schéma simplifié de la voie de réparation par excision des nucléotides (NER).

5.4.1.2. La réparation par excision de bases (BER)

Ce système de réparation permet de retirer la base endommagée et de la remplacer par une nouvelle. Ce type de remplacement, appelé réversion, est possible pour certains types de dommages seulement, comme les bases oxydées, alkylées et désaminées, ainsi qu'en présence d'uridine dans l'ADN [Friedberg et coll., 2006]. Deux voies de réparation sont également possibles pour la BER : la voie courte, qui va retirer uniquement la base endommagée et la voie longue, qui retirera également quelques bases supplémentaires. Le

mécanisme par lequel se fait le choix de la voie de réparation est peu compris. Il semblerait que la concentration relative d'ATP disponible au site de la réparation ait un rôle à jouer, de même que la capacité de la pol β à retirer le désoxyribosephosphate en position 5', qui est généré par l'ADN glycosylase à la première étape de la BER [Robertson et coll., 2009].

Brièvement, la BER se déroule ainsi (**Figure 17**, ci-dessous). Tout d'abord, la lésion est reconnue et retirée par une ADN glycosylase spécifique. Il existe 11 glycosylases différentes chez l'humain, dont OGG1 et NEIL1 qui reconnaissent les 8-OH-dG [Robertson et coll., 2009]. Cette étape laisse un site abasique (*AP site*) sur l'ADN. Par la suite, il y a coupure de l'armature de sucres-phosphate par une AP endonucléase ou par une AP lyase.

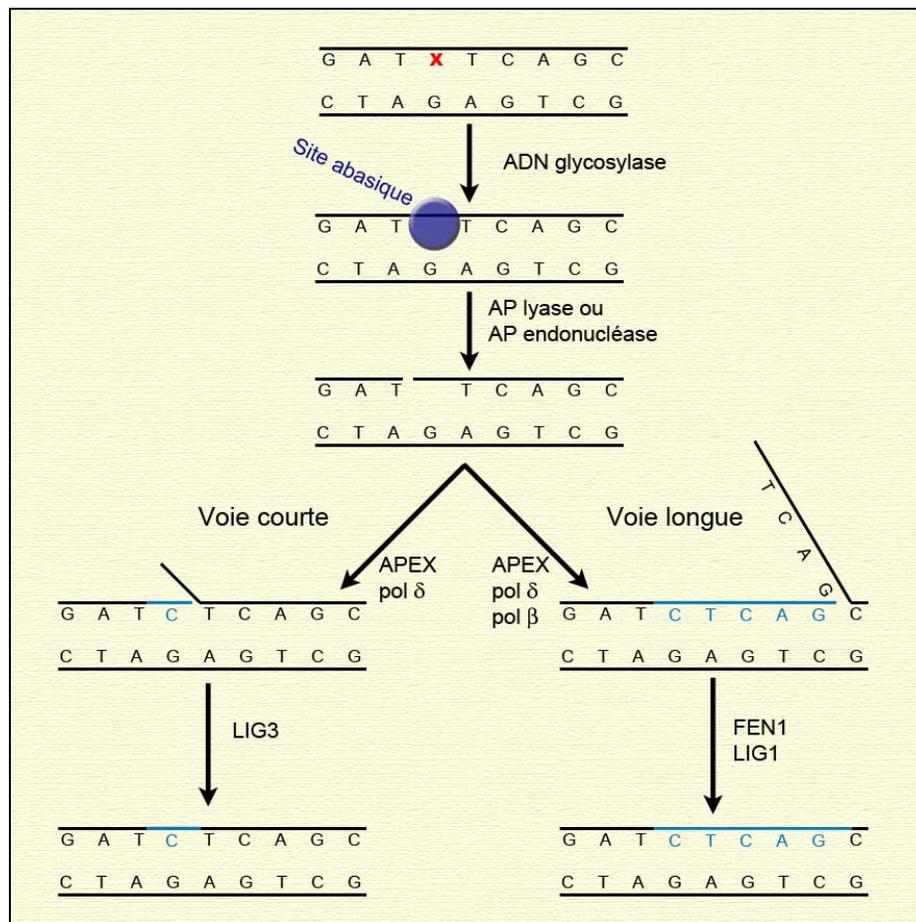


Figure 17: Schéma simplifié de la voie de réparation par excision de bases (BER).

Certaines glycosylases possèdent également une activité lyase. Ceci laisse un bris simple-brin en position 5' de la base retirée. Par la suite, il y a resynthèse de la base retirée

(voie courte) ou de plusieurs bases (voie longue). L'armature de sucres-phosphate en trop (le « flap ») est retirée, puis la ligature est effectuée.

L'exposition aux HAP génère des sites abasiques qui sont produits spontanément, par instabilité de l'adduit HAP-ADN, ou sont produits comme intermédiaires de réparation des lésions oxydatives qui apparaissent durant leur métabolisme [Flowers et coll., 1997; Braithwaite et coll., 1998; Melendez-Colon et coll., 2000; Park et coll., 2006]. Dans un essai *in vitro* de Braithwaite et coll. [1998], la réaction des diol-époxydes de différents HAP (BaP, chrysène, benzo-b-fluoranthène, benz-a-anthracène) avec de l'ADN plasmidique, a permis de déterminer que les adduits BPDE-ADN sont nettement plus stables que les adduits générés par le chrysène et le fluoranthène, qui dépurinent très rapidement. Cependant, dans des cellules métaboliquement compétentes, l'exposition au BaP et au diméthyle benz-a-anthracène (DMBA) montre que peu de sites abasiques sont générés après 4 h d'exposition. Toutefois, une exposition de 24 h augmente significativement le nombre de sites abasiques générés par ces deux produits [Melendez-Colon et coll., 2000].

5.4.2. LA RÉPARATION DES BRIS DOUBLE-BRIN ET LES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES

Comme on a pu le voir, les intermédiaires de réparation par NER et par BER génèrent des bris simple-brin (BSB) à l'ADN. Si la réparation n'est pas complétée avant l'arrivée de la fourche de réplication, ces BSB deviendront des bris double-brin (BDB). Par ailleurs, les BDB peuvent également être causés par l'action des rayonnements ionisants naturellement présents dans notre environnement et par l'action des ERO qui causent des BSB. En effet, des BSB situés très près l'un de l'autre, sur les deux brins antiparallèles de l'ADN, sont reconnus comme des BDB [Lieber et coll., 2006]. La réparation des BDB est effectuée par deux systèmes : la NHEJ et la HRR [Gonzalez-Barrera et coll., 2003; Delacôte et Lopez, 2008; Lieber et coll., 2010]. Le choix de l'un ou l'autre système dépendra principalement de la phase du cycle cellulaire, mais également du contexte dans lequel se trouve le BDB.

Le système HRR est actif du milieu de la phase S, jusqu'à la phase G2, alors que le système NHEJ est actif durant toutes les phases du cycle cellulaire [Delacôte et Lopez,

2008; Lieber et coll., 2010]. Cependant, il semble que le NHEJ serait réprimé durant la phase S et il contribuerait à la réparation de BDB produits durant la phase G1. Ces bris double-brin seront transférés à la chromatide-sœur après la réplication, produisant un BDB chromosomique (**Figure 18**, au-dessous).

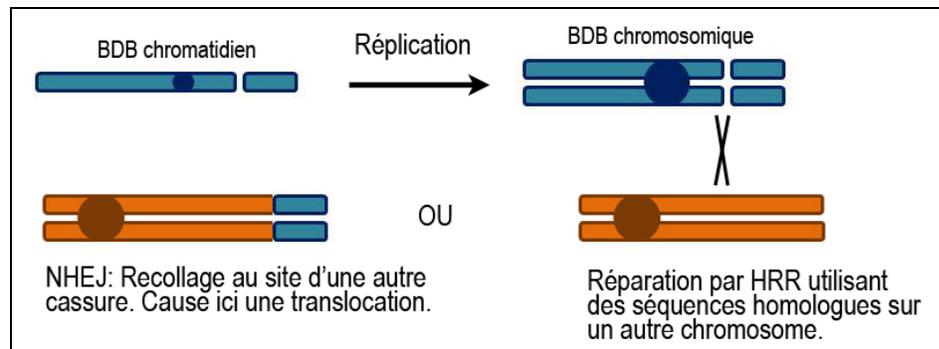


Figure 18: Formation d'un bris double-brin chromosomique et sa réparation incorrecte par le système NHEJ ou le système HRR.

Le devenir de ce BDB chromosomique est variable, quatre situations pouvant se produire :

- Le BDB n'est pas réparé. Cela causera une cassure chromosomique.
- Le système NHEJ effectue la réparation correctement en recollant les bouts. Aucune anomalie chromosomique de structure ne sera produite.
- Le système NHEJ effectue incorrectement la réparation : l'extrémité du chromosome est recollée ailleurs dans le génome au site d'une autre cassure et une anomalie de structure est produite (comme par exemple la translocation, ou encore l'insertion, etc. **Figure 19** d et g, page 90).

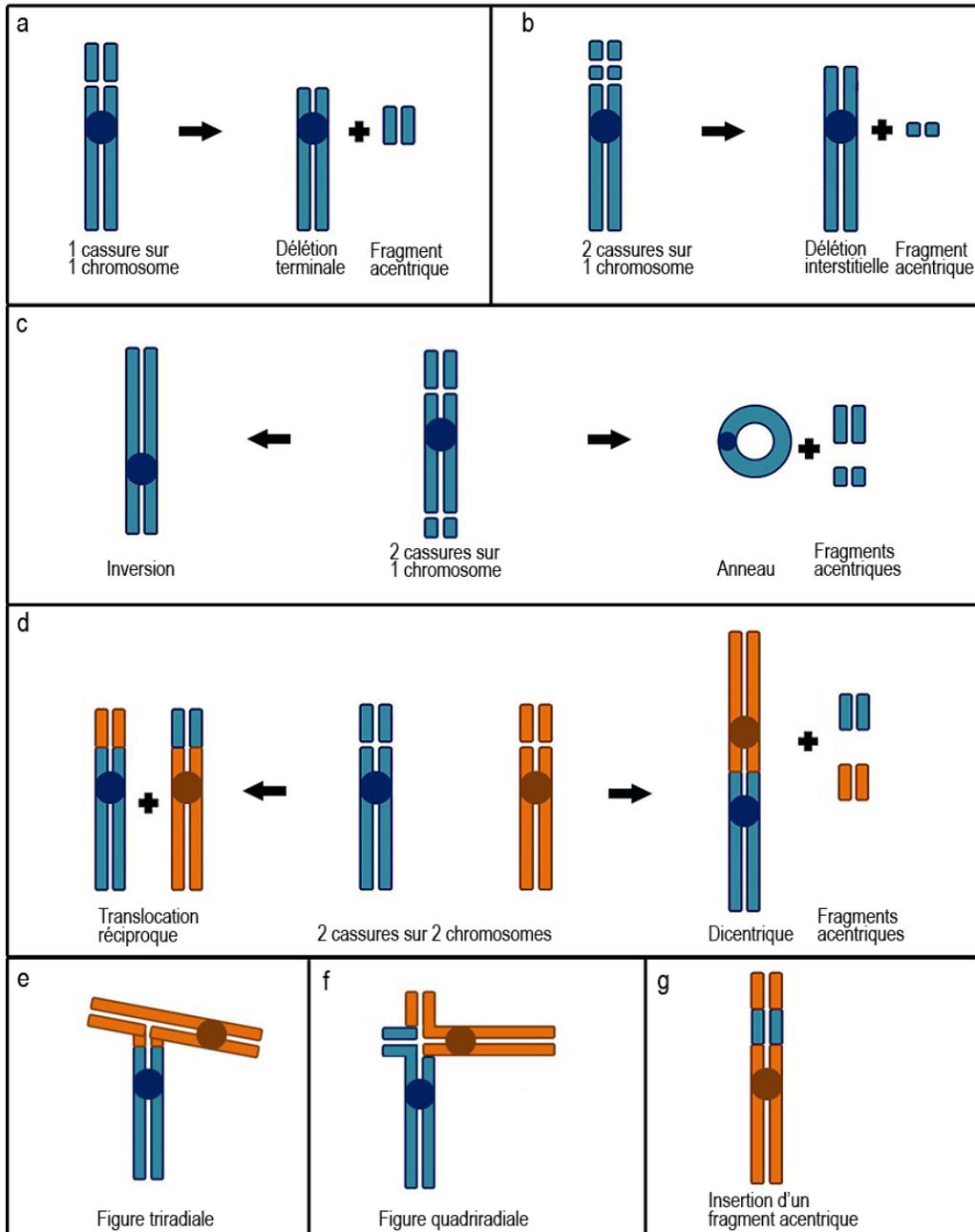


Figure 19: Principales anomalies chromosomiques pouvant être produites par réparation erronée des bris double-brin par le système NHEJ. Certains mécanismes de formation sont illustrés. Certaines de ces anomalies seront visibles lors de la réalisation du test des AC conventionnel.

- Le système HRR effectue la réparation en recherchant une séquence homologue sur un autre chromosome. Si l'autre chromosome est le second de la paire, la séquence réparée sera maintenant identique sur ces deux chromosomes; on parle alors d'une perte d'hétérozygotie. Si l'autre chromosome est différent, la réparation pourrait entraîner de l'instabilité génétique [Delacôte et Lopez, 2008].

En phase G_1 , le système de réparation NHEJ effectue la réparation des BDB. Si deux BDB sont formés et qu'ils sont près l'un de l'autre, une réparation erronée par ce système entraînera l'apparition de diverses anomalies de structure [Delacôte et Lopez, 2008], telles des délétions, inversions, translocations, dicentriques, et anneaux, ainsi que des fragments acentriques (ne contenant pas de centromère). Ces anomalies de structure se produisant en phase G_1 , le passage par la phase S les dupliquera et ces anomalies deviendront chromosomiques, c'est-à-dire que les deux chromatides seront affectées par l'anomalie de structure (**Figure 19** a à d, page 90).

La réparation erronée de bris double-brin en G_2 par le système NHEJ donnera lieu à des réarrangements plus complexes, comme des figures triradiales et quadriradiales (**Figure 19** e et f, page 90), dont les cassures sont originellement chromatidiennes. Finalement, les fragments acentriques, dont l'une ou les deux extrémités sont dites collantes, peuvent soit être perdus ou aller se recoller au site d'une autre cassure non-réparée (voir l'insertion, **Figure 19** g, page 90), ce qui augmente la complexité des anomalies pouvant être retrouvées. Ainsi, plus le nombre de cassures survenues dans une cellule est élevé, plus le patron des anomalies de structure retrouvé dans cette cellule (appelées « aberrations » dans la littérature) sera complexe.

Comme nous avons pu le voir, le système NHEJ a tendance à faire des erreurs, en raison même de sa nature. Brièvement, lorsqu'un BDB est produit, ou lorsque deux BSB sont très proches l'un de l'autre et situés sur les deux brins de l'ADN, la protéine Ku va se fixer sur les deux extrémités double-brin de l'ADN, pour les rapprocher (**Figure 20** A et B, page 92). Or, les extrémités rapprochées par Ku ne sont pas toujours celles qui devraient être ensemble. En fait, il semblerait que Ku rapproche deux extrémités au hasard. Le hasard

aura tendance à être favorable lorsqu'il y a peu de BDB à réparer. Mais lorsque le nombre de BDB est élevé, un mélange peut se produire [Delacôte et Lopez, 2008]. Suite au rapprochement des brins d'ADN par Ku, la ligature par le complexe Ligase IV peut se faire directement lorsque les extrémités sont cohésives. Cependant, lorsque ce n'est pas le cas, la polymérase μ fera une courte synthèse d'ADN avant que le complexe ligase IV ne ligature. Comme la polymérase μ n'a pas besoin de gabarit, elle insère les nucléotides au hasard et peut créer de courtes

séquences répétées, avant que la ligature soit faite. Ces séquences répétées, placées en tandem ou inversées, ont été retrouvées à plusieurs sites de réparation par NHEJ, notamment dans la

translocation (1;19)(q23;p13.3) entre les gènes *TCF3* (aussi appelé *E2A*) et *PBX1* retrouvée dans la leucémie lymphoblastique aigue [Lieber et coll., 2010].

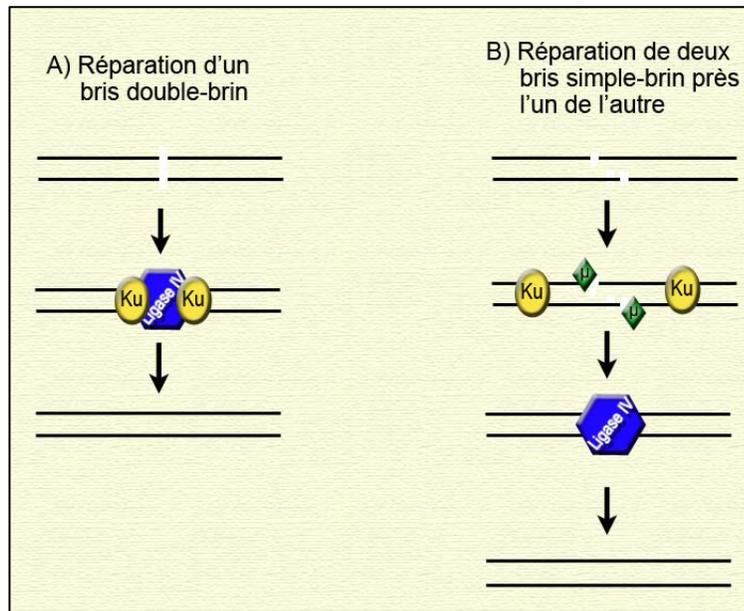


Figure 20: Schéma simplifié de la réparation par recollage d'extrémités non homologues (NHEJ).

5.4.3. LA RÉPARATION PAR RECOMBINAISON HOMOLOGUE (HRR) ET LES ÉCHANGES ENTRE CHROMATIDES-SŒURS (ÉCS)

La HRR est active du milieu de la phase S jusqu'à la phase G2. Elle est déclenchée par la protéine ATR lorsqu'il y a un arrêt de la fourche de réplication (AFR). Ces arrêts sont causés par la présence d'un adduit à l'ADN, d'une liaison covalente entre les deux brins d'ADN (produite par un agent pontant comme le cisplatine), d'une liaison entre deux bases (présence d'un photo-produit formé par les UV), d'une base anormale (comme la 8-méthyle-dG) ou encore d'un bris double-brin [Andreassen et coll., 2006].

ATR agit comme senseur et repère les AFR, puis phosphoryle une gamme de protéines effectrices, dont les protéines du complexe MRN, formé de Mre11, Rad50 et Nbs1. Lorsqu'un AFR est causé par un BDB, le complexe MRN se fixe sur les extrémités 3' des BDB (**Figure 21**, ci-bas), pour les stabiliser [Andreassen et coll., 2006].

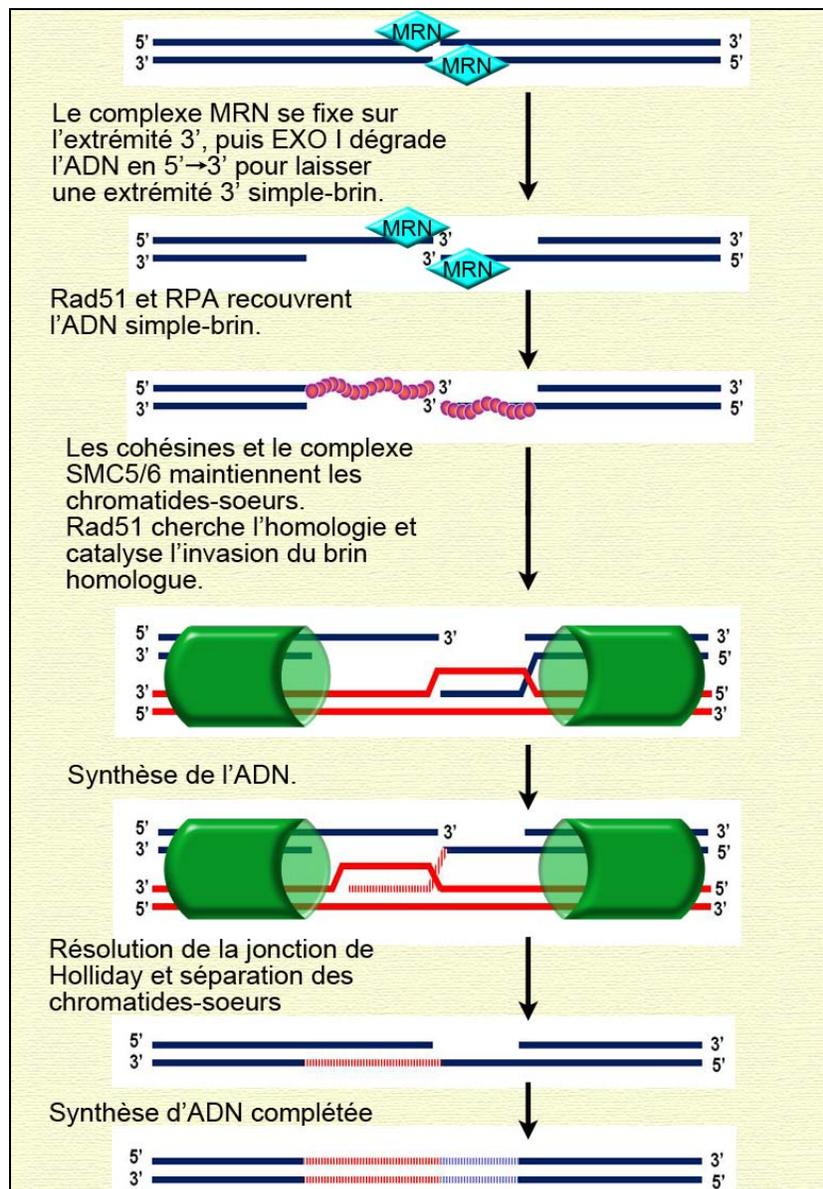


Figure 21: Schéma simplifié de la réparation d'un bris double-brin par le système de réparation par recombinaison homologue (HRR).

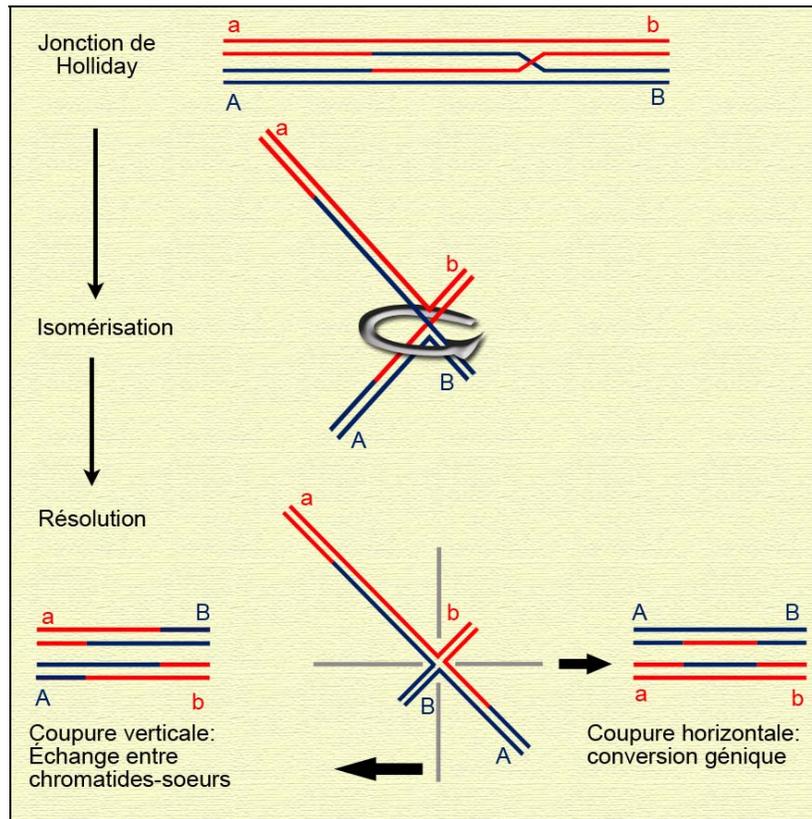


Figure 22: Résolution de la jonction de Holliday, une étape intermédiaire lors de la réparation par recombinaison homologue.

L'exonucléase I digère l'ADN du brin 5', en direction 3', laissant ainsi un segment d'ADN simple-brin libre. Ces segments simple-brin sont protégés par RPA, puis par Rad51. Le complexe Smc5/6 se fixe sur les chromatides-sœurs, en réponse au signal donné par ATR, puis recrute les cohésines afin de maintenir les chromatides-sœurs rapprochées [Potts et coll., 2006]. Rad51 peut alors rechercher des séquences homologues sur la chromatide-sœur et catalyser son invasion par le segment simple-brin. Suite à l'établissement de liaisons hydrogènes entre le segment simple-brin et le brin complémentaire de la chromatide-sœur, la synthèse de l'ADN débute et se poursuit jusqu'à ce que le segment simple-brin ait été complètement répliqué.

Il y a enfin résolution de la jonction de Holliday, puis la synthèse de l'ADN est terminée et les ligatures sont effectuées. La résolution de la jonction de Holliday (**Figure 22**, ci-haut) demande l'action d'une résolvasse, qui pourrait être la RecQ hélicase RecQL,

aidée de Blm et de Brca2 [Hirano et coll., 2005; LeRoy et coll., 2005]. Lors de la résolution de cette jonction, deux types d'évènements peuvent survenir : une conversion génique (qui est l'évènement normal) ou un échange entre chromatides-sœurs.

Dans le cas où les AFR sont causés par des bases anormales, des adduits ou des liaisons covalentes, deux situations peuvent se présenter.

- Si la lésion empêche la HRR de se produire normalement, il y aura d'abord réparation de la lésion. C'est le cas des adduits BPDE-ADN (voir section 5.4.3 à la page 61 pour des détails) lorsqu'ils sont placés en position interne de la double hélice d'ADN, ainsi que des photo-produits (6-4) pyrimidine-pyrimidone. Ces lésions seront réparées par GC-NER avant le passage de la fourche de réplication [Johansson et coll., 2004; Auclair et coll., 2008]. En raison de la proximité du complexe GC-NER et de la fourche de réplication, la réparation ne serait pas complétée et laisserait une lacune de quelques paires de bases dans l'ADN qui serait perçue comme un signal de déclenchement de la HRR [Johansson et coll., 2004].
- Lorsque la HRR se produit normalement et que la lésion n'a pas été reconnue par le système NER (comme c'est le cas des bases méthylées et de certains adduits BDPE-ADN), l'étape de synthèse de l'ADN durant la HRR pourrait ne pas se faire correctement. En effet, ces lésions entraînent un mésappariement des bases et la polymérase δ de la HRR ne peut insérer de nucléotides. Il y aura donc synthèse translésionnelle avec une des polymérases de la famille Y (η , ι ou κ), suivie du retour de la polymérase δ après la lésion [Andreassen et coll., 2006]. Dans le cas des adduits BPDE-ADN, c'est la polymérase η qui effectue cette synthèse translésionnelle [Zhang et coll., 2002].

5.4.4. LES ANOMALIES DE LA DIVISION CELLULAIRE ET LES MICRONOYAUX

Deux phénomènes sont à la base de la formation des micronoyaux : la production d'un fragment chromosomique et le défaut d'attachement d'un chromosome au fuseau mitotique. Dans le premier cas, ce sont des agents dits clastogènes, qui causeront la formation de fragments chromosomiques. La formation de ces fragments a été discutée dans la section 5.4.2 (page 88) portant sur les mécanismes à la base des aberrations chromosomiques. Par ailleurs, les MN contenant des chromosomes entiers seront le produit d'agents aneugènes. Parmi les structures cellulaires dont l'altération par un agent aneugène peut mener à la formation d'un micronoyau, il y a le fuseau mitotique, les centrosomes et centrioles, ainsi que les centromères et kinétochores. Ces structures sont toutes connues pour mener à de l'aneuploïdie (discutée dans la section 1.2.1.1, page 11). L'identification du contenu des MN à l'aide de la FISH a beaucoup contribué à comprendre les mécanismes cellulaires en jeu dans leur formation. Ces mécanismes peuvent causer de la non-disjonction, de la malségrégation, altérer le fuseau mitotique de façon à ce que plusieurs chromatides ou chromosomes ne s'y attachent correctement et prennent du retard lors de l'anaphase, etc.

Ces deux phénomènes distincts à la base de la formation des MN pourraient expliquer l'hétérogénéité structurelle et fonctionnelle observée dans ces entités extranucléaires. L'observation morphologique, en microscopie électronique, des MN formés suite à l'action de la colchicine (un agent aneugène) révèle que certains MN présentent une enveloppe nucléaire incomplète, avec certaines zones sans lamina, alors que la distribution des pores nucléaires est très variable d'un MN à l'autre [Labidi et coll., 1987; Geraud et coll., 1989]. La transcription d'ARN est également observée dans la plupart de ces MN [Terradas et coll., 2010]. Quant aux MN produits par un agent clastogène, la structure de la membrane est le plus souvent normale, la lamina étant présente, avec une faible densité de pores nucléaires couplée à un transport déficient [Hoffelder et coll., 2004]. La transcription observée dans ces MN est hétérogène et semble restreinte aux MN comportant de la lamina B et ayant un transport fonctionnel [Utani et coll., 2007].

6. La cytogénotoxicité du benzo-a-pyrène et des HAP chez l'humain

Les sources d'exposition aux HAP sont nombreuses et à cause de leur association avec l'apparition de cancers, les travailleurs qui y sont exposés ont fait l'objet d'une surveillance biologique depuis les années 1980 environ. 44 études de surveillance biologique de travailleurs exposés aux HAP, publiées entre 1983 et 2010 ont été recensées. Les études retenues ont évalué l'un des trois biomarqueurs cytogénétiques suivants : aberrations chromosomiques, micronoyaux ou échanges entre chromatides-sœurs. Parmi celles-ci, 28 rapportent une augmentation significative d'un ou de plusieurs biomarqueurs cytogénétiques (**Figure 23**, ci-haut). Les travailleurs des industries suivantes présentaient une augmentation d'au moins un biomarqueur cytogénétique : four à coke (13 études), pavage (4 études), travaillant avec des cendres de charbon (3 études), policiers et chauffeurs d'autobus (3 études), mine de charbon (2 études), aéroport (1 étude), ramonage de cheminées (1 étude) et étudiants d'une école de réparation de moteurs au diesel (1 étude).

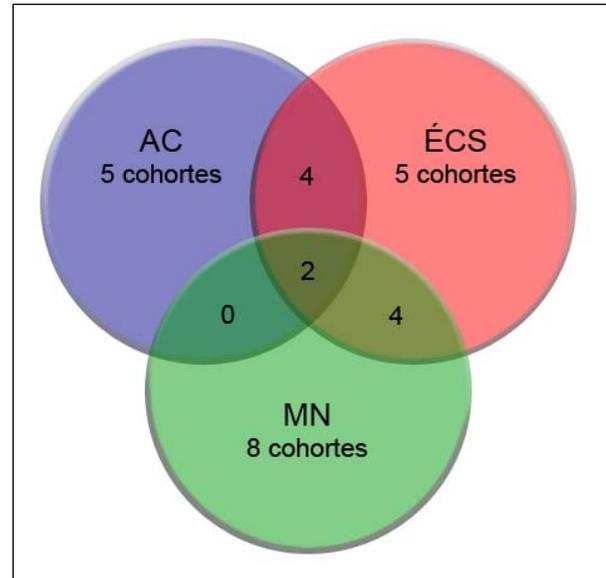


Figure 23: Diagramme de Venn indiquant le nombre de cohortes de travailleurs présentant une augmentation d'AC, d'ÉCS, de MN ou de plusieurs d'entre eux.

6.1. L'augmentation des aberrations chromosomiques

Onze cohortes rapportent une augmentation des AC. Deux proviennent de fours à coke [Bender et coll., 1988; Kalina et coll., 1998], deux de l'industrie du pavage [Major et coll., 1999, 2001], deux des mines de charbon [al-Sabti et coll., 1992; Donbak et coll.,

2005], une est exposée aux cendres de charbon [Celik et coll., 2007], une travaille dans les aéroports [Cavallo et coll., 2006] et trois sont composées de policiers affectés au contrôle du trafic automobile et de chauffeurs d'autobus [Beskid et coll., 2007; Sram et coll., 2007a; Sram et coll., 2007b].

Parmi les cinq études où une caractérisation de l'air a été effectuée, on a retrouvé une concentration de BaP variant entre 0,4 ng/m³ et 1,37 µg/m³, alors que la concentration des HAP cancérigènes varie entre 9,07 ng/m³ et 17,74 µg/m³. Quant à la mesure de 1-OH-pyrène urinaire, elle n'a été effectuée dans aucune de ces études. Chez les policiers affectés à la circulation et les chauffeurs d'autobus, l'analyse des AC par la méthode conventionnelle n'a montré aucune augmentation, alors que la variante du test des AC couplée à la FISH montre une augmentation des AC dans les trois cohortes étudiées : des translocations, insertions et autres aberrations complexes sont retrouvées. Par ailleurs, avec le retour du printemps et une diminution de la pollution atmosphérique, le niveau des AC revient à la normale [Sram et coll., 2007b].

6.2. L'augmentation des échanges entre chromatides-sœurs

Une augmentation des ÉCS est rapportée dans 15 cohortes. Huit proviennent de fours à coke [Miner et coll., 1983; Bender et coll., 1988; Motykiewicz et coll., 1992; Van Hummelen et coll., 1993; Buchet et coll., 1995; Forni et coll., 1996; Kalina et coll., 1998; Siwinska et coll., 2004], deux de l'industrie du pavage [Burgaz et coll., 1998; Major et coll., 2001], deux des mines de charbon [al-Sabti et coll., 1992; Donbak et coll., 2005], deux sont exposées aux cendres de charbon [Stierum et coll., 1993; Celik et coll., 2007] 1993) et une provient d'une école de réparation de moteurs au diesel [Karahalil et coll., 1998].

Parmi les quatre études où une caractérisation de l'air a été effectuée, on a retrouvé une concentration de BaP variant entre 0,068 et 1,37 µg/m³, alors que la concentration des HAP (totaux ou cancérigènes) varie entre 11,33 et 23,70 µg/m³. Quant à la mesure de 1-OH-pyrène urinaire, elle a été effectuée dans six études et varie entre 0,75 et 6,25 µMol/Mol de créatinine. Une corrélation a été retrouvée entre la mesure de 1-OH-pyrène urinaire et la moyenne d'ÉCS ou le pourcentage de cellules à haute fréquence d'ÉCS. Cette

corrélation a conduit deux équipes à proposer un index biologique de l'exposition (IBE) visant à protéger 95 % des travailleurs d'une augmentation de la moyenne des ÉCS (IBE = 1 $\mu\text{Mol/Mol}$ de créatinine [Siwinska et coll., 2004]) ou d'une augmentation du pourcentage de cellules à haute fréquence d'ÉCS (IBE - 2,7 $\mu\text{g/g}$ de créatinine (équivalant à 1,4 $\mu\text{Mol/Mol}$ de créatinine [Buchet et coll., 1995]). Par ailleurs, deux entreprises ont modifié leurs procédés de travail et ont vu chuter les biomarqueurs cytogénétiques mesurés (ÉCS et AC ou MN) à un niveau normal [Stierum et coll., 1993; Major et coll., 2001].

6.3. L'augmentation des micronoyaux sanguins

Une augmentation des MNs est rapportée dans 13 cohortes. Six proviennent de fours à coke [Xiao et coll., 2002; Leng et coll., 2004; Siwinska et coll., 2004; Liu et coll., 2006; Yang et coll., 2007; Pavanello et coll., 2008], deux de l'industrie du pavage [Burgaz et coll., 1998; Murray et Edwards, 2005], une des mines de charbon [al-Sabti et coll., 1992], une du ramonage de cheminées [Holmen et coll., 1994], deux sont exposées aux cendres de charbon [Stierum et coll., 1993; Celik et coll., 2007] et une provient d'une école de réparation de moteurs au diesel [Karahalil et coll., 1998].

Parmi les quatre études où une caractérisation de l'air a été effectuée, on a retrouvé une concentration de BaP variant entre 0,050 et 3,96 $\mu\text{g/m}^3$, alors que la concentration des HAP totaux varie entre 5,6 et 22,83 $\mu\text{g/m}^3$. Quant à la mesure de 1-OH-pyrène urinaire, elle a été effectuée dans huit études et varie entre 0,78 et 12,0 $\mu\text{Mol/Mol}$ de créatinine. Une augmentation des bris à l'ADN, mesurée par l'essai COMET a été rapportée dans deux de ces études, alors qu'une augmentation des adduits 8-OH-dG et HAP-ADN a été rapportée dans 3 autres études.

6.4. Les corrélations entre exposition et biomarqueurs cytogénétiques

11 études ont examiné les corrélations et associations existant entre l'exposition au HAP/ BaP et les biomarqueurs cytogénétiques mesurés. Parmi celles-ci, cinq ont noté des corrélations ou associations significatives. Par corrélation de rangs de Spearman, une faible corrélation significative entre la fréquence des MN et le niveau d'adduits a été retrouvée

chez des ramoneurs [Ichiba et coll., 1994], alors que le niveau d'ÉCS et d'AC sont significativement corrélés avec la durée de l'exposition aux HAP chez les mineurs de charbon [Donbak et coll., 2005] et que le niveau d'exposition aux HAP cancérogènes est significativement corrélé avec le pourcentage d'AC et la moyenne des ÉCS mesurés chez des travailleurs affectés aux fours à coke [Kalina et coll., 1998]. Par régression logistique multivariée, une association entre l'exposition aux HAP et la fréquence des cellules comportant des MN a été retrouvée chez des travailleurs affectés aux fours à coke [Liu et coll., 2006]. La cinquième étude montre que le niveau d'adduits mesuré chez des travailleurs affectés aux fours à coke explique 26 % de la variabilité observée dans la fréquence des MN ($p < 0,0001$), mais uniquement lorsque les travailleurs faisant partie du tertile supérieur lors de la mesure des adduits sont exclus de l'analyse, car ceux-ci présentent un plafonnement de leur fréquence des MN [Pavanello et coll., 2008]. Finalement, six études n'ont retrouvé aucune association ou corrélation significative entre le niveau ou la durée de l'exposition et un biomarqueur (ÉCS, CA ou MN) [Carstensen et coll., 1993; Van Hummelen et coll., 1993; Merlo et coll., 1997; Popp et coll., 1997; van Delft et coll., 2001; Siwinska et coll., 2004].

6.5. Les études où aucune augmentation d'un biomarqueur cytogénétique n'est observée

15 études ne rapportent aucune augmentation d'un biomarqueur cytogénétique. Deux incluent des travailleurs affectés aux fours à coke [Popp et coll., 1997; van Delft et coll., 2001], deux cohortes travaillent dans les salles d'électrolyse de l'aluminium ou de préparation des électrodes [Carstensen et coll., 1999; Crebelli et coll., 2002], trois sont de l'industrie du pavage [Jarvholm et coll., 1999; Cavallo et coll., 2006; Cavallo et coll., 2009], deux sont du ramonage de cheminées [Carstensen et coll., 1993; Ichiba et coll., 1994], deux présentent des policiers affectés au contrôle du trafic automobile [Bolognesi et coll., 1997; Merlo et coll., 1997], une provient des mines de charbon [Ulker et coll., 2008], une provient d'une fonderie d'acier [Kubiak et coll., 1999], une inclut des travailleurs dans un aéroport [Cavallo et coll., 2009], une présente des mécaniciens réparant des moteurs

diesel [Schoket et coll., 1999] et la dernière provient de pompiers [Jacobson-Kram et coll., 1993].

La caractérisation des HAP dans l'air a été effectuée pour neuf de ces études. Les concentrations de BaP ont varié entre 0,62 ng/m³ et 2,8 µg/m³, alors que la concentration de HAP totaux varie entre 1,34 et 8,8 µg/m³. La concentration de 1-OH-pyrène urinaire a été déterminée dans 6 cohortes et varie entre 0,3 et 4,31 µMol/Mol de créatinine. Une comparaison des intervalles de concentrations de BaP et HAP dans l'air, ainsi que de 1-OH-pyrène urinaire rapportés dans les études où aucune augmentation d'un biomarqueur cytogénétique n'a été observé (**Tableau V**, page 101) montre que :

- Les concentrations minimales rapportées sont inférieures aux minima des études où une augmentation des ÉCS et/ou des MN est observée.
- Les concentrations maximales sont également plus faibles que les maxima des études où une augmentation des ÉCS et/ou des MN est observée, mais sont compris dans l'intervalle rapporté.
- Les intervalles de concentrations de BaP et de HAP dans l'air sont inclus dans les intervalles des études où une augmentation des AC est observée.
- Sauf dans le cas de l'étude de Carstensen et coll. (1999), la concentration de 1-OH-pyrène urinaire est toujours inférieure aux BEI proposés par Siwinska et coll. (2004) et Buchet et coll. (1995).

Par ailleurs, une étude effectuée dans une fonderie d'acier rapporte une concentration maximale de HAP dans l'air de 13,72 µg/m³ et une moyenne de 1-OH-pyrène urinaire de 10,78 µMol/Mol créatinine, sans toutefois rapporter une augmentation significative de MNs [Kubiak et coll., 1999]. Les individus du groupe contrôle travaillent au sein de cette même fonderie, à des postes de travail impliquant peu d'exposition aux HAP et au BaP. Cependant, le niveau de MNs rapporté chez les contrôles étant assez élevé, cela soulève un doute quant à leur exposition à d'autres substances pouvant causer une augmentation des MNs. C'est pourquoi les données de cette étude n'ont pas été incluses dans les intervalles du groupe sans augmentation de biomarqueur cytogénétique.

Tableau V: Intervalles de concentrations de BaP et de HAP mesurées dans l'air, ainsi que de 1-OH-pyrène mesuré dans l'urine, rapportés dans les études de travailleurs exposés aux HAP, pour lesquelles un biomarqueur cytogénétique a été analysé : aberrations chromosomiques (AC), échanges entre chromatides-sœurs (ÉCS) et/ou micronoyaux (MN).

	[BaP] _{air}	[HAP] _{air}	[1-OH-pyrène] _{urine}
Pas d'augmentation d'AC, d'ÉCS ou de MN	0,62 ng/m ³ - 2,8 µg/m ³	1,34 – 8,8 µg/m ³	0,3 - 4,31 µMol/Mol créatinine
Augmentation d'AC	0,4 ng/m ³ - 1,37 µg/m ³	9,07 ng/m ³ et 17,74 µg/m ³ (HAP cancérrogènes)	Pas mesuré
Augmentation d'ÉCS	0,068 - 1,37 µg/m ³	11,33 - 23,70 µg/m ³	0,75 - 6,25 µMol/Mol créatinine
Augmentation de MN	0,050 - 3,96 µg/m ³	5,6 - 22,83 µg/m ³	0,78 - 12,0 µMol/Mol créatinine

Les études ont été regroupées en fonction de l'augmentation significative d'un des biomarqueurs cytogénétiques mesurés.

7. L'étude *in vitro* de la cytogénotoxicité du benzo-a-pyrène chez l'humain

Surtout effectuées avec des cellules hépatiques HepG2, les publications étudiant la cytogénotoxicité *in vitro* du BaP en utilisant le lymphocyte sanguin humain comme modèle sont très limitées en nombre. Et ceci alors que le lymphocyte humain demeure la cellule de choix pour effectuer la surveillance biologique de l'exposition aux HAP. De plus, ces études sont effectuées soit avec un nombre faible de sujets, soit à haute concentration de BaP, soit avec des temps d'exposition très courts ou très longs. Par ailleurs, la relation dose-réponse n'a été étudiée que dans une seule étude comprenant deux sujets. De plus, les relations existant entre l'exposition au BaP et les

biomarqueurs précoces n'ont pas été évaluées, probablement parce que ces études n'ont pas mesuré plusieurs biomarqueurs suite à l'exposition à quelques concentrations de BaP des lymphocytes de leurs sujets. Toutes les études publiées jusqu'à présent sont recensées ici (la plus récente datant de 2006) en fonction du biomarqueur étudié.

7.1. Les adduits BPDE-ADN

Chez l'humain, les adduits BPDE-ADN ont surtout été quantifiés suite à l'exposition *in vitro* de cellules HepG2, de même que dans les kératinocytes HaCat, ou encore comme outil de surveillance biologique de populations exposées aux HAP (adduits mesurés dans les lymphocytes sanguins). En ce qui concerne les lymphocytes sanguins humains, leur exposition *in vitro* au BaP a servi à la caractérisation des adduits présents dans ce type de cellules seulement [Okano et coll., 1979; Thompson et coll., 1989; Wiencke et coll., 1990; Holz et coll., 1991]. La quantification des adduits n'a donc jamais été effectuée dans les lymphocytes, suite à une exposition *in vitro* au BaP.

7.2. Les bris à l'ADN

La détection des bris à l'ADN suite à l'exposition *in vitro* de lymphocytes humains au BaP a été rapportée dans deux études. Après une exposition de une ou quatre heures à des concentrations de BaP variant entre 0,5 et 10 µg/mL, aucune augmentation des bris simple-brin détectables par l'essai COMET n'a été rapportée [Frenzilli et coll., 2000; Kleinsasser et coll., 2000]. Comportant un et 60 sujets respectivement, ces deux études ont été réalisées avec des lymphocytes quiescents (phase G₀ du cycle cellulaire), c'est-à-dire sans induction mitogénique à la PHA. Subséquemment l'activation métabolique du BaP avec le mélange S9 sur ces lymphocytes quiescents a permis une induction significative des bris à l'ADN chez le sujet analysé par Frenzilli et coll. [2000].

7.3. Les aberrations chromosomiques

Seules deux études ont analysé les AC sur des lymphocytes sanguins exposés *in vitro* au BaP. Effectuée en 2001 sur 38 sujets [Salama et coll., 2001], l'exposition à 1 et 10 $\mu\text{g/mL}$ de BaP durant 26 h montre une augmentation significative des AC dans ce groupe. Les AC ont été analysées de façon non conventionnelle par FISH, en utilisant deux sondes reconnaissant les séquences alpha-satellites et classiques du centromère du chromosome 1. Ainsi réalisée, cette technique a permis de détecter les cassures au niveau du centromère du chromosome 1. Par ailleurs, une étude publiée en 2006 [Guyen et coll., 2006] a été réalisée chez 31 sujets (15 hommes et 16 femmes), dont les lymphocytes ont été exposés à 1,25 $\mu\text{g/mL}$ de BaP durant 24 ou 48 heures. Une augmentation significative des AC a été rapportée dans ces deux conditions.

7.4. Les échanges entre chromatides-sœurs

Six études ont analysé les ÉCS sur des lymphocytes humains exposés *in vitro* au BaP. Une très courte exposition à 0,2 – 5 ou 10 $\mu\text{g/mL}$ de BaP durant 2,5 h, suivie de 24 h de culture, n'a pas suffi à provoquer une hausse significative des ÉCS dans les lymphocytes [Lo Jacono et coll., 1992]. Cependant, une exposition variant entre 48 et 68 h, avec des concentrations de BaP variant entre 1,25 et 50 $\mu\text{g/mL}$, a causé une augmentation significative des ÉCS au niveau des groupes comportant, respectivement, deux, 23 et 31 sujets [Warshawsky et coll., 1995; Salama et coll., 2001; Guven et coll., 2006]. Par ailleurs, dans une autre étude effectuée sur deux sujets avec de très faibles concentrations de BaP (0,0025 à 1,25 $\mu\text{g/mL}$), l'exposition des lymphocytes durant 51 h a montré une augmentation des ÉCS pouvant être significative (tests statistiques pas effectués) à partir de 0,0125 $\mu\text{g/mL}$ pour le sujet 1 et de 0,025 $\mu\text{g/mL}$ pour le sujet 2 [Wiencke et coll., 1990]. La courbe dose-réponse semble comparable pour ces deux sujets, avec une augmentation croissante de la moyenne des ÉCS, en fonction de la concentration de BaP testée. Finalement, dans la dernière étude où l'exposition au BaP effectuée durant 72 h est faite en présence du mélange S9, une augmentation significative des ÉCS est rapportée à toutes les concentrations de BaP testées (1 à 15 $\mu\text{g/mL}$) [Cho et Chung, 2003].

7.5. Les micronoyaux sanguins

Concernant l'étude des micronoyaux sanguins, les études *in vitro* ont été effectuées autant sur des cultures de sang complet (ce qui est le type habituel de culture), qu'après isolement des lymphocytes/ monocytes. Six études ont analysé les MNs sur des lymphocytes humains exposés *in vitro* au BaP, cultivés dans le sang complet ou après isolement des lymphocytes/ monocytes. Une très courte exposition à 0,2 – 5 ou 10 µg/mL de BaP (2,5 h), suivie de 24 h de culture, n'a pas provoqué une hausse significative de la fréquence des MNs dans les lymphocytes humains cultivés en sang complet [Lo Jacono et coll., 1992]. Dans une autre étude où la culture s'est faite à partir de sang complet, une exposition de 64 heures à des concentrations de BaP variant entre 0,5 et 10 µg/mL, a mené à une augmentation significative de la fréquence des MNs chez les trois sujets de l'étude [Warshawsky et coll., 1995]. De même, une exposition à 7,5 µg/mL de BaP pour 48 h a haussé significativement la fréquence des MN [Onaran et coll., 2001]. Cependant, des concentrations plus élevées, variant entre 15 et 150 µg/mL de BaP, pour 48 h d'exposition (sang complet), n'ont montré aucune augmentation de la fréquence des MNs, que la culture soit effectuée avec ou sans mélange S9 [Elhajouji et coll., 1994]. Par ailleurs, la culture avec des lymphocytes isolés sans mélange S9 a donné des résultats contradictoires lorsque de hautes concentrations de BaP sont utilisées. Ainsi, l'étude de Vian et coll. [1993] n'a montré aucune augmentation de la fréquence des MNs après une exposition à 25, 70 ou 125 µg/mL de BaP pour 48h (21 sujets), alors que l'étude de Elhajouji et coll. (1994) a montré une augmentation significative de la fréquence des MNs après une exposition à 30 et 100 µg/mL de BaP pour 48h (deux sujets). Toutes les autres concentrations (étendue testée : 15 à 150 µg/mL) montraient des résultats négatifs. Finalement, dans une étude où l'exposition au BaP effectuée durant 72 h a été faite en présence du mélange S9, une augmentation significative de la fréquence des MNs a été rapportée à toutes les concentrations de BaP testées (1 à 15 µg/mL) [Cho et Chung, 2003].

Chapitre 2: Problématique, hypothèses de travail et objectifs

Contaminant ubiquitaire de l'environnement, le benzo-a-pyrène (BaP) est présent autant dans l'air que sur les aliments. Tous les individus y sont exposés, que ce soit dans leur environnement de vie ou de travail. Par ailleurs, le BaP est un Hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP) reconnu comme cancérigène pour l'homme. À ce titre, l'évaluation de l'exposition et des effets génotoxiques de ce composé doit être effectuée chez l'Homme. Des études *in vivo* ont montré que l'exposition aux HAP causait la formation de lésions diverses à l'ADN (adduits HAP-ADN, bris à l'ADN, échanges entre chromatides-sœurs, aberrations chromosomiques et micronoyaux). Une corrélation entre ces lésions (appelées biomarqueurs) et le niveau d'exposition est mise en évidence dans certaines études, alors qu'elle n'est pas visible dans d'autres études. Ces disparités sont causées, entre autres, par le fait que les expositions environnementales et occupationnelles sont mixtes. En effet, les individus sont exposés à un mélange de composés chimiques divers qui, collectivement, vont entraîner la formation de lésions à l'ADN.

Afin de cerner les effets d'un composé ou d'une classe de composés, les études *in vitro* sont couramment utilisées. Ainsi, le benzo-a-pyrène est utilisé comme représentant de la classe des HAP et sert d'étalon de comparaison lors de l'étude de mélanges de HAP. Les études *in vitro* effectuées avec des lignées cellulaires comme la lignée hépatique HepG2 ont, entre autres, permis de grandes avancées dans la compréhension du métabolisme du BaP et autres HAP. Cependant, afin d'étudier les lésions à l'ADN causées par le BaP et les

relations qui existent entre elles, il est nécessaire d'utiliser un type cellulaire provenant des tissus cibles du cancer (peau, poumon, vessie) ou des tissus de substitution servant à la surveillance biologique (principalement les lymphocytes sanguins). De plus, comme ces lésions se produisent *in vivo* dans des cellules normales, le choix d'un type cellulaire normal et facile à obtenir s'impose pour ces études *in vitro*. C'est pour toutes ces raisons que nous avons choisi le lymphocyte sanguin humain comme cellule modèle dans cette étude *in vitro* de la génotoxicité du BaP.

Par ailleurs, l'étude de la littérature nous permet de constater que l'analyse statistique des résultats provenant des études *in vitro* sur les lymphocytes sanguins humains, est toujours effectuée par groupes, sexe et âge confondus. Ce type d'analyse ne permet pas de voir les différences existant entre les individus. Ces différences interindividuelles existent, puisque ce ne sont pas tous les individus fumant la cigarette ou tous les travailleurs exposés aux HAP qui développeront ultimement un cancer. Il doit donc exister dans la population des individus plus ou moins sensibles à ce type de produit chimique. De plus, dans les études où le sexe des sujets est spécifié, il n'y a pas de stratification par sexe, donc il n'est pas possible de savoir si des différences existent entre les sexes. L'analyse des études de travailleurs exposés aux HAP ne permet pas non plus de répondre à cette question, puisque les cohortes sont généralement composées uniquement d'hommes, en partie en raison de la nature très physique du travail effectué. Il pourrait être important de savoir si de telles différences existent entre les sexes, lors d'études populationnelles où autant les hommes, que les femmes ou les enfants sont recrutés. Même si peu de données permettent de croire qu'une différence entre les sexes existe, nous explorons cette hypothèse dans notre groupe de sujets.

Finalement, la mesure des différents biomarqueurs lors de la surveillance biologique des travailleurs montre des divergences entre les différentes cohortes, ce qui entraîne une certaine confusion dans le choix du meilleur biomarqueur à mesurer. Nous croyons donc que la mesure de tous ces biomarqueurs (adduits HAP-ADN, bris à l'ADN, échanges entre chromatides-sœurs, aberrations chromosomiques et micronoyaux) dans les lymphocytes sanguins humains pourrait permettre de déterminer le/les biomarqueurs d'exposition au BaP

les plus appropriés. De plus, l'étude de ces biomarqueurs permettra de mieux comprendre les relations existant entre eux.

Les hypothèses et objectifs du projet de recherche

Hypothèse 1 : L'exposition *in vitro* au benzo-a-pyrène cause des effets cytogénotoxiques mesurables et significatifs aux lymphocytes sanguins humains, même à de faibles concentrations.

Pour vérifier cette hypothèse, de faibles concentrations de BaP sont utilisées (0,1 – 1 – 5 – 10 µg/mL) pour effectuer une exposition des lymphocytes durant 24 heures. De plus, une période post-exposition de 24 heures sans BaP est allouée aux cellules afin de permettre le métabolisme du BaP et la réparation de l'ADN. Les effets cytogénotoxiques du BaP sont ensuite évalués à l'aide des biomarqueurs précoces suivants : adduits BPDE-ADN, bris simple-brin à l'ADN (BSB), aberrations chromosomiques (AC), échanges entre chromatides-sœurs (ÉCS) et micronoyaux sanguins (MNs). Pour chacun de ces biomarqueurs, nous déterminerons à partir de quelle concentration de BaP testée une augmentation significative de ces biomarqueurs est retrouvée. Les résultats seront analysés statistiquement à l'aide de l'ANOVA pour mesures répétées et/ou du test des rangs signés de Wilcoxon pour échantillons liés.

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

Pour vérifier cette hypothèse, les cellules d'environ 20 sujets (autant d'hommes que de femmes) sont exposées à des concentrations croissantes de BaP. Les sujets ont été strictement sélectionnés afin d'avoir un groupe le plus homogène possible (origine ethnique, tranche d'âge, expositions antérieures connue aux HAP et autres agents

génotoxiques, etc.). Puis, les dommages à l'ADN causés par le BaP sont quantifiés à l'aide des techniques suivantes : CIA (quantification des adduits BPDE-ADN), EM-ISEL (quantification des bris simple-brin à l'ADN), test des aberrations chromosomiques, test des échanges entre chromatides-sœurs et test des micronoyaux par blocage de la cytocinèse. La forme de la courbe dose-réponse dominante sera déterminée pour chacun des types de dommages quantifiés en examinant les résultats obtenus aux tests statistiques de l'hypothèse précédente.

Hypothèse 3 : Les hommes et les femmes ne répondent pas de la même façon lorsqu'ils sont exposés au benzo-a-pyrène.

À titre exploratoire, cette hypothèse est testée dans notre groupe de sujets. Pour la vérifier, la cytogénotoxicité du BaP est évaluée chez un nombre égal d'hommes et de femmes, avec chacune des techniques déjà mentionnées. Les comparaisons entre les sexes sont effectuées en suivant deux approches. En premier lieu, les quantifications effectuées chez les hommes sont comparées à celles obtenues chez les femmes pour tous les biomarqueurs précoces étudiés, à l'aide de l'ANOVA pour mesures répétées et/ou du test de t pour échantillons indépendants (bilatéral). En second lieu, la relation dose-réponse obtenue dans le groupe d'hommes est comparée à la relation obtenue dans le groupe de femmes et ce, pour chaque biomarqueur étudié.

Hypothèse 4 : Il existe des différences entre les individus dans la réponse génotoxique induite par le BaP et les biomarqueurs précoces utilisés dans cette étude permettent de les mettre en évidence.

Pour vérifier cette hypothèse, les résultats de la quantification des dommages à l'ADN de chaque sujet de l'étude sont analysés. Pour chacun des biomarqueurs et chaque condition d'exposition, le taux de variation interindividuelle est calculé. Ces taux de variation sont comparés entre eux et avec la littérature.

Hypothèse 5 : Le mode d'action du benzo-a-pyrène sur les lymphocytes sanguins humains peut être déterminé à l'aide des biomarqueurs précoces de cette étude.

Pour vérifier cette hypothèse, les différents effets du BaP sont identifiés pour chaque biomarqueur (effet clastogène, stress oxydatif, blocage de la réplication, etc.). L'analyse par corrélation partielle des différents biomarqueurs, obtenues en contrôlant ou non pour l'exposition au BaP, ainsi que l'analyse par régression linéaire multiple permettront d'évaluer l'importance de chacun de ces effets dans la réponse cytogénotoxique globale causée par l'exposition des lymphocytes humains au benzo-a-pyrène.

Les objectifs secondaires

En plus de la vérification des hypothèses énoncées, les travaux de cette thèse visent aussi à :

- Optimiser la réalisation de techniques utilisées en cytogénotoxicité : micronoyaux présents dans les cellules épithéliales de la vessie.
- Définir une approche statistique appropriée à la comparaison de plusieurs individus pour l'interprétation des données des biomarqueurs, particulièrement pour l'essai EM-ISEL.

Chapitre 3: Matériel et méthodes

1. Les sujets

Les sujets participant à cette étude ont été strictement sélectionnés afin de constituer un groupe relativement homogène, tant en termes d'âge que d'origine. Ainsi une tranche d'âge précise a été choisie (de 20 à 30 ans) et tous les sujets sélectionnés vivent dans la grande région de Montréal et travaillent à l'Université de Montréal ou au Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine. De plus, les critères de sélection visent à réduire l'exposition aux HAP (sujets non-fumeurs seulement) et à d'autres agents génotoxiques (via l'exposition aux radiations et aux drogues) et à minimiser les dommages génétiques déjà présents de façon endogène. Finalement, un bon état de santé général est requis au moment du prélèvement sanguin (pas de rhume, grippe ou autre dans les 2-3 semaines précédentes).

1.1. Les critères de sélection

Les critères de sélection retenus sont : sujets âgés de 20 à 30 ans, d'origine caucasienne, non-fumeur, n'ayant pas eu de radiographie dentaire ou des membres dans les trois mois précédant le prélèvement, ne prenant pas de médicament sur une base régulière (sauf remplacements hormonaux - anovulants et thyroïde), n'ayant pas consommé d'alcool dans les 24 heures précédant le prélèvement, n'ayant pas consommé de drogue douce (marijuana, hash, etc.) ou dure (cocaïne, héroïne, etc.) dans les six mois précédents, n'ayant jamais subi de radio- ou de chimiothérapie et n'ayant jamais été diagnostiqué avec une maladie génétique.

1.2. L'éthique et le consentement

Des annonces ont été postées dans le pavillon Roger-Gaudry de l'Université de Montréal, ainsi qu'au département de pathologie du Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, tous deux situés à Montréal, Québec. Le projet de recherche a été présenté aux individus intéressés, puis le questionnaire de sélection leur a été remis. Seuls les sujets répondant aux critères de sélection et ayant donné un consentement libre et éclairé par écrit sont choisis pour participer à la recherche. Les sujets recrutés sont majoritairement des étudiants (stagiaires, gradués) et des technologistes médicaux. Par la suite, un rendez-vous est fixé pour effectuer les prélèvements biologiques requis. Les formulaires de consentement sont présentés aux annexes V et VI (pages lxxvii et lxxix), alors que le questionnaire de sélection des sujets est à l'annexe VII (page lxxxix).

Ce projet de recherche impliquant des êtres humains a été soumis pour approbation éthique au Comité d'éthique de la faculté de médecine de l'Université de Montréal (CERFM). Le projet a été approuvé sous les numéros de référence CERFM-68(05)4#175 et CERFM 94(08)4#308.

1.3. L'identification des sujets

Vingt-sept sujets ont participé à cette étude : quinze femmes (portant les codes F1 à F15) et douze hommes (portant les codes M1 à M12). En fonction du prélèvement sanguin reçu (quantité de sang et de lymphocytes présents), un nombre limité de cultures cellulaires sont initiées et sont réparties entre les cinq biomarqueurs étudiés :

- Pour la quantification des adduits BPDE-ADN, 24 sujets ont été sélectionnés et portent les codes Add1 à Add24.
- Pour la mesure des bris simple-brin à l'ADN, 10 sujets ont été sélectionnés et sont codifiés SSB1 à SSB10.
- Pour les aberrations chromosomiques, 15 sujets ont été sélectionnés et portent les codes CA1 à CA15.

- Pour les échanges entre chromatides-sœurs, 16 sujets ont été sélectionnés et portent les SCE1 à SCE16.
- Pour les micronoyaux sanguins, 20 sujets ont été sélectionnés et portent les codes de technique MN1 à MN20.

2. La préparation du benzo-a-pyrène

Le benzo-a-pyrène (CAS : 50-32-8) étant un produit cancérigène, toutes les mesures de protection, de contention et d'élimination nécessaires sont prises afin de ne pas exposer l'expérimentateur et les autres étudiants du laboratoire au BaP en poudre ou aux solutions contenant du BaP.

Une solution-mère de BaP (Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON, Canada) est préparée en dissolvant la poudre dans du DMSO stérile (100% - qualité culture cellulaire, Sigma-Aldrich). La solution stock de 12,5 mg/mL est filtrée stérilement, puis conservée dans un microtube couvert d'aluminium, pour éviter la dégradation par la lumière [Dabrowska et coll., 2008]. Des solutions-filles sont préparées stérilement en diluant la solution-mère de BaP dans du DMSO à 100%, pour atteindre des concentrations de travail de 1,25 – 0,625 – et 0,125 mg/mL. Ces solutions-filles sont également conservées dans des microtubes recouverts d'aluminium pour éviter l'oxydation par la lumière.

3. Les échantillons biologiques

Un prélèvement de sang périphérique (30 mL) et un échantillon d'urine (50 mL pour les femmes et 250 mL pour les hommes) sont demandés aux participants de cette étude.

3.1. Les cellules sanguines

3.1.1. LE PRÉLÈVEMENT SANGUIN

Un échantillon de sang d'environ 30 mL est prélevé par ponction veineuse dans des tubes héparinés au sodium (Fisher Canada, Ottawa, On, Canada), par une technologiste

médicale accréditée. Les échantillons sanguins sont traités dans les quatre heures suivant le prélèvement. Deux types de cultures cellulaires sont préparés dans cette étude. La culture des lymphocytes isolés est effectuée pour la mesure des adduits, alors que la culture du sang complet est réalisée pour la mesure de tous les autres biomarqueurs.

3.1.2. L'ISOLEMENT DES LYMPHOCYTES

Les constituants d'environ 20 mL de sang sont séparés par centrifugation sur un gradient de Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich) en suivant les instructions du fabricant. La fraction contenant les lymphocytes et monocytes est ensuite lavée à deux reprises dans une solution saline équilibrée de Hanks (HBSS - Invitrogen Canada Inc., Burlington, ON, Canada), puis resuspendue dans du milieu de culture RPMI 1640 (Invitrogen). Les cellules sont comptées sur un hémacymètre (Fisher Canada) avant leur mise en culture. Une seule culture par condition par sujet est initiée en raison du volume de sang nécessaire pour l'isolement des lymphocytes et de la quantité limitée de cellules obtenues.

3.1.3. LA CULTURE ET L'EXPOSITION AU BENZO-A-PYRÈNE

La culture des cellules sanguines est effectuée dans du RPMI 1640 complet contenant 10 % de sérum de veau fœtal, 1 % de PHA, 2 mM de glutaMAX™-I et 0,1 % de gentamycine (tous obtenus chez Invitrogen). Les lymphocytes isolés sont cultivés dans le RPMI 1640 complet à raison de 1 à $1,5 \times 10^6$ cellules/mL, pour un volume total variant entre 2 et 4 mL, en fonction du nombre de cellules présentes suite à l'isolement. Le sang complet est cultivé à raison de 0,35 mL de sang dans 5 mL de milieu RPMI 1640 complet. Les cultures de sang complet sont réalisées en duplicata pour chaque condition d'exposition.

Les cellules sont mises en culture à 37 °C durant 24 h, puis exposées au BaP durant 24 h, aux concentrations suivantes : 0,1 – 1 – 5 – 10 µg/mL. Du DMSO stérile est utilisé comme contrôle négatif (concentration finale de 0,08 %). Suite à l'exposition, les cellules sont centrifugées et lavées à deux reprises dans du HBSS pour retirer le BaP. Les cellules

sont ensuite remises en culture dans 5 mL de RPMI 1640 complet pour 24 h. À cette étape, du BrdU (8-bromo-2-désoxyuridine – 10 µg/mL) est ajouté aux cultures destinées à l'analyse des échanges entre chromatides sœurs (ÉCS) et de la cytochalasine B (6 µg/mL) est ajoutée aux cultures destinées à l'analyse des micronoyaux sanguins (MNs). Finalement, deux heures avant la récolte des chromosomes, de la colcémide (0,1 mg/mL) est ajoutée aux tubes destinés aux analyses des bris simple-brin à l'ADN (essai EM-ISEL), des ÉCS et des aberrations chromosomiques (AC).

3.1.4. LA RÉCOLTE

3.1.4.1. *La récolte des lymphocytes isolés*

Les cultures sont centrifugées et les cellules sont transférées dans des cryovials (Sarstedt inc., Montreal, QC, Canada), en laissant le moins de surnageant possible. Les lymphocytes isolés servant à la quantification des adduits BPDE-ADN sont congelés à -80°C, jusqu'à ce que l'ADN soit extrait.

3.1.4.2. *La récolte des chromosomes*

Les cellules sont centrifugées, puis resuspendues dans du KCl (0,56 % - 0,075 M – Sigma-Aldrich) pour un choc hypotonique durant 8 min, à 37 °C. Les préparations chromosomiques sont ensuite fixées trois fois dans du Carnoy I (méthanol: acide acétique glacial – 3: 1 v/v, Fisher Canada) et étalées sur des lames pré-lavées congelées (Fisher Canada). Les préparations chromosomiques servant à l'essai EM-ISEL, à l'analyse des ÉCS et des AC sont séchées à la température de la pièce durant 24 h (7 jours pour les lames des ÉCS) avant d'être congelées à -20 °C pour ralentir leur vieillissement.

3.1.4.3. *La récolte des cellules traitées à la cytochalasine B*

Les cellules sont centrifugées, puis resuspendues dans du KCl (0,56 % - 0,075 M – Sigma-Aldrich) pour un choc hypotonique durant 5 min, à la température de la pièce. Les cellules sont ensuite fixées deux fois dans du Carnoy I et étalées sur des lames pré-lavées et pré-chauffées dans un incubateur à 37 °C. Les préparations cellulaires servant à l'analyse

des MN sont séchées à la température de la pièce durant 24 h avant d'être congelées à -20°C.

3.2. Les cellules urothéliales

L'optimisation de la technique d'isolement des cellules urothéliales présentes dans l'urine ayant fait l'objet d'une publication (Article 3, page 179), seul un court résumé de cette technique sera présenté ici.

3.2.1. LE PRÉLÈVEMENT

Un prélèvement à mi-jet de l'urine provenant de la deuxième ou troisième vidange de la vessie depuis le début de la journée est demandé aux sujets. Un volume variant entre 50 et 100 mL pour les femmes et de 250 mL et plus pour les hommes est requis. Avant le prélèvement urinaire, les sujets doivent procéder à un nettoyage de la région uréthrale, incluant les lèvres pour les femmes, avec des serviettes humides, puis uriner la première portion du jet dans la toilette. L'urine est recueillie à mi-jet dans des contenants stériles (Fisher Canada).

3.2.2. L'ISOLEMENT DES CELLULES UROTHÉLIALES PRÉSENTES DANS L'URINE

L'urine est centrifugée à 400 g durant 10 min et le surnageant est minutieusement enlevé. Les cellules sont resuspendues dans le surnageant restant (10 à 15 mL) et transférées dans des tubes de centrifugation de 15 mL (Sarstedt). Les tubes sont à nouveau centrifugés, avant d'effectuer deux lavages avec une solution de NaCl 0,9 % filtrée stérilement. Les cellules sont fixées deux fois, soit avec du méthanol à 100 %, soit avec du Carnoy I, avant d'être étalées sur des lames pré-lavées. Les préparations servant à l'analyse des MN urinaires (MNU) sont séchées à la température de la pièce durant 24 h avant d'être colorées.

4. La mesure des biomarqueurs

4.1. Les adduits BPDE-ADN

L'analyse des adduits BPDE-ADN est réalisée sur 23 sujets (11 hommes et 12 femmes) pour lesquels les culots cellulaires appropriés sont disponibles, aux conditions d'exposition suivantes : [BaP] = 0 – 0,1 – 1 – 5 µg/mL. Les adduits BPDE-ADN sont quantifiés par CIA (immunoessai en chimioluminescence), suivant une modification de la technique de Divi et coll. [2002]. Brièvement, des plaques blanches de 96 puits (Greiner Bio One North America Inc., Monroe, NC, États-Unis) sont recouvertes avec 100 pg d'adduits BPDE-ADN ou d'ADN de thymus de veau, dilué dans une solution d'enrobage Reacti-Bind DNA (Fisher Canada), pour 48 h à la température de la pièce avec agitation. Les plaques sont conservées à -20 °C jusqu'à l'usage.

Le jour de l'essai, les plaques sont lavées trois fois avec du PBST (saline tamponnée au phosphate, pH 7,3 contenant 0,5 % de Tween 20 – Sigma-Aldrich) et une fois avec de l'eau ultra-pure. Les plaques sont ensuite incubées avec de la caséine (0,25 % diluée dans le PBST – Sigma-Aldrich) à 37° C durant 90 min et lavées au PBST.

L'ADN des sujets est isolé à l'aide de la trousse Flexigene DNA (QIAGEN Inc., Mississauga, ON, Canada) pour cellules sanguines, puis soniqué avec un sonicateur 550 Sonic Dismembrator (Fisher Canada). Des dilutions sériées de l'ADN standard contenant des adduits BPDE-ADN sont préparées avec de l'ADN de thymus de veau de façon à avoir des concentrations constantes d'ADN (40 ng d'ADN), mais croissantes d'adduits (2, 4, 8, 16, 32 et 64 adduits BPDE / 10⁹ nucléotides) dans les puits servant à faire la courbe standard. L'ADN des sujets ou l'ADN standard contenant des adduits BPDE-ADN, sont mélangés avec un volume égal d'antisérum dirigé contre les adduits HAP-ADN (lapin numéro 31, saignée du 16 août 1978) dilué 1 :8 000 000 dans du PBST + caséine (0,25 %). Les plaques sont incubées à 37 °C durant 90 min, puis lavées et incubées avec un anticorps anti-lapin biotinylé (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, États-Unis) dilué dans du PBST + caséine à la température de la pièce. Après un autre lavage, les plaques sont incubées avec de la streptavidine couplée à une phosphatase alcaline (Applied Biosystems, Carlsbad, Californie, États-Unis) à la température de la pièce. Après lavage,

les plaques sont révélées avec le *CPD Star Emerald II* (Applied Biosystems) et incubées durant la nuit à 4 °C. La luminescence émise est lue avec le lecteur de plaque Lmax (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA, États-Unis).

La limite de détection est de 4 adduits par 10^9 nucléotides. Le coefficient de variation entre différentes analyses par CIA est en moyenne de 16 %, tel que déterminé avec quatre échantillons mesurés à trois reprises dans des plaques distinctes (**Tableau VI**, page 121). Les dilutions sériées d'ADN (préparation des courbes standards) sont préparées en triplicata, alors que les échantillons des sujets sont quantifiés une seule fois, en raison de la quantité limitée de cellules dont l'ADN a été extrait.

4.2. Les bris simple-brin à l'ADN

Les bris simple-brin (BSB) à l'ADN sont mis en évidence grâce à l'essai EM-ISEL (Figure 1 de l'article placé à l'annexe III, page lxiii) [Assad et coll., 1997; Depault et coll., 2006], sur des préparations chromosomiques étalées sur des lames. Brièvement, les BSB présents dans l'ADN sont amplifiés *in situ* par l'exonucléase III à 37 °C (New England Biolabs, Mississauga, ON, Canada). Les lames sont ensuite rincées et une synthèse d'ADN est réalisée par le fragment Klenow de la polymérase I (Roche Diagnostics Canada, Laval, QC, Canada), qui incorporera dans l'ADN des nucléotides dUTP couplés à de la biotine (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY, États-Unis). Cette biotine sera détectée par un anticorps anti-biotine de souris, puis par un anticorps anti-souris couplé à de l'or colloïdal (anticorps de Sigma-Aldrich). Cette détection permettra d'avoir des particules d'or de 10 nm de diamètre au site des nucléotides dUTP biotinylés.

Les préparations ainsi marquées sont incluses dans une résine de microscopie électronique (Formvar 0,5 % – JBEM Services, Montréal, QC, Canada), puis transférées sur des grilles de nickel (Canemco Inc, Lakefield, QC, Canada). Les chromosomes et noyaux sont analysés avec un microscope électronique à transmission Philips EM208 (Philips Electron Optics, Eindhoven, Pays-Bas), à un grossissement variant entre 28 000× et 36 000×. Les microphotographies sont prises à l'aide d'une caméra noir et blanc avec le logiciel AnalySIS version 3.2 (Philips Electron Optics).

Tableau VI: Coefficients de variation moyens, calculés pour tous les biomarqueurs précoces mesurés dans les lymphocytes humain de cette étude. Le coefficient de variation est calculé pour chaque sujet, en divisant la valeur maximale par la valeur minimale d'un biomarqueur, pour une condition donnée et est présenté sous forme de pourcentage.

Biomarqueur	Concentration de BaP ($\mu\text{g/mL}$)				Variation moyenne
	0	0,1	1	5	
<i>Adduits BPDE-ADN</i>					
Variation entre deux CIA	0	18 %	36 %	44 %	16 %
Variation entre deux cultures	0	35 %	33 %	42 %	25 %
<i>Bris simple-brin à l'ADN</i>					
Variation entre deux cultures	--	61 %	122 %	69 %	84 %
<i>Échanges entre chromatides-sœurs</i>					
Variation entre deux cultures	14 %	9 %	13 %	10 %	11 %
<i>Aberrations chromosomiques</i>					
Variation entre deux cultures	30 %	94 %	80 %	58 %	66 %
<i>Micronoyaux sanguins</i>					
Variation entre deux cultures	21 %	69 %	31 %	29 %	39 %

L'analyse des BSB est réalisée sur 10 sujets (cinq hommes et cinq femmes), aux conditions d'exposition suivantes : [BaP] = 0 – 0,1 – 1 – 5 ou 10 $\mu\text{g/mL}$. Dix chromosomes et 20 noyaux, provenant d'autant de cellules, sont photographiés par condition et par sujet. Les particules d'or sont quantifiées à l'aide du logiciel public Scion Image pour Windows, version 4.0.3.2 (Scion Corporation, Frederick, MD, USA). L'échelle des photographies numériques est déterminée à l'aide de la grille de calibration avec sphères de latex pour microscope électronique (Canemco).

4.3. Les aberrations chromosomiques

Les lames portant les préparations chromosomiques sont colorées au Giemsa 3 % dilué dans du tampon de Gurr, pH 6.8 (Invitrogen). L'analyse des AC est réalisée sur 15

sujets (sept hommes et huit femmes) aux conditions d'exposition suivantes : [BaP] = 0 – 0,1 – 1 – 5 µg/mL. Les AC comptabilisées sont les lacunes (*gaps*), les cassures chromatidiennes et chromosomiques, les fragments acentriques, les figures triradiales et quadriradiales, ainsi que les AC complexes (anneau, translocation, etc.) [Rooney et Czepulkowski, 1992b; Wu et coll., 2005]. Les résultats sont inscrits en suivant les indications données par le guide ISCN 2009 [Shaffer et coll., 2009]. Le nombre de chromosomes de chaque métaphase analysée est noté de façon à identifier les cellules polyploïdes (les endoreduplications ainsi que les cellules contenant 69 chromosomes) et les cellules aneuploïdes (ayant perdu ou gagné des chromosomes). Les cellules aneuploïdes correspondant aux critères de cytogénétique standard ont $45 \geq n \geq 47$ chromosomes [Rooney et Czepulkowski, 1992a]. Les cellules aneuploïdes correspondant aux critères de l'OCDE [1997] ont $43 \geq n \geq 49$ chromosomes. Les analyses sont effectuées sur des microscopes photoniques Leica Laborlux ou Aristoplan (Leica Microsystems Canada Inc., Richmond Hill, ON, Canada). 200 métaphases sont analysées sur deux cultures par condition (100 métaphases par culture), par deux observateurs indépendants.

4.4. Les échanges entre chromatides-sœurs

Les ÉCS sont mis en évidence par le traitement FPG (Fluorescence Photolyse Giemsa) des préparations chromosomiques [Perry et Wolff, 1974; Richer et coll., 1987]. L'analyse des ÉCS est réalisée sur 16 sujets (huit hommes et huit femmes) aux conditions d'exposition suivantes : [BaP] = 0 – 0,1 – 1 – 5 µg/mL. Les analyses sont effectuées sur un microscope photonique Leica Aristoplan (Leica Microsystems). 50 métaphases de deuxième génération (F2) sont analysées sur deux cultures par condition (25 métaphases par culture), par un observateur [Rooney et Czepulkowski, 1992a]. Pour chaque métaphase analysée, le nombre d'ÉCS présent est compté. Par la suite, l'analyse de la distribution du nombre d'ÉCS par cellule est effectué afin d'identifier les cellules à haute fréquence d'ÉCS (CHF) chez nos sujets. L'analyse des CHF sera spécifiquement décrite dans la section sur les statistiques (section 5.2.4, page 131).

4.5. Les micronoyaux sanguins

Les lames portant les préparations de cellules traitées à la cytochalasine-B sont colorées au Giemsa 2 % dilué dans du tampon de Gurr, pH 6.8 (Invitrogen). Les MNs sont analysés dans les cellules binucléées ayant conservé leur cytoplasme et doivent tous deux répondre aux critères de sélection décrits par Fenech [2007].

Les MNs doivent notamment :

- Avoir un diamètre compris entre 1/3 et 1/16 des noyaux principaux;
- Être de coloration semblable aux noyaux principaux;
- Être présents dans le cytoplasme de la cellule binucléée;
- Ne pas se superposer aux noyaux principaux.

L'analyse des MNs est réalisée sur 20 sujets (dix hommes et dix femmes) aux conditions d'exposition suivantes : [BaP] = 0 – 0,1 – 1 – 5 – 10 µg/mL. Les analyses sont effectuées sur un microscope photonique Leica Laborlux (Leica Microsystems). 2000 cellules binucléées sont analysées sur deux cultures par condition (1000 cellules binucléées par culture), par un observateur. Les microphotographies sont prises à l'aide d'une caméra digitale couleur SPOT RT, en utilisant le logiciel d'imagerie SPOT, version 1.4 (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, MI, USA).

L'index de division nucléaire (IDN) est évalué en dénombrant le nombre de cellules comportant un (N1), deux (N2), trois (N3) et quatre (N4) noyaux, dans un échantillon d'environ 1000 cellules. Cet IDN est calculé en appliquant la formule suivante :

$$\text{IDN} = \text{N1} + 2 \times \text{N2} + 3 \times \text{N3} + 4 \times \text{N4} / (\text{N1} + \text{N2} + \text{N3} + \text{N4})$$

4.1. Le contenu des micronoyaux sanguins

L'analyse du contenu des MNs est effectuée par hybridation de la sonde pancentromérique (Cambio, Cambridge, UK), pour les conditions d'exposition [BaP] = 0 et 5 µg/mL. Pour les 20 sujets de l'étude (dix hommes et dix femmes), une lame est colorée au Giemsa et les MNs présents sur la lame sont repérés à l'aide d'un graticule (Fisher

Scientifique), avec un microscope photonique et à fluorescence Leica Aristoplan (Leica Microsystems). Les lames sont traitées à la pepsine et à la RNase A (Sigma-Aldrich), avant d'être hybridées en suivant les recommandations du fabricant. Elles sont ensuite contre-colorées au DAPI (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada), avant l'analyse microscopique. La position des MNs est retrouvée, puis le nombre de signaux centromériques est dénombré. Seuls les MNs pour lesquels les signaux centromériques sont clairement visibles et dispersés de façon homogène dans la cellule binucléée sont analysés. Les microphotographies sont prises à l'aide d'une caméra digitale couleur, en utilisant le logiciel Cytovision (Applied Imaging, San Jose, CA, États-Unis).

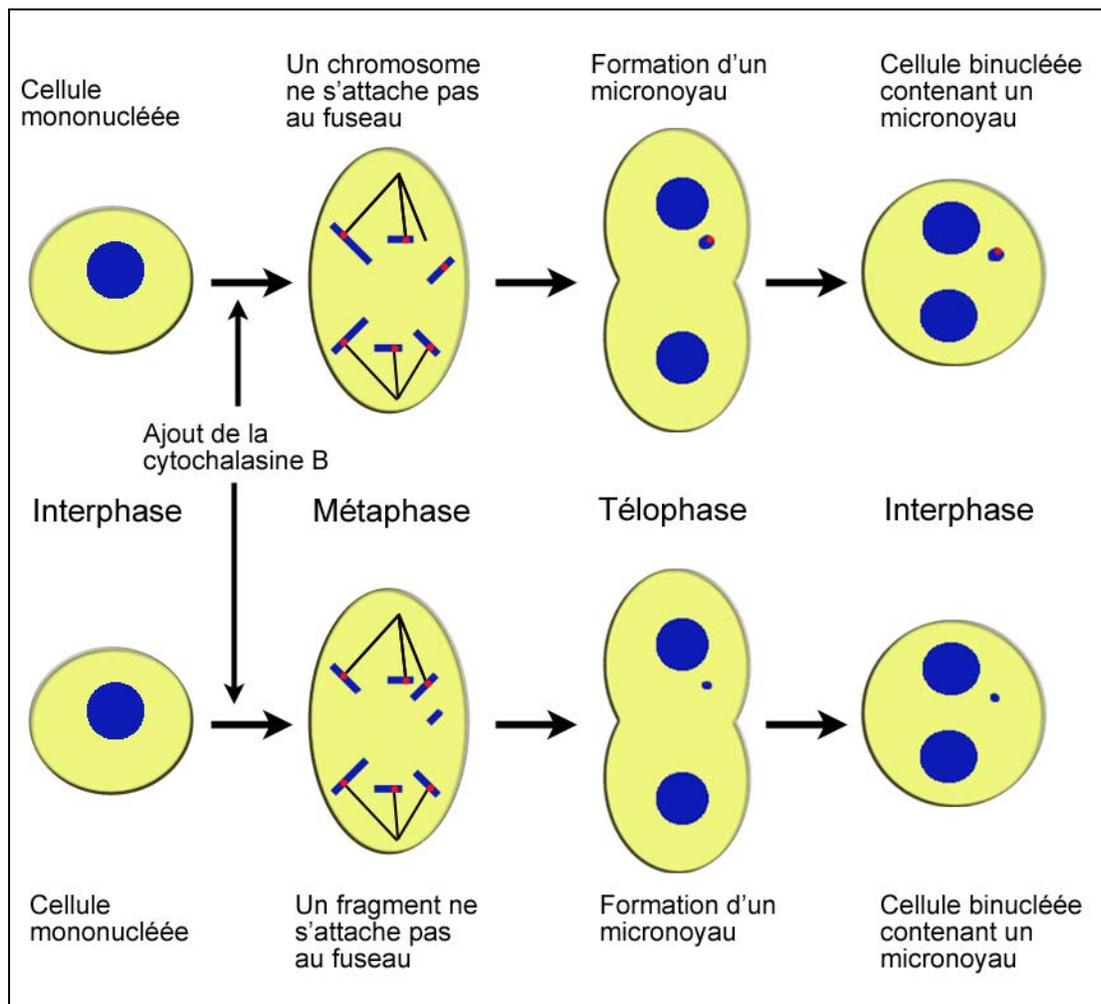


Figure 24: Illustration de la technique des micronoyaux par blocage de la cytokinèse à l'aide de la cytochalasine B. La formation d'un MN contenant un chromosome entier (haut) ou contenant un fragment chromosomique (bas) sont illustrés.

4.2. Les micronoyaux urinaires

Les détails concernant la coloration et l'analyse des MNu sont présentés dans l'article 3 (page 179). Brièvement, une partie des lames sont colorées avec du Giemsa à 4 % et l'autre partie colorés en suivant la technique Papanicolaou [Koss et Melamed, 2005a], en utilisant un colorateur automatique DRS-601 (Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA, USA). Les lames sont ensuite montées avec un poseur de lamelles Tissue-Tek (Sakura Finetek USA). Les lames sont balayées à 400× avec un microscope photonique Leica Laborlux (Leica Microsystems) et les cellules urothéliales qui ne sont pas superposées ou en amas et qui ont un noyau intact, sont sélectionnées pour l'analyse des MNu. La présence d'un MN dans les cellules urothéliales est déterminée suite à leur analyse à 1000×. Les MNu répondant aux critères énoncés par Reali [1987] et Fenech [2007] sont dénombrés. Tous les MNu sont confirmés par un second observateur. Les microphotographies sont prises à l'aide d'une caméra digitale couleur SPOT RT, en utilisant le logiciel d'imagerie SPOT, version 1.4 (Diagnostic Instruments).

5. Les analyses statistiques

5.1. Le devis de l'étude et les tests statistiques retenus

Les analyses statistiques sont réalisées sous la direction du Docteur Yvette Bonvalot, PhD, Biomathématicienne/Biostatisticienne – Épidémiologiste, Spécialiste en évaluation des risques toxicologiques du programme de la santé environnementale à Santé Canada et Professeure adjointe de clinique et chercheure associée de la Chaire en analyse et gestion des risques toxicologiques, au sein du département de Santé environnementale / Santé au travail de la Faculté de médecine, Université de Montréal.

Les analyses statistiques sont 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). Une valeur de $p < 0,05$ est considérée comme statistiquement significative.

Afin de définir l'approche statistique requise dans ce travail de recherche, la nature de chacun des facteurs et des variables est définie.

- Les conditions d'exposition au BaP sont de type numérique. Comme une étendue de concentrations de BaP est utilisée (trois ou quatre concentrations de BaP par biomarqueur), cette variable est traitée comme une variable continue dans la majorité des analyses.
- Les adduits BPDE-ADN et les BSB à l'ADN sont des données quantitatives continues.
- Les ÉCS, les AC et les MN sont des données quantitatives discrètes, de type compte.
- Le sexe est une variable qualitative catégorielle.

Les statistiques descriptives suivantes sont effectuées pour chacun des biomarqueurs, tant au niveau individuel qu'au niveau du groupe : moyenne, écart-type (SD) et erreur standard de la moyenne (SEM).

Afin d'effectuer la comparaison des différentes conditions d'exposition au BaP au niveau individuel, l'unité expérimentale (la culture ou la cellule) est définie pour chacun des biomarqueurs. Lorsque la culture constitue l'unité expérimentale (deux cultures sont analysées par sujet), il n'est pas possible d'effectuer des comparaisons statistiques au niveau individuel. C'est le cas pour trois biomarqueurs (adduits BPDE-ADN, AC et MN). Par exemple, lors de l'analyse des AC, une seule donnée est obtenue par culture, soit le nombre d'AC observées dans les 100 cellules analysées de cette culture. Pour les deux autres biomarqueurs (les BSB à l'ADN et les ÉCS), « la cellule » constitue l'unité expérimentale. Ainsi, pour l'analyse des BSB à l'ADN sur les métaphases ($n = 10$) ou sur les noyaux interphasiques ($n = 20$), de même que pour l'analyse des ÉCS ($n = 50$), chaque cellule analysée génère une donnée. L'ANOVA à un critère (*one way ANOVA*) est le test de choix lorsque des nombres équivalents de mesures sont effectués à toutes les conditions d'exposition. Les différentes conditions d'exposition au BaP constituent des facteurs indépendants, distincts les uns des autres. L'utilisation des tests *post-hoc* (comparaison

multiple) permet de déterminer quelles concentrations diffèrent des autres. Lorsque les variances sont égales, le test *post-hoc* de Bonferroni est effectué. Lorsque les variances sont inégales, le test *post-hoc* T2 de Tamhane est effectué.

Lors de la comparaison des différentes conditions d'exposition au BaP au niveau du groupe, l'unité expérimentale est le sujet. Comme chaque sujet est testé pour chacune des conditions d'exposition, on dit que des mesures répétées sont effectuées sur les sujets. Le facteur «concentration de BaP» est donc un facteur de type «intra-sujet», puisque la réponse génotoxique est mesurée à différentes concentrations pour un même individu. Dans cette étude, seul le facteur «sexe» est évalué comme facteur «inter-sujet», puisque des sujets différents font partie des deux groupes analysés (hommes et femmes). Comme nous devons tester un effet intra-sujet et un effet inter-sujet, le test statistique retenu est l'ANOVA pour mesures répétées. Les biomarqueurs mesurés chez les sujets sont traités de façon indépendante et font donc l'objet d'analyses statistiques séparées. Ce type d'ANOVA a été préféré à la MANOVA en raison de la nature exploratoire des analyses statistiques effectuées et également en raison des tailles d'échantillon inégales pour les différents biomarqueurs sélectionnés dans cette étude. Finalement, comme le devis de l'étude implique des mesures répétées effectuées sur un même sujet, le respect de cet aspect est prépondérant dans le choix de l'approche statistique utilisée.

L'ANOVA pour mesures répétées est valide lorsque la sphéricité des données est respectée. 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 est réussi lorsque la valeur de p qui lui est associée est supérieure à 0,05. Lorsque ce n'est pas le cas et que le test de Mauchly échoue, les corrections ϵ de Greenhouse-Geisser (G-G) et Huynh-Feldt (H-F) sont utilisées pour corriger les valeurs de F . L'assomption de sphéricité est vérifiée en utilisant les corrections ϵ de la façon suivante. Tout d'abord, la moyenne des deux valeurs ϵ de G-G et H-F est calculée. Ensuite, si la moyenne des $\epsilon > 0,9$ la condition de sphéricité est satisfaite et les résultats du test ANOVA pour mesures répétées sont valides. Si la moyenne des ϵ est dans l'intervalle $0,7 - 0,9$ alors la sphéricité est corrigible et la valeur de p du test des effets intra-sujets est celle associée

aux corrections G-G et H-F. Le test ANOVA pour mesures répétées est valide. Finalement, dans le cas où $\varepsilon < 0,7$ la sphéricité est non corrigible. Il y a violation de la condition de sphéricité et le test d'ANOVA pour mesures répétées n'est pas valide.

Une seconde approche est alors retenue pour effectuer la comparaison des différentes conditions d'exposition au BaP au niveau du groupe et c'est un test non-paramétrique qui est retenu, comme ce qui est très fréquemment fait dans la littérature pour des études de génotoxicité humaine *in vitro*. Plusieurs études évaluent leurs biomarqueurs sur quelques sujets (typiquement de un à quatre sujets) qui sont analysés avec une ANOVA à un critère lorsqu'il y a un seul sujet [Gajski et coll., 2007; Alves dos Santos et coll., 2008; Amahdar et coll., 2009]. Le test de Kruskal-Wallis, le test exact de Fisher (unilatéral), ainsi que le test Chi-deux (χ^2), tous trois pour des échantillons indépendants, sont fréquemment sélectionnés lorsqu'il y a quelques sujets [Digue et coll., 1999; Gonzalez Borroto et coll., 2001; Abou-Eisha et coll., 2004; Zeljezic et Garaj-Vrhovac, 2004; Kopjar et coll., 2006; Tellez et coll., 2007; Mamur et coll., 2010]. Quelques études effectuées avec un plus grand nombre de sujets tiennent compte de l'effet intra-sujet et utilisent un test non-paramétrique pour des échantillons appariés comme le test de Friedman [Donmez-Altuntas et coll., 2003; Donmez-Altuntas et coll., 2007]. Par contre, ce test ne permet pas de déterminer où se situent les différences entre les conditions d'exposition au BaP, ce qui requiert l'utilisation d'un test additionnel. Dans les autres cas, un test *t* de Student, sans autre précision [Yuzbasioglu et coll., 2006; Celik et coll., 2007; Celik et coll., 2009; Yilmaz et coll., 2009] ou encore pour échantillons appariés [Testa et coll., 2004] est sélectionné.

Dans notre étude, la violation de la sphéricité des données indique que des variations existent au sein des sujets dans la façon dont ils répondent au BaP. Il faut en tenir compte dans le choix du test non-paramétrique et sélectionner un test pour des échantillons appariés. Le test des rangs signés de Wilcoxon a été choisi pour évaluer l'effet intra-sujet de la concentration de BaP. Il permet d'évaluer l'effet de la concentration de BaP sur les indicateurs évalués, en appariant les données de chacun des sujets, puis de déterminer où se situent les différences entre les conditions d'exposition au BaP, car les conditions d'exposition au BaP sont comparées par paires. Ce test a également été utilisé dans une autre étude de génotoxicité humaine *in vitro* [Rosefort et coll., 2004].

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 (bilatéral) [Triola et Triola, 2006]. Une seconde approche pour évaluer l'effet du sexe est également utilisée. Cette approche vise à comparer la relation dose-réponse d'un biomarqueur donné obtenue dans le groupe d'hommes, et à la comparer à la relation-dose réponse obtenue dans le groupe des femmes. Cette approche vise à comparer l'intensité de la réponse génotoxique obtenue chez les deux sexes.

Le test z de deux proportions indépendantes a été sélectionné pour comparer la fréquence d'apparition d'une caractéristique donnée (comme par exemple les cassures chromatidiennes ou les MN comportant des centromères) au sein de deux groupes différents (conditions d'exposition ou sexes). Pour effectuer ce test, nous devons connaître la proportion de la caractéristique d'intérêt dans les deux groupes comparés et la population totale (p_1 , p_2 et p), ainsi que le nombre de caractéristiques de chaque groupe et de la population totale (n_1 , n_2 et n).

La formule mathématique suivante est ensuite appliquée, en sachant que $p + q = 1$:

$$z = (p_2 - p_1) / \sqrt{(pq/n_1 + pq/n_2)}$$

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. Une valeur de p inférieure à 0,05 permettra donc de conclure que la proportion de la caractéristique étudiée est différente entre les deux groupes comparés. 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_1p , n_2p , nq , n_1q et n_2q) sont supérieurs ou égaux à cinq [Schwartz, 1986].

5.2. Les analyses effectuées

5.2.1. LES ADDUITS BPDE-ADN

Une seule mesure d'adduits étant effectuée par sujet et par condition d'exposition, l'ANOVA pour mesures répétées est d'abord effectuée. Comme le test de sphéricité a

échoué (ϵ de G-G et H-F : 0,556 et 0,627), l'analyse finale de la relation dose-réponse est réalisée avec le test des rangs signés de Wilcoxon. La différence entre les sexes est évaluée avec le test t de Student pour échantillons indépendants (bilatéral) et par comparaison des relations dose-réponse. Les échantillons dans lesquels les adduits étaient indétectables ont reçu une valeur correspondant à la moitié de la limite de détection (4 adduits par 10^9 nucléotides) pour fins de calculs statistiques.

5.2.2. LES BRIS SIMPLE-BRIN À L'ADN

Plusieurs mesures de BSB ($n \geq 10$) étant effectuées par sujet et par condition, la comparaison des conditions d'exposition est effectuée pour chacun des sujets à l'aide de l'ANOVA à un critère, suivi du test post-hoc approprié en fonction du test d'égalité des variances. Ceci permet de déterminer la forme de la relation dose-réponse pour chaque sujet. Pour effectuer les analyses de groupe, la moyenne de BSB est tout d'abord normalisée pour chacun des sujets. Une valeur de 1,00 est attribuée à la condition contrôle négatif ($[\text{BaP}] = 0 \mu\text{g/mL}$) et la moyenne normalisée de chaque condition d'exposition au BaP est calculée. Les moyennes normalisées pour nos sujets sont ensuite analysées avec l'ANOVA pour mesures répétées. Comme le test de sphéricité a échoué (ϵ de G-G et H-F : 0,617 et 0,779), l'analyse finale de la relation dose-réponse est réalisée avec le test des rangs signés de Wilcoxon. La différence entre les sexes est évaluée avec le test t de Student pour échantillons indépendants (bilatéral) et par comparaison des relations dose-réponse.

5.2.3. LES ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES

Les indicateurs suivants sont testés statistiquement : la fréquence des AC par 100 cellules analysées, la fréquence des cellules comportant des AC par 100 cellules analysées, le pourcentage de cellules polyploïdes et le pourcentage de cellules aneuploïdes (cellules comportant des pertes ou des gains de chromosomes). Une fréquence ou un pourcentage unique étant obtenu par sujet et par condition d'exposition, seule l'analyse du groupe est possible. L'ANOVA pour mesures répétées est d'abord effectuée. Comme le test de

sphéricité a échoué (ϵ de G-G et H-F : 0,600 et 0,776 pour la fréquence des AC et ϵ de G-G et H-F : 0,554 et 0,700 pour la fréquence des cellules comportant des AC), l'analyse finale de la relation dose-réponse est réalisée avec le test des rangs signés de Wilcoxon. La différence entre les sexes est évaluée avec le test t de Student pour échantillons indépendants (bilatéral) et par comparaison des relations dose-réponse. De plus, le test z de deux proportions indépendantes est utilisé pour évaluer les proportions de cassures chromosomiques et d'AC complexes retrouvées chez les hommes et les femmes.

5.2.4. LES ÉCHANGES ENTRE CHROMATIDES-SŒURS

Plusieurs mesures d'ÉCS ($n \geq 10$) étant effectuées par sujet et par condition, la comparaison des conditions d'exposition est effectuée pour chacun des sujets à l'aide de l'ANOVA à un critère, suivi du test post-hoc approprié en fonction du test d'égalité des variances. Ceci permet de déterminer la relation dose-réponse pour chaque sujet. Par la suite, la moyenne des ÉCS par sujet et par condition d'exposition sert à effectuer la comparaison des groupes à l'aide de l'ANOVA pour mesures répétées. Le test de sphéricité ayant réussi, la relation dose-réponse est examinée pour le groupe entier, ainsi que pour les hommes et les femmes séparément, puis la contribution du facteur sexe à la réponse génotoxique est déterminée.

Les CHF sont identifiées comme étant les cellules ayant un nombre d'ÉCS supérieur au 95^{ième} percentile de la distribution d'ÉCS de la condition contrôle de l'ensemble des sujets (critère de Carrano et Moore II [1982]), puis en suivant une modification de la méthode utilisée par Kosmider et coll. [2004] dans leur étude *in vitro* sur la génotoxicité d'un agent chimiothérapeutique analogue au cisplatine. Cette analyse est donc réalisée en déterminant d'abord le 95^{ième} percentile de la condition contrôle négatif, individuellement pour chaque sujet, puis en calculant le % de CHF de chacun, pour les différentes conditions d'exposition au BaP. Afin de déterminer si nos sujets présentent une augmentation significative du % de CHF suite à l'exposition au BaP, l'ANOVA pour mesures répétées est effectuée. Comme le test de sphéricité est réussi, la relation dose-réponse est examinée pour le groupe entier, ainsi que pour les hommes et les femmes séparément, puis la contribution

du facteur sexe à la réponse génotoxique est déterminée. La puissance statistique obtenue avec l'ANOVA pour mesures répétées est rapportée à l'Annexe I, page lxiii.

5.2.5. LES MICRONOYAUX SANGUINS

Les indicateurs suivants sont testés statistiquement : la fréquence des MNs par 1000 cellules binucléées (BN) analysées, la fréquence des cellules BN comportant un/des MNs (MNBN) par 1000 cellules BN analysées et le nombre de MNs par cellule MNBN. Une fréquence ou un nombre unique étant obtenu par sujet et par condition d'exposition, l'ANOVA pour mesures répétées est d'abord effectuée. Comme le test de sphéricité a échoué (ϵ de G-G et H-F : 0,578 et 0,736 pour la fréquence des MNs et ϵ de G-G et H-F : 0,497 et 0,596 pour la fréquence des cellules comportant un/des MNs), l'analyse finale de la relation dose-réponse est réalisée avec le test des rangs signés de Wilcoxon. Les différences entre les sexes sont évaluées avec le test t de Student pour échantillons indépendants (bilatéral) et par comparaison des relations dose-réponse.

En ce qui concerne le contenu des micronoyaux sanguins, deux approches statistiques sont utilisées pour analyser les résultats recueillis. Tout d'abord, les MNs sont classifiés en deux catégories en fonction de la présence de signaux centromériques : MN C- (ne contenant aucun signal centromérique) et MN C+ (contenant un/des signaux centromériques). Par la suite, les MN C+ sont subdivisés en deux catégories en fonction du nombre de signaux centromériques dénombrés : MN C₁₋₂+ (contenant un ou deux signaux centromériques) et MN C₃₊+ (contenant 3 signaux centromériques et plus). Ces catégories sont choisies en fonction des suggestions présentes dans l'article de Iarmarcovai et coll. [2007a]. L'analyse de la proportion de MN C+ et MN C₃₊+ présents dans les conditions d'exposition [BaP] = 0 et 5 $\mu\text{g/mL}$ est effectuée avec le test z de deux proportions indépendantes.

Dans un deuxième temps, les MNs sont classifiés en 18 catégories, en fonction du nombre de signaux centromériques présents dans ces MNs (1 signal, 2 signaux, 3 signaux, ..., 18 signaux). Ce seuil de 18 signaux a été établi expérimentalement en étudiant la

fréquence de MNs comportant de 1 à 21 signaux. L'analyse de cette fréquence montre une chute importante de MNs contenant 19, 20 et 21 signaux, dans les deux conditions d'exposition. Ceci suggère que les MNs contenant 19, 20 et 21 signaux pourraient avoir une taille réelle supérieure à la limite de 1/3 du diamètre des noyaux principaux de la cellule BN préalablement sélectionnée. Ces MNs sont donc exclus de l'analyse subséquente. Nous avons déterminé la contribution relative de chaque catégorie de signaux FISH à la somme de signaux dénombrés dans les deux conditions d'exposition. Une régression linéaire est ensuite effectuée pour les deux conditions d'exposition, afin d'évaluer la force de la relation existant entre ces deux paramètres. Finalement, une comparaison statistique des coefficients de régression par ANCOVA en utilisant l'approche par régression [Hartman J, 2000] est réalisée pour confirmer la différence statistique existant entre les deux conditions d'exposition.

5.2.6. LES MICRONOYAUX URINAIRES

Les résultats de chaque sujet sont exprimés en termes de fréquence de MNu par 1000 cellules urothéliales. Les sujets sont regroupés par sexe et les statistiques descriptives sont effectuées.

5.2.7. LA VARIATION INTERINDIVIDUELLE

La variation interindividuelle est obtenue en divisant la valeur maximale par la valeur minimale mesurée pour un biomarqueur donné. Cet indice permet d'apprécier l'ampleur de la variation présente lors de la mesure d'un biomarqueur dans un groupe d'individus. C'est une valeur numérique supérieure à 1,0 et s'exprime en nombre de fois.

5.2.8. LES RELATIONS ENTRE LES BIOMARQUEURS

Les relations existant entre les biomarqueurs mesurés dans les lymphocytes humains de nos sujets suite à l'exposition au BaP sont explorées en trois étapes successives. Tout d'abord, l'analyse par corrélation de Pearson est effectuée pour déterminer le degré de

linéarité (aussi appelé «lien de dépendance monotone») observé entre le niveau d'exposition au BaP et un biomarqueur donné. Par la suite, une analyse par régression linéaire multiple qui tient compte de la colinéarité est réalisée pour déterminer quels sont les facteurs significatifs expliquant la variabilité observée dans la mesure de nos biomarqueurs, ainsi que le pourcentage de variation expliquée par ces facteurs. Finalement, l'analyse par corrélation partielle est exécutée avec un ajustement en fonction de l'exposition au BaP et du sexe, afin d'étudier les relations existant entre les biomarqueurs mesurés dans cette étude. Ces corrélations partielles sont effectuées car lors de l'analyse par régression linéaire multiple, le fait de tester pour la colinéarité masque la présence de certaines associations entre biomarqueurs, justement parce qu'ils évoluent de manière colinéaire en fonction de l'exposition au BaP. L'analyse des corrélations partielles permet donc de mettre en évidence les biomarqueurs qui évoluent significativement de manière colinéaire et de pouvoir les relier aux mécanismes de formation sous-jacents.

Chapitre 4: Les résultats

Trois articles découlent des travaux effectués dans le cadre de cette thèse de doctorat. Les deux premiers articles visent à vérifier les hypothèses 1 à 5 de ce projet de recherche, alors que le troisième article répond à l'objectif secondaire de ce projet visant à optimiser la réalisation d'une technique de cytogénotoxicité. Le dernier objectif secondaire sera traité dans la discussion générale.

Ces trois articles inclus dans la thèse sont les suivants :

Article 1: *Early biomarkers of genotoxicity and benzo-a-pyrene exposure in human lymphocytes. Part I: Aneugenic and clastogenic properties.* (page 137)

Article 2: *Early biomarkers of genotoxicity and benzo-a-pyrene exposure in human lymphocytes. Part II: Interindividual and sex differences, correlations between BaP-DNA adducts and early biomarkers of genotoxicity.* (page 177)

Article 3: *Optimizing urothelial cell preparation for the human urinary micronucleus assay.* (page 215)

Article 1

Early biomarkers of genotoxicity and benzo-a-pyrene exposure in human lymphocytes.

Part I: Aneugenic and clastogenic properties.

Par **F. Fortin**, TCV Pham, Y Bonvalot, C Viau et N Lemieux.

Soumis au journal *Mutagenesis* le 7 septembre 2011.

L'article 1 décrit les analyses de génotoxicité du benzo-a-pyrène effectuées sur les lymphocytes sanguins prélevés chez des sujets non-fumeurs de 20 à 30 ans (autant d'hommes que de femmes) strictement sélectionnés. La génotoxicité est évaluée avec les deux biomarqueurs suivants : les micronoyaux sanguins (*MNs*) et les aberrations chromosomiques (*CAs*). L'emploi de plusieurs concentrations de BaP permet d'étudier la relation dose-réponse de ce composé dans les lymphocytes humains, alors que la stratification par sexe permet de déterminer si l'appartenance des sujets à l'un ou l'autre genre a une influence sur la génotoxicité du BaP. Les MNs et les AC montrent tous deux une courbe dose-réponse non-linéaire compatible avec un phénomène de saturation enzymatique, alors que l'analyse des deux sexes révèle que les hommes montrent une augmentation significative de la fréquence des AC et des MN, lorsque comparés aux femmes.

De plus, afin de déterminer le mode d'action du BaP au niveau chromosomique, une étude du contenu des micronoyaux est effectuée par hybridation *in situ* en fluorescence avec une sonde pancentromérique (reconnaissant tous les centromères humains). En comparant le contenu des MN présents dans les cellules non exposées avec le contenu des MN produits suite à l'exposition au BaP, il est possible de distinguer deux modes d'action du BaP différents. Premièrement, les MN qui, majoritairement, contiennent un ou des centromères, sont associés à un effet aneugène du BaP. Deuxièmement, les résultats obtenus au test des AC permettent d'identifier les effets clastogènes du BaP, visibles avec une augmentation significative des chromosomes cassés et donc, des AC.

L'analyse du contenu des MNs par FISH n'a jamais été réalisée jusqu'à présent suite à une exposition *in vitro* des lymphocytes humains au BaP, de même que chez des travailleurs exposés. Les résultats présentés dans cet article, ainsi que l'approche statistique employée pour les analyser, contribuent à établir des balises pour la réalisation de ce test et pour l'interprétation des résultats, autant lorsque ce test est réalisé suite à des expositions *in vitro*, qu'*in vivo*, chez des travailleurs ou des populations exposées à des contaminants environnementaux. La pertinence de cette étude dépasse donc le BaP et les HAP, de par sa large applicabilité à une foule d'agents physiques et chimiques présents dans notre environnement.

Contribution des auteurs à cet article

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. Madame Thi Cam Van Pham, étudiante à la maîtrise, 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.

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 that can form adducts with DNA, 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 low BaP concentrations (0.1, 1, 5 and 10 µg/ml) for 24h, then washed and cultivated without BaP for an additional 24h. Micronuclei (MNs) and chromosome aberrations (CAs) were analysed for all 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 mostly contain centromeres (77.1 % vs 68.5 % for the control, $p < 0.01$), and specifically three or more centromeres ($p < 0.01$). Also, BaP exposure increased the percentage of metaphases presenting chromosome losses and gains. Our study confirms a clastogenic effect of BaP with CA and MN tests, associated with initiation stage of chemical carcinogenesis. More importantly, using FISH-coupled MN assay and metaphases analysis, an aneugenic effect of BaP links 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.

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.

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.

Materials and methods

Subjects

Twenty subjects (ten women and ten men), aged between 20 and 30 years (mean: 26.6 years), living in Montréal (Québec, Canada) 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.

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 (25). 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.

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 glutaMAXTM-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. 6 µg/ml (final) 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.

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 (N1), two (N2), three (N3) or four (N4) nuclei on 1000 cells, as described in Fenech (18). All slides were analysed by the same observer.

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 ($43 \leq$ chromosomes ≤ 49 , triploid and tetraploid cells, as well as endoreduplications). Also, mitotic index (MI) was determined for all BaP conditions, by scoring the number of metaphases and nuclei on 1000 cells. All microscopic analyses were done by two observers, one duplicate culture per observer, for all subjects.

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 μ 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 μ g/ml condition. Only MNs where the FISH signals were clearly visible and homogeneously dispersed within the BN cell were analysed.

Statistical analysis

Statistics were performed using the SPSS 17.0 software for Windows (SPSS inc. Chicago, IL, USA). Results are expressed as means \pm 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 NDI and MI with the non-parametric Wilcoxon signed-Rank test for related samples. For the dose-response relationship of MNs, 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: frequency of cells presenting one or more CA (CA cells), frequency of CA and percentage of cells with chromosome losses and gains. The first two indicators 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 (bilateral) 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, MNs were classified for the two conditions (negative control and [BaP] = 5 μ g/ml) in the following categories, as suggested by Iarmarcovai *et al.* [Iarmarcovai et coll., 2007a]. First, MNs containing no Cen signal (C-MN), and containing 1 or more Cen signals (C+ MN) were enumerated. Second, C+ MNs were divided in two new categories according to the number of Cen signals present: 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 group, as well as women and men separately.

Results

Micronuclei (MN) analysis

Analysis of NDI showed a significant decrease when cells were exposed to 10 µg/ml BaP, compared to negative control (Supplemental Table IV). Individual results for MN assay are presented in Supplemental Table V (Suppl. Table V), while group mean values are in Table I. 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 (Suppl. Table V), with a mean MN frequency of 9.9 ± 1.2 for the group (Table I). While women had an increased spontaneous MN frequency when compared to men, it was non-significant.

Following BaP exposure, significant increases in MN and MNBN frequencies were observed, starting at [BaP] = 0.1 µg/ml ($p < 0.01$ – see Table I). Maximal MN and MNBN frequencies were observed at [BaP] = 5 µg/ml, followed by a decrease at [BaP] = 10 µg/ml. As seen in Figure 1, this decrease was significant only for MN frequency, when compared to [BaP] = 5 µg/ml, for men ($p < 0.05$ – Figure 1A), while the group showed only a moderate non-significant decrease ($p < 0.1$ - Figure 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 I). It slowly decreased at higher BaP concentrations, being significant for the group at [BaP] = 10 µg/ml, when compared to [BaP] = 1 µg/ml ($p < 0.05$ - Figure 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 I) in MN frequency and no MNBN frequency increase, while men showed significant increases for both indicators ($p < 0.05$).

Chromosome Aberration (CA) analysis

Analysis of the mitotic index (MI) showed no significant differences between negative control and all BaP conditions (Suppl. Table IV). Individual results for CA test are presented in Supplemental Table VI (Suppl. Table VI), while group mean values are in Table II. An interindividual variation was present among the subjects with spontaneous CA frequency (without gaps, Suppl. Table VI) ranging from 1 to 10 for women, and from 0 to 4 for men, with a mean CA frequency (without gaps, Table II) 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 II).

BaP exposure caused mainly gaps and chromatid breaks, as seen in Suppl. Table VI, but chromosome breaks and complex aberrations were also recorded. Significant increases in cells presenting chromosome losses and gains were observed, starting at $[\text{BaP}] = 0.1 \mu\text{g/ml}$ (group: $p < 0.05$ – Table II). For the group, significant increases in CA cells and CA frequency (with and without gaps) were observed, starting at $[\text{BaP}] = 0.1 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0.01$). Maximal percentage of CA cells and CA frequency were observed at $[\text{BaP}] = 5 \mu\text{g/ml}$, followed by a slight decrease at $[\text{BaP}] = 10 \mu\text{g/ml}$ (see Table II). The CA cell decrease was moderate (non-significant) when compared to $[\text{BaP}] = 5 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0.1$ – Figure 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 II) was different for the two sexes. Women behaved differently at $[\text{BaP}] = 0.1 \mu\text{g/ml}$, as they showed a moderate non-significant ($p < 0.1$) increase in CA frequency (without gaps), while men showed a significant increase ($p < 0.05$).

FISH-coupled MN analysis

Classification of FISH results in four categories (C-, C+, C₁₋₂+ and C₃₊+ MNs) for each subjects are presented in Supplemental Table VII (Suppl. Table VII), while group

results are presented in Table III. Our results show that BaP-induced MNs were mostly C+ MN ($p < 0.01$ – Table IV). 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 IV). Furthermore, sex analysis showed that women and men behaved differently (see Table III): 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 III).

Discussion

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 (13,14,12). 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 (Suppl. Table IV). However, the observed NDI at [BaP] = 10 µg/ml 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. This was further confirmed by analysis of the mitotic index, as no significant decreases were observed following BaP exposure. Together, these results reveal a trend towards a reduction in viability of human lymphocytes with increasing BaP exposure. This is in line with an observed decrease in mitotic rate of cultured human lymphocytes exposed to 12.5 - 62.5

$\mu\text{g/ml}$ BaP, reported by Vian *et al.* (17), and could be related to the activation of p53, resulting in a cell cycle arrest or in apoptosis (27,28).

Significant induction of MNs and CAs were observed at all BaP conditions tested, for all tested indicators (Tables I and II). Also, decreases in MN and CA frequencies were observed after exposure to $[\text{BaP}] = 10 \mu\text{g/ml}$, when compared to $[\text{BaP}] = 5 \mu\text{g/ml}$ (Figure 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 $\mu\text{g/ml}$ BaP 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 (31). 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 (32). Furthermore, an analog dose-response curve was observed by Binkova *et al.* (27) in human lung fibroblasts, where less DNA adducts were observed at 1 $\mu\text{g/ml}$ BaP, when compared to 0.25 $\mu\text{g/ml}$.

Also, as results are mostly presented for groups in literature, sex differences were investigated. In our cohort, direct comparison of all MN and CA indicators, between men and women following BaP exposure of blood lymphocytes (bilateral Student's *t*-test for independent samples) did not reveal significant sex differences (Tables I and II), 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 (33). Also, we cannot exclude an effect of our small sample size. Although large population studies reported no sex differences in spontaneous MN frequency in children (34), a pilot study performed in Czech Republic (35) 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 (33).

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 I), as well as CA frequency (without gaps – Table II) were significantly increased at [BaP] = 0.1 µg/ml in our male subjects, 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.

BaP is an Aneugen and a Clastogen

In our study, exposure to BaP induced mainly formation of gaps and chromatid breaks (Suppl. Table VI). This is in line with the type of aberrations produced by BPDE in human lymphocytes (36) and classification of BaP as a S-dependent agent by Natarajan and Paliti (19). Moreover, significant increase of all CA types 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 (22). In the same way, our study also reports an increased MN frequency (Table I). On the other hand, we observed significantly increased percentage of cells presenting chromosome losses and gains after BaP exposure, maximal at [BaP] = 5 µg/ml ($p < 0.001$ – Table II). 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 III). 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 III). 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 III).

As most MNs produced by BaP contain three or more centromeres in our study, this could be related to an impairment at the centrosome level (37). Indeed, Shinmura *et al.* (38) 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.* (39) 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 (40).

In chemical carcinogenesis, BaP is recognized as an initiator, through formation of highly mutagenic BPDE-DNA adducts. Also, clastogenic events participate in initiation, as chromosomal breaks favor formation of chromosome aberrations, important for generation of transformed cells (41). Also, 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 segregation errors are aggravated. Taking into consideration that BaP also caused chromosome losses and gains, our results combined with the work of Shinmura *et al.* (38) and Matsuoka *et al.* (40,39) 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 (42).

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, aneugenic activity of BaP on human lymphocytes was suggested by the presence of metaphases presenting chromosome losses and gains after BaP exposure. This was confirmed by FISH-coupled MN assay showing that most BaP-induced MNs contained three or more centromeres, also suggesting an aneugenic effect. Whether this aneugenic effect is related to chromosome nondisjunction or malsegregation still remains to be determined. As pancentromeric FISH-coupled MN assay has been realized in a limited number of human *in vivo* (welders, pathologists, cancer patients) (43-46) and *in vitro* studies (paclitaxel, vinblastine, cyclophosphamide) (47-49), use of increased proportion of C⁺ MN and/or C₃₊⁺ MN as biomarkers of aneugenic activity must be validated. Together with karyotypic changes (39), spindle disturbances (40) and centrosome duplication (38), our results provide additional evidences that BaP could play a role in the progression step of carcinogenesis. Involvement of BaP and other PAH during cancer 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.

Supplemental data

Supplemental Tables IV, V, VI, and VII are available at *Mutagenesis* online.

Funding

This work was supported by the département de pathologie du Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine [to N.L.], the Fonds de la Recherche en Santé du Québec

(FRSQ) [to F.F.], and the Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine / Fondation des Étoiles [to F.F.].

Acknowledgments

The authors wish to thank all subjects for their cooperation while participating in this study.

References

1. Straif , K., Baan, R., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F. and Cogliano, V. (2005) Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Lancet Oncology*, **6**, 931-932.
2. Miller , K.P. and Ramos, K.S. (2001) Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons. *Drug Metab. Rev.*, **33**, 1-35.
3. Park, J.H., Troxel , A.B., Harvey, R.G. and Penning, T.M. (2006) 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. Toxicol.*, **19**, 719-728.
4. Shimada, T. (2006) Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **21**, 257-276.
5. Donbak , L., Rencuzogullari, E., Yavuz, A. and Topaktas, M. (2005) The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey. *Mutat. Res.*, **588**, 82-87.
6. Liu, A.L., Lu, W.Q., Wang, Z.Z., Chen, W.H., Lu, W.H., Yuan, J., Nan, P.H., Sun, J.Y., Zou, Y.L., Zhou, L.H., Zhang, C. and Wu, T.C. (2006) 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**, 673-677.
7. Cavallo, D., Ursini , C.L., Rondinone, B. and Iavicoli, S. (2009) Evaluation of a suitable DNA damage biomarker for human biomonitoring of exposed workers. *Environ. Mol. Mutag.*, **50**, 781-790.
8. Okano , P., Miller, H.N., Robinson, R.C. and Gelboin, H.V. (1979) 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**, 3184-3193.
9. Siest, G., Jeannesson, E., Marteau, J.B., Samara, A., Marie, B., Pfister, M. and Visvikis-Siest, S. (2008) Transcription factor and drug-metabolizing enzyme gene

- expression in lymphocytes from healthy human subjects. *Drug Metab. Dispos.*, **36**, 182-189.
10. Lin, P., Hu, S.W. and Chang, T.H. (2003) 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**, 20-26.
 11. Cho, Y.H. and 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. *Toxicol. Lett.*, **143**, 37-44.
 12. Warshawsky, D., Livingston, G.K., Fonouni-Fard, M. and LaDow, K. (1995) Induction of micronuclei and sister chromatid exchanges by polycyclic and N-heterocyclic aromatic hydrocarbons in cultured human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.*, **26**, 109-118.
 13. Guven, G.S., Guven, M., Onaran, H., Ulutin, T. and Hacianefioglu, S. (2006) Individual sensitivity to cytogenetic effects of benzo[alpha]pyrene in cultured human lymphocytes: Influence of glutathione S-transferase M1 genotype. *Genet. Mol. Biol.*, **29**, 142-147.
 14. Hastak, K., Lubri, N., Jakhi, S.D., More, C., John, A., Ghaisas, S.D. and Bhide, S.V. (1997) Effect of turmeric oil and turmeric oleoresin on cytogenetic damage in patients suffering from oral submucous fibrosis. *Cancer Lett.*, **116**, 265-269.
 15. Wu, X., Gu, J., Amos, C.I., Jiang, H., Hong, W.K. and Spitz, M.R. (1998) A parallel study of in vitro sensitivity to benzo[a]pyrene diol epoxide and bleomycin in lung carcinoma cases and controls. *Cancer*, **83**, 1118-1127.
 16. Xiong, P., Bondy, M.L., Li, D., Shen, H., Wang, L.E., Singletary, S.E., Spitz, M.R. and Wei, Q. (2001) 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**, 8465-8469.

17. Vian, L., Bichet, N. and Gouy, D. (1993) The in vitro micronucleus test on isolated human lymphocytes. *Mutat. Res.*, **291**, 93-102.
18. Fenech, M. (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.*, **2**, 1084-1104.
19. Natarajan, A.T. and Palitti, F. (2008) DNA repair and chromosomal alterations. *Mutat. Res.*, **657**, 3-7.
20. OECD. (1997) *Test No. 473: In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*. OECD Publishing, Paris.
21. Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhrer, S., van Benthem, J. and Vanparys, P. (2008) ECVAM retrospective validation of in vitro micronucleus test (MNT). *Mutagenesis*, **23**, 271-283.
22. Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. and 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. Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung. *Mutat. Res.*, **410**, 81-116.
23. Iarmarcovai, G., Bonassi, S., Sari-Minodier, I., Baciuchka-Palmaro, M., Botta, A. and Orsiere, T. (2007) Exposure to genotoxic agents, host factors, and lifestyle influence the number of centromeric signals in micronuclei: a pooled re-analysis. *Mutat. Res.*, **615**, 18-27.
24. Norppa, H. and Falck, G.C. (2003) What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*, **18**, 221-233.
25. Dabrowska, D., Kot-Wasik, A. and Namiesnik, J. (2008) Stability studies of selected polycyclic aromatic hydrocarbons in different organic solvents and identification of their transformation products. *Pol. J. Environ. Stud.*, **17**, 17-24.
26. Lemieux, N., Drouin, R. and Richer, C.L. (1990) High-resolution dynamic and morphological G-bandings (GBG and GTG): a comparative study. *Hum. Genet.*, **85**, 261-266.

27. Binkova, B., Giguere, Y., Rossner, P., Jr., Dostal, M. and Sram, R.J. (2000) 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**, 57-70.
28. Gomez-Lazaro, M., Fernandez-Gomez, F.J. and Jordan, J. (2004) p53: Twenty five years understanding the mechanism of genome protection [Review]. *Journal of Physiology & Biochemistry*, **60**, 287-307.
29. Elhajouji, A., Santos, A.P., Van Hummelen, P. and 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**, 307-313.
30. Van Hummelen, P., Gennart, J.P., Buchet, J.P., Lauwerys, R. and Kirsch-Volders, M. (1993) Biological markers in PAH exposed workers and controls. *Mutat. Res.*, **300**, 231-239.
31. Slikker, W., Jr., Andersen, M.E., Bogdanffy, M.S., Bus, J.S., Cohen, S.D., Conolly, R.B., David, R.M., Doerrer, N.G., Dorman, D.C., Gaylor, D.W., Hattis, D., Rogers, J.M., Woodrow Setzer, R., Swenberg, J.A. and Wallace, K. (2004) Dose-dependent transitions in mechanisms of toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **201**, 203-225.
32. Till, M., Riebinger, D., Schmitz, H.J. and Schrenk, D. (1999) Potency of various polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of CYP1A1 in rat hepatocyte cultures. *Chem.-Biol. Interact.*, **117**, 135-150.
33. Fenech, M. and Bonassi, S. (2011) The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, **26**, 43-49.
34. Holland, N., Fucic, A., Merlo, D.F., Sram, R. and Kirsch-Volders, M. (2011) Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables. *Mutagenesis*, **26**, 51-56.
35. Pedersen, M., Vinzents, P., Petersen, J.H., Kleinjans, J.C., Plas, G., Kirsch-Volders, M., Dostal, M., Rossner, P., Beskid, O., Sram, R.J., Merlo, D.F. and Knudsen, L.E.

- (2006) 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**, 112-120.
36. Wu, X., Lippman, S.M., Lee, J.J., Zhu, Y., Wei, Q.V., Thomas, M., Hong, W.K. and Spitz, M.R. (2002) Chromosome instability in lymphocytes: a potential indicator of predisposition to oral premalignant lesions. *Cancer Res.*, **62**, 2813-2818.
37. Iarmarcovai, G., Botta, A. and Orsiere, T. (2006) Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy. *Toxicol. Lett.*, **166**, 1-10.
38. Shinmura, K., Iwaizumi, M., Igarashi, H., Nagura, K., Yamada, H., Suzuki, M., Fukasawa, K. and 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). *J. Pathol.*, **216**, 365-374.
39. Matsuoka, A., Ozaki, M., Takeshita, K., Sakamoto, H., Glatt, H.R., Hayashi, M. and 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**, 365-372.
40. Matsuoka, A., Matsuura, K., Sakamoto, H., Hayashi, M. and 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. *Mutat. Res.*, **419**, 1-12.
41. Knudson, A.G. (2001) Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **1**, 157-162.
42. Schneider, B.L. and Kulesz-Martin, M. (2004) Destructive cycles: the role of genomic instability and adaptation in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **25**, 2033-2044.
43. Baciuchka-Palmaro, M., Orsiere, T., Duffaud, F., Sari-Minodier, I., Pompili, J., Bellon, L., De Meo, M., Digue, L., Favre, R. and Botta, A. (2002) Acentromeric micronuclei are increased in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients. *Mutat. Res.*, **520**, 189-198.

44. Iarmarcovai, G., Ceppi, M., Botta, A., Orsiere, T. and Bonassi, S. (2008) Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis. *Mutat. Res.*, **659**, 274-283.
45. Iarmarcovai, G., Sari-Minodier, I., Orsiere, T., De Meo, M., Gallice, P., Bideau, C., Iniesta, D., Pompili, J., Berge-Lefranc, J.L. and Botta, A. (2006) A combined analysis of XRCC1, XRCC3, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and centromere content of micronuclei in welders. *Mutagenesis*, **21**, 159-165.
46. Orsiere, T., Sari-Minodier, I., Iarmarcovai, G. and Botta, A. (2006) 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**, 30-41.
47. Darroudi, F., Meijers, C.M., Hadjidekova, V. and 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**, 425-433.
48. Digue, L., Orsiere, T., De Meo, M., Mattei, M.G., Depetris, D., Duffaud, F., Favre, R. and Botta, A. (1999) 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**, 269-278.
49. Huber, R., Salassidis, K., Kulka, U., Braselmann, H. and Bauchinger, M. (1996) 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**, 105-109.

Legend to Figure 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).

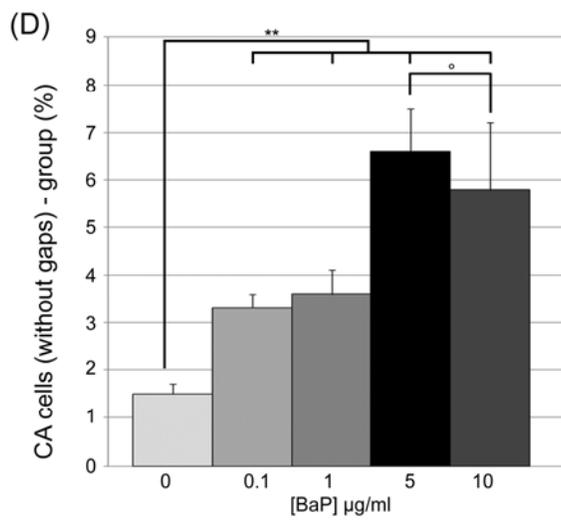
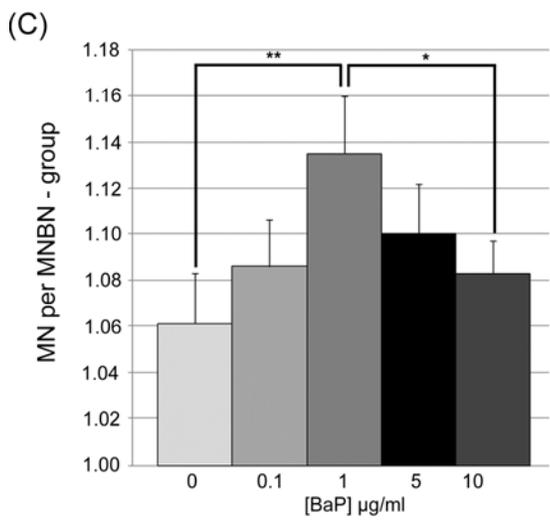
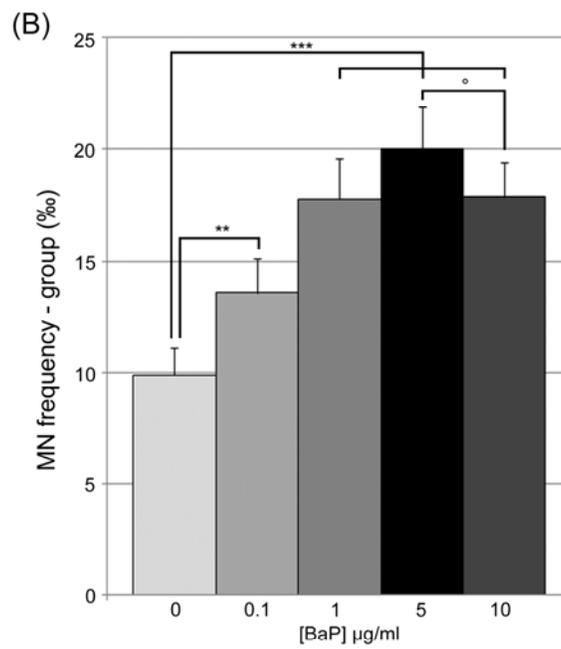
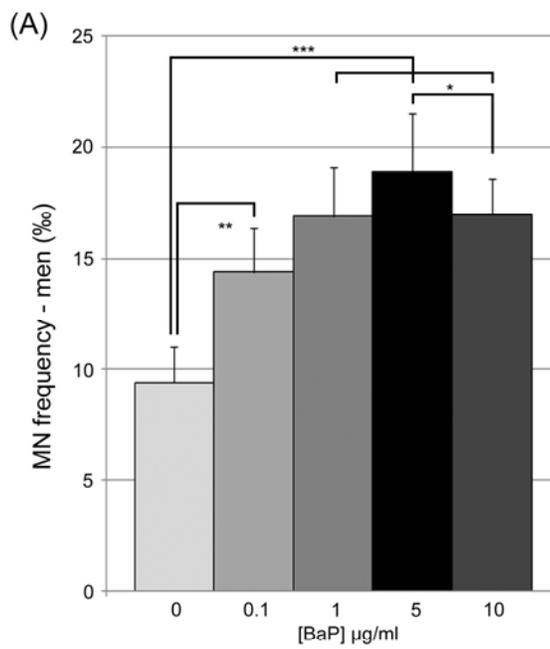


Table I

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 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 II

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 ^a
Women	1600	1600	1600	1400	400
Men	1400	1400	1400	1200	400
CA frequency (- gaps ^b) (%)					
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 ^b) (%)					
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 ^c (- 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 (%) ^d					
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 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 Chromosomes from only four subjects were available for CA analysis at [BaP] = 10 μ g/ml

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

^c Percentage of cells presenting one or more CAs

^d Cells with $43 \leq \text{chromosomes} \leq 49$

Table III

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 ₁₋₂ + MN ^c	C ₃₊ + MN (%) ^d
Group	0	235	74 (31.5)	161 (68.5)	54 (33.5)	107 (66.5)
	5	477	109 (22.9)	368 (77.1) **	80 (21.7)	288 (78.3) **
Women	0	138	39 (28.3)	99 (71.7)	37 (37.4)	62 (62.6)
	5	236	52 (22.0)	184 (78.0) [†]	44 (23.9)	140 (76.1) **
Men	0	97	35 (36.1)	62 (63.9)	17 (27.4)	45 (72.6)
	5	241	57 (23.7)	184 (76.3) **	36 (19.6)	148 (80.4) [†]

The number (and percentage) of C-, C+, C₁₋₂+ and C₃₊+ MNs are presented for the 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

Supplemental Table IV

Cell cycle, nuclear division index (NDI) and mitotic index (MI) obtained in human lymphocytes *in vitro* exposed to benzo-a-pyrene.

BaP ($\mu\text{g/ml}$)	% N1 ^a	% N2 ^b	% N3 + N4 ^c	NDI ^d	MI (%) ^d
0	39.5	52.9	7.6	1.71 \pm 0.03	3.5 \pm 0.4
0.1	37.6	54.3	8.1	1.73 \pm 0.02	3.3 \pm 0.8
1	41.0	53.4	5.5	1.67 \pm 0.01	3.2 \pm 0.7
5	38.9	54.7	6.5	1.70 \pm 0.01	3.2 \pm 0.7
10	49.4	43.8	6.8	1.60 \pm 0.05 *	3.3 \pm 0.4

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

* $p < 0.05$

^a % N1: percentage of mononucleated cells

^b % N2: percentage of binucleated cells

^c % N3 + N4: percentage of trinucleated and quadrinucleated cells

^d Results are presented as means \pm SEM, for the group.

Supplemental Table V

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 VI

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
	10	11	18	5	-	-	20	29	23	35
CA3/ F4/ 28	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
CA4/ F5/ 21	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
CA5/ F6/ 29	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

CA6/ F7/ 27	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
CA7/ F11/ 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
CA8/ F12/ 29	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
	10	3	7	3	-	-	8	10	10	13
CA10/ M2/ 28	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
	10	8	11	2	-	-	10	15	13	21
CA11/ M3/ 28	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
	5	8	7	5	1	2	8	16	12	20
CA12/ M4/ 21	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

	5	13	16	3	1	1	19	25	22	33
CA13/ M5/ 29	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 VII

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 Subject/ Age	Code/ 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

Article 2

Early biomarkers of genotoxicity and benzo-a-pyrene exposure in human lymphocytes.

Part II: Interindividual and sex differences, correlations between BaP-DNA adducts and early biomarkers of genotoxicity.

Par **F Fortin**, Y Bonvalot, N Ouellet, TCV Pham, P Ayotte, C Viau et N Lemieux.

Soumis au journal *Mutagenesis* le 7 septembre 2011.

L'article 2 poursuit l'analyse de la génotoxicité du benzo-a-pyrène effectuée sur les lymphocytes sanguins prélevés chez des sujets non-fumeurs de 20 à 30 ans (autant d'hommes que de femmes), strictement sélectionnés. La génotoxicité est évaluée avec les biomarqueurs suivants : les adduits BPDE-ADN (*BaP-DNA adducts*), les bris simple-brin à l'ADN (*DNA SSBs*), les échanges entre chromatides-sœurs (*SCEs*) et les cellules à haute fréquence d'ÉCS (*HFC*). L'emploi de plusieurs concentrations de BaP permet d'étudier la relation dose-réponse de ce composé dans les lymphocytes humains, alors que la stratification par sexe permet de déterminer si l'appartenance des sujets à l'un ou l'autre genre a une influence sur la génotoxicité du BaP. L'analyse des adduits BPDE-ADN révèle une courbe dose-réponse non-linéaire, suggérant une détoxification du BPBE et/ou une réparation accrue des adduits BPDE-ADN. Par contre, l'analyse des ÉCS montre une courbe dose-réponse linéaire, ce qui indique une sollicitation plus importante du système de réparation par recombinaison homologue, à toutes les concentrations de BaP testées. Comme le niveau d'adduits BPDE-ADN diminue significativement à la plus forte concentration de BaP testée dans notre étude, d'autres lésions à l'ADN seraient importantes dans la formation des ÉCS. Ces lésions pourraient être des bris à l'ADN (simple ou double-brin) ou encore des bases oxydées, comme la 8-OH-dG.

De plus, une analyse des corrélations entre les biomarqueurs est également effectuée, en incluant les données présentées dans l'Article 1. Comme la majorité des

biomarqueurs montrent une corrélation significative avec l'exposition au BaP, l'analyse par corrélation partielle, en tenant compte du niveau d'exposition et du sexe est effectuée. Cette analyse montre que les adduits BPDE-ADN mesurés chez nos sujets sont significativement corrélés avec la moyenne des ÉCS et le pourcentage de cellules à haute fréquence d'ÉCS (% de CHF). De plus, le % de CHF est significativement corrélé avec deux indicateurs du test des AC et des MN, soit la fréquence des AC et le nombre de MN par cellule micronucléée (MN par MNBN). Afin de comprendre un peu plus la relation existant entre ces biomarqueurs, une analyse par régression linéaire multiple est exécutée. Ceci montre que la variabilité retrouvée dans le % de CHF peut être significativement expliquée par l'exposition au BaP et les adduits BPDE-ADN. Par ailleurs, la variabilité retrouvée dans la fréquence des AC et des MN peut être significativement expliquée par le % de CHF. Cette analyse, combinée à l'analyse des corrélations partielles, suggère que les lésions à l'ADN responsables de la formation des AC et des MN (comme les bris à l'ADN) pourraient jouer un rôle significatif dans la formation des ÉCS. La compréhension des relations existant entre les biomarqueurs mesurés dans cette étude, couplée aux connaissances entourant le métabolisme du BaP dans le lymphocyte humain permettent d'identifier le biomarqueur précoce le plus intéressant pour effectuer de la surveillance biologique d'exposition au HAP. L'utilité de l'approche utilisée dans cette étude dépasse le BaP et les HAP, de par sa large applicabilité à une foule d'agents physiques et chimiques présents dans notre environnement.

Contribution des auteurs à l'article

Fléchère Fortin a préparé le plan et réalisé 80% des expérimentations. Nathalie Ouellet, du laboratoire du Dr Pierre Ayotte, a réalisé 15% des expérimentations et Van Pham, 5%. Madame Fortin a effectué les analyses statistiques sous la direction de la biostatisticienne, le Dre Yvette Bonvalot, et a également écrit le manuscrit. Les docteurs Claude Viau, Yvette Bonvalot et Pierre Ayotte ont participé à la révision du manuscrit. Le Dre Nicole Lemieux, en qualité de directrice, supervise la rédaction du manuscrit.

Abstract

Benzo-a-pyrene (BaP) is a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) classified as carcinogenic to human. Its metabolic activation leads to production of metabolites forming adducts with DNA, being at origin of BaP-induced DNA damages, mutagenesis and carcinogenesis. Human blood lymphocytes cultures established from 25 subjects were exposed to BaP (0.1, 1, 5 and 10 $\mu\text{g/ml}$) for 24 h, then washed and cultivated without BaP for an additional 24 h. BaP-DNA adducts, DNA single-strand breaks (SSBs) and sister chromatid exchanges (SCEs) were analysed. Data for micronuclei (MNs) and chromosomal aberrations (CAs), from a previous work, were analyzed further. Significantly increased formation of BaP-DNA adducts and SCEs were observed starting at $[\text{BaP}] = 0.1 \mu\text{g/ml}$ ($p < 0.01$), with a significant decrease of BaP-DNA adducts after exposure to 5 $\mu\text{g/ml}$ BaP, suggesting saturation of metabolic activation or induction of phase II metabolism. As for SCEs, no such decrease was observed, suggesting that DNA lesions engaged homologous recombination repair to a greater extent at higher BaP concentrations. For DNA SSBs, group analysis showed no significant increase in all BaP conditions tested. Regarding sex differences, mean SCEs and high frequency SCE cells (HFC) were significantly increased only in men, at $[\text{BaP}] = 0,1 \mu\text{g/ml}$. Also, interindividual differences were present and were higher for BaP-DNA adducts, MNs and CAs, whereas they were low for SCEs. Statistical analysis by multiple linear regression showed that two variables (BaP exposure level and BaP-DNA adducts) significantly explained 53 % of observed variability in SCE test, while % HFC was the only variable significantly explaining the observed variability in CA and MN test (34 % and 12 %, respectively). These observations indicate that DNA breaks contributed to SCEs formation. Finally, our study provides new insights regarding the biomarker best suited to monitor PAH exposure and its early genotoxic effects in lymphocytes.

Keywords

Partial correlation; multiple linear regression; 8-OH-dG; oxidative stress; EM-ISEL.

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. Occupational exposure to PAHs occurs in coal gasification and aluminium production industries, as well as during use of coal tar, asphalt and mixtures of coal-tar pitch (1). Currently, 15 PAHs are classified as carcinogenic, probably or possibly carcinogenic to human by the International Agency for Research on Cancer (groups 1, 2A and 2B) (1), and BaP is a prototypical member of this class of carcinogenic PAHs.

Bioactivation of BaP leads to production of BaP-7,8-diol-9,10-epoxide (BPDE), which is considered as the ultimate carcinogenic species. BPDE can bind to DNA, forming adducts that will be removed mainly by nucleotide excision repair (NER) (2). In addition, BaP quinone metabolites can form stable and depurinating adducts with DNA. It can be redox-cycling, thus generating reactive oxygen species (ROS), which will oxidize DNA bases generating 8-oxo-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) (3). These adducts are at the origin of BaP induced DNA damage, mutagenesis and carcinogenesis (4,5), and their levels are increased in occupationally exposed individuals presenting raised levels of cytogenetic biomarkers such as sister chromatid exchanges (SCEs) (6,7). As for DNA damage measured with the Comet assay, some studies report a significant increase in PAH exposed workers (8,9), while other studies did not report such an increase (10,11). In order to evaluate DNA damage, biological monitoring is commonly performed on human lymphocytes, used as surrogate tissue, as they are considered to reflect damage present in target tissues (12).

Human lymphocytes exposed *in vitro* to BaP produce metabolites, such as BPDE and quinones, which can be quantified (13). Also, the expression of genes involved in phase I and phase II metabolism of BaP (CYP1A1 and GSTP1), and in its induction (AhR, ARNT) (14), as well as the fact that CYP1A1 enzyme is induced in benzanthracene treated lymphocytes (15), all suggest that human lymphocytes could be a good model for *in vitro*

studies of BaP-induced genotoxicity. Indeed, a significant production of SCEs was observed in lymphocytes treated with up to 250 µg/ml BaP for a 48-h exposure period (16-18). As for early biomarkers, BaP-DNA adducts have been characterized by ³²P-postlabeling in human lymphocytes exposed *in vitro* to BaP (13,19). In the only two studies measuring DNA single-strand breaks in human lymphocytes exposed to BaP for a short period (1 or 4 h; 0.5 – 10 µg/ml BaP), Comet assay did not detect a significant increase in DNA breaks, unless S9 mix was present (20,21).

In the literature, *in vitro* BaP exposure studies usually present grouped results, making it difficult to evaluate interindividual variations in genotoxic response, and identify sensitive individuals. This variability was assessed by Warshawsky *et al.* (22), who reported a 2.5-fold interindividual variation using the micronuclei (MN) assay on human lymphocytes exposed *in vitro* to BaP. Larger variation was reported for other biomarkers studied in a population exposed to environmental pollution in Poland (23). Indeed, a 2 to 22-fold variation ratio was observed for SCEs and chromosome aberrations (CAs), while a 73-fold variation was present when measuring PAH-DNA adducts by ELISA. Also, sex differences are rarely assessed in PAH exposed individuals, as occupational studies are mostly conducted in male cohorts. Environmental exposure studies only occasionally examine the effect of sex on biomarkers of genotoxicity.

Our study was designed to evaluate the genotoxicity of BaP at low concentrations (0.1 – 10 µg/ml), with an exposure period of 24 h followed by a 24 h post-exposure period. We used BaP-DNA adducts, DNA single-strand breaks (DNA SSBs) and SCEs as genotoxicity endpoints. Also, we assessed interindividual variation and sex differences and compared it with results obtained for MNs and CAs, from our previous study on the same group of volunteers (Fortin *et al.* submitted). Finally, we established correlations between the biomarkers. To our knowledge, very few reports have assessed such a large number of early biomarkers following BaP exposure of human lymphocytes.

Methods

Subjects

Twenty five subjects (13 women and 12 men), 20 to 30 years old (mean: 26.6 years), living in Montréal (Québec, Canada) were carefully selected to ensure minimal 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 diagnosed with a genomic instability syndrome and with no chemo- or radio-therapy history. This research was approved by the research ethics board of Université de Montréal (reference numbers CERFM-68(05)#75 and CERFM-94(08)4#308). All subjects provided informed consent to participate in this study.

Subjects were abstain from alcohol for 24 hours prior to a 30 ml blood draw. As there were a large number of biomarker analyses and the amount of blood was limited, all assays were not done on every subject. For BaP-DNA adducts measurements, 24 subjects were involved and received technical codes Add1 to Add24. 10 subjects participated in DNA single-strand break measurement by EM-ISEL assay and received technical codes SSB1 to SSB10. 16 subjects were involved in SCEs test and received technical codes SCE1 to SCE16.

Chemicals

A benzo-a-pyrene (BaP) stock solution was prepared by dissolving the powder (CAS number: 50-32-8, Sigma-Aldrich Canada Ltd, Oakville, ON, Canada) 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-wrapped microtubes to prevent light degradation (24).

Cell cultures

For BaP-DNA adduct measurement, lymphocyte/ monocyte cell fraction were first isolated using Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich Canada Ltd) following the

manufacturer's instructions. Cultures containing $3 - 5 \times 10^6$ cells (1.5×10^6 cells/ml) were established. Cells were cultivated in 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). For EM-ISEL assay and SCE test, peripheral blood cultures were established using standard cytogenetic procedures (25). A 0.35 ml aliquot of blood was added to 5 ml supplemented RPMI medium. Cultures 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, and then reincubated in fresh supplemented RPMI medium for 24 h, before harvest.

BaP-DNA adducts measurement by CIA

After culture, cells (approximately 5 to 15 million cells per culture) were centrifuged and pellets were frozen at -80°C until DNA preparation. DNA was isolated using Flexigene DNA kit for blood cells (Qiagen Inc., Mississauga, ON, Canada). DNA adducts were measured using a chemiluminescence immunoassay (CIA), as described by Divi *et al.* (26). In our experimental setting, the lower limit of detection was 4 adducts/ 10^9 nucleotides and inter-assay variation was 1.16-fold (16 %) as determined with four samples assayed three times on different microtiter plates. One culture per treatment and per subject was prepared for BaP-DNA adducts measurements, as there was a limited amount of cells available for culture.

DNA single-strand break (DNA SSB) measurements with EM-ISEL assay

Colcemid (0.1 mg/ml – Invitrogen Canada Inc.) was added to cultures 2 h prior harvesting cells in metaphase. Cells were centrifuged, resuspended in 0.075M KCl, incubated for 8 minutes at 37°C, centrifuged and fixed three times in Carnoy I. Finally, metaphase cells were spread on ice-cold precleaned microscope slides and air-dried overnight at room temperature. DNA SSBs were detected using the EM-ISEL assay, as described in Depault *et al.* (27). One culture per treatment and per subject, was analysed with EM-ISEL assay, due to limitation in blood volume. Twenty nuclei were observed and

photographed with a Philips EM208 transmission microscope (Philips Electron Optics, Eindhoven, The Netherlands) at 28 000 to 36 000x of magnification. Labeling density was evaluated by counting the number of immunogold particles (IGPs) per μm^2 of chromatin using the public domain software Scion Image for Windows, version 4.0.3.2 (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

Sister chromatid exchanges (SCE) test

BrdU (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ – Sigma-Altrich Canada Ltd) was added to cultures after cell washing for 24 h and colcemid (0.1 mg/ml – Invitrogen Canada Inc.) was added to cultures 2 h prior harvesting cells in metaphase. Cells were centrifuged, resuspended in 0.075M KCl, incubated for 8 minutes at 37°C, centrifuged and fixed three times in Carnoy I. Finally, metaphases were spread on ice-cold precleaned microscope slides. Fluorescence-Photolysis-Giemsa (FPG) technique was then performed to visualize sister chromatids and SCEs (28).

Duplicate cultures were established per treatment and per subject. Fifty (50) M2 metaphases per treatment were analysed at 1000x of magnification on a Leica Aristoplan microscope (Leica Microsystems Canada Inc., Richmond Hill, ON, Canada), for SCE number. Selected metaphases contained 46 chromosomes, as prescribed by OECD guideline 479 (29). All microscopic analyses were done by a single observer. High frequency SCE cells were evaluated following a modification of the method described by Kosmider *et al.* (30). The number of SCE corresponding to the 95th percentile of SCE distribution of the negative control condition ([BaP] = 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was determined for each subject. The percentage of cells having more SCEs than the 95th percentile was calculated for all subjects and all conditions.

Statistical analysis

To evaluate dose-response relationships, the following indicators were analysed at individual level: raw data for DNA SSBs (n = 20 per subject and condition) and SCEs (n = 50 per subject and condition). These indicators were analyzed by one-way ANOVA followed by multiple comparison *post-hoc* test (Bonferroni for equal variances or Tamhane's T2 for unequal variances). To evaluate dose-response relationships at the group

level, DNA SSB data were expressed as means normalized to the negative control, while SCE data were expressed as mean SCEs per cell, and as percentage HFC. Dose-response relationships of BaP-DNA adducts and DNA SSBs were analysed with the non-parametric Wilcoxon signed-Rank test. For SCEs and % HFC, repeated measures ANOVA were performed. For all biomarkers, interindividual variation ratio was obtained by dividing the maximal value by the minimal value observed for this particular biomarker, and is expressed as fold variation.

Sex differences were investigated using two approaches. First, women and men samples were compared for every dose and indicators with the bilateral Student's *t*-test for independent samples (BaP-DNA adducts and DNA SSBs) or as a part of the repeated measures ANOVA (SCEs and % HFC). Second, dose-response relationships for all indicators were analyzed for women and men separately and were then compared to each other. To study the relationships existing between the different biomarkers, Pearson's correlation, as well as partial correlation (adjusted on BaP exposure and sex) were performed. Also, multiple linear regression, testing for collinearity, was conducted to explain the variability observed in our biomarkers. Samples in which BaP-DNA adducts were non detected were assigned a value corresponding to half the limit of detection (LOD/2). Statistic analyses were done using SPSS 17.0 software for Windows (SPSS inc. Chicago, IL, USA), and *p*-values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

BaP-DNA adduct

Individual results for BaP-DNA adduct measurements by CIA are presented in Table I, while group mean values are in Table II. Interindividual variation was present when measuring the spontaneous ($[\text{BaP}] = 0 \mu\text{g/ml}$) BaP-DNA adduct level (see Table I), as adducts were undetected in 76 % of the unexposed samples. In one subject BaP-DNA adducts reached a level of 98 adducts per 10^9 nucleotides, representing at least a 49-fold interindividual variation ratio (Supplemental Table V). After BaP exposure, interindividual variation ratio decreased, reaching a minima of 5.1-fold, at $[\text{BaP}] = 1 \mu\text{g/ml}$.

Comparison at group level showed a significant increase in BaP-DNA adducts following BaP exposure, starting at [BaP] = 0.1 µg/ml ($p < 0.001$ for the group – see Table II). Maximal BaP-DNA adduct level was observed at [BaP] = 1 µg/ml, followed by a significant decrease at [BaP] = 5 µg/ml, for both group ($p < 0.05$), and women ($p < 0.01$ – see Figure 1). Direct comparison of women and men results in all BaP-tested conditions showed no significant differences, despite the 1.6 fold difference at BaP 5 µg/ml condition (Table II).

DNA single-strand breaks (DNA SSBs)

Individual results for DNA SSBs are presented in Table III, while group mean values are in Table II. Interindividual variation was present for spontaneous mean IGPs (Suppl. Table V), and this ratio was calculated as 13-fold. Following BaP exposure, mean IGPs variation ratio fluctuated between 2.7 and 15-fold. Interindividual variation was also present when looking at individual genotoxic responses to BaP (Table III). Indeed, statistical analysis by one-way ANOVA showed significantly increased IGPs for 4/10 subjects at [BaP] = 0.1 µg/ml, when compared to negative control ($p < 0.001$). At [BaP] = 1 µg/ml, differences between individuals were especially present, as 5/10 subjects presented a significant IGPs increase, while 2/10 subjects presented a significant decrease at this concentration (comparison with negative control condition; $p < 0.001$). The remaining three subjects presented no significant increases or decreases in IGPs. Group statistical analysis was performed after normalisation of the means, taking the negative control as reference. Normalised group means are presented in Table II and show a non-significant IGPs increase in all BaP conditions tested. Direct comparison of women and men results in all BaP-tested conditions showed no significant differences

Sister chromatid exchanges (SCEs)

Individual results for SCEs and % HFC are presented in Supplemental Tables VI and VII, while group mean values are in Table II. SCE test showed variation in individual genotoxic responses to BaP (Suppl. Table VI). At [BaP] = 0.1 µg/ml, four subjects (SCE1, SCE3, SCE5 and SCE9; three women and one man) had no significant increase in their mean SCEs per cell, while at [BaP] = 1 µg/ml, this was observed for a single subject (SCE1). However, interindividual variation was almost constant for mean SCEs per cell,

for both spontaneous and induced SCEs, variation ratio remaining at 2.0-fold (see Suppl. Table V). This was not the case for % HFC, as interindividual variation ratio ranged between 2.5 and 28-fold, being maximal at [BaP] = 0.1 µg/ml.

Significant increases in mean SCEs per cell and % HFC were observed following BaP exposure, starting at [BaP] = 0.1 µg/ml ($p < 0.05$ for the group – see Table II). These increases were linear: individual mean SCEs per cell and individual % HFC (shown in Suppl. Tables VI and VII) presented a very good correlation with BaP exposure (Pearson's $r = 0.64$ and $r = 0.66$; $p = 1.5 \times 10^{-8}$ and $p = 2.9 \times 10^{-9}$, respectively – Table IV). However, men and women behaved differently (see Table II), as women showed a non-significant increase in mean SCEs per cell at [BaP] = 0.1 µg/ml, and a significant increase at [BaP] = 1 µg/ml ($p < 0.05$), while men presented highly significant mean SCE increases at both concentrations ($p < 0.001$). When analyzing % HFC (Table II), the same situation was observed: men had significantly increased % HFC at [BaP] = 0.1 and 1 µg/ml ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively), while women presented significant % HFC increases starting at [BaP] = 1 µg/ml ($p < 0.05$).

Finally, analyzing more extensively our previous results on the same cohort (Fortin *et al.* submitted), we observed that a great interindividual variation was present for both MN and CA frequencies. A variation ratio of 21-fold was present for spontaneous MN frequency, while it was 5.0-fold for CA frequency (Suppl. Table V). Following BaP exposure, variation ratio fluctuated between 2.6 and 26-fold, for both MNs and CAs frequencies.

Correlations between biomarkers

Since in our study most biomarkers (BaP-DNA adducts, mean SCEs per cell, % HFC, MN and CA frequencies) were significantly correlated with BaP exposure, partial correlation coefficients were calculated, controlling for BaP exposure and sex (Table IV). BaP-DNA adducts showed significant partial correlations with SCEs indicators (mean SCEs per cell and % HFC) ($p = 0.008$ and $p = 0.002$, respectively – Table IV). Interestingly, % HFC also showed a significant partial correlation with CA frequency ($p = 0.020$) and the number of MN per micronucleated cells (MN per MNBN – $p = 0.034$). Also,

MN per MNBN and CA frequency showed a significant partial correlation with each other ($p = 0.011$ – Table IV).

Multiple linear regression analysis was performed to identify the explanatory variables affecting our early biomarkers of genotoxicity. BaP exposure was the most important variable affecting % HFC, as it explained 44 % of its variability ($r^2 = 0.441$; $p = 1.2 \times 10^{-4}$). Addition of BaP-DNA adducts to the regression explained 53 % of observed variability in % HFC ($r^2 = 0.528$; $p = 8.5 \times 10^{-5}$). As for mean SCEs per cell, BaP exposure explained 41% of its variability ($r^2 = 0.411$; $p = 2.4 \times 10^{-4}$). About CA and MN frequencies, the only significant explanatory variable was % HFC, as it explained 34 % of CA frequency's variability ($r^2 = 0.335$; $p = 0.001$), and 12% of MN frequency's variability ($r^2 = 0.124$; $p = 0.028$).

Discussion

Early biomarkers of genotoxicity show different dose-response curves

In our study, BaP-DNA measurements showed that globally BaP-DNA adducts increase with increasing BaP concentrations when compared to negative control ($p < 0.01$ – Table I). A progressive increase over control values is observed for the first two BaP concentrations and at $[\text{BaP}] = 5 \mu\text{g/ml}$, BaP-DNA adducts significantly decreased (Figure 1). This dose-response histogram has an inverted U-shape already observed in our cohort, when previously evaluating MNs and CAs. An analog dose-response curve has been observed in lung fibroblasts (31), where cells exposed to high concentrations of BaP ($1 \mu\text{g/ml}$) presented less DNA adducts than cells exposed to $0.25 \mu\text{g/ml}$ BaP. On the other hand, this dose-response curve could also be cell specific, as HepG2 and HaCat cells (originating from an hepatocellular carcinoma and from keratinocyte cells, respectively) showed no BPDE-DNA adducts decrease at much higher BaP concentrations (up to 12.5 and $100 \mu\text{g/ml}$, respectively) (32).

A decreasing DNA adduct level occurring at high BaP concentrations, as observed in human lymphocytes and lung fibroblasts, could result from a saturation in metabolic activation enzymes (33). A saturation of CYP1A1 enzyme was observed in rat hepatocytes

(34), and in breast cancer MCF-7 and HepG2 cells (35), at high benzo-a-pyrene concentrations. These cell-specific responses could also be related to the presence of different metabolic enzymes having different affinities for BaP. Indeed, CYP1A1 induction was more prominent in MCF-7 cells than in HepG2 cells, while the latter contained more CYP1A2 protein (35). Alternatively, this decreased BaP-DNA adduct level could be a consequence of phase II metabolism induction, occurring when a sufficient amount of ROS is produced, thereby stabilizing Nrf2 and activating transcription of aldo-keto reductases (AKRs), glutathione-s-transferases (GSTs) and other conjugating enzymes (36).

Regarding SCEs, in our study a linear dose-response curve was observed for mean SCEs per cell and % HFC (see Table II). Those SCEs are generated during homologous recombination (HR) repair, which is engaged in response to stalled replication forks. SCEs are a consequence of an incorrect resolution of Holliday junctions during HR (37). These fork arrests result from the presence of DNA double-strand breaks (DSBs), DNA interstrand crosslinks, modified DNA bases or DNA adducts (38). As we report a significant decrease in BaP-DNA adduct level at [BaP] = 5 µg/ml, a decrease in SCE formation would be expected at this concentration. Clearly, this is not the case here (see Table II). This could result from the presence of modified DNA bases, such as 8-OH-dG, generated during redox-cycling of BaP quinones (3). Also, factors affecting BaP-DNA adducts repair could partly explain this observation.

In human blood lymphocytes treated with BaP, the major BPDE diastereoisomer is (+)-*anti*-BPDE, representing 85 % of all BPDE diastereoisomers, followed by (+)-*syn*-BPDE (13). Adduction of (+)-*anti*-BPDE to guanine is mainly in *trans* (95 %) in bronchoalveolar cells, while (+)-*syn*-BPDE generates *cis* and *trans* dG adducts (39). These adducts are mainly repaired by NER (2) and repair efficiency is modulated by conformational changes caused by insertion of different BPDE diastereoisomer adducts in DNA (40). Using an *in vitro* repair assay with human lymphoblastoid cell extracts, Custer *et al* (41) showed that *trans*-(±)-*anti*-BPDE-dG adducts were the less efficiently repaired of all *trans* adducts. Given that these adducts would be the major ones in blood lymphocytes (as in bronchoalveolar cells), and as they are not efficiently repaired by NER, we can postulate that these adducts could still be present in DNA when replication forks progress.

Presence of these unrepaired adducts would stall replication forks during the next cell cycle turn, therefore engaging HR repair to a greater extent, and leading to production of an increased number of SCEs. Conversely, if NER repair efficiency was increased, fewer DNA adducts would persist, HR repair would be less engaged and fewer SCEs would be observed. It is actually the case in smoking individuals having an increased NER repair efficiency, where decreased mean SCEs were observed (42).

Early biomarkers of genotoxicity show different interindividual variations

In our cohort, 76 % of unexposed lymphocyte samples had an undetectable level of BaP-DNA adducts, as measured by CIA (Table I). This is in the upper range of reported values for control or exposed populations (13 – 77 %), when adducts are measured with techniques having similar limits of detection (43-46). This high rate of undetectable samples may be explained, in part, by application of strict selection criteria in our study, which minimizes exposure to PAH. On the other hand, interindividual variation ratios in BaP-DNA adduct level varied between 7.6 and 49-fold in our cohort (Suppl. Table V), well comparable with other methods. Indeed, using ELISA a 73-fold interindividual variation ratio was reported in a population exposed to air pollution (23). Also, individuals with documented specific exposure to PAHs (psoriatic patients, aluminium workers), exhibited a 8.9 to 266-fold variation ratio in BPDE-DNA adduct level (measured by HPLC/fluorescence) (45).

As for DNA SSBs evaluated with EM-ISEL assay, interindividual variation ratio found in our study in mean IGPs, was estimated at 13-fold for spontaneous level (Suppl. Table V). Nevertheless, it could not be compared to other published studies, as all were done using blood from a single subject (27,47). Concerning SCEs, we report a 2.0-fold interindividual variation ratio for mean SCEs in our cohort (Suppl. Table V), identical to what is reported by Perera *et al.* (23) and Sénécal-Quevillon *et al.* (48). Regarding % HFC, interindividual variation ratio in unexposed samples (2.5-fold) was lower than other control populations (7.0 to 56-fold) (49,50). Finally, with an interindividual variation ratio in CA frequency ranging between 2.6 and 26-fold (Suppl. Table V), our results are similar to what Perera *et al.* reported (22-fold variation) (23). For MN frequency, it shows higher interindividual variation, for both spontaneous (21-fold variation ratio – Suppl. Table V),

and induced (4.3 – 26-fold variation ratio) MNs, compared to Warshawsky *et al.* (22), with values between 1.6 and 2.5-fold, in BaP-exposed human lymphocytes. The small number of subjects included in this study ($n = 5$) could explain this reduced variation. Nonetheless, a much higher spontaneous MN frequency variation ratio (up to 30-fold) has been reported in numerous papers, as reviewed by Fenech (51) and Vral *et al.* (52).

High interindividual variation in MN and CA tests could be explained by genetic factors collectively known as heritability. It was shown that this factor plays a major role in spontaneous and radiation-induced MN frequencies, as well as in spontaneous and BPDE-induced CA frequencies, explaining up to 70 % of interindividual variation, as estimated in monozygotic twins - control pairs studies (53-55). As for SCEs, heritability factor is lower, being estimated at 30 % (56), and may explain the low interindividual variation ratio observed with this test. Concerning BaP-DNA adducts formation, heritability still needs to be evaluated.

Men could be more sensitive to genotoxic effects caused by low BaP exposure

When analyzing the dose-response curves observed in women and men separately, an increased sensitivity of men showed up, especially to our lower BaP concentrations. Taking into account BaP-DNA adducts, men presented more adducts than women in all BaP-exposure conditions, even though this difference did not reach statistical significance (see Table II). Also, only men presented a significant increase in the following biomarkers at $[BaP] = 0.1 \mu\text{g/ml}$: mean SCEs and % HFC (Table II). Same results were found in our previous study with MN frequency and CA frequency (without gaps).

Sex differences in DNA damages have not been reported frequently and could be related to specific exposures. In individuals exposed to air pollution, a significantly increased bulky DNA adduct level in lymphocytes was reported only in males (57). On the other hand, in Upper Silesia (Poland), significantly increased blood DNA adduct level, mean SCEs and MN frequency were found in girls, but not in boys, in response to a complex environmental exposure (58). Also, processing of electronics waste in China is associated with a significantly increased blood CA and MN frequencies only in women (59).

Sex differences in genotoxic response to BaP or PAHs could be associated with different metabolic capacities, specific for a particular cell type. In fact, women have a significantly lower baseline CYP1A1 activity in blood cells, and this activity is less inducible by 3-methylcholanthrene, when compared to men (60). This could explain the lower BaP-DNA adduct level observed in women of our cohort. On the contrary, significantly more bulky DNA adducts are found in lung tissues taken from non-smoking females, when compared with non-smoking male tissues (61). Furthermore, lung adenocarcinoma cell lines of female origin have significantly more BaP-induced DNA adducts, increased basal and induced CYP1A1 levels, and increased CYP1A1 activity (62). Together, these findings support the concept that sex differences have multiple origins and may be related to specific exposures and cell types.

Correlations between BaP exposure, BaP-DNA adducts and early biomarkers of genotoxicity

In our study, early biomarker levels (BaP-DNA adducts, SCEs, % HFC, MN and CA frequencies) correlated significantly with BaP exposure (Table IV). Those correlations were not established in previous published *in vitro* studies using human lymphocytes. Nevertheless, correlations were analyzed in occupational studies (e.g. non experimental designs) with contradictory results. Indeed, mean SCEs, MN frequency and/ or CA frequency were associated with PAH exposure in coke oven workers and coal exposed workers in many studies (6,63-65), while no association was found in other reports (7,66). The same contradictory situation was reported for DNA adducts and PAH exposure, as reviewed by Brandt and Watson (67).

Investigation of relations existing between early biomarkers measured in our study revealed that BaP-DNA adducts correlated significantly with the two SCE indicators (mean SCEs per cell and % HFC; $p = 0.008$ and $p = 0.002$, respectively – Table IV), when controlling for BaP exposure and sex. In literature, significant positive correlations between SCEs and BaP-induced or bulky DNA-adducts were reported only in one *in vitro* study conducted on human lymphocytes of two subjects (19), and in one cohort study exposed to environmental pollution in Upper Silesia (Poland) (58). However, in coke oven workers,

no significant correlations were observed between SCEs or % HFC, and bulky DNA-adducts (68,11)

In our study, multiple linear regression analysis showed that a large part of the variability present when analysing SCE indicators (mean SCEs per cell and % HFC) can be explained by BaP exposure and by BaP-DNA adducts. This analysis also showed that % HFC is the only variable significantly affecting CA and MN frequency, providing a link between SCEs, CAs and MNs. Furthermore, we report a significant correlation existing between CA frequency and MN per MNBN ($r = 0.351$, $p = 0.011$; Table IV) that can be explained by the role of chromosome breaks in MN formation (69). On the other hand, additional DNA lesions caused by BaP exposure, such as DSBs and 8-OH-dG, are also responsible for SCE formation, in addition to DNA adducts (38). While DSBs are responsible for CA and MN formation (70), importance of 8-OH-dG in MN formation should not be excluded, as MN and 8-OH-dG increases were significantly associated with PAH exposure in coke oven workers (65). Also, as BaP quinones were detected in BaP-treated human lymphocytes (13), 8-OH-dG formation is probably present in this cell type. In our study, because % HFC's variability is linked to BaP-DNA adducts, CA frequency and MN frequency (when excluding effect of BaP exposure and sex), this gives support to a role of DNA DSBs and 8-OH-dG in the production of cells containing a high number of SCEs. These factors could explain why % HFC are considered a more sensible genotoxic endpoint than mean SCEs per cells (71). At last, since heritability has a major role in MN and CA formation (53-55), it is not surprising that, in our study, an environmental factor such as BaP exposure, cannot significantly explain the observed variability in CA and MN frequencies. Only % HFC, which reflects action of both environmental and genetic factors, significantly explains a small part of CA and MN frequencies (34 % and 12 %, respectively).

In summary, our study shows that, when measuring early biomarkers (BaP-DNA adducts, MNs and CAs), an inverted-U dose-response curve is present in human lymphocytes exposed to low BaP concentrations. This particular dose-response curve could be caused by saturation of metabolic activation enzymes or initiation of phase II metabolism. On the other hand, as SCE test gave a linear dose-response curve, it suggests

that some DNA lesions (such as unrepaired DNA adducts, DNA DSBs, or 8-OH-dG) engaged HR repair to a greater extent at high BaP concentrations. As unrepaired adducts could persist, a kinetic study evaluating formation and repair rates of BaP-DNA adducts in human lymphocytes could be interesting, using similar and lower BaP concentrations. In addition, an increased sensitivity of men's lymphocytes towards low BaP exposure was highlighted in our study. This could be caused by sex-related differences in BaP metabolism, but remains to be explored in subsequent studies involving BaP and other chemicals, as well as in population studies designed to investigate this specific issue. Finally, our study provides new insights regarding the biomarker best suited to monitor PAH exposure and its early genotoxic effects in lymphocytes. We found that BaP-DNA adducts, CAs and MNs showed considerable interindividual variation and this variation was poorly explained by BaP exposure. However, low interindividual variability was present when evaluating SCEs (mean SCEs per cell and % HFC), and most of it could be explained by BaP exposure. Besides, as interindividual variation was higher for % HFC, their use in low BaP exposure studies could be of interest. This could permit an easier distinction between subjects having increased DNA damages or not, therefore allowing to search for genetic susceptibility factors in more defined subsets of a population and even achieve interpretation of biomonitoring results on an individual basis.

Supplemental data

Supplemental Tables V, VI and VII are available at *Mutagenesis* online.

Funding

This work was supported by the département de pathologie du Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine [to N.L.], the Fonds de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) [to F.F.], FRSQ's Environmental Health Research Network [to P.A.] and the Fondation de l'Hôpital Sainte-Justine / Fondation des Étoiles [to F.F.].

Acknowledgment

The authors would like to thank all subjects for their cooperation while participating in this study.

References

1. Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F. and Coglianò, V. (2005) Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Lancet Oncology*, **6**, 931-932.
2. Xue, W. and Warshawsky, D. (2005) Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **206**, 73-93.
3. Park, J.H., Troxel, A.B., Harvey, R.G. and Penning, T.M. (2006) 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. Toxicol.*, **19**, 719-728.
4. Luch, A. (2005) Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, **5**, 113-125.
5. Shimada, T. (2006) Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **21**, 257-276.
6. Celik, M., Donbak, L., Unal, F., Yuzbasioglu, D., Aksoy, H. and Yilmaz, S. (2007) Cytogenetic damage in workers from a coal-fired power plant. *Mutat. Res.*, **627**, 158-163.
7. Siwinska, E., Mielzynska, D. and Kapka, L. (2004) Association between urinary 1-hydroxypyrene and genotoxic effects in coke oven workers. *Occup. Environ. Med.*, **61**, e10.
8. Xiao, C., Chen, S., Li, J., Hai, T., Lu, Q., Sun, E., Wang, R., Tanguay, R.M. and Wu, T. (2002) Association of HSP70 and genotoxic damage in lymphocytes of workers exposed to coke-oven emission. *Cell Stress Chaperones*, **7**, 396-402.
9. Yang, X., Zheng, J., Bai, Y., Tian, F., Yuan, J., Sun, J., Liang, H., Guo, L., Tan, H., Chen, W., Tanguay, R.M. and Wu, T. (2007) Using lymphocyte and plasma Hsp70

- as biomarkers for assessing coke oven exposure among steel workers. *Environ. Health Perspect.*, **115**, 1573-1577.
10. Carstensen, U., Hou, S.M., Alexandrie, A.K., Hogstedt, B., Tagesson, C., Warholm, M., Rannug, A., Lambert, B., Axmon, A. and Hagmar, L. (1999) Influence of genetic polymorphisms of biotransformation enzymes on gene mutations, strand breaks of deoxyribonucleic acid, and micronuclei in mononuclear blood cells and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine in potroom workers exposed to polyaromatic hydrocarbons. *Scand. J. Work. Environ. Health*, **25**, 351-360.
 11. van Delft, J.H., Steenwinkel, M.S., van Asten, J.G., de Vogel, N., Bruijntjes-Rozier, T.C., Schouten, T., Cramers, P., Maas, L., van Herwijnen, M.H., van Schooten, F. and Hopmans, P.M. (2001) Biological monitoring the exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of coke oven workers in relation to smoking and genetic polymorphisms for GSTM1 and GSTT1. *Ann. Occup. Hyg.*, **45**, 395-408.
 12. Cavallo, D., Ursini, C.L., Rondinone, B. and Iavicoli, S. (2009) Evaluation of a suitable DNA damage biomarker for human biomonitoring of exposed workers. *Environ. Mol. Mutag.*, **50**, 781-790.
 13. Okano, P., Miller, H.N., Robinson, R.C. and Gelboin, H.V. (1979) 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**, 3184-3193.
 14. Siest, G., Jeannesson, E., Marteau, J.B., Samara, A., Marie, B., Pfister, M. and Visvikis-Siest, S. (2008) Transcription factor and drug-metabolizing enzyme gene expression in lymphocytes from healthy human subjects. *Drug Metab. Dispos.*, **36**, 182-189.
 15. Lin, P., Hu, S.W. and Chang, T.H. (2003) 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**, 20-26.
 16. Guven, G.S., Guven, M., Onaran, H., Ulutin, T. and Hacıanefioglu, S. (2006) Individual sensitivity to cytogenetic effects of benzo[alpha]pyrene in cultured

- human lymphocytes: Influence of glutathione S-transferase M1 genotype. *Genet. Mol. Biol.*, **29**, 142-147.
17. Hatzi, V.I., Terzoudi, G.I., Stavropoulou, C., Malik, S.I., Makropoulos, V. and Pantelias, G.E. (2011) Lack of association between GSTT1 polymorphism and endogenous or benzo[a]pyrene-induced sister chromatid exchanges as analyzed in metaphase or G2-phase lymphocytes. *Mol. Biol. Rep.*
 18. Salama, S.A., Sierra-Torres, C.H., Oh, H.Y., Hamada, F.A. and Au, W.W. (2001) Variant metabolizing gene alleles determine the genotoxicity of benzo[a]pyrene. *Environ. Mol. Mutagen.*, **37**, 17-26.
 19. Wiencke, J.K., McDowell, M.L. and Bodell, W.J. (1990) Molecular dosimetry of DNA adducts and sister chromatid exchanges in human lymphocytes treated with benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis*, **11**, 1497-1502.
 20. Frenzilli, G., Bosco, E. and Barale, R. (2000) Validation of single cell gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds. *Mutat. Res.*, **468**, 93-108.
 21. Kleinsasser, N.H., Wallner, B.C., Kastenbauer, E.R., Muenzenrieder, R.K. and Harreus, U.A. (2000) Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the Comet assay. *Mutat. Res.*, **467**, 21-30.
 22. Warshawsky, D., Livingston, G.K., Fonouni-Fard, M. and LaDow, K. (1995) Induction of micronuclei and sister chromatid exchanges by polycyclic and N-heterocyclic aromatic hydrocarbons in cultured human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.*, **26**, 109-118.
 23. Perera, F.P., Hemminki, K., Gryzbowska, E., Motykiewicz, G., Michalska, J., Santella, R.M., Young, T.L., Dickey, C., Brandt-Rauf, P., De Vivo, I. and et al. (1992) Molecular and genetic damage in humans from environmental pollution in Poland. *Nature*, **360**, 256-258.

24. Dabrowska, D., Kot-Wasik, A. and Namiesnik, J. (2008) Stability studies of selected polycyclic aromatic hydrocarbons in different organic solvents and identification of their transformation products. *Pol. J. Environ. Stud.*, **17**, 17-24.
25. Lemieux, N., Drouin, R. and Richer, C.L. (1990) High-resolution dynamic and morphological G-bandings (GBG and GTG): a comparative study. *Hum. Genet.*, **85**, 261-266.
26. Divi, R.L., Beland, F.A., Fu, P.P., Von Tungeln, L.S., Schoket, B., Camara, J.E., Ghei, M., Rothman, N., Sinha, R. and Poirier, M.C. (2002) Highly sensitive chemiluminescence immunoassay for benzo[a]pyrene-DNA adducts: validation by comparison with other methods, and use in human biomonitoring. *Carcinogenesis*, **23**, 2043-2049.
27. Depault, F., Cojocaru, M., Fortin, F., Chakrabarti, S. and Lemieux, N. (2006) Genotoxic effects of chromium(VI) and cadmium(II) in human blood lymphocytes using the electron microscopy in situ end-labeling (EM-ISEL) assay. *Toxicol. In Vitro*, **20**, 513-518.
28. Richer, C.L., Senecal-Quevillon, M. and Duquette, P. (1987) Analysis of low concentrations of 5-bromo-2-deoxyuridine on sister chromatid exchanges in human lymphocytes. *Genome*, **29**, 165-168.
29. OECD. (1986) *Test No. 479: In vitro sister chromatid exchange assay in mammalian cells*. OECD Publishing, Paris.
30. Kosmider, B., Wyszynska, K., Janik-Spiechowicz, E., Osiecka, R., Zyner, E., Ochocki, J., Ciesielska, E. and Wasowicz, W. (2004) Evaluation of the genotoxicity of cis-bis(3-aminoflavone)dichloroplatinum(II) in comparison with cis-DDP. *Mutat. Res.*, **558**, 93-110.
31. Binkova, B., Giguere, Y., Rossner, P., Jr., Dostal, M. and Sram, R.J. (2000) 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**, 57-70.

32. Marie, C., Maitre, A., Douki, T., Gateau, M., Tarantini, A., Guiraud, P., Favier, A. and Ravanat, J.L. (2008) Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo[a]pyrene DNA adducts. *J. Appl. Toxicol.*, **28**, 579-590.
33. Slikker, W., Jr., Andersen, M.E., Bogdanffy, M.S., Bus, J.S., Cohen, S.D., Conolly, R.B., David, R.M., Doerrer, N.G., Dorman, D.C., Gaylor, D.W., Hattis, D., Rogers, J.M., Woodrow Setzer, R., Swenberg, J.A. and Wallace, K. (2004) Dose-dependent transitions in mechanisms of toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **201**, 203-225.
34. Till, M., Riebniger, D., Schmitz, H.J. and Schrenk, D. (1999) Potency of various polycyclic aromatic hydrocarbons as inducers of CYP1A1 in rat hepatocyte cultures. *Chem.-Biol. Interact.*, **117**, 135-150.
35. Skupinska, K., Misiewicz, I. and Kasprzycka-Guttman, T. (2007) A comparison of the concentration-effect relationships of PAHs on CYP1A induction in HepG2 and Mcf7 cells. *Arch. Toxicol.*, **81**, 183-200.
36. Jiang, H., Gelhaus, S.L., Mangal, D., Harvey, R.G., Blair, I.A. and Penning, T.M. (2007) Metabolism of benzo[a]pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography-mass spectrometry. *Chem. Res. Toxicol.*, **20**, 1331-1341.
37. Hirano, S., Yamamoto, K., Ishiai, M., Yamazoe, M., Seki, M., Matsushita, N., Ohzeki, M., Yamashita, Y.M., Arakawa, H., Buerstedde, J.M., Enomoto, T., Takeda, S., Thompson, L.H. and Takata, M. (2005) Functional relationships of FANCC to homologous recombination, translesion synthesis, and BLM. *EMBO J.*, **24**, 418-427.
38. Andreassen, P.R., Ho, G.P. and D'Andrea, A.D. (2006) DNA damage responses and their many interactions with the replication fork. *Carcinogenesis*, **27**, 883-892.
39. Ruan, Q., Gelhaus, S.L., Penning, T.M., Harvey, R.G. and Blair, I.A. (2007) Aldo-keto reductase- and cytochrome P450-dependent formation of benzo[a]pyrene-derived DNA adducts in human bronchoalveolar cells. *Chem. Res. Toxicol.*, **20**, 424-431.

40. Hess, M.T., Gunz, D., Luneva, N., Geacintov, N.E. and Naegeli, H. (1997) Base pair conformation-dependent excision of benzo[a]pyrene diol epoxide-guanine adducts by human nucleotide excision repair enzymes. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 7069-7076.
41. Custer, L., Zajc, B., Sayer, J.M., Cullinane, C., Phillips, D.R., Cheh, A.M., Jerina, D.M., Bohr, V.A. and Mazur, S.J. (1999) Stereospecific differences in repair by human cell extracts of synthesized oligonucleotides containing trans-opened 7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene 7,8-diol 9,10-epoxide N2-dG adduct stereoisomers located within the human K-ras codon 12 sequence. *Biochemistry (Mosc)*. **38**, 569-581.
42. Stierum, R.H., Hageman, G.J., van Herwijnen, M.H., van der Veer, M.S. and Kleinjans, J.C. (1997) Age-related negative associations between parameters of cytogenetic damage and ex vivo (+/-)-anti-benzo(a)pyrene diolepoxide-induced unscheduled DNA synthesis in smoking humans. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **6**, 943-948.
43. Gunter, M.J., Divi, R.L., Kulldorff, M., Vermeulen, R., Haverkos, K.J., Kuo, M.M., Strickland, P., Poirier, M.C., Rothman, N. and Sinha, R. (2007) Leukocyte polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation and colorectal adenoma. *Carcinogenesis*, **28**, 1426-1429.
44. Pastorelli, R., Cerri, A., Mezzetti, M., Consonni, E. and Airoidi, L. (2002) Effect of DNA repair gene polymorphisms on BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Int. J. Cancer*, **100**, 9-13.
45. Pavanello, S., Favretto, D., Brugnone, F., Mastrangelo, G., Dal Pra, G. and Clonfero, E. (1999) HPLC/fluorescence determination of anti-BPDE-DNA adducts in mononuclear white blood cells from PAH-exposed humans. *Carcinogenesis*, **20**, 431-435.
46. Poirier, M.C., Weston, A., Schoket, B., Shamkhani, H., Pan, C.F., McDiarmid, M.A., Scott, B.G., Deeter, D.P., Heller, J.M., Jacobson-Kram, D. and Rothman, N.

- (1998) Biomonitoring of United States Army soldiers serving in Kuwait in 1991. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **7**, 545-551.
47. M'Bemba-Meka, P., Lemieux, N. and Chakrabarti, S.K. (2005) Nickel compound-induced DNA single-strand breaks in chromosomal and nuclear chromatin in human blood lymphocytes in vitro: role of oxidative stress and intracellular calcium. *Mutat. Res.*, **586**, 124-137.
48. Sénécal-Quevillon, M., Duquette, P. and Richer, C.L. (1986) Analysis of sister-chromatid exchanges (SCEs) in familial and sporadic multiple sclerosis. *Mutat. Res.*, **161**, 65-74.
49. Lai, J.S., Kuo, H.W., Liao, F.C. and Lien, C.H. (1998) Sister chromatid exchange induced by chromium compounds in human lymphocytes. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **71**, 550-553.
50. Lanza, A., Robustelli della Cuna, F.S., Zibera, C., Pedrazzoli, P. and Robustelli della Cuna, G. (1999) Somatic mutations at the T-cell antigen receptor in antineoplastic drug-exposed populations: comparison with sister chromatid exchange frequency. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **72**, 315-322.
51. Fenech, M. (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.*, **2**, 1084-1104.
52. Vral, A., Fenech, M. and Thierens, H. (2011) The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis*, **26**, 11-17.
53. Surowy, H., Rinckleb, A., Luedeke, M., Stuber, M., Wecker, A., Varga, D., Maier, C., Hoegel, J. and Vogel, W. (2011) Heritability of baseline and induced micronucleus frequencies. *Mutagenesis*, **26**, 111-117.
54. Tedeschi, B., Cicchetti, R., Argentin, G., Caporossi, D., Pittaluga, M., Parisi, P. and Vernole, P. (2004) Aphidicolin and bleomycin induced chromosome damage as biomarker of mutagen sensitivity: a twin study. *Mutat. Res.*, **546**, 55-64.

55. Wu, X., Spitz, M.R., Amos, C.I., Lin, J., Shao, L., Gu, J., de Andrade, M., Benowitz, N.L., Shields, P.G. and Swan, G.E. (2006) Mutagen sensitivity has high heritability: evidence from a twin study. *Cancer Res.*, **66**, 5993-5996.
56. Hirsch, B.A., Sentz, K.K. and McGue, M. (1992) Genetic and environmental influences on baseline SCE. *Environ. Mol. Mutag.*, **20**, 2-11.
57. Georgiadis, P., Topinka, J., Stoikidou, M., Kaila, S., Gioka, M., Katsouyanni, K., Sram, R., Autrup, H. and Kyrtopoulos, S.A. (2001) Biomarkers of genotoxicity of air pollution (the AULIS project): bulky DNA adducts in subjects with moderate to low exposures to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and their relationship to environmental tobacco smoke and other parameters. *Carcinogenesis*, **22**, 1447-1457.
58. Mielzynska, D., Siwinska, E., Kapka, L., Szyfter, K., Knudsen, L.E. and Merlo, D.F. (2006) The influence of environmental exposure to complex mixtures including PAHs and lead on genotoxic effects in children living in Upper Silesia, Poland. *Mutagenesis*, **21**, 295-304.
59. Liu, Q., Cao, J., Li, K.Q., Miao, X.H., Li, G., Fan, F.Y. and Zhao, Y.C. (2009) Chromosomal aberrations and DNA damage in human populations exposed to the processing of electronics waste. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **16**, 329-338.
60. Smart, J. and Daly, A.K. (2000) Variation in induced CYP1A1 levels: relationship to CYP1A1, Ah receptor and GSTM1 polymorphisms. *Pharmacogenetics*, **10**, 11-24.
61. Cheng, Y.W., Hsieh, L.L., Lin, P.P., Chen, C.P., Chen, C.Y., Lin, T.S., Su, J.M. and Lee, H. (2001) Gender difference in DNA adduct levels among nonsmoking lung cancer patients. *Environ. Mol. Mutag.*, **37**, 304-310.
62. Uppstad, H., Osnes, G.H., Cole, K.J., Phillips, D.H., Haugen, A. and Mollerup, S. (2011) Sex differences in susceptibility to PAHs is an intrinsic property of human lung adenocarcinoma cells. *Lung Cancer*, **71**, 264-270.

63. Donbak, L., Rencuzogullari, E., Yavuz, A. and Topaktas, M. (2005) The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey. *Mutat. Res.*, **588**, 82-87.
64. Kalina, I., Brezani, P., Gajdosova, D., Binkova, B., Salagovic, J., Habalova, V., Mrackova, G., Dobias, L. and Sram, R.J. (1998) Cytogenetic monitoring in coke oven workers. *Mutat. Res.*, **417**, 9-17.
65. Liu, A.L., Lu, W.Q., Wang, Z.Z., Chen, W.H., Lu, W.H., Yuan, J., Nan, P.H., Sun, J.Y., Zou, Y.L., Zhou, L.H., Zhang, C. and Wu, T.C. (2006) 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**, 673-677.
66. Van Hummelen, P., Gennart, J.P., Buchet, J.P., Lauwerys, R. and Kirsch-Volders, M. (1993) Biological markers in PAH exposed workers and controls. *Mutat. Res.*, **300**, 231-239.
67. Brandt, H.C. and Watson, W.P. (2003) Monitoring human occupational and environmental exposures to polycyclic aromatic compounds. *Ann. Occup. Hyg.*, **47**, 349-378.
68. Popp, W., Vahrenholz, C., Schell, C., Grimmer, G., Dettbarn, G., Kraus, R., Brauksiepe, A., Schmeling, B., Gutzeit, T., von Bulow, J. and Norpoth, K. (1997) DNA single-strand breakage, DNA adducts, and sister chromatid exchange in lymphocytes and phenanthrene and pyrene metabolites in urine of coke oven workers. *Occup. Environ. Med.*, **54**, 176-183.
69. Norppa, H. and Falck, G.C. (2003) What do human micronuclei contain? *Mutagenesis*, **18**, 221-233.
70. Delacôte, F. and Lopez, B.S. (2008) Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: the trans-S double-strand break repair model. *Cell Cycle*, **7**, 33-38.

71. Bonassi, S., Fontana, V., Ceppi, M., Barale, R. and Biggeri, A. (1999) Analysis of correlated data in human biomonitoring studies. The case of high sister chromatid exchange frequency cells. *Mutat. Res.*, **438**, 13-21.

Legend to Fig. 1

Fig. 1: Histogram showing the dose-response relationships observed in BaP-DNA adducts measurements of human lymphocytes exposed *in vitro* to benzo-a-pyrene, for the group, as well as for women and men separately. A significant decrease in BaP-DNA adduct level is observed between BaP 1 and 5 $\mu\text{g/ml}$ conditions, for both group ($p < 0.05$) and women ($p < 0.01$). Means \pm SEM are shown (Wilcoxon signed rank test for paired samples).

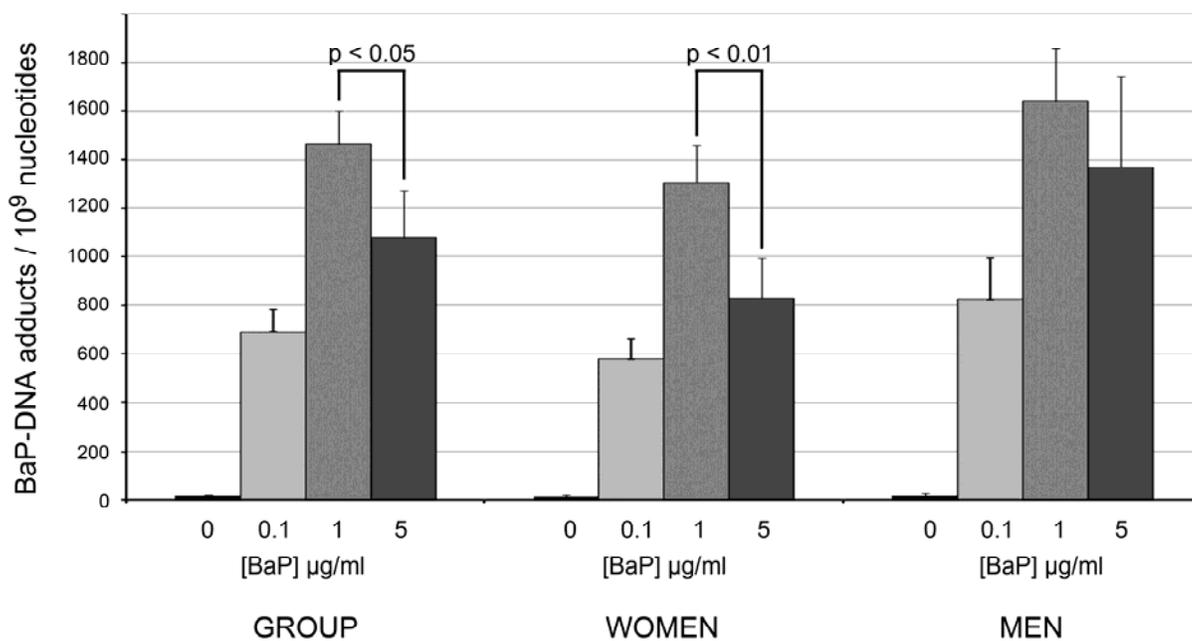


Table I

BaP-DNA adducts measured by CIA in human lymphocytes drawn from 24 subjects, *in vitro* exposed to benzo-a-pyrene. Results are expressed as adducts per 10^9 nucleotides.

Technique Subject / Age	Code/	BaP concentrations ($\mu\text{g/ml}$)			
		0	0.1	1	5
Add1 ^a / F1 ^b / 30	nd	232	1729	1685	
Add2/ F2/ 25	nd	504	709	176	
Add3/ F3/ 30	nd	676	1311	1293	
Add4/ F4/ 28	nd	744	2311	417	
Add5/ F5/ 21	nd	1150	1274	4038	
Add6/ F6/ 29	nd	313	1391	742	
Add7/ F7/ 27	nd	327	505	205	
Add8/ F8/ 23	nd	378	1931	1258	
Add9/ F11/ 29	nd	1017	1336	1276	
Add10/ F12/ 29	nd	466	1515	1746	
Add11/ F13/ 26	83	332	915	381	
Add12/ F14/ 29	11	840	768	214	
Add13/ F15/ 29	19	550	na	396	
Add14/ M1 ^b / 28	98	1570	1405	589	
Add15/ M2/ 28	nd	920	1961	920	
Add16/ M3/ 28	nd	251	1373	2457	
Add17/ M4/ 21	nd	1308	3132	3803	
Add18/ M5/ 29	nd	631	2580	3288	
Add19/ M6/ 30	nd	646	1836	1336	
Add20/ M7/ 23	nd	1754	1398	848	
Add21/ M8/ 29	55	1099	1535	674	
Add22/ M9/ 25	nd	149	1213	364	
Add23/ M10/ 23	nd	543	1110	223	
Add24/ M11/ 21	nd	243	483	568	

nd : non detected; na : not available –not enough DNA in sample

^a Add: Adducts; ^b F: Female; M: Male

Table II

Early genotoxic biomarkers measured in human lymphocytes drawn from healthy subjects, *in vitro* exposed to benzo-a-pyrene. Results expressed as means \pm SEM.

Biomarker	BaP concentration ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	0.1	1	5	10
<i>BaP-DNA adducts (per 10^9 nucleotides)</i>					
Group	14 \pm 5.4 ^a	693 \pm 89.1***	1466 \pm 133.0***	1076 \pm 195.1***	na
Women	12 \pm 6.2 ^a	579 \pm 80.0**	1308 \pm 152.6**	832 \pm 159.6**	na
Men	16 \pm 9.5 ^a	829 \pm 165.4**	1638 \pm 218.5**	1370 \pm 373.2**	na
<i>DNA SSBs (normalised mean)</i>					
Group	1.00	1.37 \pm 0.17	1.68 \pm 0.34	1.28 \pm 0.35	1.72 \pm 0.19
Women	1.00	1.43 \pm 0.21	1.54 \pm 0.61	1.29 \pm 0.28	1.61 \pm 0.45
Men	1.00	1.32 \pm 0.30	1.82 \pm 0.37	1.26 \pm 0.73	1.84 \pm 0.01
<i>Mean SCEs per cell</i>					
Group	7.6 \pm 0.12	11.1 \pm 0.21***	14.6 \pm 0.22***	16.2 \pm 0.22***	na
Women	7.5 \pm 0.15	10.7 \pm 0.36	13.9 \pm 0.31*	16.0 \pm 0.34***	na
Men	7.8 \pm 0.18	11.4 \pm 0.22***	15.3 \pm 0.31***	16.4 \pm 0.30***	na
<i>HFC (%)</i>					
Group	5.1 \pm 1.75	25.9 \pm 16.11*	57.8 \pm 19.56***	66.9 \pm 16.66***	na
Women	5.8 \pm 1.98	25.3 \pm 18.39	56.6 \pm 24.43*	68.6 \pm 20.22***	na
Men	4.5 \pm 1.41	26.5 \pm 14.73*	58.9 \pm 14.83***	65.4 \pm 14.11***	na

na: not available – chromosome preparation not available

^a non detected were assigned a value corresponding to half the limit of detection.

p-values are presented for negative control vs BaP exposure; Wilcoxon signed rank test (BaP-DNA adducts and DNA SSBs) or repeated measures ANOVA (SCEs and HFC).

* p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001

Table III

DNA single-strand breaks quantified in human lymphocytes drawn from 10 subjects, *in vitro* exposed to benzo-a-pyrene. Results expressed as mean Immunogold particles (IGPs) per μm^2 of chromatin \pm SEM, and as means normalised to the negative control ([BaP] = 0 $\mu\text{g/ml}$).

Technique Subject / Age	Code/ Indicator	BaP concentrations ($\mu\text{g/ml}$)				
		0	0.1	1	5	10
SSB1 ^a / F1 ^b / 30	IGP/ μm^2	93 \pm 3.7	164 \pm 8.1***	366 \pm 12.0***	na	191 \pm 5.4***
	Normalised mean	1.00	1.76	3.92		2.05
SSB2/ F4/ 28	IGP/ μm^2	681 \pm 31.6	634 \pm 26.7	466 \pm 35.0***	502 \pm 47.5**	na
	Normalised mean	1.00	0.93	0.68	0.74	
SSB3/ F5/ 21	IGP/ μm^2	233 \pm 6.7	438 \pm 19.8***	358 \pm 11.9***	362 \pm 8.0***	na
	Normalised mean	1.00	1.88	1.54	1.56	
SSB4/ F11/ 29	IGP/ μm^2	312 \pm 17.1	291 \pm 13.7	260 \pm 15.4	na	361 \pm 13.0
	Normalised mean	1.00	0.93	0.83		1.16
SSB5/ F12/ 29	IGP/ μm^2	52 \pm 1.6	85 \pm 3.2***	39 \pm 1.2***	81 \pm 3.0***	na
	Normalised mean	1.00	1.64	0.75	1.57	
SSB6/ M1 ^b / 28	IGP/ μm^2	278 \pm 13.0	306 \pm 10.2	576 \pm 16.9***	na	508 \pm 41.9***
	Normalised mean	1.00	1.10	2.07		1.83
SSB7/ M2/ 28	IGP/ μm^2	560 \pm 32.2	565 \pm 23.2	538 \pm 16.3	323 \pm 23.9***	na
	Normalised mean	1.00	1.01	0.96	0.58	

SSB8/ M3/ 28	IGP/ μm^2	75 \pm 7.2	86 \pm 4.9	100 \pm 5.4	37 \pm 1.6***	na
	Normalised mean	1.00	1.14	1.33	0.49	
SSB9/ M4/ 21	IGP/ μm^2	276 \pm 13.8	231 \pm 12.69	451 \pm 15.8***	577 \pm 19.3***	na
	Normalised mean	1.00	0.83	1.63	2.72	
SSB10/ M11/ 21	IGP/ μm^2	165 \pm 11.4	415 \pm 24.9***	514 \pm 24.5***	na	307 \pm 17.8***
	Normalised mean	1.00	2.51	3.11		1.85

na: not available – chromosome preparation not available

^a SSB: DNA single-strand breaks

^b F: Female; M: Male

p-values are presented for negative control vs BaP exposure; One-way ANOVA followed by Bonferroni or Tamhane's T2 *post-hoc* test.

** p < 0.01 *** p < 0.001

Table IV

Partial correlation coefficients (controlling for exposure and sex) existing between the biomarkers studied in human lymphocytes *in vitro* exposed to benzo-a-pyrene. Pearson's correlation coefficients present between the biomarkers and BaP exposure are also presented.

Biomarker	% HFC	Adducts (LOD/2) ^a	Mean SCEs per cell	Normalised SSBs	MN frequency	^b MN per MNBN ^b	CA frequency ^b
BaP exposure ^c	$r=$ 0.664 $p=$ 2.9×10^{-9} $n=$ 62	0.311 0.003 91	0.641 1.5×10^{-8} 62	0.165 0.309 39	0.279 0.008 88	-0.009 0.930 88	0.518 1.6×10^{-5} 61
% HFC	$r=$ $p=$ $n=$	0.393 0.002 57	0.752 1.9×10^{-12} 61	0.022 0.912 26	0.233 0.160 37	0.345 0.034 37	0.367 0.020 39
Adducts (LOD/2)	$r=$ $p=$ $n=$		0.344 0.008 57	0.188 0.281 34	0.165 0.170 70	0.119 0.321 70	0.106 0.432 56
Mean SCEs per cell	$r=$ $p=$ $n=$			0.84 0.679 26	0.214 0.198 37	0.131 0.433 37	-0.032 0.844 39
Normalised SSBs	$r=$ $p=$ $n=$				0.160 0.415 27	0.099 0.616 27	0.180 0.307 33
MN frequency	$r=$ $p=$ $n=$					0.473 3.2×10^{-6} 87	0.074 0.604 51
MN per MNBN	$r=$ $p=$ $n=$						0.351 0.011 51

^a non detected were assigned a value corresponding to half the limit of detection.

^b MN: Micronuclei; MN per MNBN: number of MN per micronucleated cell; CA: Chromosome aberrations. Indicators presented in a previous study (Fortin *et al.* submitted).

Supplemental Table V

Interindividual variation, calculated by dividing the maximal value by the minimal value for a given biomarkers' exposure condition, present during evaluation of early biomarkers of genotoxicity in human lymphocytes *in vitro* exposed to benzo-a-pyrene. When the lowest measurement corresponded to a non-detected value, half the limit of detection was assigned to the latter.

Biomarker	BaP concentrations ($\mu\text{g/ml}$)				
	0	0.1	1	5	10
BaP-DNA adducts	49-fold	7.6-fold	5.1-fold	22-fold	na
Mean IGPs	13-fold	7.5-fold	15-fold	7.1-fold	2.7-fold
Mean SCEs per cell	2.0-fold	2.4-fold	2.1-fold	1.8-fold	na
% HFC	2.5-fold	28-fold	10-fold	2.6-fold	na
MN frequency ^a	21-fold	16-fold	26-fold	12-fold	4.3-fold
CA frequency ^a	10.0-fold	7.0-fold	26-fold	3.9-fold	2.6-fold

na: not available – chromosome preparation not available

^a Interindividual variation calculated from a previous study (Fortin *et al.* submitted)

Supplemental Table VI

Mean sister chromatid exchanges (SCEs) per cell in human lymphocytes drawn from 16 subjects, *in vitro* exposed to benzo-a-pyrene. Results expressed as mean SCEs per cell \pm SEM.

Technique Subject / Age	Code/	BaP concentrations ($\mu\text{g/ml}$)			
		0	0.1	1	5
SCE1 ^a / F1 ^b / 30		7.5 \pm 0.44	8.5 \pm 0.48	8.8 \pm 0.47	13.0 \pm 0.81**
SCE2/ F2/ 25		6.8 \pm 0.34	11.9 \pm 0.57**	16.8 \pm 0.90**	20.9 \pm 0.87**
SCE3/ F6/ 29		5.9 \pm 0.33	7.1 \pm 0.40	12.8 \pm 0.63**	17.2 \pm 0.87**
SCE4/ F7/ 27		7.8 \pm 0.40	12.2 \pm 0.85**	15.3 \pm 1.39**	na
SCE5/ F11/ 29		7.0 \pm 0.45	8.8 \pm 0.47	10.5 \pm 0.55**	11.9 \pm 0.54**
SCE6/ F12/ 29		8.8 \pm 0.36	10.9 \pm 0.48*	15.1 \pm 0.75**	16.0 \pm 0.86**
SCE7/ F13/ 26		7.7 \pm 0.45	9.8 \pm 0.42*	16.7 \pm 0.95**	15.8 \pm 0.59**
SCE8/ F14/ 29		8.1 \pm 0.47	16.8 \pm 2.20**	16.3 \pm 0.68**	17.8 \pm 1.07**
SCE9/ M1 ^b / 28		12.0 \pm 0.61	13.7 \pm 0.49	18.1 \pm 0.91**	18.6 \pm 1.28**
SCE10/ M2/ 28		7.3 \pm 0.51	10.2 \pm 0.57*	16.7 \pm 0.75**	17.3 \pm 0.89**
SCE11/ M3/ 28		6.9 \pm 0.41	10.1 \pm 0.49**	13.9 \pm 0.65**	14.2 \pm 0.58**
SCE12/ M4/ 21		6.0 \pm 0.36	9.3 \pm 0.46**	13.0 \pm 0.74**	14.0 \pm 0.68**
SCE13/ M5/ 29		7.8 \pm 0.41	12.6 \pm 0.79**	17.5 \pm 0.88**	17.8 \pm 0.88**
SCE14/ M8/ 29		8.0 \pm 0.42	11.5 \pm 0.42**	15.3 \pm 0.66**	18.0 \pm 0.70**
SCE15/ M11/ 21		8.1 \pm 0.42	13.4 \pm 0.61**	16.2 \pm 0.98**	18.2 \pm 0.82**
SCE16/ M12/ 23		6.5 \pm 0.35	10.7 \pm 0.69**	12.7 \pm 0.86**	13.7 \pm 0.75**

na: not available – chromosome preparation not available

^a SCE: sister chromatid exchange

^b F: Female; M: Male

p-values are presented for negative control vs BaP exposure; One-way ANOVA followed by Bonferroni or Tamhane's T2 *post-hoc* test.

* $p < 0.01$ ** $p < 0.001$

Supplemental Table VII

Percentage of High Frequency SCE Cells (HFC) in human lymphocytes drawn from 16 subjects, *in vitro* exposed to benzo-a-pyrene.

Technique Code/ Subject / Age	95 th percentile SCE distribution (negative control)	HFC cells (%)			
		BaP (µg/ml)			
		0	0.1	1	5
SCE1 ^a / F1 ^b / 30	13.9 SCE	4	10	8	44
SCE2/ F2/ 25	12 SCE	6	50	82	98
SCE3/ F6/ 29	11 SCE	6	8	62	86
SCE4/ F7/ 27	13 SCE	10	36	75	na
SCE5/ F11/ 29	13 SCE	6	16	32	44
SCE6/ F12/ 29	14 SCE	6	22	64	64
SCE7/ F13/ 26	13.5 SCE	4	8	66	68
SCE8/ F14/ 29	14.5 SCE	4	52	64	76
SCE9/ M1 ^b / 28	20.5 SCE	4	2	28	38
SCE10/ M2/ 28	14.9 SCE	4	10	60	62
SCE11/ M3/ 28	12.5 SCE	4	26	58	62
SCE12/ M4/ 21	11.9 SCE	4	20	64	64
SCE13/ M5/ 29	12.5 SCE	4	36	80	82
SCE12/ M8/ 29	13 SCE	8	36	70	84
SCE13/ M11/ 21	13.9 SCE	4	40	58	70
SCE14/ M12/ 23	10.9 SCE	4	42	52	60

na: not available – chromosome preparation not available

^a SCE: sister chromatid exchange

^b F: Female; M: Male

Article 3

Optimizing urothelial cell preparation for the human urinary micronucleus assay.

Référence complète:

Fortin F, Anghel T, Brochu P, Lemieux N. *Optimizing urothelial cell preparation for the human urinary micronucleus assay* (2010). *Toxicology in Vitro*, 24:1821-1827, doi: 10.1016/j.tiv.2010.05.011

Cet article a été accepté pour publication le 17 mai 2010, dans le journal *Toxicology in Vitro*. La version électronique de cet article est disponible chez l'éditeur sur le site internet : <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2010.05.011>

L'article 3 décrit l'optimisation de la technique d'isolement et de coloration différentielle des cellules urothéliales présentes dans l'urine, dans le but d'effectuer le test des micronoyaux urinaires. En effet, l'utilisation de cellules exfoliant naturellement, comme les cellules urothéliales (cellules de l'épithélium bordant l'intérieur de la vessie), permet d'évaluer la génotoxicité manifestée au niveau des cellules cibles du cancer de la vessie (particulièrement associé à l'exposition aux HAP et à l'arsenic), plutôt que de l'évaluer dans un tissu de substitution, comme les lymphocytes sanguins. Ainsi, il est possible d'isoler les cellules urothéliales s'exfoliant dans l'urine et de les examiner afin d'y rechercher la présence de micronoyaux.

Développée en 1982 par Stich et coll., cette technique souffre de certaines lacunes importantes, comme la difficulté de distinguer les différents types cellulaires présents dans l'urine en utilisant les colorants préconisés (Giemsa, Diff-Quick ou vert rapide). De plus la présence, dans l'urine des femmes, de très nombreuses cellules squameuses d'origine vaginale, rend l'analyse de leurs spécimens particulièrement ardue. Comme l'analyse des micronoyaux urinaires doit être effectuée sur les cellules urothéliales seulement, l'analyse par erreur de cellules squameuses peut fausser les résultats obtenus et l'interprétation des risques de cancer de la vessie qui en découle.

Nous avons travaillé à optimiser cette technique afin de pallier les lacunes mentionnées précédemment et également dans le but futur de l'appliquer à la surveillance biologique de populations exposées à des contaminants environnementaux ciblant la vessie. Ces analyses visent, au Québec, les travailleurs de l'industrie de l'aluminium, pour lesquels une exposition professionnelle aux HAP entraîne une incidence accrue de cancer de la vessie [Tremblay et coll., 1995; Gibbs et Sévigny, 2007]. Elles visent également les habitants de certaines régions du Québec, comme dans l'Estrie, pour lesquels l'eau de boisson provient de puits privés contaminés à l'arsenic [Groupe scientifique sur l'eau, 2006; Renaud et coll., 2007].

Contribution des auteurs à cet article

Fléchère Fortin a réalisé les préparations de cellules urothéliales et a effectué les analyses de micronoyaux avec un stagiaire (T Anghel). Les préparations cellulaires ont été supervisées par le Dr Brochu. Madame Fortin a également effectué les analyses statistiques, puis a écrit le manuscrit. Le Dre Lemieux, en qualité de directrice, ainsi que le Dr Brochu ont supervisé la rédaction du manuscrit.

Abstract

Biological monitoring of early genotoxic effects in urothelial cells using the urinary micronucleus (MNU) assay is promising for early detection of cancer, such as bladder carcinoma. But many problems are encountered, the major being the poorly differential staining of cells, particularly in women having an important amount of squamous cells. We have optimized the protocol and obtained a differential staining of the cell types present in urine on 10 subjects. Following Carnoy I fixation and Papanicolaou staining, urothelial cells were blue while most squamous cells were pink. This differential staining allowed for optimization of the MNU assay on a single urine void, for both females and males. Even if our MNU means were comparable to the literature, the great variation in reported MNU results could reside in the ability of scorers to distinguish correctly between urothelial and squamous cells. When monitoring exposed populations, this erroneous distinction could largely influence the results, even more in women's urine samples. Given a situation where exposure would not increase micronuclei frequency in vaginal squamous cells, their erroneous analysis in the MNU assay could mask an early genotoxic effect. Therefore, as transitional cell carcinoma of the bladder originates from transformed urothelial cells, restricting micronuclei analysis to urothelial cells could yield a more precise estimate of cancer risk in exposed populations. Moreover, it is hoped that the improvements proposed in this paper will allow for an easier implementation of the MNU assay in various set-ups and enhance its specificity, since MNU are considered a suitable biomarker.

Keywords

Micronuclei, Urine, Urothelial cells, Papanicolaou staining, Biological monitoring, Bladder cancer.

Introduction

Bladder cancer has been associated with exposure to chemicals present in environmental and occupational settings, such as arsenic in drinking water (Basu et al., 2002), 4,4'-methylenebis-(2-chloroaniline) used in manufacturing of wear-resistant polyurethane products (Murray and Edwards, 1999) or occupational exposure as a painter (Straif et al., 2007). In particular, exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) present in coal gasification and aluminium production industries, in mixtures of coal-tar pitch, coal tar and asphalt (Straif et al., 2005), as well as in tobacco smoke (Burgaz et al., 1995; DeMarini, 2004), reveal a statistically significant excess risk of bladder cancer. Urothelial carcinoma (or transitional cell carcinoma) is the most common form of bladder cancer, representing 90% of bladder tumors. Urothelial carcinoma can arise in every part of the urinary tract, from ureters to urethra, although bladder is the most common site. Being frequently present on multiple sites, this tumor is thought to arise following the action of carcinogens on the urinary tract and subsequent neoplastic transformation of the bladder epithelium cells (McKee, 2003).

The normal bladder epithelium, called urothelium, is lined with superficial cells, known as umbrella cells. These are often large binucleated or larger multinucleated cells, covering several layers of deeper (cuboidal) urothelial cells, formerly known as transitional cells. Cuboidal urothelial cells are smaller than the umbrella cells, with a single nucleus, and show little variation in size. They are attached to each other and to the umbrella cells with numerous desmosomes. In voided urine, many epithelial cell types can be found: umbrella cells, cuboidal urothelial cells (occurring singly or in cluster), squamous cells, and renal tubular cells. In males, squamous cells are not frequent and are of urethral origin. More abundant in females, squamous cells originate either from the trigone of the bladder or from the vagina, through contamination of the urine with vaginal fluid (Koss and Melamed, 2005b; McKee, 2003). In addition, squamous cell types of the urine vary, according to the hormonal status of the women. Superficial and intermediate squamous cells are found in urine samples taken from women in childbearing age, while navicular (with glycogen deposits) and parabasal (which are the progenitor cells) squamous cells will

exfoliate only during specific hormonal conditions such as pregnancy, breastfeeding period, menopause or progesterone hormone therapy (Koss and Melamed, 2005c).

Urinary cytology on voided specimen has been used for long term follow-up of industrial workers exposed to a bladder carcinogen (*p*-aminodiphenyl), but has failed in the detection of low-grade tumors. Only high-grade urothelial tumors and flat carcinoma in situ of the bladder could be readily detected, suggesting that these cancers were not preceded by a precursor (dysplastic) stage detectable with urinary cytology on voided specimens (Koss and Melamed, 2005d). Nevertheless, it is expected that monitoring for early biological effects occurring prior to neoplastic transformation of urothelial cells could be done on the target tissue, by using the urinary micronucleus (MNU) assay. Following arsenic exposure through drinking of contaminated water, an increase MNU frequency was observed in populations living in many countries, including India, Chile, China and United States (Basu et al., 2002; Biggs et al., 1997; Tian et al., 2001; Warner et al., 1994). Also, a follow-up study revealed a decreased frequency of MNU in individuals who lowered their intake of water contaminated with arsenic (Moore et al., 1997a), suggesting the usefulness of this urinary assay in environmental health. Since then, many groups have used the MNU assay to perform biological monitoring of individuals living in Cs¹³⁷ radionuclide-contaminated regions (Jen et al., 2002), as well as in workers exposed to various chemicals, such as 4,4'-methylenebis-(2-chloroaniline) (Murray and Edwards, 1999), sodium nitrite and *n*-phenyl-1-naphthylamine (Fontana et al., 2001). Workers exposed to PAHs through bitumen fumes and emanations from coke ovens have also been monitored for increased micronuclei frequency in urothelial cells (Murray and Edwards, 2005; van Delft et al., 2001). Thus, MNU assay is considered to be a suitable biomarker of bladder cancer risk (Majer et al., 2001).

Still, many problems are encountered, making interpretation of the MNU assay difficult: insufficient number of analysable cells in the preparation (Rosin and Anwar, 1992; Tian et al., 2001; van Delft et al., 2001), or contamination of the urine sample with bacteria or fungi (Basu et al., 2004). This led to the collection of many urine specimens for a given subject (Basu et al., 2004; Fontana et al., 2001; Moore et al., 1997b), or to a low success rate (45 - 60 %) for this technique in some studies (Rosin and Anwar, 1992; van Delft et al., 2001). In addition, the presence in women's urine sample of a large number of undesired squamous cells, that are difficult to differentiate with urothelial cells (Warner et

al., 1994), limits biological monitoring, in comparison to male populations (Moore et al., 1997b). To get rid of the squamous cells problem, enrichment in urothelial cells from female urine sediments using magnetic cell sorting has been described (Dorrenhaus et al., 2007), but this technique seems limited to biochemical applications. At the moment, as no other developments in the MNu assay have been described to allow suitable preparation of urothelial cells, excellent urine specimens and a very good cytological knowledge are necessary for analysis (Espinoza et al., 2008).

In order to address these issues, our objectives were to optimize the sample collection for women and men, and obtain a differential staining between urothelial and squamous cells. To do so, we compared two commonly used fixatives, methanol (Dorrenhaus et al., 2007; Titenko-Holland et al., 1994) and Carnoy I (Ghosh et al., 2006; Jen et al., 2002), as well as two staining methods, Giemsa (Ghosh et al., 2006; van Delft et al., 2001) and the Papanicolaou technique (Koss and Melamed, 2005a). Giemsa is used to produce high-quality staining of the chromatin and nuclear membrane of all cell types (Barcia, 2007), while Papanicolaou is commonly used in urinary cytology for diagnostic of high-grade urothelial tumors (Koss and Melamed, 2005d; McKee, 2003).

Materials and Methods

Subjects

Five females and five males, aged between 20 and 60 years, were selected. All were healthy non-smokers, with no history of abnormal urinary cytology, bladder cancer or any other cancer. Three of the women were using contraceptive pills (21, 26 and 34 years), while the other two were in early post-menopause (51 and 58 years). This research was approved by the research ethical board of our institutions and all subjects provided informed consent to participate in this study.

Collection of urine specimens

A midstream clean catch collection of urine from the second or third voids of the day was requested from the subjects (Koss and Melamed, 2005b). Before urine collection, participants were asked to wash extensively their urethral area, including the labiae in

women, with flushable premoistened wipes, and to void the first portion of the urine stream into the toilet. The midstream urine was then collected in sterile containers. These procedures were adopted to limit the contamination of urine with squamous cells coming from vaginal fluids of female, as well as to limit the microbial contamination of urine from both sexes. Midstream urine was processed within 2 h. Volume of voided specimens varied from 50 ml and 250 ml; several trials were done to determine the best sample volume for female and male. Some male subjects were required to raise their hydration level by drinking one glass of water (approximately 250 ml) every 30 min, for 3 h before the void, in order to increase the amount of desquamated urothelial cells in urine (Koss and Melamed, 2005b).

Isolation of exfoliated cells in urine

As urine of males contains considerably less cells than urine of females, we modified the isolation procedure of Lehucher-Michel et al. (1996) to minimize cell loss. Urine samples were first centrifuged at 400g for 10 min in 250 ml centrifuge plastic bottle (Fisher Scientific Company, Ottawa, ON, Canada). The supernatant was carefully discarded, leaving 10-15 ml urine in the bottle. The pellet was resuspended and transferred to a 15 ml conical centrifuge tube (Sarstedt Inc., Montreal, QC, Canada). A second centrifugation was performed at 400g for 10 min. The supernatant was again discarded, leaving 0.5 ml to ensure no cell loss, especially in urine samples from males. The cell pellet was washed with 10 ml sterile NaCl 0.9 % and centrifuged at 400g for 10 min. At this step, half the samples of both females and males, presented a cloudy material stacked on top of the cell pellet. The material, present in the supernatant, was separated and processed further in the same way as the cell pellet. Microscopic observation of the cloudy material revealed that there were no well preserved urothelial cells in this fraction. It mostly contained well preserved squamous cells, some neutrophils and cellular debris; this material was therefore discarded. After a second wash, the final pellet was resuspended in 1.0 ml sterile NaCl 0.9 %. For samples from males, the pellet was transferred in a 1.5 ml microtube, and further centrifuged at 10 000g for 1 min. Most of the supernatant was removed and the pellet was resuspended in 0.2 ml sterile NaCl 0.9 %. The final volumes obtained after cell isolation for female and male samples (1 and 0.2 ml respectively) reflect the differences in the size of the cell pellets.

Fixation and staining of exfoliated cells in urine

Different combinations of fixatives and staining were used during the optimization process. Fixation was performed using either 100 % methanol (Fisher Scientific Company) or Carnoy I fixative (methanol:glacial acetic acid, 3:1; Fisher Scientific Company). Pellets were resuspended in the fixative and fixed twice (10 ml for female; 1.5 ml for male) for 10 min. After fixation, pellets were resuspended in 0.5 ml (female) or 25 μ l (male) fixative. One cell spread on precleaned microscope slide (Fisher Scientific Company) was prepared for each female and male sample. Slides were air dried overnight and staining was performed, using Giemsa or Papanicolaou.

Giemsa staining was realized with freshly filtered 4% Giemsa diluted in Gurr's pH 6.8 buffer (both from Invitrogen, Burlington, ON, Canada). The Papanicolaou technique was done according to Koss and Melamed (2005a) using a DRS-601 automatic slide stainer (Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA, USA). Briefly, slides were stained in Harris hematoxylin (ACP Chemicals Inc., Montreal, QC, Canada). A differential extraction of the hematoxylin with 0.25 % HCl (Fisher Scientific Company) was done before dehydration and followed by a subsequent cytoplasmic staining with orange G (OG-6; ACP Chemicals Inc.) and eosin (EA-65; VWR International, Mississauga, ON, Canada). Slides were then conditioned in xylene (Fisher Scientific Company) and mounted using a Tissue-Tek coverslipper (Sakura Finetek USA, Inc.).

Micronuclei scoring procedure and criteria

Following optimization of isolation and differential coloration of the exfoliated cells, the MNu assay was performed on samples obtained from the 10 participants. Slides were screened at 400 \times magnification on a Leica Laborlux microscope (Leica Microsystems Canada inc., Richmond Hill, ON, Canada) and only cells with an intact nucleus that were not clumping or overlapping, were chosen. Micronuclei were scored following a modification of the Fenech (2007) and Reali (1987) criteria, as urothelial cells frequently contain cytoplasmic inclusions (Koss and Melamed, 2005b) that can be mistaken for micronuclei. These criteria were: (a) being less than 1/3 and more than 1/16 diameter than the main nucleus, (b) being on the same focus plane, while (c) not superimposing to the main nucleus, (d) having the same color, texture and refraction as the main nucleus, (e)

having a smooth round or oval shape, and (f) having limits clearly distinguishable from the main nuclear membrane if touching the main nucleus. Inclusions are usually smaller (less than 1/16 diameter) and mostly on a different focus plane than the main nucleus. 1000 urothelial cells were analysed at 1000× magnification, for the presence of micronuclei. All micronuclei were confirmed by a second observer. Microphotographs were obtained with a SPOT RT color camera, using the SPOT imaging software, version 4.1 (Diagnostic Instruments Inc., Sterling Heights, MI, USA).

Results

Collection and isolation of exfoliated cells

In general, an efficient isolation of urothelial cells present in urine samples from both the females and the males could be readily performed. For males, a minimum urine specimen of 250 ml was required. One male needed to provide a new urine specimen so that 1000 cells could be analysed in a single sample. Finally, another male subject was excluded and replaced, as his urine samples provided only a few urothelial cells, even after hydration was augmented.

As for the women, a urine specimen of 100 ml provided enough urothelial cells to perform the MNu assay. Two females were asked to wash more thoroughly their labiae and urethral area before providing a second urine specimen, in order to reduce contamination with bacteria or fungi, and the number of squamous cells. Indeed, the squamous cells represented more than 95% of the cells present in their samples. The midstream clean catch collection of urine, as well as the careful cleaning of urethral region, clearly reduced the amount of bacteria and squamous cells in urine samples of females.

Fixation and staining of exfoliated cells

When Giemsa or Papanicolaou staining was done after methanol fixation (Fig. 1A and B, respectively), this resulted in a loss of morphological features: urothelial cells (*U*) were roundish, with their nucleus nearly black and not clearly delineated. Squamous cells (*S*) and urothelial cells were blue, their nucleus barely visible and the cytoplasm of urothelial cells being darker than that of squamous cells. With Carnoy I fixation and Giemsa staining (Fig. 1C), squamous and urothelial cells presented the same violet color.

Urothelial cells were again roundish, their cytoplasm was not sharply demarcated, and the nucleus, again, was not clearly delineated.

Carnoy I fixation followed by the Papanicolaou technique provided the best results (Fig. 1D-F). A differential staining was achieved, as most of the squamous cells appeared red to pink, while the urothelial cells were light blue. Furthermore, in women's urine samples, we could determine that blue cuboidal urothelial cells represented 5-10 % of the cells, compared to 90-95 % of squamous cells, of which 83 % were pink superficial squamous cells, while 17 % were blue intermediate ones. Table 1 summarizes the main morphological features of urothelial and squamous cells. Morphology of urothelial cells was well preserved with a sharply demarcated cytoplasm, and a dark blue nucleus clearly delineated presenting chromatin textures. The size of the nucleus was big when compared to the size of the cell (nuclear-cytoplasmic ratio is around 1:2 to 1:5). In urothelial cell clusters, desmosomal attachment points (small arrows in Fig. 1D) led to a cytoplasm stretching. Occasionally, blue intermediate squamous cells (*I*) originating either from the vagina or the trigone (Fig. 1F) could be found, but were much larger in size than cuboidal urothelial cells. More rarely, some of these intermediate cells called navicular cells, also showed yellowish glycogen deposits. Another distinctive feature of the vaginal squamous cells is the presence of bacilli-type bacteria on their cytoplasm.

Micronuclei analysis in urothelial cells

Usually, enough urothelial cells were present on one slide per subject to perform the MN analysis. MN analysis was performed only on "blue" cuboidal urothelial cells. Rarely present, umbrella cells were also analysed for the presence of a micronucleus, as they are part of the urothelium and derive from urothelial cells. Some urothelial cells contained one or more cytoplasmic inclusions that could be easily distinguished from a micronucleus since they were not on the same focus plane and were too small (less than 1/16 diameter of the main nucleus). Representative micronucleus (*MNu*) and cytoplasmic inclusions (stars) present in a urothelial cell analysed at 1000× magnification is shown in Figure 1E. The micronuclei frequency per thousand analysed cells for each subject is presented in Table 2. Briefly, we report a mean frequency of 2.6 ± 1.6 MNu per thousand urothelial cells for females, and 3.0 ± 1.4 for male subjects. On the other hand, some blue intermediate

squamous cells also presented a micronucleus (Figure 1F), but they were not included in the calculation of the micronuclei frequency in urothelial cells.

Discussion

The MNu assay was developed in 1982, based on the blood micronucleus (MN) assay (Stich et al., 1982). Since then, many fixation methods have been described, using either methanol alone or Carnoy I fixative before or after cells were spread onto slides. In urine cytology, a 20:1 mix of methanol and acetic acid has also been described as a liquid-based fixative (Koss and Melamed, 2005a). As for staining methods, Feulgen reaction counterstained with Fast green (Moore et al., 1993; Rosin and Anwar, 1992), Diff-Quik (Murray and Edwards, 1999), and Giemsa stain (Ghosh et al., 2006; Gonzalez Cid et al., 1991) are frequently used. Although these staining methods allow for clear demarcation between nucleus and cytoplasm (Majer et al., 2001), distinction between urothelial cells and other cell types present in urine, such as squamous cells, is mainly based on cytological features (Espinoza et al., 2008). Also, some studies report use of fluorescent in situ hybridization with a pan-centromeric probe, with propidium iodide as a counterstain, to investigate the content of micronuclei present in urine preparations (Moore et al., 1997b; Warner et al., 1994). However, as urine samples taken from females contain numerous squamous cells from vaginal origin, many population studies have been restricted to males (Burgaz et al., 1995; Moore et al., 1997a,b; Ranmuthugala et al., 2003), therefore limiting their applicability to only a subset of the exposed population.

During our optimization process, we combined several approaches taken from medical microbiology, urinary cytology, and the current MNu assay. We improved the technique via a reduced amount of vaginal squamous cells present in urine samples, and a differential staining of urothelial and squamous cells. This was achieved by an extensive washing of the urethral region, including the labiae for women, coupled with a midstream clean catch collection of voided urine specimen, as required for urinary microbiology cultures (Ronald and Alfa, 1996). In addition, the cells were fixed using Carnoy I, which is frequently used in MNu assay, and stained with the multichromatic Papanicolaou technique, as described in urinary cytology (Koss and Melamed, 2005a). This staining technique is used for diagnosis in clinical cytology, as it produces a differential staining

allowing for the distinction between cell types present in a variety of biological samples. It had never been used before to perform the MNu assay, probably because development of this assay was based on the blood micronucleus assay, which did not require a differential staining. In clinical settings such as ours, this staining is regularly performed with an automatic slide stainer, but it can be easily realized manually within an hour (Koss and Melamed, 2005a). Even though Papanicolaou technique requires multiple steps when compared to Giemsa staining, its benefits are important as it allowed us to discriminate between urothelial and squamous cells, thus restricting analysis to urothelial cells, even if urine samples of women contained a high proportion of squamous cells, mainly from vaginal origin. Furthermore, the achieved differential staining limits the need for strong urine cytology knowledge, as urothelial cells are small cuboidal cells stained in blue, and most of the squamous cells are large, polygonal and pink. In women's samples, some squamous cells staining in blue were noticed (Figure 1F). These were intermediate squamous cells of vaginal type who were also polygonal, the same size as superficial squamous cells (stained in pink), with their nucleus being slightly larger (Table 1). These characteristics made them easily distinguishable from the smaller cuboidal urothelial cells, even if they presented the same blue coloration.

Revision of women's cytology suggested that an additional criterion should be added when selecting women for MNu studies, according to their hormonal status. During days 7-13 of the menstrual cycle, the proportion of mature superficial squamous cells present in the vaginal fluid (stained in pink) increases, in comparison to the blue intermediate ones, allowing for an easier discrimination between squamous and urothelial cells. In contrast, following ovulation, intermediate squamous cells (stained in blue) are more numerous in the vaginal fluid (Koss and Melamed, 2005c). On the other hand, particular hormonal conditions present in women, such as breastfeeding period, late post-menopause or some hormone therapies, all characterized by a lack of estrogenic activity, have an influence on the cell composition of the vaginal fluid. During these periods parabasal cells, stained in blue by the Papanicolaou technique, naturally exfoliate (Koss and Melamed, 2005c). Thus, when conducting a population-based study, a special attention should be given to urinary samples from women in the above-mentioned hormonal conditions. These samples should not be included in the MNu study.

Overall, a success rate of 72% was reached for the isolation and micronuclei analysis of urothelial cells after reception of the first urine specimen of our subjects. Inclusion of the second urine specimen for three subjects raises our success rate to 91%, comparable with the reported success rates achieved on larger population samples (Basu et al., 2004; Fontana et al., 2001). Our analysis also confirmed that women exfoliate more urothelial cells than men. Using this improved technique, we obtained a mean frequency of 2.6 ± 1.6 and 3.0 ± 1.4 MNu/1000 urothelial cells for female and male subjects, respectively. Our values are within the mean frequencies reported for control cohorts in the literature (as reviewed in Table 3). However, a great variation in the MNu frequencies is reported among these control cohorts, and could be explained by many factors such as sex, age, lifestyle habits, geographic region and ethnicity, sample size, and scoring criteria (Espinoza et al., 2008; Majer et al., 2001). Nevertheless, we believe that one of the main factors could reside in the ability of the scorers to distinguish correctly between urothelial and squamous cells, during the MNu analysis. As all those control cohorts have no reported diseases, impact of erroneous analysis of a certain number of squamous cells is probably minor. But when monitoring exposed populations, this erroneous distinction could largely influence the results, even more if squamous cells represent a large proportion of cells present in women's urine samples, as noticed in our study and by many authors (Dorrenhaus et al., 2007; Hofseth et al., 1996; Moore et al., 1997a; Stich et al., 1982). For example, given a situation where exposure to a compound did not increase the MN frequency in squamous cells from vaginal origin, but increased it in urothelial cells, erroneous analysis of those squamous cells as part of the MNu assay would lower the resulting MNu frequency and mask a bladder genotoxic effect. The reverse situation could also be encountered and could be more common than previously thought, as even tobacco consumption alone has been associated with an increased MN frequency in exfoliated cells from the cervix (Majer et al., 2001). Since an increased MN frequency will be found in the target cells only when the metabolites reach the epithelia, or when the target cells have sufficient metabolic competence to activate the carcinogen (Majer et al., 2001), a bladder genotoxic substance will be detected if an accurate MNu frequency can be obtained upon analysis of the target cells, namely the urothelial cells.

It is hoped that the improvements proposed in this paper will allow for an easier implementation of the MNu assay in various set-ups and enhance its specificity, since this

assay is presently considered a suitable biomarker of bladder cancer risk. As transitional cell carcinoma of the bladder originates from transformed urothelial cells, restricting the micronuclei analysis to urothelial cells could result in a more precise estimate of cancer risk in exposed populations and lead to the implementation of better preventive measures in the living environment and at the workplace.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr Claude Viau and Mrs Mélanie Beaulieu Bergeron for the revision of this manuscript, Mrs Josée-Marie Dubé for her assistance in the Papanicolaou technique, and the study subjects for their cooperation. 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.].

Figure 1

Representative examples of results obtained with various fixation and staining methods of cells present in voided urine samples, and subsequent identification of micronuclei in squamous and urothelial cells. Urothelial cells (*U*), vaginal type superficial squamous cells (*S*), and intermediate squamous cells (*I*) are marked. (A) Methanol fixation and Giemsa staining of cells. (B) Methanol fixation and Papanicolaou staining. (C) Carnoy I fixation and Giemsa staining. In panels A, B and C, urothelial cells and squamous cells have alike blue or violet coloration. Also, urothelial cells have lost some of their morphological features and nuclei are not clearly delineated. (D), (E) and (F) Carnoy I fixation and Papanicolaou staining of cells. Differential staining of all cell types is achieved, as urothelial cells are blue while superficial squamous cells are red to pink, and intermediate squamous cells are blue. (D) Desmosomal attachment points (small arrows) are clearly visible between urothelial cells. (E) Presence of a micronucleus (*MNu* - long arrow), in an urothelial cell. Presence of cytoplasmic inclusions (stars) are also seen in some urothelial cells. (F) Presence of a micronucleus (*MN* – long arrow) in a blue intermediate squamous cell with glycogen deposits, identifying it as a navicular cell (*N*). Panels A, B, C and D at original magnification: 400×. Panels E and F at original magnification: 1000×.

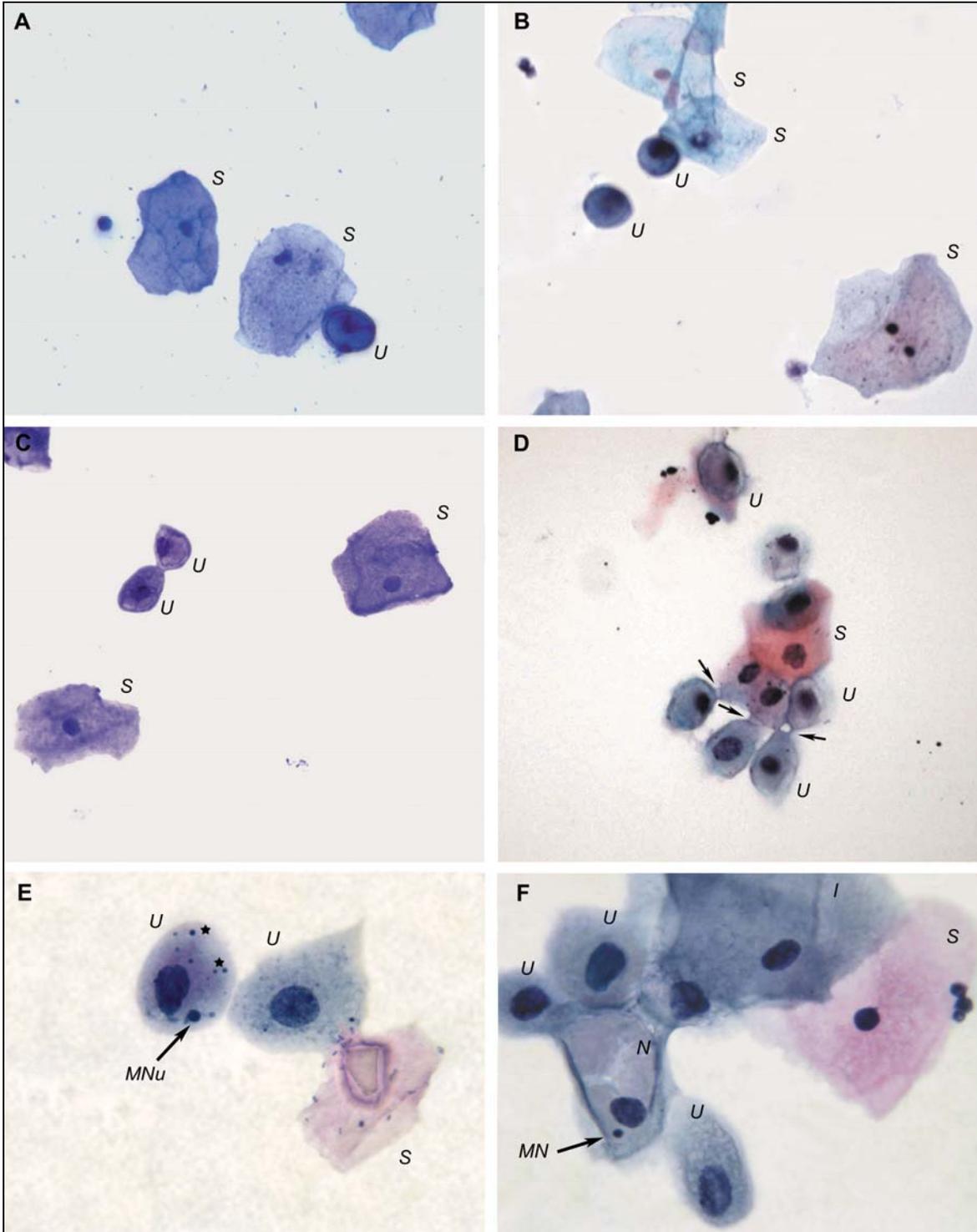


Table 1

Main morphological features of urothelial and squamous cells.

Morphological features	Urothelial cells	Superficial squamous cells	Intermediate squamous cells
PAP coloration	Blue	Red to pink	Blue
Shape	Cuboidal	Polygonal	Polygonal
Relative size	Small cells	Large cells	Large cells
Nuclear-cytoplasmic ratio	1:2 to 1:5	1:20 and more	1:15 to 1:20

Table 2

Micronuclei analysis of urothelial cells in 10 subjects. Urine samples were fixed using Carnoy I and differentially stained using the Papanicolaou technique.

	Male subjects					Female subjects				
Subject code	M1	M2	M3	M4	M5 ^a	F1	F2 ^a	F3	F4	F5 ^a
MNu/ 1000 cells	3	2	4	5	1	5	3	3	0	2

One thousand «blue» urothelial cells were analyzed per sample.

^a Analysis done on the second urinary sample.

Table 3

Reported urinary micronuclei frequencies (per 1000 analyzed cells) in control (unexposed) subjects.

Sex	Urinary micronuclei frequency \pm Standard deviation	Number of subjects	References
nr	0.62 ± 0.52 ‰ ^a	nr	Moore et al., 1993
M + F	0.53 ± 0.14 ‰ ^a	13	Tian et al., 2001
M + F	0.56 ± 0.45 ‰ ^a	21	Basu et al., 2002
M + F	2.73 ± 0.59 ‰ ^a	10	Jen et al., 2002
Males	$0-20$ ‰ ^b	30	Kassie et al., 2001
Males	7.3 ± 1.8 ‰	15	Gonzalez Cid et al., 1991
Males	1.2 ± 0.4 ‰	32	Rosin and Anwar, 1992
Males	2.14 ± 0.46 ‰	8	Warner et al., 1994
Males	6.6 ± 0.5 ‰	20	Burgaz et al., 1995
Males	0.98 ± 0.3 ‰	26	Hofseth et al., 1996
Males	1.6 ‰	19	Moore et al., 1997b
Males	1.7 ‰	85	Ranmuthugala et al., 2003
Males	1.36 ± 0.041 ‰	88	Basu et al., 2004
Males	6.88 ± 0.18 ‰	18	Murray and Edwards, 2005
<i>Males</i>	3.0 ± 1.4 ‰	5	<i>Present study</i>
Mean Mnu frequency in males		3.28 ‰	
Females	0.83 ± 0.74 ‰	5	Titenko-Holland et al., 1994
Females	1.28 ± 0.31 ‰	10	Warner et al., 1994
Females	4.7 ± 3.1 ‰	4	Lehucher-Michel et al., 1996
Females	1.4 ± 0.3 ‰	41	Fontana et al., 2001
Females	1.48 ± 0.051 ‰	66	Basu et al., 2004
Females	9.72 ± 0.82 ‰	72	Espinoza et al., 2008
<i>Females</i>	2.6 ± 1.6 ‰	5	<i>Present study</i>
Mean MNU frequency in females		3.14 ‰	

nr: not reported

M + F: Males and Females – grouped results

^a Values excluded for the calculation of the mean MNu frequencies, because both sexes were paired or not reported.

^b Value excluded for the calculation of the mean MNu frequency in males, because a frequency interval was given.

References

- Barcia, J. J., 2007. The Giemsa stain: its history and applications. *Int. J. Surg. Pathol.* 15, 292-296.
- Basu, A., Ghosh, P., Das, J.K., Banerjee, A., Ray, K., Giri, A.K., 2004. Micronuclei as biomarkers of carcinogen exposure in populations exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India: a comparative study in three cell types. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13, 820-827.
- Basu, A., Mahata, J., Roy, A.K., Sarkar, J.N., Poddar, G., Nandy, A.K., Sarkar, P.K., Dutta, P.K., Banerjee, A., Das, M., Ray, K., Roychaudhury, S., Natarajan, A.T., Nilsson, R., Giri, A.K., 2002. Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutat. Res.* 516, 29-40.
- Biggs, M.L., Kalman, D.A., Moore, L.E., Hopenhayn-Rich, C., Smith, M.T., Smith, A.H., 1997. Relationship of urinary arsenic to intake estimates and a biomarker of effect, bladder cell micronuclei. *Mutat. Res.* 386, 185-195.
- Burgaz, S., Iscan, A., Buyukbingol, Z.K., Bozkurt, A., Karakaya, A.E., 1995. Evaluation of micronuclei in exfoliated urothelial cells and urinary thioether excretion of smokers. *Mutat. Res.* 335, 163-169.
- DeMarini, D.M., 2004. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat. Res.* 567, 447-474.
- Dorrenhaus, A., Muller, T., Roos, P.H., 2007. Increased CYP1A1 expression in human exfoliated urothelial cells of cigarette smokers compared to non-smokers. *Arch. Toxicol.* 81, 19-25.
- Espinoza, F., Silverman, D., Kogevinas, M., Creus, A., Fernandez, F., Garcia-Closas, M., Tardon, A., Garcia-Closas, R., Serra, C., Carrato, A., Rothman, N., Dosemeci, M., Malats, N., Marcos, R., 2008. Micronuclei assessment in the urothelial cells of women using hair dyes and its modulation by genetic polymorphisms. *Cancer Lett.* 263, 259-266.

- Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2, 1084-1104.
- Fontana, L., Lasfargues, G., Ughetto, S., Rogier, S., Masdieu, E., Lafaure, M., Aublet-Cuvelier, B., and Catilina, P., 2001. The micronucleus assay in human exfoliated urothelial cells: application in a genotoxicity study of workers exposed to a mineral jelly containing sodium nitrite and N-phenyl-1-naphthylamine. *Mutagenesis* 16, 449-452.
- Ghosh, P., Basu, A., Mahata, J., Basu, S., Sengupta, M., Das, J.K., Mukherjee, A., Sarkar, A.K., Mondal, L., Ray, K., Giri, A.K., 2006. Cytogenetic damage and genetic variants in the individuals susceptible to arsenic-induced cancer through drinking water. *Int. J. Cancer* 118, 2470-2478.
- Gonzalez Cid, M., Loria, D., Vilensky, M., Miotti, J.L., Matos, E., 1991. Leather tanning workers: chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes and micronuclei in exfoliated cells in urine. *Mutat. Res.* 259, 197-201.
- Hofseth, L.J., Dunn, B.P., Rosin, M.P., 1996. Micronucleus frequencies in urothelial cells of catheterized patients with chronic bladder inflammation. *Mutat. Res.* 352, 65-72.
- Jen, M.H., Hwang, J.J., Yang, J.Y., Nabyvanets, Y.B., Hsieh, W.A., Tsai, M.H., Guo, S.D., Chang, W.P., 2002. Micronuclei and nuclear anomalies in urinary exfoliated cells of subjects in radionuclide-contaminated regions. *Mutat. Res.* 520, 39-46.
- Kassie, F., Darroudi, F., Kundi, M., Schulte-Hermann, R., Knasmuller, S., 2001. Khat (*Catha edulis*) consumption causes genotoxic effects in humans. *Int. J. Cancer* 92, 329-332.
- Koss, L.G., Melamed, M.R., 2005a. Laboratory techniques, in Koss, L.G., Melamed, M.R. (Eds.), *Koss' Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1569-1635.
- Koss, L.G., Melamed, M.R., 2005b. The lower urinary tract in the absence of cancer, in Koss, L.G., Melamed, M.R. (Eds.), *Koss' Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 738-771.

- Koss, L. G., and Melamed, M. R., 2005c. The normal female genital tract, in Koss, L.G., Melamed, M.R. (Eds.), *Koss' Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 183-226.
- Koss, L. G., and Melamed, M. R., 2005d. Tumors of the urinary tract in urine and brushings, in Koss, L.G., Melamed, M.R. (Eds.), *Koss' Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 777-846.
- Lehucher-Miche , M. P., Amara-Mokrane, Y. A., Devictor, B., Catilina, P., and Botta, A., 1996. Micronuclei kinetics of exfoliated urothelial cells. *Mutat. Res.* 354, 1-7.
- Majer, B.J., Laky, B., Knasmuller, S., Kassie, F., 2001. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. *Mutat. Res.* 489, 147-172.
- McKee, G.T., 2003. Urinary tract cytology, in Gray, W. McKee, G.T. (Eds.), *Diagnostic Cytopathology*, 2nd ed. Churchill Livingstone, London, pp. 471-498.
- Moore , L.E., Smith, A.H., Hopenhayn-Rich, C., Biggs, M.L., Kalman, D.A., Smith, M.T., 1997a. Decrease in bladder cell micronucleus prevalence after intervention to lower the concentration of arsenic in drinking water. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 6, 1051-1056.
- Moore, L.E., Smith, A.H., Hopenhayn-Rich, C., Biggs, M.L., Kalman, D.A., Smith, M.T., 1997b. Micronuclei in exfoliated bladder cells among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 6, 31-36.
- Moore, L E., Titenko-Holland, N., Quintana, P.J., Smith, M.T., 1993. Novel biomarkers of genetic damage in humans: use of fluorescence in situ hybridization to detect aneuploidy and micronuclei in exfoliated cells. *J. Toxicol. Environ. Health* 40, 349-357.
- Murray, E.B., Edwards, J.W., 1999. Micronuclei in peripheral lymphocytes and exfoliated urothelial cells of workers exposed to 4,4'-methylenebis-(2-chloroaniline) (MOCA). *Mutat. Res.* 446, 175-180.

- Murray, E.B., Edwards, J.W., 2005. Differential induction of micronuclei in peripheral lymphocytes and exfoliated urothelial cells of workers exposed to 4,4'-methylenebis-(2-chloroaniline) (MOCA) and bitumen fumes. *Rev. Environ. Health* 20, 163-176.
- Ranmuthugala, G., Pilotto, L., Smith, W., Vimalasiri, T., Dear, K., Douglas, R., 2003. Chlorinated drinking water and micronuclei in urinary bladder epithelial cells. *Epidemiology* 14, 617-622.
- Reali, D., Di Marino, F., Bahramandpour, S., Carducci, A., Barale, R., Loprieno, N., 1987. Micronuclei in exfoliated urothelial cells and urine mutagenicity in smokers. *Mutat. Res.* 192, 145-149.
- Ronald, A.R., Alfa, M.J., 1996. Microbiology of the genitourinary system, in Baron, S. (Ed), *Medical Microbiology*, 4th ed. The University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, pp. 1143-1157.
- Rosin, M.P., Anwar, W., 1992. Chromosomal damage in urothelial cells from Egyptians with chronic *Schistosoma haematobium* infections. *Int. J. Cancer* 50, 539-543.
- Stich, H.F., Curtis, J.R., Parida, B.B., 1982. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. *Int. J. Cancer* 30, 553-559.
- Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Bouvard, V., Altieri, A., Benbrahim-Tallaa, L., Coglianò, V., 2007. Carcinogenicity of shift-work, painting, and fire-fighting. *Lancet Oncology* 8, 1065-1066.
- Straif, K., Baan, R., Grosse, Y., Secretan, B., El Ghissassi, F., Coglianò, V., 2005. Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Lancet Oncology* 6, 931-932.
- Tian, D., Ma, H., Feng, Z., Xia, Y., Le, X.C., Ni, Z., Allen, J., Collins, B., Schreinemachers, D., Mumford, J.L., 2001. Analyses of micronuclei in exfoliated epithelial cells from individuals chronically exposed to arsenic via drinking water in inner Mongolia, China. *J Toxicol Environ Health A* 64, 473-484.
- Titenko-Holland, N., Moore, L.E., Smith, M.T., 1994. Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe. *Mutat. Res.* 312, 39-50.

- van Delft, J.H., Steenwinkel, M.S., van Asten, J.G., de Vogel, N., Bruijntjes-Rozier, T.C., Schouten, T., Cramers, P., Maas, L., van Herwijnen, M.H., van Schooten, F., Hopmans, P.M., 2001. Biological monitoring the exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of coke oven workers in relation to smoking and genetic polymorphisms for GSTM1 and GSTT1. *Ann. Occup. Hyg.* 45, 395-408.
- Warner, M.L., Moore, L.E., Smith, M.T., Kalman, D.A., Fanning, E., Smith, A.H., 1994. Increased micronuclei in exfoliated bladder cells of individuals who chronically ingest arsenic-contaminated water in Nevada. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 3, 583-590.

Chapitre 5: Discussion générale

L'exposition au benzo-a-pyrène des lymphocytes humains a entraîné l'augmentation significative de la fréquence des divers biomarqueurs précoces ayant été mesurés dans cette étude : des adduits BPDE-ADN, des bris simple-brins à l'ADN (BSB), des échanges entre chromatides-sœurs (ÉCS), des aberrations chromosomiques (AC) et des micronoyaux (MN). L'évaluation de ces biomarqueurs en fonction de la concentration de BaP, ainsi que l'étude des facteurs influençant leur formation et des relations existant entre eux a permis de mieux comprendre le mode d'action du BaP sur ce type de cellules. Par ailleurs, profitant de l'expertise du docteur Pierre Brochu, pathologiste au CHU Sainte-Justine et membre du département de pathologie et biologie cellulaire de l'Université de Montréal, nous avons effectué la mise au point de la technique d'isolement des cellules urothéliales et avons expérimenté une coloration différentielle de ces cellules. Nous avons ainsi pu évaluer la fréquence spontanée de micronoyaux urinaires (MNU) dans un échantillon d'individus contrôles. Finalement, l'apport du docteur Yvette Bonvalot, biostatisticienne et épidémiologiste à Santé Canada, a permis de définir l'approche statistique appropriée à la comparaison de plusieurs individus, particulièrement dans le cas de l'essai EM-ISEL, et de commencer à évaluer la pertinence d'un indicateur peu commun du test des ÉCS, soit les cellules à haute fréquence d'ÉCS (CHF).

1. La courbe dose-réponse du benzo-a-pyrène varie en fonction du biomarqueur

Deux types de relation sont obtenus lors de l'évaluation de la réponse génotoxique avec nos biomarqueurs : une relation linéaire et une relation dite «en U-inversé» ou non-linéaire (**Figure 25**, page 241). Une courbe dose-réponse linéaire est obtenue avec les échanges entre chromatides-sœurs (ÉCS), alors qu'un abaissement significatif est remarqué aux concentrations plus élevées de BaP pour les adduits BPDE-ADN et la fréquence des micronoyaux (MN). En ce qui concerne la fréquence des aberrations chromosomiques (AC), l'abaissement observé est non-significatif, fort probablement en raison du faible nombre de sujets analysés à cette concentration. Quant aux bris simple-brin (BSB) à l'ADN, la courbe normalisée n'a montré aucune différence significative avec le contrôle négatif. De façon générale, sauf pour les BSB à l'ADN, la pente de la courbe dose-réponse entre les conditions contrôle négatif et [BaP] = 0,1 µg/mL est très forte, en raison du fait que chez la majorité des sujets, le niveau des biomarqueurs mesurés est fortement augmenté dès la première concentration de BaP testée.

L'abaissement du niveau d'adduits aux concentrations plus élevées de BaP pourrait être associé au passage de la phase I du métabolisme, vers la phase II, ce qui se traduirait par une augmentation de la formation des adduits BPDE-ADN dans la première phase, suivie d'une diminution dans la seconde phase. Tel que mentionné dans l'introduction (section 4.4.1, page 51), la première phase du métabolisme biotransforme le BaP en BPDE [Xue et Warshawsky, 2005] et entraîne la production de quinones et, suite à l'entrée des quinones dans un cycle d'oxydoréduction, d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) [Miller et Ramos, 2001; Shimada, 2006]. Dans cette première phase, il y a également production d'adduits BPDE-ADN et transcription du gène *Nrf2*, ainsi que des gènes impliqués dans la métabolisation du BaP. Par la suite, la liaison des ERO au facteur de transcription Nrf2 stabilise celui-ci, qui pourra entamer la transcription des gènes impliqués dans le métabolisme de phase II [Jiang et coll., 2007]. L'étape de conjugaison des métabolites du

BaP pourra alors débiter de façon plus efficace, la cellule ayant une activité des protéines Gst et Nqo1 augmentée d'environ 55 % [Szaefer et coll., 2008]. L'activité augmentée de ces deux protéines liées à la détoxification du BaP entraîne une diminution de la formation d'adduits BPDE-ADN, tel que démontré dans un essai de Szaefer et coll. [2004] visant à évaluer la protection conférée par des phénols présents dans les végétaux (comme l'acide procatéchuique et l'acide chlorogénique) contre les dommages génotoxiques induits par une application topique de BaP sur de l'épiderme de souris.

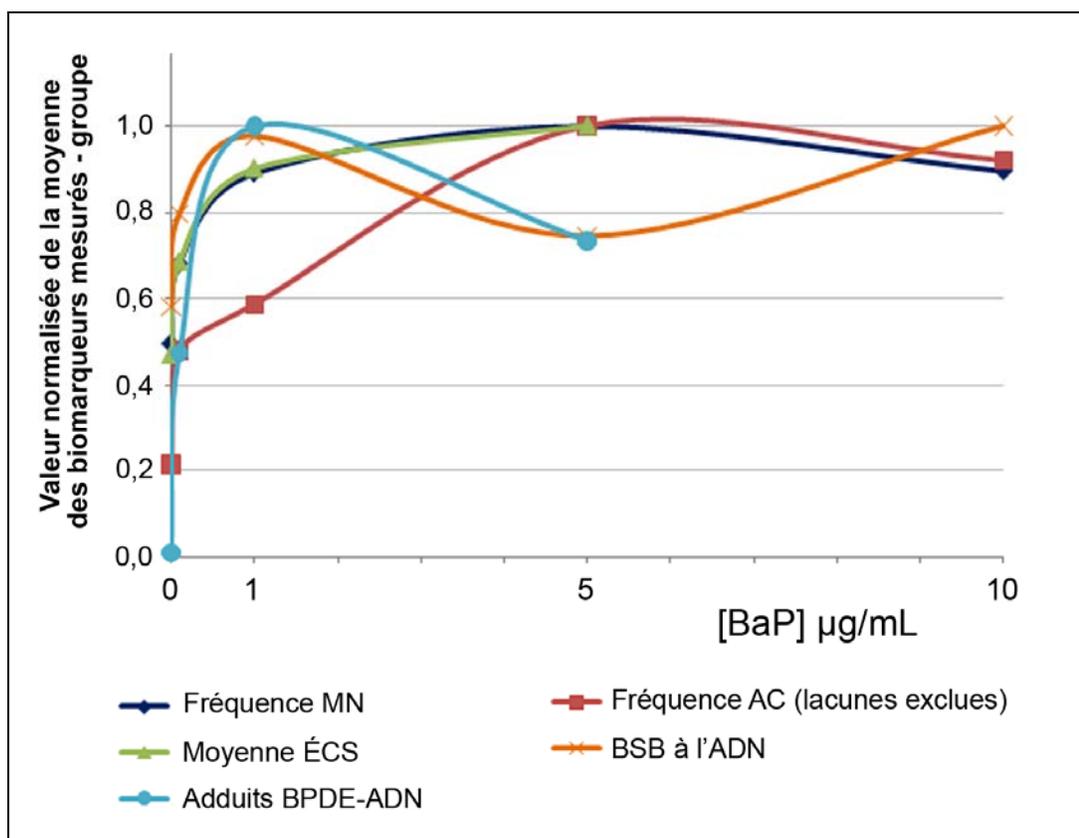


Figure 25: Courbes dose-réponse obtenues lors de la mesure de nos biomarqueurs génotoxiques précoces induits par l'exposition de lymphocytes humains au benzo-a-pyrène. Les valeurs moyennes des biomarqueurs (groupe) ont été normalisées sur la valeur maximale obtenue (valeur 1,0), pour en faciliter la comparaison.

En résumé, les résultats obtenus dans notre étude semblent mettre en évidence la stimulation, à plus faibles doses de BaP, de la production d'adduits BPDE-ADN, d'AC, de MN et d'ÉCS, qui seraient associés à la phase I du métabolisme du BaP. Ces résultats sont

en accord avec l'étude de Wiencke et coll. [1990] qui rapportent une augmentation des adduits à l'ADN à toutes les concentrations de BaP testées (variant entre 0,0025 et 1,25 µg/mL, 51 h d'exposition) chez leurs deux donneurs. Une augmentation des adduits à l'ADN en fonction du niveau d'exposition est également rapporté chez des femmes chinoises non-fumeuses, exposées aux HAP émis lors de la cuisson sur charbon [Binkova et coll., 1995]. En second lieu, une inhibition, à doses plus élevées de BaP, de la production d'adduits BPDE-ADN, d'AC et de MN est également observée dans notre étude, et serait associée au déclenchement de la phase II du métabolisme du BaP. Nos résultats sont en accord avec les observations de Elhajouji et coll. [1994] et de Vian et coll. [1993] qui ont observé une faible fréquence de MN lorsque les lymphocytes humains sont exposés à des concentrations très élevées de BaP (jusqu'à 125 µg/mL). De plus, dans une étude effectuée chez des travailleurs, Van Hummelen et coll. [1993] ont observé une diminution de la fréquence des MN chez les travailleurs les plus exposés aux HAP. Par ailleurs, dans une étude de Lewtas et coll. [1997], le niveau d'adduits formés suite à une exposition forte aux HAP (chez des travailleurs affectés aux fours à coke) montre une saturation de la courbe dose-réponse. Ceci a conduit les auteurs à proposer la notion de puissance de liaison à l'ADN (*DNA binding potency*), où le niveau d'adduits à l'ADN est rapporté par unité d'exposition. En normalisant de cette façon, les auteurs observent que la puissance de liaison à l'ADN est très faible chez les travailleurs les plus exposés aux HAP, alors que les individus exposés à l'air pollué présentent la puissance de liaison à l'ADN la plus élevée. Une situation analogue de saturation dans la formation des adduits BPDE-ADN et la fréquence des MN est rapportée chez les travailleurs affectés aux fours à coke qui appartiennent au troisième tertile au niveau de l'exposition (travailleurs les plus exposés) [Pavanello et coll., 2008].

En ce qui concerne les ÉCS, une inhibition de leur formation n'a pas été observée à la concentration la plus élevée étudiée avec ce biomarqueur ([BaP] = 5 µg/mL). Une situation similaire est rapportée par Wiencke et coll. [1990] qui ont montré une augmentation linéaire de la moyenne des ÉCS chez leurs deux donneurs. Cette situation pourrait s'expliquer par le fait que la diminution aurait pu être effective à une concentration plus élevée de BaP, telle qu'elle est observée pour les MN. En effet, ces deux biomarqueurs

montrent des moyennes normalisées presque identiques, tel qu'on peut l'observer sur la **Figure 25** (page 241). Par contre, cette hypothèse est contredite par l'étude de Hatzi et coll. [2011] qui est sous presse. Elle montre que la moyenne des ÉCS augmente à toutes les concentrations de BaP testées (2,5 – 25 et 250 µg/mL; 48 h d'exposition) dans leur groupe de 40 donneurs (âge et sexe inconnus). Ceci peut être expliqué par les mécanismes de formation des ÉCS. En effet, ils sont formés lorsque la réparation par recombinaison homologue (HRR) est sollicitée en phase S du cycle cellulaire, en présence d'une grande variété de lésions à l'ADN pouvant être produites par le BaP : les adduits BPDE-ADN, les bases modifiées comme les 8-OH-dG, ainsi que les bris simple-brin et double-brin à l'ADN [Andreassen et coll., 2006]. La production de toutes ces lésions n'ayant pas été quantifiée dans notre étude, il est difficile d'évaluer leur apport dans la production d'ÉCS, lors de la sollicitation de la HRR. L'implication de la HRR dans la production des ÉCS sera détaillée de façon plus importante dans la section 4.4 de la discussion (page 268).

Afin de vérifier si les relations dose-réponse observées sont crédibles, la variation intra-test a été calculée pour tous nos biomarqueurs (**Tableau VI**, page 121). Le faible coefficient de variation présent entre deux cultures lors de l'analyse des adduits BPDE-ADN (25 %) nous permet de conclure à la justesse et la reproductibilité de nos résultats. Comme la technique CIA (*Chemiluminescent ImmunoAssay*) réalisée dans le laboratoire du Dr Pierre Ayotte à l'Institut National de Santé Publique du Québec n'avait jamais été utilisée dans le cadre d'une étude d'exposition aux HAP *in vitro* ou *in vivo* (travailleurs ou autre), nous avons évalué un second facteur pouvant influencer les niveaux d'adduits BPDE-ADN détectés chez nos sujets, c'est-à-dire la variabilité entre les analyses par CIA indépendants (Voir Matériel et méthodes, section 4.1, page 119). Cette variabilité présente dans la quantification d'adduits BPDE-ADN est de 16 % (**Tableau VI**, page 121). Dans une première publication par Divi et coll. [2002], le coefficient de variation du CIA est de 13,8 %, alors que dans les deux publications suivantes du même groupe, des coefficients de 19 et 14,3 % sont rapportés [Keshava et coll., 2005; Gunter et coll., 2007]. Puisque notre coefficient de variation entre CIA se compare avec ceux rapportés dans la littérature, cela

démontre la fiabilité de la technique CIA dans la mesure du nombre réel d'adduits d'un échantillon donné, lors d'analyses par CIA successives.

En ce qui concerne les MN, dans la littérature, le coefficient de variation entre deux cultures considéré comme acceptable est de 40 % pour la fréquence spontanée des MN et de 20 % suite à une exposition, lorsque la fréquence induite des MN est supérieure à 20 % [Fenech 2007]. Selon cet auteur, un coefficient de variation de cet ordre de grandeur devrait aussi être retrouvé pour les autres biomarqueurs cytogénétiques (ÉCS et AC), quoiqu'il n'en ait pas fait l'expérience. D'ailleurs, aucune mention de ce type n'a été retrouvée dans la littérature pour les ÉCS et les AC. Dans notre étude, la variation entre deux cultures lors de l'analyse des ÉCS est en moyenne 11 % (**Tableau VI**, page 121). Lors de l'analyse des MN, elle est de 39 %, alors que pour le test des AC elle est de 66 %. Selon notre expérience, des coefficients de variation de cette taille sont inhérents à ce type d'analyse. En effet, lors de l'analyse des ÉCS, chaque cellule analysée génère une donnée et le nombre d'ÉCS par cellule, bien qu'étant peu élevé (de l'ordre de 3 à 12 ÉCS par cellule non exposée), n'est pas nul. La variation entre cultures s'en trouve donc très réduite. Au contraire, lors de l'analyse des MN et des AC, la majorité des cellules ne contiennent pas de MN ou d'AC, ce qui explique qu'un grand nombre de cellules analysées est requis pour mettre en évidence ces événements rares. Ainsi, le fait de retrouver un, deux ou trois MN ou AC de plus parmi les 100 ou 1000 cellules analysées peut changer de façon importante la fréquence rapportée. Par exemple, des fréquences d'AC de 2 % et 3 % retrouvées dans deux cultures donnent un coefficient de variation de 50 %. Par ailleurs, la variation entre deux cultures pour la fréquence spontanée des MN dans notre étude est de 21 %, ce qui est tout à fait dans les standards (40 %) rapportés par l'étude internationale sur la variation entre laboratoires [Fenech et coll., 2003]. Nous sommes donc confiants que la reproductibilité atteinte dans cette étude est tout à fait adéquate et donc que les résultats rapportés sont justes. Par contre, la grande variation entre deux cultures retrouvée lors de l'évaluation des BSB à l'ADN (en moyenne entre 61 et 122 % - **Tableau VI**, page 121) nous indique que des ajustements sont encore nécessaires afin de rendre la technique EM-ISEL plus reproductible. Ces ajustements seront discutés dans la section 5.2 de la discussion générale (page 286).

2. Les hommes et les femmes ne répondent pas de la même façon à de faibles concentrations de benzo-a-pyrène

A priori, très peu d'éléments présents dans la littérature pouvaient laisser présager de l'existence de différences entre les sexes, en ce qui a trait à leur réponse aux effets génotoxiques du BaP. En effet, les niveaux spontanés d'ÉCS et d'AC observés chez les hommes et les femmes ne sont pas significativement différents [Bonassi et coll., 1995; Kasuba et coll., 1995].

Par contre, concernant les MN sanguins (MNs), les premières études effectuées avec un grand nombre de sujets montrent que les femmes avaient une fréquence de MNs significativement plus élevée que les hommes [Fenech, 1993; Bonassi et coll., 1995]. Cette différence entre les sexes est observée dans de nombreuses études et est maintenant reconnue [Fenech et Bonassi, 2011]. Cependant, un effet de l'âge est également couplé à cet effet du sexe et il est estimé que la fréquence des MNs (par 1000 cellules binucléées) augmente de 0,31 MN par année (par 1000 cellules binucléées) chez les hommes, alors qu'il augmente de 0,52 MN par année chez les femmes [Fenech, 1993]. Ces estimés ont été confirmés par des études subséquentes, tel que revu par Vral et coll. [2011]. Il est intéressant de noter que chez les enfants, il n'y a pas de différence significative entre les deux sexes, dans la fréquence des MNs [Holland et coll., 2011], et que le niveau de progestérone ou d'œstradiol sanguin n'influence pas la fréquence de MNs retrouvée chez les femmes [Baeyens et coll., 2005].

En ce qui a trait au niveau de base des adduits BPDE-ADN dans les lymphocytes humains, il n'a pas été établi de façon précise avec la technique utilisée (CIA) : une seule étude ayant mesuré les adduits BPDE-ADN dans ces cellules [Gunter et coll., 2007]. Ces auteurs ne rapportent pas d'effet du sexe dans leur cohorte. Par contre, une différence entre les sexes est rapportée dans une étude suédoise où les BSB à l'ADN ont été quantifiés avec l'essai COMET chez de jeunes adultes non exposés [Hofer et coll., 2006]. Ainsi, les hommes montrent significativement plus de BSB que les femmes.

D'autre part, lorsqu'il est question d'évaluer l'effet du sexe dans les réponses génotoxiques au BaP et aux HAP, certaines difficultés surgissent. En effet, les études effectuées chez des travailleurs ne recrutent souvent que des hommes. En raison de la nature très physique des emplois pour lesquels une exposition aux HAP est importante (alumineries, entreprises sidérurgiques, pavage et goudronnage des routes, mines de charbon, etc. – voir l'introduction, section 0, page 97), un très faible nombre de femmes sont présentes dans ces milieux de travail, ce qui limite leur recrutement. En ce qui concerne les études où l'exposition est liée à la pollution de l'air ambiant, les recrutements concernent les policiers et chauffeurs d'autobus [Beskid et coll., 2007; Sram et coll., 2007b], ou encore des enfants ou des cellules familiales où mères et enfants sont invités à participer à l'étude [Neri et coll., 2003; Bocskay et coll., 2005; Mielzynska et coll., 2006]. Dans ces dernières études, les pères ne sont pas recrutés.

Dans le cadre de notre recherche, les différences entre les sexes ont été étudiées en suivant deux approches différentes. La première approche est celle traditionnellement utilisée dans la littérature et vise à comparer directement les réponses obtenues pour les deux sexes, en contrôlant pour le niveau d'exposition. C'est l'approche privilégiée en surveillance biologique où des sujets contrôles sont comparés à des sujets exposés, par exemple pour étudier les effets génotoxiques liés à l'usage du tabac ou à l'exposition à la fumée secondaire [DeMarini, 2004; Gyorffy et coll., 2004]. En utilisant cette approche, aucune différence significative entre les deux sexes n'a été retrouvée et ce, pour tous les biomarqueurs étudiés. Nous croyons que cette absence de différences pourrait être due à la grande variabilité interindividuelle existant dans la mesure de ces biomarqueurs. Ce point sera spécifiquement traité dans la prochaine section (page 249). La seconde approche s'est imposée d'elle-même alors que les analyses statistiques ont été systématiquement réalisées pour le groupe entier, ainsi que pour les hommes et les femmes séparément. Cette approche vise à comparer la relation dose-réponse obtenue dans le groupe d'hommes, à la relation obtenue dans le groupe de femmes pour chaque biomarqueur étudié. Ceci permet donc de comparer le comportement de leurs lymphocytes sanguins, leurs réponses génotoxiques face à l'épreuve imposée par l'exposition au BaP. En analysant ainsi les données obtenues pour les deux sexes, nous avons relevé des différences qui semblent indiquer une sensibilité

accrue des hommes face au BaP. En effet, les hommes présentent plus d'adduits que les femmes à toutes les conditions de BaP testées (jusqu'à 1,6 fois plus, à [BaP] = 5 µg/mL), mais cette augmentation est non significative. La différence la plus marquée se situe au niveau de l'exposition à [BaP] = 0,1 µg/mL, alors que les hommes ont montré une augmentation significative de la moyenne d'ÉCS, du % de CHF, de la fréquence d'AC et de celle des MN, alors que chez les femmes l'augmentation de tous ces biomarqueurs, quoique présente, est non significative.

La présence d'un effet du sexe dans le niveau de dommages génétiques mesurés n'a pas été rapportée très souvent dans la littérature et pourrait être liée à certaines expositions particulières. Ainsi, dans une étude grecque visant à évaluer les biomarqueurs associés à une exposition à la pollution de l'air, les sujets masculins provenant de la ville d'Halkida (secteur rural) présentaient significativement plus d'adduits volumineux à l'ADN (nommés *bulky adducts* en anglais) que les femmes [Georgiadis et coll., 2001]. Par contre, en Haute-Silésie (Pologne), région où l'air est fortement pollué (HAP, plomb), une étude effectuée chez les enfants a montré que les fillettes ont une augmentation significative des biomarqueurs suivants : adduits volumineux à l'ADN, fréquence de MNs et moyenne d'ÉCS, alors que ces biomarqueurs ne sont pas significativement augmentés chez les garçons [Mielzynska et coll., 2006]. Par ailleurs, à Jinghai en Chine, où le recyclage des déchets électroniques se fait de façon rudimentaire, dans les habitations mêmes, seules les femmes présentent une fréquence significativement accrue d'AC et de MNs [Liu et coll., 2009]. Les auteurs attribuent cette différence au mode de vie traditionnel prévalant dans cette région : les femmes demeurent à l'intérieur de la maison durant de plus longues heures que les hommes. Elles sont donc exposées plus longtemps aux composés se dégageant lors du recyclage des déchets électroniques. La différence entre les sexes rapportée dans cette étude serait donc plutôt liée au niveau d'exposition qu'au sexe.

Des différences métaboliques existant entre les hommes et les femmes pourraient expliquer la présence d'un effet du sexe en réponse au BaP. C'est notamment le cas pour deux tissus : les cellules pulmonaires et les lymphocytes sanguins. Ainsi, les niveaux basal et induit de Cyp1a1, ainsi que l'activité de cette protéine (mesurée par l'essai EROD – éthoxyrésorufine-*O*-dééthylase) sont significativement plus élevés dans les lignées

d'adénocarcinomes pulmonaires d'origine féminine, comparativement aux lignées d'origine masculine [Uppstad et coll., 2011]. De plus, un niveau significativement plus élevé d'adduits volumineux à l'ADN est également observé dans ces mêmes cellules, ainsi que dans du tissu pulmonaire normal, uniquement lorsqu'ils sont prélevés chez des sujets féminins atteints d'un cancer du poumon, qu'elles soient fumeuses ou non [Ryberg et coll., 1994; Cheng et coll., 2001]. Bien que le tabagisme soit la cause la plus importante de cancer du poumon [Taioli, 2008], un excès de risque de cancer est observé chez les femmes non-fumeuses, particulièrement celles d'origine asiatique, en comparaison avec les hommes non-fumeurs [Koo et Ho, 1990]. Par exemple, à Taiwan, seules 10 % des femmes ayant un cancer du poumon sont fumeuses, suggérant que des facteurs autres que l'usage actif du tabac, comme par exemple des différences métaboliques entre les sexes, pourraient être en cause [Cheng et coll., 2001]. Par contre, cet effet du sexe ne serait pas relié à une activation différentielle du récepteur aux œstrogènes ou à une interaction fonctionnelle entre AhR et ce récepteur dans les cellules pulmonaires [Berge et coll., 2004].

En ce qui concerne les lymphocytes sanguins, les niveaux de base des ARNm de *CYP1A1* et *CYP1B1* sont significativement plus élevés chez les femmes que chez les hommes [Finnstrom et coll., 2002; Lin et coll., 2003]. Par contre, l'induction de ces deux enzymes par des HAP (3-méthylcholanthrène ou benz-a-anthracène), a montré que les hommes ont une activité significativement plus grande de Cyp1a1 et Cyp1b1, post-induction, que les femmes [Smart et Daly, 2000; Lin et coll., 2003]. Les différences observées dans l'induction de ces enzymes de phase I dans les lymphocytes en culture pourraient expliquer que le niveau d'adduits BPDE-ADN est plus élevé chez les hommes que les femmes dans notre étude. De plus, les effets de cette induction différentielle pourraient être plus visibles à faible concentration de BaP et se traduire par une augmentation plus importante des biomarqueurs précoces de génotoxicité chez les sujets masculins, tel que nous l'avons observé dans notre étude. Cette hypothèse est appuyée par le fait que le niveau d'adduits BPDE-ADN explique une fraction significative de la variabilité observée dans la moyenne d'ÉCS et le % de CHF chez nos sujets (analyse par régression linéaire multiple). Toutefois, le niveau d'adduits BPDE-ADN n'explique pas entièrement la variabilité observée dans la fréquence des MN et celle des AC (lacunes

exclues), suggérant le rôle de facteurs additionnels, non mesurés dans cette étude, sur la sensibilité accrue des lymphocytes de nos sujets masculins.

3. La variation interindividuelle observée change en fonction du biomarqueur

Une variation interindividuelle est observée et les biomarqueurs analysés dans cette étude permettent de la mesurer. Le biomarqueur montrant la plus faible variation est la moyenne des ÉCS avec une variation d'environ 2 fois, présente autant dans les ÉCS spontanés ([BaP] = 0 µg/mL) que dans les ÉCS induits par l'exposition au BaP (Article 2, Tableau supplémentaire V, page 211). Par exemple, l'étendue de la moyenne des ÉCS observée chez nos sujets non exposés est de 5,9 à 12,0 ÉCS par cellule. Cette faible variation est identique à celle qui a été rapportée dans des études antérieures, provenant de notre équipe ou d'autres équipes de recherche [Sénécal-Quevillon et coll., 1986; Perera et coll., 1992]. Les autres biomarqueurs présentent des variations maximales de 15 fois (BSB à l'ADN), 26 fois (fréquences des MN et des AC), 28 fois (% de CHF) et 49 fois (adduits BPDE-ADN) (voir Article 2, Tableau supplémentaire V, page 211). Sauf pour la variation dans les BSB à l'ADN mesurés par EM-ISEL qui n'a jamais été quantifiée, la variation interindividuelle présente dans notre étude pour les autres biomarqueurs est similaire ou plus faible que celle rapportée dans la littérature. Ainsi, des variations de 73 fois dans le niveau d'adduits (mesurés par ELISA) et de 22 fois dans la fréquence des AC sont rapportées dans une étude effectuée en Haute-Silésie [Perera et coll., 1992]. Chez des travailleurs de l'industrie de l'aluminium (travaillant près de l'anode dans la chambre d'électrolyse), une très importante variation interindividuelle de 266 fois est observée dans leur niveau d'adduits (séparés par HPLC et détectés en fluorescence), alors qu'elle est de 128 fois pour les travailleurs aux fours à coke, 36 fois pour les ramoneurs de cheminée et 48 fois pour les sujets contrôles de cette étude [Pavanello et coll., 1999]. Quant à la variation observée dans la fréquence des MN, elle est nettement plus faible que la nôtre dans l'étude de Warshawski et coll. [1995], qui rapportent une variation de 1,6 à 2,5 fois.

Effectuée chez cinq sujets, cette étude d'exposition *in vitro* de lymphocytes humains au BaP est la seule à mentionner une variation interindividuelle. Par contre, les grandes études de fréquence de MN rapportent une variation interindividuelle semblable à la nôtre, d'environ 30 fois [Fenech, 2007; Vral et coll., 2011]. Quant au % de CHF, notre niveau de base montre une variation interindividuelle de 2,5 fois, ce qui est plus faible que les valeurs rapportées dans les sujets contrôles des études de Lanza et coll. [1999] et de Lai et coll. [1998] (variation du % de CHF de 7 et 56 fois, respectivement). Cette différence pourrait être due à la méthode de calcul des cellules à haute fréquence d'ÉCS qui diffère. En effet, comme les sujets de notre étude sont leurs propres contrôles, il est possible d'établir le % de CHF de chaque sujet, individuellement. Par contre, dans les études de type cas-témoins, le nombre d'ÉCS nécessaire pour attribuer le titre de CHF à une cellule est calculé à partir de la distribution du nombre d'ÉCS de la population contrôle entière. Le pourcentage de CHF est par la suite calculé pour chaque sujet à partir de la valeur de ce seuil [Hirsch et coll. 1992].

Les facteurs expliquant la variabilité présente entre les individus sont généralement divisés en deux classes : facteurs génétiques et environnementaux. Afin d'isoler l'effet des facteurs génétiques (appelé l'héritabilité) dans l'apparition de maladies ou dans la production d'aberrations génétiques, des études de jumeaux monozygotes (MZ)/ jumeaux dizygotes (DZ)/ contrôles non apparentés sont habituellement réalisées. L'intérêt de ces études réside dans le fait que les jumeaux MZ partagent 100 % de leur patrimoine génétique, alors que les DZ en partagent 50 % (tout comme les frères et sœurs) et que les individus non apparentés n'en partagent pas. En ce qui concerne l'environnement, les jumeaux MZ et DZ en partagent une certaine fraction, alors que les contrôles apparentés n'en partagent pas. Par des études de variance, il est donc possible d'évaluer la part de l'hérédité, de l'environnement partagé et de l'environnement unique dans l'apparition du phénomène étudié [Surowy et coll., 2011]. Ce type d'étude a été effectué pour les AC, les MNs et les ÉCS. Par contre, en ce qui a trait à l'importance de l'héritabilité dans la production des adduits à l'ADN (tous types confondus) ou des bris simple- ou double-brin à l'ADN, elle n'a jamais été évaluée.

Dans une étude comportant 9 paires de jumeaux MZ et 10 paires de jumeaux DZ, Tedeschi et coll. [2004] ont évalué l'héritabilité dans la fréquence spontanée d'AC et de MNs, ainsi que dans la fréquence induite de ces biomarqueurs par la bléomycine et l'aphidicoline (inhibiteur de l'ADN polymérase – bloque la réplication de l'ADN). Pour les AC spontanées, 61 % de la variation interindividuelle est expliquée par l'héritabilité, alors que cette part est de 58 % dans le cas des AC induites. En ce qui concerne les MNs spontanés, 69 % de la variation est d'origine génétique, alors que cette part est estimée à 63 % pour les MNs induits. Par ailleurs, une seconde étude de plus grande envergure (25 paires de jumeaux MZ, 42 paires de jumeaux DZ) a estimée l'héritabilité à 75 % dans la variation observée dans le nombre de cassures chromosomiques par cellule induite par la bléomycine [Cloos et coll., 1999]. En troisième lieu, une cohorte a récemment été étudiée pour évaluer la fraction de la variabilité observée dans la fréquence de MNs spontanés et induits par les radiations, pouvant être expliquée par des facteurs génétiques [Surowy et coll., 2011]. Ainsi, le recrutement de 39 paires de jumeaux MZ, 10 paires de jumeaux DZ et 78 individus non apparentés a permis d'évaluer à 68 % l'héritabilité dans la fréquence spontanée de MNs et à 57 % la fraction de la variation de la fréquence induite de MNs attribuable à des facteurs génétiques. Ces trois études font donc état d'une importance majeure des facteurs génétiques (environ 60 à 70 %) dans la fréquence spontanée d'AC et de MNs observée chez les individus, ce qui laisse une part plus restreinte (environ 30 à 40 %) aux facteurs strictement environnementaux, comme les habitudes de vie et l'exposition environnementale dans la modulation de ces biomarqueurs.

En ce qui a trait à l'héritabilité dans la production des ÉCS, elle serait assez faible selon l'étude de Hirsch et coll. publiée en 1992. La variabilité observée dans la fréquence spontanée d'ÉCS a été évaluée chez 68 paires de jumeaux MZ et 44 paires de jumeaux DZ et attribuée 30 % de la variabilité interindividuelle à des facteurs génétiques. Cependant, tel que mentionné plus haut pour notre étude, la variabilité interindividuelle observée dans la moyenne des ÉCS est très faible (variation d'environ 2 fois), ce qui pourrait expliquer que la part de l'héritabilité soit plus difficile à quantifier pour cet indicateur. L'utilisation du % de CHF, qui est nettement plus variable (jusqu'à 28 fois), pourrait être un meilleur critère pour évaluer la variation d'origine génétique dans la formation des ÉCS. Des études supplémentaires sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

Afin de déterminer la part de l'environnement et de l'héritabilité, Wu et coll. [2006] ont effectué une étude de grande envergure où la sensibilité à différents mutagènes a été estimée à l'aide du test des AC. Effectuée auprès de 148 paires de jumeaux MZ, 57 paires de jumeaux DZ, ainsi que 50 frères et sœurs de jumeaux, cette étude a confirmé que l'héritabilité des AC induites par la bléomycine est importante (40,7 %), alors que la sensibilité au BPDE montre une héritabilité supérieure, soit 48,0 %. La sensibilité aux rayons ionisants montre cependant une héritabilité majeure (62,5 %), laissant une faible place aux facteurs environnementaux uniques et partagés (37,5 % et 0%, respectivement). Dans le cas de la bléomycine et du BPDE, l'apport de l'environnement unique est estimé à 33,3 et 31,8 % (respectivement), alors que la contribution de l'environnement partagé est plus faible (26,0 et 20,2 %, respectivement), mais significatif, en comparaison avec les rayons ionisants. Pour Wu et coll. [2006], la différence d'héritabilité observée entre ces mutagènes s'expliquerait par la variété des mécanismes de réparation de l'ADN, ces mécanismes de réparation impliquant des gènes différents et ayant leurs cinétiques de réparation propres.

3.1. La modulation de la formation des biomarqueurs et la variation interindividuelle

Cette importance de l'héritabilité dans la production d'ÉCS, d'AC ou de MN est à la base de la recherche de facteurs susceptibles de moduler la formation de ces biomarqueurs. Ces modulateurs peuvent être génétiques ou environnementaux et ont été brièvement abordés dans l'introduction (section 0, page 20). Les modulateurs génétiques recherchés sont le plus souvent des gènes impliqués dans le métabolisme et dans la réparation de l'ADN. Ces gènes sont présents dans la population sous plusieurs formes (appelés allèles) ayant des propriétés variables. Ces allèles sont appelés polymorphismes dans la littérature. Les modulateurs environnementaux recherchés sont très souvent d'origine nutritionnelle, quoique l'étude du mode de vie commence à être abordée. Par ailleurs, une interaction entre les modulateurs génétiques et environnementaux est avérée et permet de mieux comprendre la variation existant entre les individus.

3.1.1. LES POLYMORPHISMES GÉNÉTIQUES IMPLIQUÉS DANS LA FORMATION DES BIOMARQUEURS GÉNOTOXIQUES PRÉCOCES

Une récente revue de la littérature montre que quatre polymorphismes de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et le métabolisme sont régulièrement associés à une augmentation de la fréquence des MN [Dhillon et coll., 2011]. En premier lieu, les travailleurs possédant un ou les deux allèles du gène *XRCC1* où le codon 280 code pour une histidine (280His) ont une fréquence de MN significativement augmentée. Cette situation a été mise en évidence chez des travailleurs exposés au chlorure de vinyle et au 1,3-butadiène, ainsi que chez des travailleurs affectés aux fours à coke. La protéine Xrcc1 variante se localiserait difficilement au site où l'ADN est endommagé, entraînant un défaut dans la BER. En second lieu, les travailleurs affectés aux fours à coke présentant les deux allèles 751Gln du gène *ERCC2* ont une fréquence significativement augmentée de MN. Cette protéine est impliquée dans la NER, un système particulièrement important pour enlever les adduits à l'ADN, cependant la fonction de la protéine variante est encore inconnue. Le troisième polymorphisme a été retrouvé chez des travailleurs exposés au chlorure de vinyle, chez lesquels le fait de posséder au moins un allèle c2 du gène *CYP2E1* entraîne une hausse de la fréquence des MN. L'enzyme Cyp2e1 est importante dans le métabolisme de nombreux pro-cancérogènes, médicaments et solvants. Finalement, le quatrième polymorphisme a été mis en évidence dans les populations japonaises et australiennes. Les porteurs du nucléotide A en position 2756 du gène *MTR* présentent une augmentation de la fréquence des MN, autant chez les fumeurs que les non-fumeurs. La protéine Mtr est importante dans le métabolisme des folates. Une étude a rapporté qu'une déficience en folates est associée à une augmentation des dommages à l'ADN ou de la fréquence des MN, suite à une incorporation excessive d'uracile dans l'ADN (par manque de thymidine) et/ ou une hypométhylation des cytosines [Fenech et coll., 2005].

Concernant les ÉCS et les AC, quelques associations sont retrouvées dans des articles depuis la revue de littérature publiée par Norppa en 2004 (revue présentée dans l'introduction, section 0, page 20). Ainsi, l'absence d'activité de conjugaison de l'enzyme Gstt1 dans les lymphocytes sanguins est associée à une augmentation significative des cassures chromosomiques chez les fumeurs [Tuimala et coll., 2004; Skjelbred et coll.,

2011], à une augmentation significative des lacunes [Skjelbred et coll., 2011], ainsi qu'à une augmentation modérée (non significative) de la moyenne des ÉCS chez tous les sujets [Tuimala et coll., 2004; Hatzi et coll., 2011]. Quant à l'époxyde hydrolase (*EPHX1*), l'effet des différents polymorphismes dépendrait du niveau d'exposition de l'individu. Alors qu'une faible activité de mEH chez les non-fumeurs est significativement associée à une augmentation des cassures chromatidiennes [Skjelbred et coll., 2011], une activité élevée chez les fumeurs entraîne une augmentation significative de la moyenne des ÉCS [Bukvic et coll., 2009] et des cassures chromatidiennes [Skjelbred et coll., 2011]. De façon plus générale, le fait d'avoir un allèle variant (polymorphique) de *EPHX1* serait relié à une augmentation des cassures chromatidiennes [Skjelbred et coll., 2011].

Par ailleurs, des études ont évalué l'effet des allèles variants de diverses enzymes impliquées dans la réparation de l'ADN sur les niveaux d'ÉCS et d'AC. Chez des individus non-fumeurs ou des travailleurs exposés aux HAP (policiers affectés à la circulation), la présence de deux allèles variants du gène *ERCC2* est significativement associée à une hausse de la moyenne des ÉCS [Zijno et coll., 2006]. De plus, deux variants dits «protecteurs» du gène *XRCC1* ont été identifiés (codons 194 et 280) et sont associés à une diminution de la fréquence spontanée des cassures chromosomiques [Tuimala et coll., 2004]. Par contre, ces allèles seraient aussi associés à une sensibilité accrue à la bléomycine et au BPDE [Tuimala et coll., 2002; Wang et coll., 2003], ainsi qu'à une hausse de la fréquence des MN (tel que mentionné précédemment), soulevant des interrogations quant au rôle du système de réparation BER en réponse à ces produits chimiques.

Étant donné que les effets produits par la présence de ces allèles variants sont subtils, une approche multigénique semble prometteuse. Alors qu'en 2001, la présence d'un allèle variant du gène *XRCC3* (voie BER) est associée à une augmentation significative des adduits volumineux chez des individus non exposés [Matullo et coll., 2001], l'étude combinée des gènes *XRCC1* et *XRCC3* permet de déterminer que le fait d'avoir trois ou quatre allèles variants entraîne une hausse significative du niveau d'adduits volumineux chez des sujets fumeurs de longue date (plus de 40 ans) [Peluso et coll., 2010]. Par ailleurs, étudiant plusieurs variants fonctionnels présents dans les gènes *XPA*, *XPC* et *RAD23B* (voie

NER), Lin et coll. [2007] démontrent que la présence de 6 allèles dits «défavorables» est associée à une sensibilité significativement accrue aux effets clastogènes du BPDE, visible par une augmentation des AC. De plus, cette équipe montre que certains profils favorables ou défavorables existent, puisque plusieurs variants de ces gènes se transmettent ensemble, formant des blocs d'haplotypes. L'étude de la transmission de ces variants en blocs serait une voie intéressante pour les études futures en toxicogénomique, sur des cohortes de grande envergure, de plusieurs centaines, voire quelques milliers d'individus [Balmain et coll., 2003]. En évaluant la présence combinée d'allèles variants de plusieurs gènes impliqués au sein d'une même voie métabolique ou de réparation de l'ADN, il sera possible de discerner des effets significatifs qui, pris isolément, sont trop subtils pour être distingués du niveau de base de l'aberration étudiée.

3.1.2. LES FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX INFLUENÇANT LA FORMATION DES ABERRATIONS CYTOGÉNÉTIQUES

Récemment, neuf nutriments et oligoéléments influençant la fréquence spontanée des MN ont été identifiés [Fenech et coll., 2005]. Ainsi, les individus ayant la consommation la plus élevée (3ième tertile) de vitamine E, rétinol, folate, acide nicotinique et calcium, présentent une réduction significative de la fréquence des MN de l'ordre de 28 à 49 %, en comparaison avec ceux qui en consomment le moins. Par ailleurs, ceux qui consomment le plus de riboflavine, d'acide pantothénique et de biotine ont une fréquence significativement plus élevée de MN (de 36 à 65 % plus de MN), en comparaison avec ceux qui en consomment le moins. Finalement, cette étude montre également que la consommation de β -carotène est optimale avec un apport quotidien de 4000 à 6000 μg par jour, puisque les individus en consommant moins ou plus présentent une augmentation significative de 18 % de la fréquence des MN. Par ailleurs, l'influence du mode de vie sur la fréquence des aberrations cytogénétiques commence aussi à être investiguée. Si les effets de l'usage du tabac et de la consommation d'alcool sur l'augmentation de la fréquence des ÉCS, des MN et des AC ne sont plus à démontrer [Hirsch et coll., 1992; DeMarini, 2004; Norppa, 2004; Fenech et Bonassi, 2011], il en va autrement de l'effet des drogues illicites, de l'exercice physique et du stress, dont les études sont peu nombreuses.

3.1.3. LES INTERACTIONS ENTRE GÈNES ET ENVIRONNEMENT MODULENT LE NIVEAU DES BIOMARQUEURS ET CONTRIBUENT À LA VARIATION INTERINDIVIDUELLE

Une interaction entre gènes et environnement se produit lorsque l'exposition environnementale et le bagage génétique s'unissent pour entraîner l'apparition d'une maladie dans un certain nombre d'individus [Brennan, 2002]. Cette définition peut également s'appliquer dans le cas où ces interactions modulent le niveau d'un biomarqueur d'intérêt. Les modèles prenant en compte ce type d'interaction font état de la présence d'effets additifs, ainsi que d'effets synergiques, dans lesquels l'effet joint de deux facteurs est plus grand que la somme des deux effets individuels [Brennan, 2002]. Dans le cas du métabolisme des folates, l'interaction entre la consommation de folates et de ses dérivés, ainsi que les polymorphismes modulant leur métabolisme est suffisante pour générer une grande variabilité dans la fréquence de MNs entre les individus. En effet, il est estimé qu'entre 10 et 70 % de la population des pays développés ne consomme pas suffisamment de folates [Fenech, 2005], alors qu'environ 80 % des sujets sont porteurs homozygotes de l'allèle A du gène MTR [Dhillon et coll., 2009; Naushad et coll., 2010]. Les deux facteurs combinés entraînent une augmentation de la fréquence des MNs [Dhillon et coll., 2011]. Comme la simple prise quotidienne d'une multivitamine contenant, entre autres, 0,2 mg d'acide folique durant 4 mois s'est traduite par une diminution significative de la fréquence spontanée des MNs [Gaziev et coll., 1996], la normalisation nutritionnelle de la fréquence des MNs peut être envisagée [Fenech, 2005]. Cette normalisation pourrait entraîner une diminution de la variation interindividuelle observée avec ce biomarqueur, mais ceci doit cependant être démontré. Par ailleurs, pour déterminer l'effet des polymorphismes ayant un rôle dans le métabolisme des folates, il serait plus facile de mesurer les folates (et leurs dérivés) chez les sujets étudiés [Bull et coll., 2011]. Ce type d'étude, réalisé avec les autres biomarqueurs précoces de génotoxicité, comme les ÉCS et les AC, serait très intéressant à effectuer et permettrait une meilleure estimation de l'effet d'une déficience en acide folique sur la formation de ces biomarqueurs. Si, comme le postule le Dr Michael Fenech [2005], ces biomarqueurs sont des dosimètres biologiques permettant d'évaluer les effets d'une déficience de certains oligoéléments sur la stabilité de notre génome, alors il importe de

bien évaluer tous ces biomarqueurs, et non un seul d'entre eux (les MN), pour identifier celui qui permettra la meilleure évaluation possible de la santé génomique sur une base individuelle.

4. Le benzo-a-pyrène produit de multiples effets sur les lymphocytes humains

Clastogène reconnu depuis plusieurs années dans la communauté scientifique [Miller et coll., 1998; Corvi et coll., 2008], le BaP a confirmé cet effet dans notre étude, en plus de dévoiler son action aneugénique sur les lymphocytes humains. Les effets aneugènes se produisent par des mécanismes qui ne sont toujours pas élucidés. Par ailleurs, l'analyse des corrélations entre les biomarqueurs mesurés dans cette étude suggère que d'autres mécanismes sont également en jeu dans leur formation. Ces mécanismes pourraient faire intervenir les ERO et le stress oxydatif, ainsi que la formation de bris double-brin (BDB) à l'ADN. Afin de comprendre comment se produisent ces différentes atteintes à l'ADN, la formation de chaque biomarqueur sera mise en perspective avec le cycle cellulaire de notre cellule modèle, le lymphocyte humain en culture, et avec les mécanismes de formation et/ou de réparation de ces biomarqueurs.

4.1. Les corrélations entre les biomarqueurs mesurés dans notre étude

Dans notre étude, la majorité des biomarqueurs sont significativement corrélés avec l'exposition au BaP : les adduits BPDE-ADN, la moyenne des ÉCS, le % de CHF, la fréquence des AC (lacunes exclues) et la fréquence des MN (Article 2, Tableau IV, page 210). Dans la littérature, l'exposition au BaP et la formation d'adduits BPDE-ADN seraient à la base des dommages à l'ADN, de la mutagénicité ainsi que de la cancérogénicité induites par ce composé [Luch, 2005; Shimada, 2006]. De façon générale, l'expression «dommages à l'ADN» réfère à des dommages oxydatifs (8-OH-dG) et à des changements

dans la structure de l'ADN (cassures et réarrangements chromosomiques, etc.) [Poirier, 2004]. Ces observations ont conduit à la description d'un continuum exposition-maladie pour les HAP (Introduction section 2.1, page 18), dans lequel les adduits BPDE-ADN sont des biomarqueurs d'exposition (plus spécifiquement de dose biologique efficace), alors que les dommages à l'ADN sont des biomarqueurs d'effet biologique précoce, plus particulièrement d'effets génotoxiques (**Figure 3**, page 20) [Manno et coll., 2010]. Il ne semble donc pas étonnant de retrouver une corrélation entre l'exposition au BaP et la formation des adduits BPDE-ADN et les autres biomarqueurs mesurés dans notre étude. Ce type d'étude a aussi été effectuée par Wiencke et coll. [1990], qui trouvent des corrélations significatives entre les biomarqueurs mesurés chez deux sujets (adduits à l'ADN et moyenne des ÉCS) et l'exposition *in vitro* au BaP. Cette étude est la seule autre étude *in vitro* sur lymphocytes sanguins ayant évalué les corrélations existant entre leurs biomarqueurs. Par contre, ce type de corrélation a été étudié à de multiples reprises dans des études d'exposition environnementale, avec des résultats contradictoires. Alors qu'une corrélation significative positive est retrouvée entre le niveau d'adduits à l'ADN, d'ÉCS, d'AC ou de MN et l'exposition aux HAP dans plusieurs études [Reddy et coll., 1991; Perera et coll., 1992; Binkova et coll., 1998; Kalina et coll., 1998; Donbak et coll., 2005; Liu et coll., 2006; Celik et coll., 2007], aucune corrélation n'est retrouvée dans d'autres études [van Schooten et coll., 1990; Van Hummelen et coll., 1993; Lewtas et coll., 1997; Merlo et coll., 1997; Zhang et coll., 2000; Siwinska et coll., 2004; Neri et coll., 2006].

Cette corrélation existant entre les adduits BPDE-ADN et les autres biomarqueurs mesurés dans notre étude est en accord avec le continuum exposition-maladie, tel qu'il est généralement accepté (Introduction section 2.1, page 18). En effet, dans ce continuum, les adduits BPDE-ADN sont considérés comme des biomarqueurs de dose efficace, alors que les effets biologiques précoces semblent en découler (BSB à l'ADN, ÉCS, MN, AC et 8-OH-dG) [Bonassi et coll., 2005; Manno et coll., 2010]. Afin d'évaluer la corrélation entre les adduits BPDE-ADN et les autres biomarqueurs de notre étude, nous avons effectué une analyse par corrélation partielle (Matériel et méthodes, section 5.2.8, page 133). Notre étude a montré l'existence de corrélations significatives entre les adduits BPDE-ADN et les deux indicateurs du test des ÉCS, soit la moyenne des ÉCS et le % de CHF (Article 2,

Tableau IV, page 210). En ce qui concerne la littérature, une corrélation significative existant entre les adduits volumineux et les ÉCS a été retrouvée dans l'étude *in vitro* de Wiencke et coll. [1990], alors que dans l'étude de Thompson et coll. [1989], aucune corrélation n'est retrouvée. Par contre, une seule concentration de BaP est testée dans cette étude. En ce qui concerne les cinq études d'exposition *in vivo* aux HAP où les adduits à l'ADN et les ÉCS ont été mesurés conjointement, encore une fois les résultats sont contradictoires. Les études d'exposition aux HAP en milieu de travail ne rapportent pas de corrélation entre adduits à l'ADN et moyenne des ÉCS [Popp et coll., 1997; Carstensen et coll., 1999; van Delft et coll., 2001], alors que les expositions environnementales (à l'air pollué, en Haute-Silésie), montrent une corrélation significative [Perera et coll., 1992; Mielzynska et coll., 2006].

Par contre, nous avons été étonnés de ne pas retrouver dans notre étude de corrélation significative entre les adduits BPDE-ADN et les AC ou les MN, alors que le continuum d'exposition-maladie semble le supposer. Ceci suggère que d'autres lésions de l'ADN, non mesurées dans cette étude, joueraient un rôle majeur dans la formation des AC et des MN. Étant donné que l'analyse par régression linéaire multiple identifie % de CHF comme contribuant significativement à la variation de la fréquence des AC et des MN observée chez nos sujets (Annexe IV, page lxxv), nous pouvons postuler que les lésions entraînant la formation de CHF entraînent également la formation d'AC et de MN. La nature de ces lésions sera discutée en détail dans la section 4.4 de la discussion (page 268). Dans la littérature, l'existence de corrélations entre les adduits BPDE-ADN et les AC ou les MN est peu étudiée et donne des résultats contradictoires. Alors qu'aucune corrélation entre la fréquence des AC ou des MN et le niveau d'adduits n'est rapporté chez des travailleurs en salle d'électrolyse de l'aluminium [Carstensen et coll., 1999], une faible corrélation significative est observée chez des ramoneurs de cheminée [Ichiba et coll., 1994]. Par ailleurs, dans une population de Haute-Silésie (Pologne), une corrélation significative est observée entre la fréquence des AC et les adduits volumineux, mais pas avec les adduits BPDE-ADN [Perera et coll., 1992]. Finalement, chez des travailleurs affectés aux fours à coke, une corrélation significative est présente entre le niveau d'adduits BPDE-ADN et la fréquence des MN, seulement chez les travailleurs qui appartiennent aux deux tertiles

inférieurs du niveau d'exposition [Pavanello et coll., 2008]. Par contre, lorsque les travailleurs les plus exposés sont inclus, cette corrélation disparaît.

4.2. La formation et la réparation des adduits BPDE-ADN

Dans notre étude, la mesure des adduits BPDE-ADN a été effectuée dans les cellules isolées du sang complet, soit la fraction contenant les lymphocytes et monocytes, après la culture et l'exposition au BaP. Lors de l'analyse par CIA, les cellules présentes dans nos échantillons sont donc activement engagées dans le cycle cellulaire. Holz et coll. [1991] ont démontré que des adduits BPDE-ADN sont retrouvés dans ces deux types de cellules. En effet, dans des monocytes purifiés ou encore dans des monocytes et lymphocytes stimulés à la PHA, ces adduits sont retrouvés, suite à une exposition de 20 h à 0,125 µg/mL de BaP. Par contre, dans des lymphocytes non stimulés à la PHA, ces auteurs n'ont pas détecté d'adduits, démontrant que les lymphocytes quiescents (en phase G0 du cycle cellulaire) ne métabolisent pas le BaP. Par contre, le niveau d'adduits mesuré chez nos sujets est la résultante autant des actions du métabolisme du BaP (production et conjugaison du BPDE), que de la production et la réparation des adduits BPDE-ADN. Puisque le BPDE est hautement réactif, il est raisonnable d'assumer que la majeure partie du BPDE non conjugué réagira avec les protéines intracellulaires et avec l'ADN [Boysen et Hecht 2003]. La réaction du BPDE avec des protéines a surtout été étudiée dans le cas de protéines plasmatiques, soit l'hémoglobine et l'albumine, autant chez des travailleurs que chez des populations exposées dans l'environnement [Neri et coll., 2006; Wang et coll., 2007]. Les facteurs influençant le métabolisme du BaP en BPDE ont été discutés précédemment (Discussion, section 1, page 240), toutefois les éléments entourant la réparation des adduits BPDE-ADN restent à discuter.

Suite à la formation des adduits BPDE-ADN, les adduits instables dépurinent rapidement, générant des sites abasiques qui seront réparés par BER; les adduits qui restent sont majoritairement stables et ne génèrent pas une quantité significative de sites abasiques, tel qu'évalué par Braithwaite et coll. [1998] dans un essai de réparation de l'ADN *in vitro*.

Conséquemment, la majorité des adduits sont donc réparés par le système NER, qui comporte deux composantes : la TC-NER et la GC-NER. La TC-NER est une composante rapide et serait à l'origine de la réparation des adduits BPDE-ADN se produisant dans les quelques heures suivant l'exposition. Cette rapidité est particulièrement évidente dans l'étude de Dreij et coll. [2005] où les cellules pulmonaires A359 exposées à 1 μM de BPDE réparent 45 % des adduits BPDE-ADN formés durant la première heure, alors qu'au total 75 % des adduits sont réparés après six heures. Une situation similaire est observée suite à l'exposition de fibroblastes et de cellules HepG2, où 75 % et 33 % des adduits, respectivement, sont réparés dans les six à huit premières heures suivant une exposition à 0,5 μM de BPDE [Lloyd et Hanawalt, 2000; Marie et coll., 2008]. Il est à noter que le taux de réparation observé dans les six à huit premières heures post-exposition ne peut être le seul fait de la TC-NER étant donné que le génome activement transcrit représenterait environ 5 % du génome [Dreij et coll., 2005]. Certaines séquences réparées par la GC-NER doivent donc être plus facilement accessibles que d'autres, et donc plus rapidement réparées. Ces séquences pourraient être situées dans les bandes R des chromosomes, dont la chromatine est moins compactée, donc plus accessible à la machinerie de réparation de l'ADN [Saccone et coll., 2001]. La GC-NER serait également responsable de la réparation se poursuivant plusieurs heures, voire quelques jours après l'exposition. C'est ainsi que la réparation des adduits BPDE-ADN se poursuit pour atteindre un taux de réparation de 80 à 95 %, 48 h après l'exposition, dans les cellules HepG2 et les fibroblastes mentionnés auparavant [Lloyd et Hanawalt, 2000; Marie et coll., 2008].

Alors que la TC-NER fonctionne en tout temps, étant liée à la transcription des gènes en ARNm, il y a une controverse entourant le moment où s'effectue la GC-NER. En effet, plusieurs auteurs avancent que la GC-NER s'effectuerait autant en phase G1, G2, que dans la phase S [Hanawalt, 2001], tandis que d'autres croient qu'elle s'effectuerait presque exclusivement en phase S [Heddle et Bielas, 2005]. En effet, on observe que les mutations générées dans des cellules quiescentes par un mutagène comme l'éthyle nitrosourée, ne sont fixées qu'après la réplication de ces cellules [Bielas et Heddle, 2000]. De plus, dans des cellules différenciées comme les neurones, seule la TC-NER est active [Nospikel et Hanawalt, 2002]. Par ailleurs, en utilisant un transgène non répliqué, on remarque que si toutes les cellules ont effectué la TC-NER, seules les cellules en phase S

ont effectué la GC-NER [Heddle et Bielas, 2005]. Toutefois, les évidences s'accumulent prouvant que la GC-NER est également active dans les autres phases du cycle cellulaire. Ainsi, il est possible de réaliser la technique UDS (*Unscheduled DNA Synthesis*) sur des cellules provenant de patients atteints du syndrome de Cockayne (déficientes en TC-NER), démontrant ainsi que la GC-NER s'effectue également dans les phases G1 et G2 du cycle cellulaire [van Hoffen et coll., 1993]. L'hypothèse de la réparation couplée à une polymérase (*PC-repair*) gagne cependant en popularité et en force. Dans ce système, certaines enzymes de réparation impliquées dans la GC-NER, la MMR et la BER, seraient couplées en tout temps à des complexes de polymérase [Heddle et Bielas, 2005; Lagerqvist et coll., 2008]. De cette façon, tout le génome serait scanné à chaque ronde de réplication. Appuyant cette hypothèse, les récents résultats obtenus par Auclair et coll. [2008] suggèrent que le complexe protéique de la GC-NER serait situé tout juste devant la fourche de réplication. Par contre, comme ces deux gros complexes protéiques sont tout près l'un de l'autre, il semble que dans certains cas l'étape de polymérisation de la NER ne puisse être complétée avant l'arrivée de la fourche de réplication, ce qui laisserait une lacune de une ou plusieurs bases dans l'ADN, ou encore un BSB à l'ADN [Johansson et coll., 2004]. En fonction de la taille de la lacune, la réparation serait complétée par le système de réparation par recombinaison homologue (HRR) ou par synthèse translésionnelle (TLS) [Zhang et coll., 2002; Thompson et Hinz, 2009]. La présence du complexe protéique FANC activé (par mono-ubiquitination) au site de la lacune augmenterait l'efficacité du système de réparation présent, que ce soit la HRR ou la TLS [Thompson et Hinz, 2009]. Le cas de la HRR sera spécifiquement discuté dans la section 4.4 de la discussion (page 268).

D'autre part, l'efficacité de réparation des adduits BPDE-ADN par le système NER est aussi fonction de leur conformation dans l'ADN. Le diastéréoisomère majeur formé dans le lymphocyte est le (+)-*anti*-BPDE, représentant environ 85 % de tous les diastéréoisomères de BPDE produits, suivi par le (+)-*syn*-BPDE [Okano et coll., 1979]. Dans les cellules bronchoalvéolaires H358 et les cellules mammaires MCF-7, l'adduit formé entre le (+)-*anti*-BPDE et l'ADN se forme majoritairement en *trans* avec une guanine (à 95 %), alors que le (+)-*syn*-BPDE génère autant des adduits *cis* que *trans* avec la guanine [Melendez-Colon et coll., 2000; Ruan et coll., 2007]. Ces adduits ne sont pas tous aussi efficacement

réparés par la NER. Or, les adduits *trans*-(±)-*anti*-BPDE-dG sont les adduits les moins efficacement réparés de tous les adduits *trans*, dans un système *in vitro* de réparation de l'ADN, où les extraits cellulaires proviennent d'une lignée lymphoblastoïde établie à partir des cellules sanguines d'un donneur sain [Custer et coll., 1999]. Si les adduits majoritairement formés dans les lymphocytes humains sont les mêmes que dans les cellules bronchoalvéolaires, et s'ils sont effectivement moins efficacement réparés par la NER, il est alors possible que ces adduits soient ceux qui demeurent le plus longtemps dans l'ADN et qu'ils soient ceux qui persistent après plusieurs rondes de réplication de l'ADN, expliquant que plus de 72 h après l'exposition aiguë au BaP de cellules en réplication active, il reste encore 1 à 3 % d'adduits présents [Lloyd et Hanawalt, 2000].

Comme la cinétique de formation et de réparation des adduits BPDE-ADN n'a jamais été évaluée dans le lymphocyte humain, il est difficile de déterminer lequel de ces deux processus est prédominant. Par contre, cette cinétique a été réalisée dans les cellules HepG2 exposées à 2 µg/mL de BaP durant 24 h [Tarantini et coll., 2009]. Une augmentation significative des adduits BPDE-ADN est détectée 8 h après l'ajout du BaP dans ces cellules en culture. Le niveau d'adduits est maximal après 14 h et reste constant jusqu'à la mesure suivante, effectuée 10 h plus tard. Ce plateau indique un équilibre entre la métabolisation du BaP en BPDE, la formation des adduits BPDE-ADN et leur réparation. Quant à la cinétique post-exposition, elle a été évaluée dans des cellules HepG2 et HaCat qui sont reconnus, respectivement, comme des métaboliseurs rapides et lents du BaP [Marie et coll., 2008]. Suite à l'exposition de cellules HepG2 à 2,5 µg/mL de BaP pour 24 h et au lavage des cellules, le niveau maximum d'adduits est atteint à environ 4 h post-exposition, puis il décroît rapidement de façon qu'à 24 h post-exposition, 50 % des adduits aient été réparés. Ceci indiquerait que la métabolisation du BaP en BPDE est très rapide dans les cellules HepG2, tel que suggéré par Marie et coll. [2008], ou encore que la réparation des adduits s'accélère alors que le taux de formation de BPDE reste constant. Concernant la mesure des adduits présents dans les cellules HaCat suite à l'exposition à 50 µg/mL de BaP pour 24 h, les résultats obtenus suggèrent un effet de réservoir [Marie et coll. 2008]. De fait, le niveau d'adduits mesuré dans ces cellules augmente d'environ 5 fois durant les 48 h post-exposition qui ont été étudiées, démontrant que la cadence de production d'adduits excède leur réparation. Une des critiques majeures de cette étude réside dans le fait que des

concentrations très différentes de BaP ont été utilisées dans ces deux types cellulaires. En effet, les cellules HaCat doivent être exposées à 20 fois plus de BaP que les cellules HepG2, de façon à ce qu'elles produisent suffisamment d'adduits pour atteindre un niveau détectable avec la technique utilisée (spectrométrie de masse) [Marie et coll., 2008]. Les concentrations très élevées de BaP utilisées pour exposer les cellules HaCat sont peut-être à l'origine de cet effet de réservoir, effet qui aurait peut-être été visible dans les cellules HepG2 si des concentrations aussi élevées avaient été utilisées. Ceci est suggéré par une étude effectuée avec des cellules hépatiques de rat, où l'utilisation de faibles concentrations de BaP permet l'atteinte d'un état d'équilibre entre l'entrée de BaP et le métabolisme. En effet, suite à l'ajout de 2,5 µg/mL de BaP dans le milieu de culture, le BaP se répartit rapidement dans les toutes membranes cellulaires, tel qu'observé en microscopie confocale [Barhoumi et coll., 2000]. Cette distribution est complétée en quatre heures environ, puis reste stable durant les 16 heures d'observation rapportées. Concernant l'activité de Cyp1a1, elle est significativement augmentée trois heures après l'ajout du BaP dans ces cellules et est maximale après 16 h, suggérant que le taux d'entrée de BaP, la distribution membranaire et le métabolisme sont alors en équilibre [Barhoumi et coll., 2000]. Il est raisonnable de supposer qu'une concentration de BaP de plusieurs fois supérieure, ou encore qu'une capacité métabolique limitée vienne briser cet équilibre et entraîne une accumulation plus importante de BaP dans les membranes cellulaires, qui servirait de réservoir plusieurs heures après la fin de l'exposition.

Concernant le lymphocyte humain, les études antérieures mesurant les adduits à l'ADN suggèrent que le métabolisme du BaP est efficace, autant dans sa capacité à le biotransformer en de multiples métabolites, que dans sa capacité à générer du BPDE qui formera des adduits détectables à l'ADN. En effet, lorsque du BaP radioactif (0,0025 µg/mL) est ajouté à des lymphocytes/monocytes en culture ayant préalablement été induits par le benz-a-anthracène, un grand nombre de métabolites du BaP est retrouvé : BaP-7,8-diol, BaP-4,5-diol, (+)-*anti*-BPDE, (+)-*syn*-BPDE, (-)-*anti*-BPDE, BaP-1,6-dione, BaP-3,6-dione, BaP-6,12-dione, 3-OH-BaP, etc. [Okano et coll., 1979]. Cette grande variété de métabolites du BaP ont également été retrouvés dans une autre étude où les lymphocytes de 37 sujets ont été exposés durant 51 h à 0,25 µg/mL de BaP [Thompson et coll., 1989]. Des

métabolites glucurono- et sulfoconjugués ont également été retrouvés dans cette étude, démontrant que la détoxification est fonctionnelle. Finalement, dans l'étude de Wiencke et coll. [1990] effectuée avec deux donneurs, l'exposition durant 51 h des lymphocytes à des concentrations de BaP variant entre 0,0025 et 1,25 µg/mL montre que le nombre d'adduits augmente linéairement avec la concentration de BaP jusqu'à [BaP] = 0,125 µg/mL, puis que le taux de formation diminue aux concentrations plus élevées.

Dans notre étude, nous observons que le taux de production d'adduits diminue aux deux dernières concentrations testées, ce qui suggère une diminution de la formation du BPDE, possiblement au profit d'autres métabolites et/ou d'une réparation accrue des adduits. À la lumière de ces faits, nous croyons qu'avec la méthodologie employée dans notre étude (exposition des cellules de nos sujets durant 24 h, suivie d'une période post-exposition de 24 h) et les faibles concentrations de BaP utilisées (0,1 – 1 – 5 µg/mL), le niveau d'adduits BPDE-ADN retrouvé chez nos sujets reflète autant la capacité métabolique des lymphocytes que la capacité de réparation de l'ADN de chacun d'entre eux.

4.3. Les bris simple-brin à l'ADN

L'analyse des bris simple-brin (BSB) à l'ADN dans notre étude a été effectuée au niveau individuel et pour l'ensemble du groupe. Diverses réponses génotoxiques ont été observées alors que cinq des dix sujets analysés présentent une augmentation significative des BSB à [BaP] = 1 µg/mL par rapport au contrôle (sujets F1, F5, M1, M4 et M11 – $p < 0,05$), alors que deux autres montrent une diminution significative à cette concentration (sujets F4 et F12 – $p < 0,001$) (Article 2, Tableau III, page 208). Finalement, les trois autres sujets ne présentent aucune variation significative des BSB à l'ADN, suite à l'exposition à cette concentration de BaP (sujets F11, M2 et M3). L'analyse du groupe montre par ailleurs qu'il n'y a pas d'augmentation significative des BSB à l'ADN à toutes les concentrations de BaP testées (Article 2, Tableau II, page 207). Dans la littérature, aucune étude n'a évalué la production de BSB à l'ADN, suite à une exposition au BaP. Une technique, l'essai COMET, s'approche sensiblement de celle que nous avons utilisée et permet d'évaluer plusieurs dommages à l'ADN (sites abasiques, BSB, bris double-brin (BDB) à l'ADN et 8-

OH-dG, tous confondus) présents dans les noyaux des cellules analysées. Nos résultats sont donc comparés à ceux obtenus avec cette technique.

Les deux seules études ayant effectué l'essai COMET sur des lymphocytes humains exposés *in vitro* au BaP ont rapporté des résultats négatifs [Frenzilli et coll., 2000; Kleinsasser et coll., 2000], probablement parce que les lymphocytes utilisés étaient quiescents, donc incapables de métaboliser le BaP [Holz et coll., 1991], quoique les temps d'exposition choisis (60 min et 4 h) étaient très courts. Par ailleurs, l'utilisation de types cellulaires différents montre une augmentation significative des dommages à l'ADN dans les cellules HepG2, après quatre heures d'exposition à 2 µg/mL de BaP [Tarantini et coll., 2009]. Ces auteurs suggèrent que le stress oxydatif contribuerait de façon significative à la production des dommages à l'ADN détectés par l'essai COMET. L'utilisation de cellules bronchiques 16BHE montre également une augmentation significative et linéaire des dommages à l'ADN suite à l'exposition durant 24 h à des concentrations de BaP variant entre 0,25 et 7,5 µg/mL [Tao et coll., 2009]. Ces auteurs ont également évalué la réparation des dommages post-exposition et pour les concentrations de BaP égales ou inférieures à 1,25 µg/mL, il n'y avait plus de différence significative avec le contrôle négatif, démontrant une réparation complète des dommages induits par le BaP. Aux concentrations plus élevées étudiées, la majorité des dommages étaient réparés après 24 h. Par ailleurs, la réparation rapide des 8-OH-dG, qui peuvent aussi être détectées avec l'essai COMET, est suggérée par l'étude de Marie-Desvergne et coll. [2010] qui observent une production significative de la 8-OH-dG chez le rat, deux, huit et seize heures après une injection intraveineuse de 40 µM/kg de BaP, alors que cette base oxydée n'est pas détectée dans le cas des temps post-exposition plus longs. Par ailleurs, l'étude de Tao et coll. [2009] a démontré l'importante contribution de la BER dans la réparation des dommages causés par le BaP. En effet, en utilisant une lignée 16BHE transfectée avec l'ARNsh ciblant le gène *PARP1* (causant une réduction très importante de l'ARNm de *PARP1*), la BER a été considérablement réduite, ce qui entraînait une augmentation importante des dommages détectés par l'essai COMET. De fait, Parp1 serait un senseur des BSB et un acteur majeur dans leur réparation par la BER [Thompson et Hinz, 2009].

Comme la BER répare principalement les bases endommagées, les sites abasiques et les BSB à l'ADN, l'hypothèse d'une contribution significative du stress oxydatif dans la génotoxicité du BaP s'en trouve renforcée. En effet, la voie métabolique du BPDE, qui implique la formation d'adduits BPDE-ADN, ne produit pas de dommages à l'ADN détectables par l'essai COMET, dans des cellules de carcinome pulmonaire exposées au BPDE [Mattsson et coll., 2009]. Ceci expliquerait l'observation de Johansson et coll. [2004] qui rapportent que l'exposition de cellules CHO à 2 μ M de BPDE, n'entraîne pas une production significative de BDB à l'ADN, deux, six ou même 24 heures après l'exposition. L'analyse des voies métaboliques impliquées dans la biotransformation du BaP suggère fortement que les quinones seraient responsables du stress oxydatif, à tout le moins dans les cellules hépatiques [Flowers-Geary et coll., 1993]. Ce stress oxydatif serait responsable de la formation des bases oxydées 8-OH-dG qui sont réparées par la BER [Friedberg et coll., 2006]. D'ailleurs, dans les cellules bronchoalvéolaires humaines H358, un traitement avec la BaP-7,8-dione a produit une augmentation significative des 8-OH-dG [Mangal et coll., 2009]. Dans ces cellules, la détoxification de la BaP-7,8-dione se ferait suite à sa transformation en BaP-7,8-catéchol, puis l'ajout d'un groupement méthyle par l'enzyme Comt irait briser le cycle d'oxydoréduction. Cette voie de détoxification a été mise en évidence par l'utilisation d'un inhibiteur de la Comt qui a entraîné une augmentation des 8-OH-dG induites par la BaP-7,8-dione [Mangal et coll., 2009]. Ces recherches lient clairement le cycle d'oxydoréduction des quinones à la production de 8-OH-dG, qui produiront des dommages à l'ADN détectables par l'essai COMET. Ces 8-OH-dG seront réparées par la BER à toutes les phases du cycle cellulaire, incluant la phase S. En effet, le couplage de la BER avec la fourche de réplication a été suggéré [Heddle et Bielas, 2005], puisque la réplication de l'ADN dont la matrice comporte un 8-OH-dG entraîne l'insertion d'une base incorrecte, créant un mésappariement [van Loon et coll., 2010]. Par ailleurs, la BER serait également couplée à la transcription, par interaction avec les protéines Csa et Csb, qui sont les senseurs classiques de la TC-NER. Ceci ouvrirait la voie à un élargissement des fonctions de ces protéines qui, en fait, favoriseraient la réparation des bases anormales avant la transcription, que ce soit par NER ou par BER [Braithwaite et coll., 1998; van Loon et coll., 2010].

En résumé, quoique nos résultats ne montrent, dans l'ensemble, aucune augmentation des BSB, pouvant être due au petit nombre de sujets analysés, notre étude met surtout en évidence une variété de réponses génotoxiques, lorsqu'évaluée avec l'essai EM-ISEL. Ceci suggère l'existence d'une induction du métabolisme oxydatif du BaP et donc de la production de quinones, qui diffèrerait entre les individus et que nous avons pu mettre en évidence avec la technique que nous avons employée. Cette observation est appuyée par Mattsson et coll. [2009] qui ont observé une hétérogénéité cellulaire dans l'induction de foci contenant le marqueur de dommages à l'ADN γ H2AX (histone H2AX phosphorylée), apparaissant dans des cellules de carcinome pulmonaire, en réponse à une exposition de 3 h à 0,01 μ M de BPDE. En effet, certaines cellules contiennent des foci γ H2AX, alors que d'autres n'en contiennent pas, suggérant que l'absorption intracellulaire du BPDE est variable.

4.4. Les échanges entre chromatides-sœurs et la réparation par recombinaison homologue

Dans notre étude, une relation dose-réponse linéaire a été retrouvée pour les deux indicateurs du test des échanges entre chromatides-sœurs (ÉCS) retenus, soit la moyenne des ÉCS et le % de CHF. D'ailleurs, les coefficients de détermination des régressions de Pearson confirment cette linéarité : $r = 0,64$ pour la moyenne des ÉCS ($p < 0,0001$) et $r = 0,66$ pour le % de CHF ($p < 0,0001$) (Article 2, Tableau IV, page 210). Alors que les autres biomarqueurs mesurés dans cette étude montrent une diminution significative aux plus hautes concentrations de BaP testées, l'augmentation de la moyenne des ÉCS est visible à toutes les concentrations de BaP dans notre étude. D'ailleurs, Hatzi et coll. [2011] rapportent une augmentation de la moyenne des ÉCS même à des concentrations de BaP plus élevées que celles que nous avons utilisées (25 et 250 μ g/mL de BaP). Comme les ÉCS sont produits lors de la réparation par recombinaison homologue (HRR) suite à la résolution de la jonction de Holliday (**Figure 22**, page 94), leur production toujours plus importante avec l'exposition à des doses croissantes de BaP suggère une sollicitation considérable de ce système de réparation lors de la réplication de l'ADN (phase S), en

raison de la présence de lésions qui n'auront pas été réparées lors des phases précédentes du cycle cellulaire ou qui auront été nouvellement produites.

Ceci doit être mis en perspective avec certains aspects techniques entourant la mise en évidence des ÉCS. En effet, les ÉCS analysés en génération F2 (voir **Figure 15**, page 73) se sont produits lors de la première phase de synthèse de l'ADN en présence de BrdU [Sénécal-Quevillon, 1985], soit dans les premières heures suivant la fin de l'exposition de 24 h au BaP. Durant ces 24 h d'exposition, un à deux tours de cycle cellulaire ont pu être initiés, durant lesquels le BaP est métabolisé en BPDE et en divers autres métabolites, générant également des ERO. Ces métabolites et ERO peuvent produire différents types d'adduits et de dommages à l'ADN, comme les adduits BPDE-ADN, les bases oxydées (8-OH-dG) et les bris à l'ADN (simple-brin ou double-brin) et causer des arrêts de la fourche de réplication (AFR) [Andreassen et coll., 2006]. Ce sont donc les lésions présentes (non réparées) lors de la première phase S en présence de BrdU qui seront à l'origine des ÉCS analysés dans les cellules de génération F2 (**Figure 26**, page 270).

Cependant, quels sont les meilleurs inducteurs de ce système de réparation? Tout d'abord, la HRR est activée lors des AFR, dont deux sous-types sont distingués [Saleh-Gohari et coll., 2005]. Le premier sous-type se caractérise par un arrêt du complexe réplicatif en présence d'un BDB dans l'ADN matrice. Les fourches arrêtées (appelées en anglais *stalled replication forks*) vont régresser pour permettre la mise en place de la HRR et vont conduire majoritairement à un événement de conversion génique dit «de courte distance» (*short track*), dans 85 % des cas. Le second sous-type entraîne un effondrement de la fourche de réplication (appelées *collapsed replication forks*) lorsqu'un BSB à l'ADN est converti en BDB suite au passage de la fourche. Il entraîne la formation d'un événement de conversion génique dit «de longue distance» (*long track*) ou encore la formation d'un ÉCS, ces deux événements représentent 78 % des événements de HRR qui originent d'un BSB à l'ADN. La proportion exacte des événements de conversion génique, en comparaison avec la formation des ÉCS semble dépendre du type cellulaire étudié. Ainsi, l'analyse moléculaire des événements de recombinaison homologe chez la levure a permis de déterminer qu'entre 0 et 20 % de ceux-ci seraient associés à de la recombinaison entre les chromosomes homologues [Paques et Haber, 1999], résultant en la production d'un ÉCS. Dans les cellules de mammifères (hamster chinois), des proportions semblables,

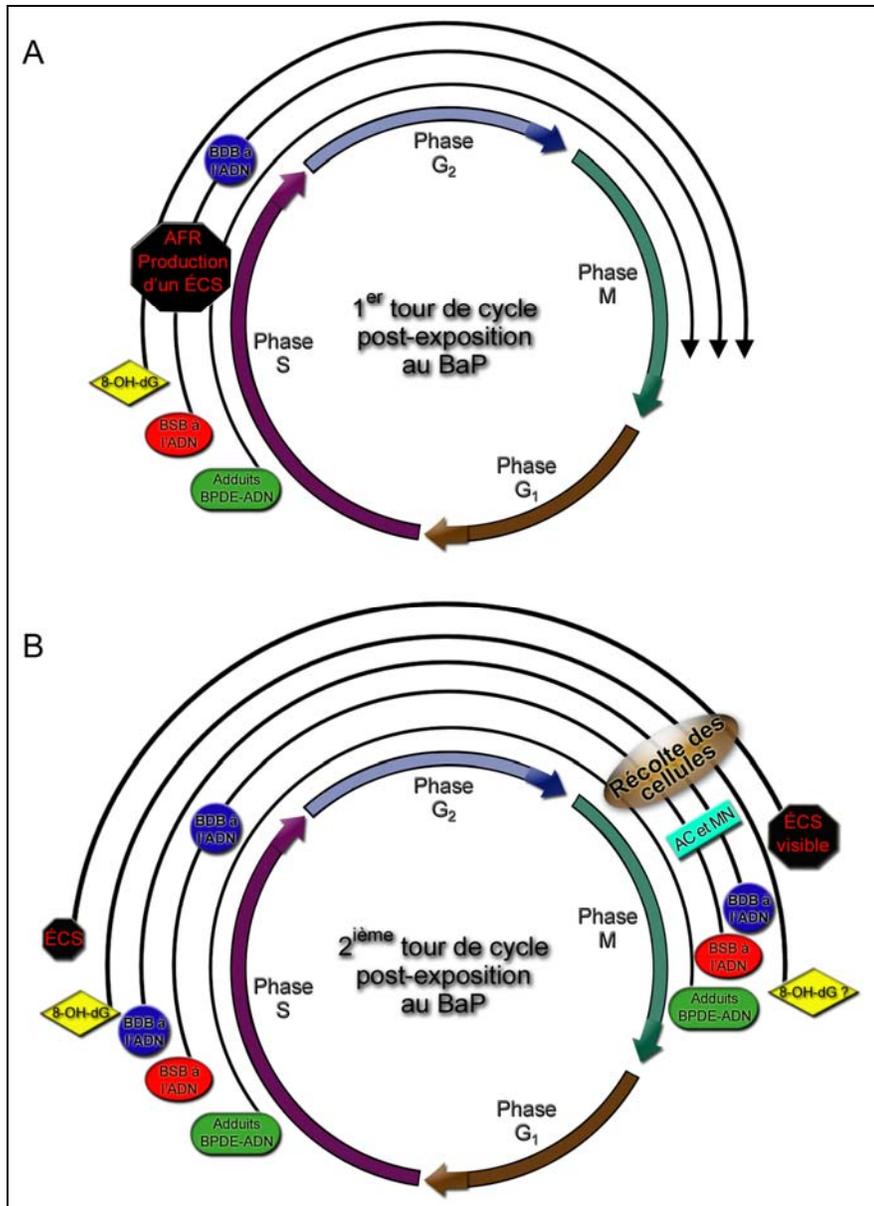


Figure 26: Devenir des lésions non réparées présentes dans le lymphocyte, en fonction des tours de cycle cellulaire post-exposition au BaP. A) Lors du premier tour post-exposition, les adduits BPDE-ADN, les BSB à l'ADN et les 8-OH-dG peuvent entraîner un arrêt de la fourche de réplication (AFR) et causer un ÉCS. Les BSB à l'ADN peuvent être convertis en BDB. B) C'est lors du deuxième tour post-exposition que la majorité des cellules sont récoltées. Les ÉCS produits lors du premier tour post-exposition deviennent visibles. Les BSB et BDB causent des AC et des MN, ou demeurent tels quels. Les adduits BPDE-ADN non réparés sont mesurés par CIA. Des 8-OH-dG pourraient être encore présents.

quoique se rapprochant de la barre inférieure, ont été retrouvées : 1/11 évènements (9 %) [Nagaraju et coll., 2006] et moins de 1/29 évènements ($> 3\%$) [Johnson et Jasin, 2000] sont des ÉCS. La proportion d'ÉCS produits pourrait également dépendre du type d'AFR produit. Dans des cellules de hamster chinois, des évènements de HRR spontanés (sans exposition) ont été comparés avec ceux produits par trois mécanismes différents : des bris double-brin à l'ADN induits par l'enzyme de restriction *SceI*, un déséquilibre du pool nucléotidique par ajout massif de thymidine et des bris simple-brin à l'ADN induits par la camptothécine [Saleh-Gohari et coll., 2005]. Les auteurs ont donc pu démontrer que dans la majorité des cas, les fourches effondrées étaient à l'origine des évènements de HRR et seraient causées par la production de BSB à l'ADN.

La présence de bris simple-brin à l'ADN serait donc un inducteur naturel de la HRR. Par contre, les adduits à l'ADN n'ayant pas été réparés par la NER induisent également l'activation de la HRR, suite au blocage de la fourche de réplication [Thompson et Hinz, 2009]. Cette observation est appuyée par le fait que la lignée de hamster chinois UV4 ayant un défaut dans la NER présente significativement plus d'ÉCS que la lignée parentale, suite à une exposition de 24 h à 2 μM de BPDE [Natarajan et Palitti, 2008]. De plus, tel que mentionné précédemment, lorsque la NER n'est pas complétée avant l'arrivée de la fourche de réplication, la présence d'une lacune de quelques paires de bases peut aussi induire la HRR [Johansson et coll., 2004]. Finalement, lorsque la réplication doit se poursuivre malgré la présence d'un adduit (8-OH-dG ou adduit BPDE-ADN), la synthèse translésionnelle sera activée, puis complétée par la HRR [Andreassen et coll., 2006]. La poursuite de la réplication empêchera qu'un arrêt en phase S se prolonge, ce qui pourrait éventuellement mener à une duplication excessive des centrosomes, tel qu'observé par Shinmura et coll. [2008], dans des cellules de carcinome pulmonaire exposées à 0,6 μM de BPDE durant 5 à 72 h. Il y a cependant un hic : cette synthèse translésionnelle permet de poursuivre la réplication de l'ADN, mais la lésion originale n'est pas retirée [Lagerqvist et coll., 2008]. Elle sera donc encore présente lors du prochain tour de cycle cellulaire, ce qui est à la base du phénomène de persistance des dommages à l'ADN qui explique, entre

autres, que des adduits BPDE-ADN ne soient toujours pas réparés 48 h après une exposition au BPDE ou au BaP [Lloyd et Hanawalt, 2000; Marie et coll., 2008].

Par l'étude des corrélations entre les biomarqueurs effectuée, nous pouvons appuyer l'implication des adduits BPDE-ADN et des BSB dans la formation des ÉCS et des CHF observés dans notre étude. En effet, l'utilisation de la régression linéaire multiple (modèles présentés en Annexe II, page xli) identifie l'exposition au BaP et les adduits BPDE-ADN comme facteurs influençant significativement la variation observée lors de la mesure du % de CHF chez nos sujets (53 % de la variation expliquée, $p < 0,0001$). Quant à la variation observée dans la moyenne des ÉCS, la régression linéaire multiple identifie l'exposition au BaP comme seul facteur explicatif significatif (Annexe IV, page xli; 41 % de la variation expliquée, $p < 0,0001$). Par ailleurs, le % de CHF est le seul facteur expliquant significativement une proportion de la variation retrouvée dans la mesure de la fréquence des AC et la fréquence des MN (34 % - $p = 0,001$ et 12 % - $p = 0,028$; respectivement). Ces corrélations entre les biomarqueurs mesurés dans notre étude ciblent donc les adduits BPDE-ADN, ainsi que les lésions à la base de la formation des AC et des MN, comme contribuant significativement à la formation des ÉCS. Par contre, d'autres facteurs non identifiés dans notre étude et reliés à l'exposition au BaP, contribuent à la formation des ÉCS dans les lymphocytes humains. Tel qu'illustré par les éléments de la littérature discutés précédemment, les 8-OH-dG pourraient fort probablement en faire partie.

4.5. Les aberrations chromosomiques et les micronoyaux : effets clastogènes et aneugènes

4.5.1. LES EFFETS CLASTOGÈNES DU BAP

Les résultats rapportés dans notre étude montrent que l'exposition des lymphocytes à diverses concentrations de BaP entraîne une augmentation significative des aberrations chromosomiques (AC) chez nos sujets (Article 1, Tableau II, page 164), majoritairement

visibles sous formes de lacunes et de cassures chromatidiennes, quoique des cassures chromosomiques et des aberrations complexes soient également présentes (Article 1, Tableau supplémentaire VI, page 172). Ces résultats concordent avec la littérature et avec la classification du BaP comme agent clastogène S-dépendant [Bender et coll., 1974]. Ainsi, l'exposition de lymphocytes humains à [BaP] = 1,25 µg/mL pour 24 ou 48 h mène à une augmentation significative des lacunes et des cassures chromatidiennes et chromosomiques, dans une étude effectuée chez 31 sujets non-fumeurs strictement sélectionnés pour éviter l'exposition à des mutagènes connus [Guven et coll., 2006]. Par ailleurs, sensiblement le même profil d'AC est observé dans des lymphocytes humains ou des cellules de hamster chinois exposés au BPDE [Wu et coll., 2002; Natarajan et Palitti, 2008], ainsi que chez des travailleurs exposés aux HAP [Bender et coll., 1988; al-Sabti et coll., 1992; Kalina et coll., 1998; Donbak et coll., 2005; Celik et coll., 2007], avec une prépondérance de lacunes et/ou de cassures chromatidiennes.

Le profil d'AC obtenu après l'exposition au BaP, tel qu'observé dans notre étude et dans la littérature, est compatible avec la formation majoritaire de BSB, plutôt que de BDB à l'ADN. En effet, une prépondérance de cassures chromatidiennes est associée à la formation de BSB à l'ADN qui sont ultérieurement convertis en BDB lors du passage de la fourche de réplication durant la phase S [Obe et Durante, 2010]. D'ailleurs, Natarajan et coll. [1980] ont démontré que la conversion des BSB produits par une endonucléase, en BDB à l'ADN, entraîne la formation d'AC. Ces BDB à l'ADN ont été reconnus plus tard comme étant les lésions ultimement responsables de la formation des AC [Obe et coll., 1992]. Toutefois, la présence de cassures chromosomiques causées par l'exposition au BaP suggère que des BDB à l'ADN seraient présents durant la phase G1 dans certaines cellules [Obe et Durante, 2010]. Puisque des BDB à l'ADN ne sont pas formés de façon significative lors d'une exposition au BaP [Johansson et coll., 2004], comment expliquer la présence de ce type d'AC? Comme des BSB à l'ADN situés à quelques bases l'un de l'autre sont reconnus comme des BDB par les systèmes de réparation [Lieber et coll., 2006], il est plausible d'associer la formation des cassures chromosomiques à la présence de BSB spatialement regroupés [Obe et Durante, 2010]. Par ailleurs, ce regroupement de BSB est également associé à la formation d'aberrations chromosomiques complexes, qui ont été retrouvées à quelques reprises chez certains sujets de notre étude (Article 1, Tableau

supplémentaire VI, page 172). Ces aberrations complexes sont produites lors d'erreurs de recollage du système de réparation NHEJ en phase G1 [Delacôte et Lopez, 2008]. Ces erreurs de recollage s'expliqueraient par les mouvements de la chromatine qui doit être décondensée pour effectuer la réparation, de même que par le fait que les domaines occupés par les différents chromosomes s'entrelacent [Johnson et Jasin, 2000; Falk et coll., 2007; Trinkle-Mulcahy et Lamond, 2008]. Comme la majorité des événements de réparation par NHEJ conserve intacte la séquence initiale de l'ADN [Lieber et coll., 2010] et que le BaP ne produit pas de façon habituelle des BSB regroupés (à l'inverse des radiations ionisantes [Obe et Durante, 2010]), cela explique la faible fréquence de cassures chromosomiques et d'aberrations complexes retrouvées dans notre étude.

En ce qui a trait aux micronoyaux (MN), une augmentation significative de leur fréquence est également observée dans notre cohorte (Article 1, Tableau I, page 163). Ceci concorde avec la classification du BaP comme agent clastogène, classification établie sur la base d'une induction significative de MN et d'AC dans divers types de cellules de mammifères [Miller et coll., 1998; Corvi et coll., 2008]. Par ailleurs, comme la formation de fragments chromosomiques acentriques (ne contenant pas de centromère) contribue à la formation de MN, cela explique le lien causal existant entre les deux [Norppa et coll., 2006; Bonassi et coll., 2007] et que nous avons mis en évidence lors de l'étude des corrélations existant entre les biomarqueurs de notre étude (Article 2, Tableau IV, page 210).

4.5.2. LES EFFETS ANEUGÈNES DU BAP

L'étude des AC et des MN permet également de mettre en évidence les effets aneugènes des composés chimiques. En effet, lorsqu'un composé cause une augmentation de la production de MN à faible concentration et celle d'AC à des concentrations nettement plus élevées (incluant de la polyploïdie), alors des propriétés aneugéniques sont assignées à ce composé [Miller et coll., 1998; Elhajouji et coll., 2011]. Ce type de situation est observé dans le cas d'aneugènes purs, tels que la colchicine, la vincristine ou encore l'acrylamide [Aardema et coll., 1998; Miller et coll., 1998]. Par contre, lorsqu'une exposition complexe

doit être caractérisée ou que les effets observés ne permettent pas une démarcation aussi nette entre les effets clastogènes et aneugènes, l'étude du contenu des MN par la FISH avec une sonde pancentromérique ou un anticorps dirigé contre les kinétochores (protéines assemblées au site d'un centromère actif) apporte des informations supplémentaires [Norppa et Falck, 2003]. Ainsi, les composés clastogènes produisent des MN ne contenant majoritairement pas de signal centromérique (MN C-), alors que les aneugènes produisent surtout des MN comportant un ou plusieurs centromères (MN C+).

C'est dans cette optique que nous avons investigué le contenu des MN produits suite à l'exposition au BaP, en utilisant une sonde pancentromérique. Lors de notre étude, la séparation classique des MN en deux classes (MN C- et MN C+) [Kirsch-Volders et coll., 2002; Norppa et Falck, 2003] ne montre pas d'augmentation des MN C- suite à l'exposition à [BaP] = 5 µg/mL, même si nos résultats précédents sur les AC indiquaient que le BaP était clastogène pour les lymphocytes humains. Nous retrouvons plutôt une augmentation significative du pourcentage de MN C+ dans les MN produits suite à l'exposition au BaP (77,1 % comparativement à 68,5 % pour la condition contrôle – Article 1, Tableau III, page 166). Les MN C+ ont été par la suite subdivisés en MN contenant un ou deux signaux centromériques (MN C₁₋₂+) et MN contenant trois signaux centromériques ou plus (MN C₃₊), tel que suggéré par Kirsch-Volders et coll. [2002] et appliqué pour la première fois par Iarmarcovai et coll. [2007a]. Cette distinction additionnelle montre dans notre étude que les MN produits par le BaP contiennent majoritairement trois centromères ou plus (78,3 % comparativement à 66,5 % pour la condition contrôle – Article 1, Tableau III, page 166) et que cette différence est statistiquement significative. Voulant confirmer ces résultats, nous avons adopté une approche différente de ce qui a été décrit dans la littérature. Étant donné que le nombre précis de signaux centromériques est noté pour chacun des MN analysés par FISH, les MN observés dans chacune des deux conditions d'exposition ([BaP] = 0 et 5 µg/mL) sont classifiés en catégories de signaux FISH. Les MN sont assignés à une catégorie, en fonction du nombre de signaux présents (voir le Chapitre 3 – Matériel et méthodes, section 5.2.2, page 132). Cette approche de catégorisation de signaux FISH est couramment utilisée en cytogénétique clinique lors de l'interprétation des résultats obtenus suite à l'hybridation d'un ensemble de sondes pour des échantillons de cellules leucémiques, comme par exemple dans la leucémie lymphoblastique chronique [Zenz et

coll., 2008]. Suite à la catégorisation des MN, la contribution relative de chaque catégorie FISH à la somme de signaux répertoriés est déterminée pour les deux conditions d'exposition. Finalement, la régression linéaire effectuée montre que l'exposition au BaP a entraîné la formation de MN contenant un nombre plus élevé de centromères ($R = 0,67$; $p = 0,0023$ – Annexe IV, page lxxv). De plus, la comparaison statistique des deux droites de régression présentes dans cette figure montre qu'elles sont significativement différentes ($p = 1,5 \times 10^{-6}$).

Les résultats de notre étude ont été comparés à la littérature. En effet, bien que la FISH sur les MN produits par l'exposition au BaP n'ait jamais été réalisée auparavant, ce type d'étude a été effectué sur des MN produits par l'exposition à des composés clastogènes (diépoxybutane) et aneugènes (taxol, paclitaxel, etc.) reconnus (**Tableau VII**, page 278). La comparaison de nos résultats avec ces composés montre que le BaP a également des propriétés aneugènes. En effet, tout comme pour les composés aneugènes connus (**Tableau VII**, page 278), une augmentation du pourcentage des MN C+ et des MN contenant plus d'un centromère (MN C_x+) est observée dans notre étude. Par contre, à la différence de l'alachlor [Mattiuzzo et coll., 2006], notre étude du contenu des MN par la FISH ne met pas en évidence les effets clastogènes du BaP. Ceci est dû à des différences dans l'approche statistique utilisée pour analyser les résultats. En effet, Mattiuzzo et coll. [2006] ont comparé les fréquences de MN C- et MN C+ obtenues dans leur contrôle négatif et les composés évalués, avec un test X^2 (Chi carré). Dans notre étude, nous avons choisi d'effectuer le test z de deux proportions indépendantes, afin que l'augmentation de la fréquence des MN induits par le BaP ne vienne pas biaiser les résultats. Nous croyons que cette approche permet une meilleure évaluation du mode d'action d'un composé.

Des indications appuyant l'idée d'effets aneugènes induits par le BaP sont également venues du test des AC. En effet, lors de la réalisation de ce test, le nombre de chromosomes présents dans les métaphases analysées a également été répertorié. Afin de se conformer à l'OCDE dans la réalisation du test des AC [OECD, 1997] les métaphases considérées comme «normales» comportent 46 ± 2 chromosomes. Les métaphases aneuploïdes comportent donc moins de 44 chromosomes ou plus de 48 chromosomes. Ainsi

classifiées, nos données montrent que l'exposition au BaP entraîne une augmentation significative des métaphases aneuploïdes (Article 1, Tableau II, page 164), concordant avec l'analyse du contenu des MN par FISH.

Dans la littérature, il n'a jamais été mentionné clairement que le BaP possède des propriétés aneugènes. Cependant, quatre études *in vitro* et une étude *in vivo* ont mis en évidence des effets sur le nombre de chromosomes, le fuseau mitotique, le cytosquelette et les centrosomes liés à l'exposition au BaP ou aux HAP, que nous associons à des effets aneugènes. Ces effets sont décrits pour la première fois en 1997, alors que Matsuoka et coll. observent que les cellules de hamster chinois V79 exposées au BaP durant 24 h présentent des changements caryotypiques : la distribution de chromosomes varie d'un nombre diploïde à tétraploïde. Comme cette lignée cellulaire ne métabolise pas le BaP, les auteurs suggèrent qu'un effet direct sur le cytosquelette pourrait expliquer leurs observations. Les auteurs poursuivent leurs investigations en microscopie confocale et observent des anomalies du fuseau mitotique immédiatement après l'exposition : fuseau incomplet ou anormal et chromosomes retardataires [Matsuoka et coll., 1998]. De plus, dans les cellules cultivées cinq mois post-exposition, une hyperdiploïdie est présente et certains clones tétraploïdes sont également retrouvés. Par ailleurs, l'exposition durant une heure au BaP d'hémocytes prélevés sur des moules du genre *Mytilus* a perturbé le cytosquelette de ces cellules : réduction ou disparition des filipodes, désorganisation des fibres de stress et formation d'agrégats d'actine [Gomez-Mendikute et coll., 2002]. Une augmentation des ERO a également été notée dans ces hémocytes, suggérant que les perturbations observées pourraient être causées par ces ERO. Plus récemment, l'exposition au BPDE d'une lignée de carcinome pulmonaire déficiente en p53 a entraîné une duplication excessive des centrosomes et subséquemment une instabilité chromosomique [Shinmura et coll., 2008]. L'expression forcée du gène *POLK* dans ces cellules a levé le blocage en phase S induit par le BPDE, suggérant un rôle important de la TLS dans la progression de la phase S en présence d'adduits BPDE-ADN non réparés. Finalement, une augmentation significative des cellules polyploïdes a été observée dans une cohorte de travailleurs transportant des cendres de charbon dans une usine productrice d'électricité [Celik et coll., 2007].

Ensemble, les observations de ces auteurs couplées à nos résultats suggèrent que le BaP a des effets sur le cytosquelette, composé d'actine et sur le fuseau mitotique, composé de tubuline. Une analyse par protéomique réalisée sur des cellules MCF-7 traitées durant 24 heures avec du BaP, appuie ces observations [Hooven et Baird, 2008]. En effet, une augmentation du niveau d'actine cytoplasmique 1et de la chaîne α -1c de la tubuline a été

Tableau VII: Aperçu des applications de la FISH (sonde pancentromérique) ou du marquage anti-kinétochore sur micronoyaux, avec des composés aneugènes et clastogènes connus ou des composés en cours d'évaluation. Le pourcentage de MN sans signal centromérique (MN C-), comportant un ou des signaux centromériques (MN C+) et comportant plus d'un signal centromérique (MN C_x+) retrouvé dans un groupe de sujets contrôles (non exposés, en bonne santé) est indiqué.

Étude	Composé	Caractéristique	MN C-	MN C+	MN C _x +
Iarmarcovai et coll. 2007a	--	Sujets contrôles	35- 50 %	50- 65 %	50- 70 % des MN C+
Digue et coll. 2006	Paclitaxel	Aneugène connu	Dim.	Augm.	Augm.
Mattiuzzo et coll. 2006	Taxol	Aneugène connu	=	Très augm.	nd
Colognato et coll. 2007	Griséofulvine	Aneugène connu	Dim.	Augm.	nd
	Diépoxybutane	Clastogène connu	Très augm.	Augm.	nd
Iarmarcovai et coll. 2007a	Formaldéhyde	Déclaré aneugène	Dim.	Augm.	=
Mattiuzzo et coll. 2006	Alachlor	Déclaré aneugène et clastogène	Augm.	Très augm.	nd
	Dichlorvos	Déclaré aneugène	=	Très augm.	nd
<i>Notre étude (Article 1)</i>	<i>Benzo-a-pyrène</i>	<i>Effets aneugènes</i>	<i>Dim.</i>	<i>Augm.</i>	<i>Augm.</i>

Dim. : Pourcentage diminué en comparaison avec le contrôle négatif.

Augm. : Pourcentage augmenté en comparaison avec le contrôle négatif.

= : Pourcentage inchangé en comparaison avec le contrôle négatif.

nd: analyse non réalisée dans cette étude.

observée de façon concomitante à une diminution de la chaîne β -4 de la tubuline et de la cofiline. Cette dernière joue un rôle important dans le processus de polymérisation/dépolymérisation de l'actine. Les effets observés sur la tubuline et le fuseau mitotique seraient à la base des effets aneugènes du BaP sur les cellules des mammifères, animales ou humaines. Ces effets aneugènes entraînent la survenue d'évènements de malségrégation visibles par des changements dans le nombre de chromosomes (allant de l'aneuploïdie à la polyploïdie), la présence d'une instabilité chromosomique et la formation de MN contenant plusieurs centromères.

4.5.3. LES AUTRES APPLICATIONS DE L'ÉTUDE DU CONTENU DES MN PAR LA FISH

Dans l'introduction, section 5.2.3.1 (page 76), nous avons pu voir que l'étude des MN spontanément formés, en utilisant la technique de caryotypage spectral SKY, a montré qu'un seul chromosome est généralement présent dans le MN [Leach et Jackson-Cook, 2001]. Ce chromosome ou segment de chromosome peut contenir un centromère ou non, tel qu'évalué avec une sonde pancentromérique ou des anticorps anti-kinétochores [Norppa et Falck, 2003]. Toutefois, une question demeure : est-ce que les micronoyaux ayant des centromères comportent essentiellement des chromosomes entiers, ou peuvent-ils contenir des chromosomes ayant perdu une partie de leur bras? Afin de répondre à cette question et de mieux comprendre les mécanismes de formation des MN, plusieurs équipes ont effectué l'hybridation simultanée de sondes pancentromérique et pantélomérique sur des MN.

Une équipe allemande travaillant avec des cellules de souris a donc démontré que les rayonnements induisent majoritairement des fragments chromosomiques contenant un télomère seulement (C_0T_1 – 60 %) ou des fragments interstitiels, sans signaux centromérique et télomérique (C_0T_0 – 22 %), conformément à l'effet clastogène de ce produit [Miller et coll., 1992]. Des résultats semblables sont obtenus par une autre équipe travaillant avec des cellules humaines, où 55% des MN induits par la mitomycine C contiennent seulement des fragments (C_0T_0 et C_0T_1), alors qu'un aneugène, la colchicine, induit principalement des MN contenant des chromosomes (C_nT_n – 75 %) [Jie et Jia, 2001].

Cependant, la réponse à la question primaire n'est toujours pas acquise, puisque le nombre de signaux télomériques présents n'est pas mis en relation avec le nombre de signaux centromériques. Lindberg et coll. [2008] y répondent partiellement, en étudiant la formation spontanée de MN dans les lymphocytes humains. Ainsi, le contenu des MN est aussi diversifié qu'on aurait pu l'imaginer, avec des MN contenant une ou deux chromatides, complètes ou non, des fragments centriques et acentriques contenant une ou deux chromatides et des MN contenant plus de deux chromatides ou fragments. Un des désavantages de cette technique est que les résultats obtenus sont très difficiles à interpréter lorsque le MN contient un grand nombre de signaux centromériques et télomériques (plus de six signaux par sonde), comme dans le cas de MN induits par des aneugènes.

Une dernière application très intéressante de la FISH sur les MN est reliée au mécanisme de malségrégation chromosomique. La malségrégation des chromosomes peut se faire par non-disjonction des chromatides lors de la mitose, ou encore par une ségrégation non-équitable du matériel génétique entre les deux cellule-filles. Cette distinction peut se faire à l'aide de sondes reconnaissant un centromère précis. Ainsi, une à trois sondes reconnaissant des centromères spécifiques sont hybridées et l'analyse est effectuée sur des cellules binucléées contenant, ou non, des MN. Différents patrons d'hybridation sont possibles, en fonction du nombre de signaux présents dans chaque noyau et dans le MN, permettant d'évaluer la non-disjonction et la ségrégation non-équitable (**Figure 27**, page 281). L'évaluation du mécanisme de malségrégation induit par l'exposition de lymphocytes humains au 1,2,4-benzène-triol a permis de constater que le phénomène prépondérant est la ségrégation non-équitable [Chung et coll., 2002].

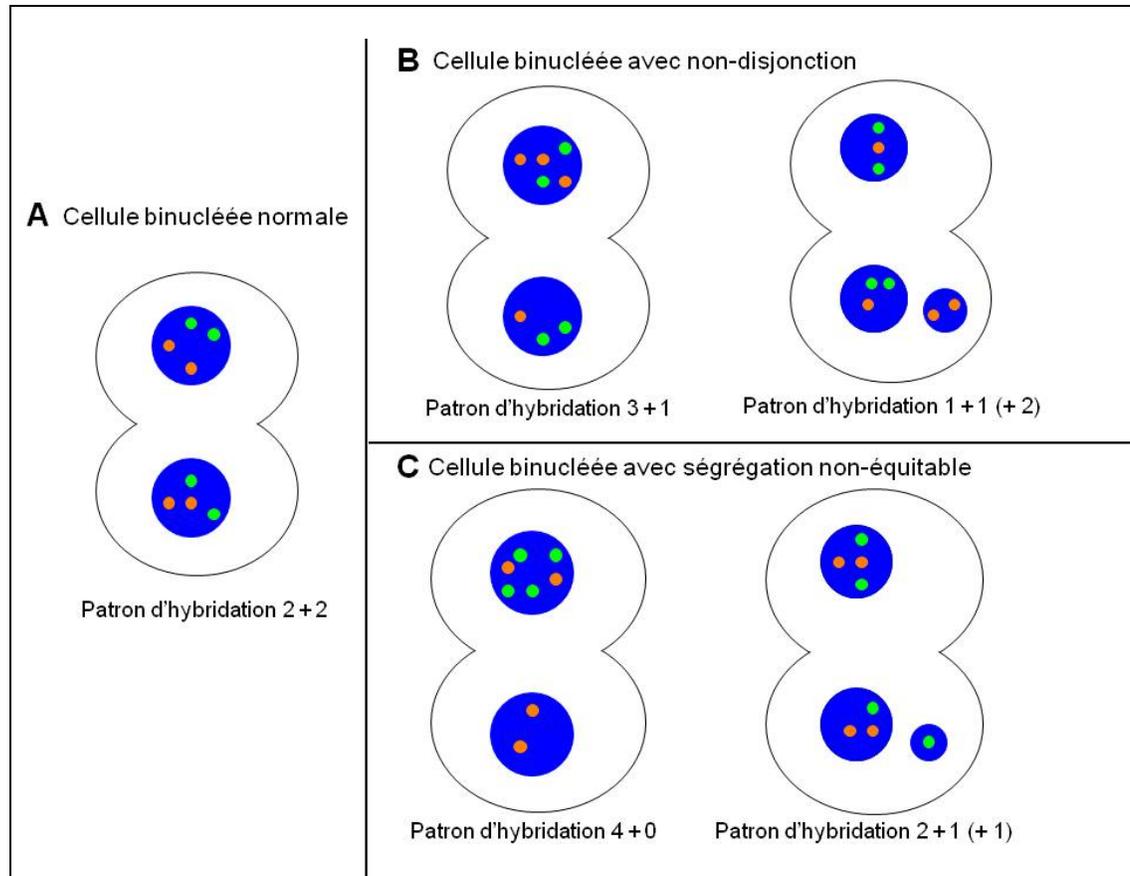


Figure 27: Illustration des mécanismes de malségrégation distingués par la FISH avec deux sondes centromériques spécifiques de deux chromosomes, en orange et en vert. **A)** Cellule binucléée (BN) normale, avec un patron d'hybridation 2 + 2 pour chacun des chromosomes étudiés: il y a deux signaux centromériques pour chaque chromosome dans les deux noyaux. **B)** Cellules BN présentant une non-disjonction du chromosome en orange avec un patron d'hybridation 3 + 1 dans la cellule de gauche et un patron d'hybridation 1 + 1 (+ 2) dans la cellule micronucléée de droite. **C)** Cellules BN présentant une ségrégation non-équitable du chromosome en vert (signal vert) avec un patron d'hybridation 4 + 0 dans la cellule de gauche et un patron d'hybridation 2 + 1 (+ 1) dans la cellule micronucléée de droite.

4.6. La modification du continuum exposition-maladie du BaP

Notre étude a mis en évidence, à travers l'analyse de plusieurs biomarqueurs, de multiples effets du BaP sur les lymphocytes humains. Par ailleurs, l'analyse par corrélation partielle et par régression linéaire multiple a permis de mieux comprendre les relations existant entre ces biomarqueurs. Combinée avec l'analyse des mécanismes de formation de ces biomarqueurs, l'ensemble de ces observations nous conduit à proposer une modification au continuum exposition-maladie du BaP. En effet, nos résultats suggèrent un lien causal entre les adduits BPDE-ADN, les bris à l'ADN et possiblement les 8-OH-dG (via le stress oxydatif) et la formation des biomarqueurs précoces de génotoxicité, soit les biomarqueurs cytogénétiques (ÉCS, AC et MN). La présence de ce lien causal justifie, selon nous, que les bris à l'ADN et les 8-OH-dG soient considérés comme des biomarqueurs de dose biologique efficace, faisant donc partie intégrante des biomarqueurs d'exposition (**Figure 28**, page 283). Cette nouvelle classification est à contre-courant de la conception actuellement en vigueur [Manno et coll., 2010], mais rejoint la première classification établie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1993, dans laquelle les biomarqueurs cytogénétiques pouvaient être considérés comme biomarqueurs d'exposition [WHO, 1993]. Cette classification de l'OMS préconisait l'utilisation d'éléments de réponse biologique, comme les ÉCS, pour évaluer le niveau d'exposition, ce qui a été repris en 2007 par Nordberg et coll. dans leur dictionnaire analytique des termes clés en toxicologie. Les études effectuées depuis l'établissement de la classification de l'OMS ont conduit à introduire la classe des biomarqueurs d'effets génotoxiques, comme faisant partie intégrante des biomarqueurs d'effets biologiques précoces [Manno et coll., 2010]. Dans cette classe sont inclus les biomarqueurs cytogénétiques (ÉCS, AC et MN), ainsi que les lésions à l'ADN détectées par l'essai COMET, i.e. les bris à l'ADN et les 8-OH-dG (**Figure 3**, page 20) [Collins et coll., 1993; Tice et coll., 2000]. Notre proposition vise donc à déplacer les lésions détectées par l'essai COMET (bris à l'ADN et 8-OH-dG) vers la classe des biomarqueurs d'exposition, sous-classe des biomarqueurs de dose biologique efficace (**Figure 28**, page 283).

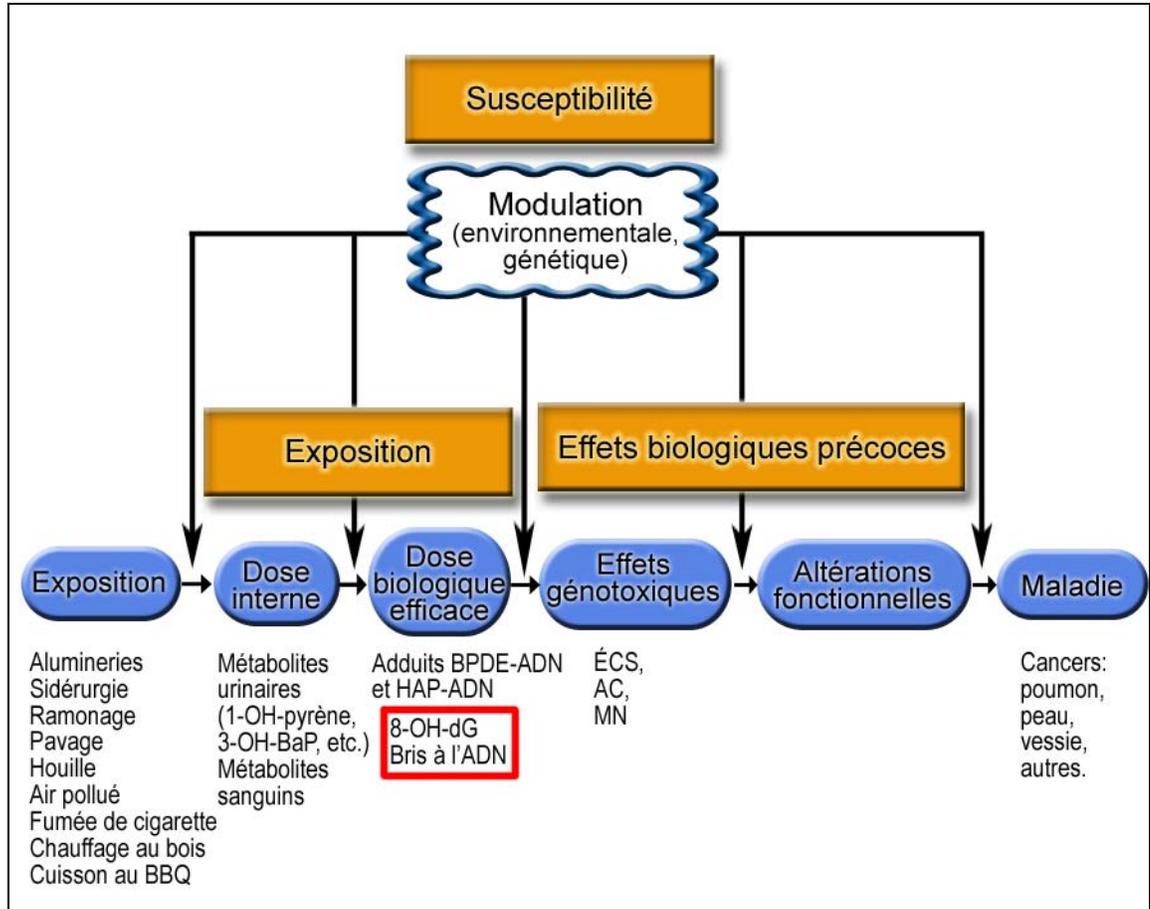


Figure 28: Proposition d'un nouveau continuum exposition-maladie pour les HAP/ BaP. Les bris à l'ADN et les bases oxydées (8-OH-dG) sont intégrés à la classe des biomarqueurs d'exposition, sous-classe des biomarqueurs de dose biologique efficace (dont font partie les adduits BPDE-ADN), en raison du lien causal les liant à la formation des biomarqueurs cytogénétiques : ÉCS, AC et MN.

5. Les objectifs secondaires de cette thèse

5.1. Les micronoyaux urinaires

Les travaux de recherche entrepris durant cette thèse de doctorat ont été l'occasion de mettre au point quelques techniques permettant l'analyse de nouveaux biomarqueurs au laboratoire. Ont ainsi été implantées l'analyse des micronoyaux sanguins par la technique de blocage de la cytotinèse (technique nommée CBMN dans la littérature) et l'analyse des micronoyaux présents dans les cellules urothéliales s'exfoliant spontanément dans l'urine (micronoyaux urinaires – MNu). Ces techniques ont été développées afin de les appliquer dans un plan de surveillance biologique de travailleurs exposés aux HAP au Québec. Ce plan de surveillance biologique n'étant actuellement pas en place, le recrutement de travailleurs exposés n'a pu être inclus dans le projet de recherche de cette thèse de doctorat.

Alors que la technique CBMN est très précisément décrite dans la littérature [Fenech, 2007], la technique des MNu n'est pas standardisée. Plusieurs variantes sont présentes dans la littérature, utilisant des fixateurs (méthanol, Carnoy I) et des colorations (vert rapide, Giemsa, réaction de Feulgen) très variés [Moore et coll., 1993; Titenko-Holland et coll., 1994; Ghosh et coll., 2006]. Par ailleurs, plusieurs études limitent l'analyse des MNu aux hommes, excluant les femmes en raison des très nombreuses cellules squameuses contaminant l'urine spontanée [Warner et coll., 1994; Moore et coll., 1997b]. C'est dans ce contexte que l'expertise du Docteur Pierre Brochu est très précieuse.

Plusieurs variantes de la technique des MNu ont donc été expérimentées et combinées aux techniques de cytologie couramment utilisées dans le domaine médical. Il en est ressorti une technique optimisée où l'isolement des cellules urothéliales permet d'avoir un nombre suffisant de cellules à analyser chez les hommes et où une contamination des échantillons de femmes par des cellules squameuses d'origine vaginale est moindre (Article 3, page 215). Par ailleurs, la fixation des spécimens avec le Carnoy I conserve adéquatement la structure cellulaire et nucléaire des cellules. Finalement, l'utilisation de la coloration polychromatique de Papanicolaou génère une coloration

différentielle des cellules présentes dans les échantillons urinaires : les cellules urothéliales sont petites, cuboïdales et bleues, alors que les cellules squameuses sont grandes, polygonales et de coloration rose ou bleue (Article 3, Figure 1, page 229). Cette coloration différentielle limite la nécessité d'avoir une connaissance étendue en cytologie pour effectuer l'analyse des MNu.

Toutes ces modifications ont permis d'analyser avec succès 91 % des échantillons recueillis, ce qui se compare favorablement avec les taux de succès rapportés dans de grandes études populationnelles [Fontana et coll., 2001; Basu et coll., 2004]. La fréquence de MNu retrouvée chez nos sujets ($2,6 \pm 1,6$ et $3,0 \pm 1,4$ MNu % cellules urothéliales, pour les femmes et les hommes, respectivement) se compare aux moyennes rapportées dans la littérature pour des groupes de sujets contrôles (Article 3, Tableau 3, page 232). Une grande variation de fréquences de MNu est rapportée dans la littérature (0,83 à 9,72 % pour les femmes et 0,98 à 7,3 % pour les hommes) et pourrait être due à de nombreux facteurs incluant le sexe, l'origine ethnique et géographique, la taille échantillonnale, les habitudes de vie, etc. [Majer et coll., 2001; Espinoza et coll., 2008]. Ces différences pourraient aussi s'expliquer par des critères d'analyse différents, tel que mentionné par Majer et coll. [2001]. Par contre, nous croyons que l'habileté du microscopiste à bien différencier les cellules urothéliales des cellules squameuses pourrait être un facteur majeur. Dans le cas de populations contrôles n'étant pas exposées à des cancérigènes de la vessie, l'analyse erronée d'un certain nombre de cellules squameuses est sans conséquence. Toutefois, la situation pourrait être toute autre si un agent provoquait une augmentation de la fréquence des MN dans les cellules urothéliales, mais pas dans les cellules squameuses. L'analyse erronée d'un grand nombre de cellules squameuses pourrait alors «diluer» l'effet génotoxique mesuré de cet agent et éventuellement masquer un effet génotoxique pour la vessie. La situation inverse pourrait également se poser, comme par exemple dans le cas du tabagisme où une augmentation des MN dans les cellules endocervicales est observée chez les fumeuses [Majer et coll., 2001].

Les MNu sont considérés comme des biomarqueurs appropriés à l'estimation du risque de cancer de la vessie associé à l'exposition à des cancérigènes comme l'arsenic, les HAP, ainsi que ceux présents dans la fumée de tabac [Burgaz et coll., 1995; Biggs et coll.,

1997; Tian et coll., 2001; Basu et coll., 2002; Murray et Edwards, 2005]. Comme le cancer de la vessie le plus fréquent est le carcinome de la vessie à cellules transitionnelles et qu'il origine de la transformation des cellules urothéliales, l'analyse des MN restreinte aux seules cellules urothéliales permettra une estimation plus précise du risque de cancer dans les populations exposées. Le Québec comportant des individus exposés à des agents cancérigènes pour la vessie, nous espérons être en mesure de participer à des études de surveillance biologique à moyen terme et de mettre en pratique les optimisations entourant la mesure des MNu.

5.2. L'analyse statistique des données provenant de plusieurs individus : le cas de l'essai EM-ISEL

Lors de l'analyse des bris simple-brin (BSB) à l'ADN par EM-ISEL, nous avons constaté qu'il existe une grande variation dans la quantification des particules d'or (IGP). Cette variation est importante pour un échantillon donné, alors que les valeurs minimales et maximales d'IGP montrent qu'une grande étendue d'IGP est retrouvée lors de la quantification des 10 ou 20 microphotographies prises par échantillon (**Tableau VIII**, page 288). Elle est encore plus importante entre les deux cultures préparées pour une condition donnée, variant entre 61 et 122 % (**Tableau VI**, page 121). Finalement, elle est considérable entre deux sujets donnés, avec une variation maximale observée de 15 fois dans la moyenne d'IGP observée entre deux sujets, pour une condition donnée (voir Article 2, Tableau supplémentaire V, page 211). Dans toutes les études publiées antérieurement utilisant l'essai EM-ISEL, les cellules d'un seul sujet ont fait l'objet de traitements avec divers produits chimiques [Assad et coll., 1999; M'Bemba-Meka et coll., 2005; Depault et coll., 2006]. Les données ont donc toujours été publiées sous forme de moyenne. Les observations faites dans notre étude, où dix sujets sont recrutés pour l'essai EM-ISEL, nous ont conduits à repenser la présentation des données et leur analyse statistique.

Ainsi, une analyse des données de chaque sujet est effectuée à l'aide d'une ANOVA à un critère et d'un test *post-hoc*, puisque, tout comme dans le cas des ÉCS, chaque cellule

analysée génère une donnée. Cela permet d'évaluer la relation dose-réponse pour chaque sujet, individuellement. Pour l'analyse des données du groupe, des différences importantes dans le niveau de base d'IGP (condition contrôle négatif) rendent nécessaire la normalisation des données. Cette normalisation permet d'assigner la valeur de 1,00 à la moyenne d'IGP quantifiée pour la condition contrôle, pour chaque individu (Article 2, Tableau III, page 208). Ensuite, la moyenne normalisée de chaque condition d'exposition au BaP est calculée en comparaison avec la valeur de la condition contrôle. Finalement, l'analyse statistique du groupe est effectuée avec ces moyennes normalisées pour évaluer la relation dose-réponse. Cette approche statistique permet de comparer adéquatement plusieurs individus dont les cellules ont été exposées *in vitro* à différentes concentrations de BaP. Par contre, cette approche ne serait pas valable dans le cas d'une étude populationnelle où l'exposition serait environnementale, par exemple. Des ajustements techniques doivent donc être réalisés afin que les niveaux de base d'IGP soient directement comparables, d'un individu à l'autre. Certains paramètres techniques pouvant faire l'objet d'ajustements sont décrits ici.

Suite à la récolte des cellules, les chromosomes et les noyaux sont étalés sur des lames de microscopie qui sont conservées au congélateur jusqu'au moment où l'essai EM-ISEL est effectué. Cette congélation vise à ralentir le vieillissement du matériel génétique et permet une conservation du matériel durant plusieurs années (dans le cas de la FISH : jusqu'à 10 ans). Cependant, nous avons constaté que l'essai EM-ISEL est très sensible et qu'un vieillissement de deux ans, par exemple, rend les lames inutilisables pour cette technique, puisqu'un marquage dense est observé sur les noyaux et les chromosomes. Les quantifications effectuées sur des lames vieilles durant 14 à 28 jours ou durant environ un an, montrent une variation dans le niveau de base d'IGP (**Tableau VIII**, page 288), les lames de 14 à 28 jours montrant un niveau d'IGP plus faible. En effet, l'étendue des IGP diffère de façon importante entre les lames de 14 à 28 jours (40 à 64 pour les chromosomes et 23 à 61 pour les noyaux) et les lames de un an (315 à 536 [chromosomes] et 238 à 506 [noyaux]) (**Tableau VIII**, page 288).

Tableau VIII: Quantification des particules d'or (IGP) dans la condition contrôle négatif ([BaP] = 0 µg/mL), pour les chromosomes et les noyaux analysés par EM-ISEL chez quelques sujets, en fonction du vieillissement des lames.

	Moyenne ± Écart-type	Min/ Max	Étendue
<i>Lames vieilles durant 14 à 28 jours</i>			
Sujet F1			
Chromosomes	150 ± 19	116/ 180	64
Noyaux	93 ± 16	74/ 134	60
Sujet F12			
Chromosomes	89 ± 19	57/ 116	59
Noyaux	52 ± 7	41/ 64	23
Sujet M3			
Chromosomes	75 ± 15	54/ 94	40
Noyaux	67 ± 17	36/ 97	61
<i>Lames vieilles environ un an</i>			
Sujet F4			
Chromosomes	762 ± 121	596/ 910	314
Noyaux	682 ± 142	456/ 962	506
Sujet M2			
Chromosomes	614 ± 181	377/ 913	536
Noyaux	560 ± 144	376/ 872	497
Sujet M4			
Chromosomes	402 ± 102	250/ 565	315
Noyaux	276 ± 62	168/ 446	238

Min/ Max : valeurs minimales et maximales d'IGP quantifiées dans l'échantillon.

Étendue : nombre représentant la soustraction de la valeur maximale par la valeur minimale.

Chromosomes : 10 microphotographies par échantillon.

Noyaux : 20 microphotographies par échantillon.

Cette étendue peut aussi s'expliquer par la variation observée dans la compaction de l'ADN, lors de la sélection des chromosomes. En effet, nous observons que le niveau de compaction varie d'une métaphase à l'autre. De plus, nous observons que l'aire occupée par les noyaux sur la lame de microscope varie également, en fonction du contenu en ADN du noyau, donc en fonction de la phase du cycle cellulaire de la cellule étudiée. Seule la section de noyau photographiée à un grossissement de 36 000X pour effectuer la quantification demeure constante (**Figure 29**, page 289). Il en résulte donc que la quantité d'ADN analysée varie d'une cellule à l'autre. Une correction mathématique effectuée pour tenir compte de l'aire du noyau contribuerait à diminuer l'étendue des données. Elle requerrait la prise d'une microphotographie à faible grossissement (1400X), parallèlement à celle qui est prise à fort grossissement.

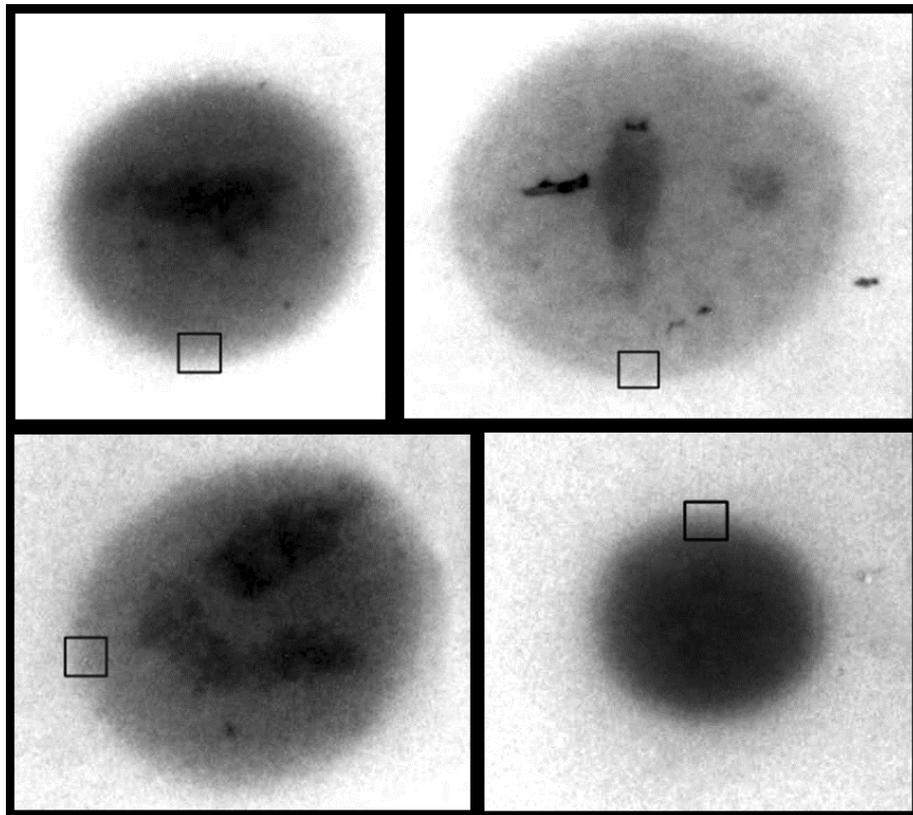


Figure 29: Noyaux marqués par l'essai EM-ISEL, photographiés à un grossissement de 1400X. Les petits carrés représentent approximativement la section photographiée à 36 000X pour effectuer la quantification des particules d'or. Notez la variation de l'aire occupée par les noyaux.

Enfin, comme des coûts élevés sont associés à l'utilisation du microscope électronique à transmission, il est impératif de maximiser le temps de microscopie et de prise de microphotographies. Les premières études effectuées au laboratoire ont demandé l'analyse de 10 chromosomes et de 10 sections de noyaux, provenant d'autant de cellules distinctes [Assad et coll., 1999; M'Bemba-Meka et coll., 2005; Depault et coll., 2006]. Alors que la prise de microphotographies de 10 sections de noyaux est très rapide (environ 2 minutes par photo), la sélection des chromosomes métaphasiques à photographier est beaucoup plus longue (parfois jusqu'à 10- 15 minutes par métaphase). Beaucoup de temps est donc nécessaire pour trouver les métaphases, avant de les photographier. Pour ces raisons, on peut se demander s'il serait justifié de quantifier les particules d'or uniquement sur les noyaux. Pour répondre à cette question, une analyse par régression linéaire a été effectuée. Elle vise à évaluer la concordance existant entre la quantification des particules d'or sur les sections de noyaux et celle effectuée sur les chromosomes sur une même lame. L'analyse a été effectuée sur l'ensemble des données de cette étude (10 sujets, quatre conditions par sujet et deux cultures distinctes par condition). Elle montre une concordance très élevée entre les deux mesures ($r^2 = 0,74$; $r = 0,86$, $p < 0,0001$). Ceci indique que la quantification effectuée sur les noyaux est un excellent prédicteur de la quantification obtenue sur les chromosomes et ce, peu importe la condition d'exposition analysée (**Figure 30**, page 291). Il est donc justifié d'analyser uniquement les noyaux dans l'essai EM-ISEL, ce qui contribuera à diminuer le temps de microscopie.

En résumé, la normalisation de la moyenne des IGP, effectuée en assignant la valeur de 1,00 au contrôle négatif et en calculant la moyenne normalisée de chaque condition d'exposition, a permis d'analyser statistiquement les données de plusieurs individus. Par ailleurs, la concordance très élevée retrouvée entre la moyenne des IGP quantifiée sur les noyaux et sur les chromosomes d'une même lame justifie de restreindre l'analyse par EM-ISEL aux noyaux. Finalement, la réalisation de cette technique sur des lames vieilles pour une période bien précise (14 à 28 jours), couplée à la correction mathématique requise pour

tenir compte de l'aire totale du noyau lors de la quantification des particules d'or, permettra de diminuer les disparités observées entre les cellules dans les prochaines études.

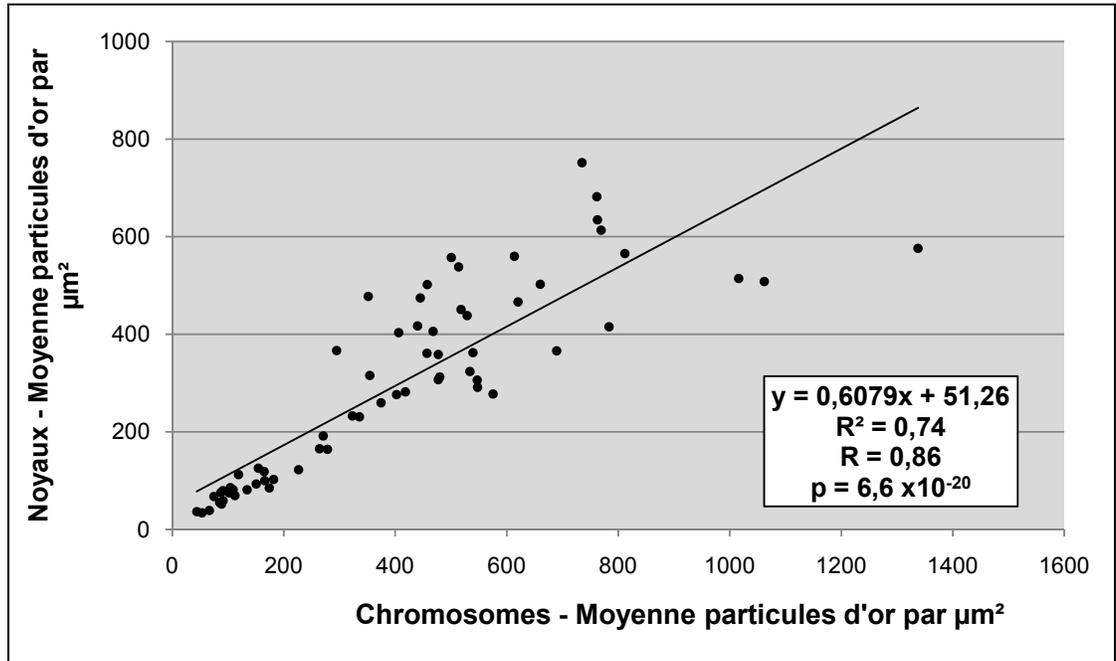


Figure 30: Régression linéaire montrant la concordance existant entre la moyenne des particules d'or (IGP) quantifiées dans les noyaux et le moyenne des IGP quantifiée dans les chromosomes, pour une même lame.

Chapitre 6: Conclusion et perspectives

La formation des biomarqueurs précoces suite à l'exposition au benzo-a-pyrène des lymphocytes humains prélevés chez de jeunes adultes en bonne santé, a permis de comprendre un peu mieux le mécanisme d'action du BaP dans ces cellules, ainsi que la relation existant entre ces biomarqueurs. Ainsi, deux types de courbes dose-réponse ont été obtenus lors de la mesure de ces biomarqueurs : non-linéaire et linéaire. Alors que tous les biomarqueurs montrent une augmentation importante de leurs niveaux suite à l'exposition au BaP, un abaissement significatif aux concentrations supérieures de BaP utilisées dans cette étude a été obtenu lors de la mesure des adduits BPDE-ADN et des micronoyaux (MN). Cette courbe dose-réponse non-linéaire est aussi observée avec les aberrations chromosomiques (AC), quoique la diminution soit non significative. Ces diminutions peuvent être expliquées par un déclenchement de la phase II du métabolisme du BaP, qui résulte en la conjugaison du BPDE et donc en la diminution de la formation des adduits BPDE-ADN [Szaefer et coll., 2004]. Une situation analogue de saturation dans la formation des adduits BPDE-ADN et des MN a été rapportée dans quelques études de surveillance biologique de travailleurs exposés aux HAP [Van Hummelen et coll., 1993; Lewtas et coll., 1997; Pavanello et coll., 2008].

Contrairement aux autres biomarqueurs, une courbe dose-réponse linéaire est observée au test des échanges entre chromatides-sœurs (ÉCS). En effet, la moyenne des ÉCS et le pourcentage de cellules à haute fréquence d'ÉCS (CHF) augmentent à toutes les concentrations de BaP testées dans notre étude. C'est également le cas dans l'étude de Hatzi et coll. [2011] lors d'une exposition *in vitro* des lymphocytes humains avec des concentrations de BaP encore plus élevées (allant jusqu'à 250 µg/mL). Étant donné que

nous avons obtenu une diminution des adduits BPDE-ADN aux concentrations supérieures de BaP dans notre étude, l'augmentation des ÉCS indique que la production d'un autre type de lésions à l'ADN pourrait également être responsable de la formation des ÉCS. Ces lésions pourraient être des bris simple-brin (BSB) à l'ADN et/ou des bases oxydées (telle la 8-OH-dG), qui peuvent stopper la progression de la fourche de réplication et enclencher le système de réparation par recombinaison homologue (HRR) [Saleh-Gohari et coll., 2005; Andreassen et coll., 2006; Thompson et Hinz, 2009]. En effet, lors de la résolution de la jonction de Holliday, un ÉCS peut se produire, avec une fréquence de moins de 3 % dans des cellules de mammifères [Johnson et Jasin, 2000], fréquence qui pourrait varier en fonction de la lésion entraînant l'arrêt de la fourche de réplication.

Par ailleurs, la comparaison des courbes dose-réponse obtenues chez les hommes et les femmes de notre étude a permis de mettre en évidence des différences dans la réponse de leurs lymphocytes face au BaP. Ainsi, trois biomarqueurs différents montrent une augmentation significative lorsque mesurés chez les hommes à la plus faible concentration de BaP, alors que chez les femmes, cette augmentation n'est pas significative. De plus, les hommes présentent plus d'adduits BPDE-ADN que les femmes à toutes les concentrations de BaP étudiées, quoique cette différence soit non significative. Des différences métaboliques existant dans les lymphocytes sanguins des hommes et des femmes pourraient être à l'origine de ces observations. En effet, les hommes présentent une activité plus importante des enzymes Cyp1a1 et Cyp1b1 que les femmes, suite à une induction par un HAP [Smart et Daly, 2000; Lin et coll., 2003].

En plus des différences observées entre les sexes, des différences interindividuelles sont observées entre nos sujets. L'amplitude de ces différences varie en fonction du biomarqueur étudié comme suit :

Adduits BPDE-ADN >> MN = AC = % CHF > BSB à l'ADN >> moyenne ÉCS

Des facteurs génétiques et environnementaux peuvent expliquer ces différences interindividuelles. La contribution relative de ces facteurs peut être évaluée par des études de jumeaux monozygotes et dizygotes. Dans la littérature, des études de ce type ont été

répertoriées pour les biomarqueurs cytogénétiques suivants : les AC, les MN et les ÉCS. Ainsi, les facteurs génétiques sont très importants pour expliquer la variabilité observée dans le test des MN et le test des AC (héritabilité de 60 à 70 %) [Cloos et coll., 1999; Tedeschi et coll., 2004; Surowy et coll., 2011], alors que dans le cas des ÉCS, l'héritabilité est évaluée à 30 % [Hirsch et coll., 1992]. Ceci laisse donc une place très importante aux facteurs environnementaux pour influencer la formation des ÉCS, ce qui est confirmé dans notre étude. En effet, l'étude des corrélations entre nos biomarqueurs montre que, si presque tous les biomarqueurs sont significativement corrélés avec l'exposition au BaP, les ÉCS montrent la corrélation significative la plus forte avec l'exposition, suivie des AC, des adduits BPDE-ADN, puis des MN.

Afin de déterminer l'importance du facteur environnemental (l'exposition au BaP) et des facteurs ayant une composante mixte (les biomarqueurs précoces : adduits BPDE-ADN, AC et MN), à la fois génétique et environnementale, sur la variabilité observée dans le test des ÉCS, une analyse par régression linéaire multiple est réalisée. Cette analyse permet d'identifier deux facteurs significatifs expliquant 53 % de la variabilité observée dans la mesure du pourcentage de CHF (le niveau d'exposition au BaP et les adduits BPDE-ADN) et un facteur expliquant 41 % de la variabilité observée dans la moyenne des ÉCS (le niveau d'exposition au BaP). En ce qui a trait aux AC et aux MN, un seul facteur mesuré dans notre étude explique significativement une faible proportion de la variabilité observée dans leurs fréquences chez nos sujets. Il s'agit du pourcentage de CHF qui explique 34 % de la variabilité observée dans la fréquence des AC et 12 % de la variabilité dans la fréquence des MN. Ceci appuie encore plus le fait que l'héritabilité est très importante pour ces deux derniers biomarqueurs et contribuerait à expliquer que les AC et les MN sont des biomarqueurs prédicteurs de risque de cancer, alors que les ÉCS ne le sont pas [Norppa et coll., 2006; Bonassi et coll., 2007; Surowy et coll., 2011].

Puisque le pourcentage de CHF est un facteur influençant significativement la variabilité observée dans la fréquence des AC et des MN, ceci nous permet de postuler que certaines lésions à l'ADN sont communément responsables de la formation des ÉCS, des AC et des MN. Ces lésions doivent être en mesure de stopper la progression de la fourche de réplication, en plus d'entraîner la formation de cassures chromosomiques ou de MN.

L'analyse des mécanismes à la base de la formation de ces biomarqueurs permet d'identifier les BSB à l'ADN comme lésions communes à ces trois biomarqueurs. En effet, suite au passage de la fourche de réplication, les BSB sont convertis en bris double-brin (BDB) à l'ADN [Obe et Durante, 2010]. Ces BDB peuvent stimuler la HRR [Andreassen et coll., 2006] ou entraîner la formation de cassures chromatidiennes et chromosomiques (chromosomes cassés) et d'AC [Obe et coll., 1992]. Par ailleurs, les cassures chromatidiennes et chromosomiques peuvent entraîner la formation de MN contenant des fragments chromosomiques [Norppa et Falck, 2003].

D'autre part, l'analyse des biomarqueurs de cette étude suggère que le stress oxydatif généré lors du métabolisme du BaP dans le lymphocyte humain pourrait aussi contribuer à la formation des biomarqueurs, comme les ÉCS, les AC et les MN, via la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui causent des BSB à l'ADN et des 8-OH-dG [Park et coll., 2006]. En effet, l'essai EM-ISEL effectué chez nos sujets a montré une formation significative de BSB à l'ADN chez environ 50 % d'entre eux, 24 heures après la fin de l'exposition au BaP. L'analyse de la littérature suggère que ce temps post-exposition a pu être trop long pour permettre la détection d'une augmentation significative de BSB chez tous les sujets, puisque la réparation par le système d'excision de bases est rapide et pourrait être complétée moins de 24 heures après l'exposition au BaP [Tao et coll., 2009]. Ceci expliquerait que, dans notre étude, il n'a pas été possible de relier le niveau de BSB mesuré chez nos sujets, avec la formation des autres biomarqueurs précoces. Toutefois, l'existence du stress oxydant produit par le cycle d'oxydoréduction des quinones dans le lymphocyte humain est fortement suggérée par la présence de diverses quinones suite à l'exposition de ces cellules au BaP, dont la quantité varie d'un individu à l'autre [Thompson et coll., 1989].

Collectivement, ces observations nous ont conduits à proposer un nouveau continuum exposition-maladie pour le BaP, dans lequel les 8-OH-dG ainsi que les BSB à l'ADN sont regroupés dans la classe des biomarqueurs de dose biologique efficace, au sein des biomarqueurs d'exposition (**Figure 28**, page 283). Ce nouveau classement est basé sur le mécanisme de formation des biomarqueurs précoces de génotoxicité (les ÉCS, les AC et les MN) et reconnaît l'apport des trois lésions primaires à l'ADN (les adduits BPDE-ADN,

les 8-OH-dG et les BSB) à leur formation. De plus, nous croyons que les études de corrélation effectuées entre nos biomarqueurs identifient les ÉCS comme biomarqueur de choix pour évaluer les effets génotoxiques liés à une exposition au BaP et, possiblement, aux autres HAP. L'inclusion d'un paramètre additionnel au test des ÉCS, soit les CHF, semble très prometteur. En effet, ce paramètre pourrait être plus sensible que la moyenne des ÉCS, lorsque la génotoxicité induite par un composé n'est pas très importante. De fait, lors d'une exposition à la simazine (un herbicide), la moyenne des ÉCS n'était pas significativement augmentée dans la cohorte étudiée par Suarez et coll [2003], alors que le pourcentage de CHF l'était. En outre, ces CHF pourraient être interprétées sur une base individuelle, permettant d'identifier des individus divergents, soit des individus possédant un nombre anormalement élevé de CHF [Carbonell et coll., 1995]. En contrôlant statistiquement les facteurs confondants reconnus pour augmenter le pourcentage de CHF (l'âge et le tabagisme actif) à l'aide de modèles d'effets aléatoires [Bonassi et coll., 1999], et en incluant la mesure de certains autres biomarqueurs précoces tels les AC et les MN, une telle interprétation individuelle pourrait être possible.

En ce qui concerne le mécanisme de la cancérogenèse induite par le BaP, notre étude a montré qu'en plus d'être un clastogène reconnu [Miller et coll., 1998; Corvi et coll., 2008], le BaP a des effets aneugènes sur les lymphocytes humains. En effet, lors de l'analyse des AC, des métaphases aneuploïdes, comportant des pertes et des gains de chromosomes, ont été retrouvées dans une proportion significativement augmentée dans les cellules exposées au BaP. De plus, l'analyse du contenu des MN par la FISH avec une sonde pancentromérique a montré que l'exposition au BaP entraîne surtout la formation de MN contenant trois signaux centromériques ou plus, ce qui est significativement différent de la condition contrôle. La formation de MN comportant plusieurs centromères est associée à la présence d'effets aneugènes, indiquant une perturbation de l'appareil mitotique ou des centrosomes [Iarmarcovai et coll., 2007b]. Ces mêmes perturbations ont été suggérées seulement par deux équipes travaillant avec des cellules de hamster chinois [Matsuoka et coll., 1997; Matsuoka et coll., 1998] ou avec des cellules de carcinome pulmonaire [Shinmura et coll., 2008] et rapportant, respectivement, des changements caryotypiques et une duplication excessive des centrosomes, en réponse à une exposition au

BaP. Par contre, ces auteurs ne relient pas les perturbations observées avec des effets aneugènes.

Alors que la littérature scientifique lie l'exposition au BaP avec l'initiation et la promotion du cancer, nos résultats témoignent de la présence d'effets aneugènes induits par le BaP, qui sont généralement reliés avec l'étape de progression du cancer [Cazaux, 2010]. Les effets aneugènes peuvent se traduire par une instabilité caryotypique (changements dans le nombre de chromosomes), ainsi que par des perturbations lors de la mitose, entraînant des défauts lors de la ségrégation des chromosomes. Cette instabilité chromosomique permettrait d'augmenter le répertoire génétique de la tumeur, afin d'accroître sa résistance aux pressions de sélection qu'elle subit. Ces pressions proviennent du micro-environnement de la tumeur, qui elle-même est assaillie par de l'hypoxie et une restriction en nutriments, par des facteurs autocrines inhibant sa croissance et par la surveillance du système immunitaire [Schneider et Kulesz-Martin, 2004]. Ainsi, en fonction des pressions subies à un moment précis de sa vie, une cellule portant une mutation/ une combinaison chromosomique particulière sera sélectionnée, car étant en mesure de faire face à ces pressions. L'instabilité génétique étant constamment présente, de nouvelles mutations/ combinaisons chromosomiques seront générées au fil des divisions cellulaires et permettront l'adaptation aux nouvelles pressions et ultimement permettront de poursuivre la progression tumorale.

Le fait que le BaP possède des effets aneugènes et soit impliqué dans la progression tumorale pourrait être de grande importance étant donné que l'exposition au BaP et aux autres HAP dure généralement durant des années, voire des décennies (tabagisme actif, exposition à de l'air pollué en milieu de vie ou de travail, etc.). Ceci pourrait expliquer que des évidences de plus en plus nombreuses supportent une association entre le tabagisme et l'apparition de certaines formes plus agressives de cancer du sein [Fentiman et coll., 2005]. Ainsi, le fait de fumer activement est associé à un pronostic moins favorable et à un risque de décès plus élevé chez les femmes ayant ce cancer [Rezaianzadeh et coll., 2009]. Ce pronostic moins favorable pourrait être relié au fait que les tumeurs retrouvées chez les fumeuses sont plus fréquemment indépendantes des hormones (absence des récepteurs aux

oestrogènes et à la progestérone) [Manjer et coll., 2001]; ces tumeurs étant plus agressives que les formes dépendantes des hormones.

La réalisation de ce projet de recherche a soulevé de nombreuses questions et ouvert plusieurs perspectives de recherche sur la génotoxicologie du BaP chez l'humain, sur la formation des biomarqueurs précoces dans le lymphocyte humain et sur l'interprétation de ces biomarqueurs. Ainsi, la mise en évidence des différences entre les sexes dans cette étude demande à être approfondie afin de déterminer si elles sont bien réelles et quelle en est leur nature. L'étude d'un plus grand nombre de sujets permettrait de confirmer ces différences. Ainsi, des analyses visant à évaluer le niveau des protéines ou des ARNm présents dans les lymphocytes des sujets (avant et après exposition au BaP), à l'aide de micropuces à ARN par exemple, permettrait de rechercher les différences existant autant dans les enzymes métaboliques que dans les enzymes de réparation de l'ADN.

En ce qui a trait à la formation des biomarqueurs précoces dans le lymphocyte humain, plusieurs interrogations persistent concernant leur cinétique d'apparition et de disparition. L'analyse des adduits BPDE-ADN et des bases oxydées 8-OH-dG suite à l'exposition au BaP, gagnerait à être investiguée plus avant chez un nombre substantiel de sujets, en incluant des concentrations de BaP plus faibles, ainsi que des temps d'exposition et de post-exposition variables. Ceci permettrait d'établir un profil cinétique plus complet pour ces deux types d'adduits et de déterminer leurs séquences respectives de formation et de réparation. Également, cela permettrait de déterminer l'importance relative de la voie métabolique du BPDE par rapport à la voie métabolique des quinones qui génère des ERO et des 8-OH-dG dans ces cellules.

De plus, la variabilité observée entre deux cultures cellulaires, lors de la réalisation de l'essai EM-ISEL, suggère que cette technique pourrait encore être optimisée. En plus de la correction au niveau de l'aire analysée qui a été suggérée dans la discussion générale, l'automatisation de la quantification des particules d'or par le logiciel d'analyse d'images permettrait de maximiser la zone de chromatine quantifiée et d'éliminer les erreurs systématiques pouvant affecter cette étape. Ces optimisations pourraient permettre de diminuer les disparités observées entre les cellules lors de l'analyse statistique.

D'autre part, nous avons observé que le nombre d'adduits BPDE-ADN mesuré chez certains de nos sujets variait lors de prélèvements sanguins pris avec quelques semaines d'intervalles. Nous n'avons pas pu expliquer ces disparités par un changement dans l'état physiologique des donneurs ou par un changement saisonnier (par exemple : passage de l'hiver à l'été) qui aurait pu s'accompagner d'une exposition environnementale aux HAP très différente entre les deux prélèvements, tel qu'observé par Sram et coll. [2007b]. Par contre, l'état nutritionnel des sujets, notamment le niveau de folates [Fenech et coll., 2005], n'a pas été investigué dans cette étude. Il serait donc intéressant d'effectuer une étude où les différences présentes entre les prélèvements sanguins seraient spécifiquement évaluées, avant et après exposition au BaP, pour plusieurs biomarqueurs. En questionnant les sujets à propos des sources d'expositions environnementales aux HAP (fumée de tabac secondaire, lieu de résidence, sources de chauffage domestique, etc.) et à propos de leur diète, certains facteurs de variation pourraient être évalués. De plus, cette étude permettrait de déterminer s'il est pertinent d'effectuer une surveillance biologique de l'exposition basée sur un prélèvement unique, en comparaison avec un nombre plus important de prélèvements.

La compréhension des relations existant entre les biomarqueurs mesurés dans cette étude, couplée aux connaissances entourant leur mécanismes de formation ainsi que le métabolisme du BaP dans le lymphocyte humain, nous ont permis d'identifier le biomarqueur précoce étant le plus influencé par l'exposition au BaP. La réalisation du test des ÉCS, incluant l'analyse de la moyenne des ÉCS ainsi que l'analyse des CHF, semble donc des plus approprié pour effectuer de la surveillance biologique d'exposition aux HAP. Par ailleurs, la pertinence de notre étude et de l'approche utilisée dépasse le BaP et les HAP, de par sa large applicabilité à une foule d'agents physiques et chimiques présents dans notre environnement. Les connaissances acquises permettront d'évaluer la génotoxicité des contaminants connus et émergents de façon plus complète et d'évaluer leur mode d'action.

Bibliographie

- Règlement sur la santé et la sécurité du travail (2011). Tiré de: Loi sur la santé et la sécurité du travail (Québec: Éditeur officiel du Québec). Loi numéro L.R.Q., c. S-2.1, r.19.01.
- Aardema MJ, Albertini S, Arni P, Henderson LM, Kirsch-Volders M et coll. (1998). *Aneuploidy: a report of an ECETOC task force*. Mutation Research 410: 3-79.
- Abou-Eisha A, Marcos R et Creus A (2004). *Genotoxicity studies on the antimicrobial drug sulfamethoxazole in cultured human lymphocytes*. Mutation Research 564: 51-56.
- Ahnstrom G (1988). *Techniques to measure DNA single-strand breaks in cells: a review*. International Journal of Radiation Biology 54: 695-707.
- al-Sabti K, Lloyd DC, Edwards AA et Stegnar P (1992). *A survey of lymphocyte chromosomal damage in Slovenian workers exposed to occupational clastogens*. Mutation Research 280: 215-223.
- Alexandrov K, Rojas M, Geneste O, Castegnaro M, Camus AM et coll. (1992). *An improved fluorometric assay for dosimetry of benzo(a)pyrene diol-epoxide-DNA adducts in smokers' lung: comparisons with total bulky adducts and aryl hydrocarbon hydroxylase activity*. Cancer Research 52: 6248-6253.
- Alves dos Santos R, Cabral TR, Cabral IR, Antunes LM, Pontes Andrade C et coll. (2008). *Genotoxic effect of Physalis angulata L. (Solanaceae) extract on human lymphocytes treated in vitro*. Biocell 32: 195-200.
- Amahdar L, Anouar A, Ababou B, Verschaeve L et Hilali A (2009). *In vitro genotoxicity of Settat town landfill leachate, Morocco*. Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju 60: 179-184.
- Andreassen PR, Ho GP et D'Andrea AD (2006). *DNA damage responses and their many interactions with the replication fork*. Carcinogenesis 27: 883-892.
- Aquilina NJ, Delgado-Saborit JM, Meddings C, Baker S, Harrison RM et coll. (2010). *Environmental and biological monitoring of exposures to PAHs and ETS in the general population*. Environment International 36: 763-771.
- Armitage P et Doll R (2004). *The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis*. British Journal of Cancer 91: 1983-1989.
- Assad M, Lemieux N et Rivard CH (1997). *Immunogold electron microscopy in situ end-labeling (EM-ISEL): assay for biomaterial DNA damage detection*. Bio-Medical Materials and Engineering 7: 391-400.
- Assad M, Lemieux N, Rivard CH et Yahia LH (1999). *Comparative in vitro biocompatibility of nickel-titanium, pure nickel, pure titanium, and stainless steel: genotoxicity and atomic absorption evaluation*. Bio-Medical Materials and Engineering 9: 1-12.

- ASTDR (2008). *Public Health Statement for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*.
Dernière mise à jour : 2008-08. Page consultée le 2010-02-20.
<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/phs69.html>
- ATCC (2010). *Product description – catalog number CRL-1862*. Page consultée le 2014-11-28.
<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-1862&Template=cellBiology>
- Auclair Y, Rouget R, Affar el B et Drobetsky EA (2008). *ATR kinase is required for global genomic nucleotide excision repair exclusively during S phase in human cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 17896-17901.
- Aylon Y, Michael D, Shmueli A, Yabuta N, Nojima H et coll. (2006). *A positive feedback loop between the p53 and Lats2 tumor suppressors prevents tetraploidization*. *Genes and Development* 20: 2687-2700.
- Baeyens A, Vandersickel V, Thierens H, Ridder LD et Vral A (2005). *Effects of estradiol and progesterone on the variability of the micronucleus assay*. *Mutation Research* 578: 308-316.
- Balmain A, Gray J et Ponder B (2003). *The genetics and genomics of cancer*. *Nature Genetics* 33 Suppl: 238-244.
- Barber TD, McManus K, Yuen KW, Reis M, Parmigiani G et coll. (2008). *Chromatid cohesion defects may underlie chromosome instability in human colorectal cancers*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 3443-3448.
- Barcia JJ (2007). *The Giemsa stain: its history and applications*. *Int J Surg Pathol* 15: 292-296.
- Barhoumi R, Mouneimne Y, Ramos KS, Safe SH, Phillips TD et coll. (2000). *Analysis of benzo[a]pyrene partitioning and cellular homeostasis in a rat liver cell line*. *Toxicological Sciences* 53: 264-270.
- Basu A, Ghosh P, Das JK, Banerjee A, Ray K et coll. (2004). *Micronuclei as biomarkers of carcinogen exposure in populations exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India: a comparative study in three cell types*. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 13: 820-827.
- Basu A, Mahata J, Roy AK, Sarkar JN, Poddar G et coll. (2002). *Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India*. *Mutation Research* 516: 29-40.
- Bender MA, Griggs HG et Bedford JS (1974). *Mechanisms of chromosomal aberration production. 3. Chemicals and ionizing radiation*. *Mutation Research* 23: 197-212.

- Bender MA, Leonard RC, White O, Jr., Costantino JP et Redmond CK (1988). *Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in lymphocytes from coke oven workers*. Mutation Research 206: 11-16.
- Benigni R, Bossa C et Worth A (2010). *Structural analysis and predictive value of the rodent in vivo micronucleus assay results*. Mutagenesis 25: 335-341.
- Berge G, Mollerup S, S OV, Hewer A, Phillips DH et coll. (2004). *Role of estrogen receptor in regulation of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolic activation in lung*. Lung Cancer 45: 289-297.
- Bergoglio V et Magnaldo T (2006). Nucleotide excision repair and related human diseases, Dans *Genome and disease*, Volff J-N (ed)^(eds), (Karger, Basel), pages 35-52.
- Beskid O, Binkova B, Dusek Z, Rossner P, Solansky I et coll. (2007). *Chromosomal aberrations by fluorescence in situ hybridization (FISH)--Biomarker of exposure to carcinogenic PAHs*. Mutation Research 620: 62-70.
- Bielas JH et Heddle JA (2000). *Proliferation is necessary for both repair and mutation in transgenic mouse cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97: 11391-11396.
- Biggs ML, Kalman DA, Moore LE, Hopenhayn-Rich C, Smith MT et coll. (1997). *Relationship of urinary arsenic to intake estimates and a biomarker of effect, bladder cell micronuclei*. Mutation Research 386: 185-195.
- Bignon Y-J et Uhrhammer N (2005). Gènes suppresseurs de tumeurs, Dans *Cancérologie fondamentale*, Lacave R, Larsen C-J, Robert J (ed)^(eds), (Éditions John Libbey Eurotext, Montrouge), pages 105-120.
- Binkova B, Giguere Y, Rossner P, Jr., Dostal M et Sram RJ (2000). *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*. Mutation Research 471: 57-70.
- Binkova B, Lewtas J, Miskova I, Lenicek J et Sram R (1995). *DNA adducts and personal air monitoring of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in an environmentally exposed population*. Carcinogenesis 16: 1037-1046.
- Binkova B, Topinka J, Mrackova G, Gajdosova D, Vidova P et coll. (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.
- Blaha L, Kapplova P, Vondracek J, Upham B et Machala M (2002). *Inhibition of gap-junctional intercellular communication by environmentally occurring polycyclic aromatic hydrocarbons*. Toxicological Sciences 65: 43-51.
- Bochkov NP, Sram RJ, Kuleshov NP et Zhurkov VS (1976). *System for the evaluation of the risk from chemical mutagens for man: basic principles and practical recommendations*. Mutation Research 38: 191-202.
- Bocskay KA, Tang D, Orjuela MA, Liu X, Warburton DP et coll. (2005). *Chromosomal aberrations in cord blood are associated with prenatal exposure to carcinogenic*

polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 14: 506-511.

Boerrigter ME et Vijg J (1991). *Induction and disappearance of DNA single-strand breaks in human B and T lymphocytes after exposure to ethylnitrosourea*. *Mutation Research* 255: 49-55.

Bolognesi C, Gallerani E, Bonatti S, De Ferrari M, Fontana V et coll. (1997). *Sister chromatid exchange induction in peripheral blood lymphocytes of traffic police workers*. *Mutation Research* 394: 37-44.

Bonassi S, Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Bigatti P et coll. (1995). *Influence of sex on cytogenetic end points: evidence from a large human sample and review of the literature*. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 4: 671-679.

Bonassi S, Fontana V, Ceppi M, Barale R et Biggeri A (1999). *Analysis of correlated data in human biomonitoring studies. The case of high sister chromatid exchange frequency cells*. *Mutation Research Genetic Toxicology & Environmental Mutagenesis* 438: 13-21.

Bonassi S, Ugolini D, Kirsch-Volders M, Stromberg U, Vermeulen R et coll. (2005). *Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future prospectives*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 45: 258-270.

Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang WP et coll. (2007). *An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans*. *Carcinogenesis* 28: 625-631.

Bouchard M, Normandin L, Gagnon F, Viau C, Dumas P et coll. (2009). *Repeated measures of validated and novel biomarkers of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in individuals living near an aluminum plant in Quebec, Canada*. *J Toxicol Environ Health A* 72: 1534-1549.

Bouchard M et Viau C (1997). *Urinary excretion of benzo[a]pyrene metabolites following intravenous, oral, and cutaneous benzo[a]pyrene administration*. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 75: 185-192.

Boysen G et Hecht SS (2003). *Analysis of DNA and protein adducts of benzo[a]pyrene in human tissues using structure-specific methods*. *Mutation Research* 543: 17-30.

Braithwaite E, Wu X et Wang Z (1998). *Repair of DNA lesions induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-free extracts: involvement of two excision repair mechanisms in vitro*. *Carcinogenesis* 19: 1239-1246.

Brambilla G et Martelli A (2009). *Update on genotoxicity and carcinogenicity testing of 472 marketed pharmaceuticals*. *Mutation Research* 681: 209-229.

Brambilla G, Mattioli F, Robbiano L et Martelli A (2010). *Genotoxicity and carcinogenicity testing of pharmaceuticals: Correlations between induction of DNA lesions and carcinogenic activity*. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 705: 20-39.

- Brandt HC et Watson WP (2003). *Monitoring human occupational and environmental exposures to polycyclic aromatic compounds*. The Annals of Occupational Hygiene 47: 349-378.
- Brennan P (2002). *Gene-environment interaction and aetiology of cancer: what does it mean and how can we measure it?* Carcinogenesis 23: 381-387.
- Brits E, Schoeters G et Verschaeve L (2004). *Genotoxicity of PM10 and extracted organics collected in an industrial, urban and rural area in Flanders, Belgium*. Environmental Research 96: 109-118.
- Brondeau MT, Clavel T, Falcy M, Jargot D, Lafontaine M et coll. (1997). *Benzo[a]pyrène: fiche technique*. Rapport numéro FT 144, 6 p, (Institut National de Recherche et de Sécurité, Paris).
- Brusick DJ, Fields WR, Myhr BC et Doolittle DJ (2007). Genetic toxicology, Dans *Principles and methods of toxicology*, Hayes AW (ed)^(eds), (Informa Healthcare, New York), pages 1179-1222.
- Buchet JP, Ferreira M, Jr., Burrion JB, Leroy T, Kirsch-Volders M et coll. (1995). *Tumor markers in serum, polyamines and modified nucleosides in urine, and cytogenetic aberrations in lymphocytes of workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons*. American Journal of Industrial Medicine 27: 523-543.
- Bukvic N, Lovreglio P, Fanelli M, Susca FC, Ballini A et coll. (2009). *Influence of some detoxification enzyme polymorphisms on cytogenetic biomarkers between individuals exposed to very low doses of 1,3-butadiene*. Journal of Occupational and Environmental Medicine 51: 811-821.
- Bull CF, Beetstra-Hill S, Benassi-Evans BJ, Crott JW, Kimura M et coll. (2011). *Application and adaptation of the in vitro micronucleus assay for the assessment of nutritional requirements of cells for DNA damage prevention*. Mutagenesis 26: 193-197.
- Burchiel SW, Thompson TA, Lauer FT et Oprea TI (2007). *Activation of dioxin response element (DRE)-associated genes by benzo(a)pyrene 3,6-quinone and benzo(a)pyrene 1,6-quinone in MCF-10A human mammary epithelial cells*. Toxicology and Applied Pharmacology 221: 203-214.
- Burczynski ME et Penning TM (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.
- Burgaz S, Erdem O, Karahalil B et Karakaya AE (1998). *Cytogenetic biomonitoring of workers exposed to bitumen fumes*. Mutation Research 419: 123-130.
- Burgaz S, Iscan A, Buyukbingol ZK, Bozkurt A et Karakaya AE (1995). *Evaluation of micronuclei in exfoliated urothelial cells and urinary thioether excretion of smokers*. Mutation Research 335: 163-169.
- Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY et coll. (2007). *Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup*. Mutation Research 627: 31-35.

- Campo L, Rossella F, Pavanello S, Mielzynska D, Siwinska E et coll. (2010). *Urinary profiles to assess polycyclic aromatic hydrocarbons exposure in coke-oven workers*. *Toxicology Letters* 192: 72-78.
- Carbonell E, Peris F, Xamena N, Creus A et Marcos R (1995). *SCE analysis in human lymphocytes of a Spanish control population*. *Mutation Research* 335: 35-46.
- Carrano AV et Moore II DH (1982). The rationale and methodology for quantifying sister chromatid exchange in humans, Dans *Mutagenicity, new horizons in genetic toxicology*, Heddle JA (ed)^(eds), (Academic Press, New York), pages 267-304.
- Carstensen U, Alexandrie AK, Hogstedt B, Rannug A, Bratt I et coll. (1993). *B- and T-lymphocyte micronuclei in chimney sweeps with respect to genetic polymorphism for CYP1A1 and GST1 (class Mu)*. *Mutation Research* 289: 187-195.
- Carstensen U, Hou SM, Alexandrie AK, Hogstedt B, Tagesson C et coll. (1999). *Influence of genetic polymorphisms of biotransformation enzymes on gene mutations, strand breaks of deoxyribonucleic acid, and micronuclei in mononuclear blood cells and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine in potroom workers exposed to polyaromatic hydrocarbons*. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health* 25: 351-360.
- Casale GP, Singhal M, Bhattacharya S, RamaNathan R, Roberts KP et coll. (2001). *Detection and quantification of depurinated benzol[alpha] pyrene-adducted DNA bases in the urine of cigarette smokers and women exposed to household coal smoke*. *Chemical Research in Toxicology* 14: 192-201.
- Castedo M, Coquelle A, Vivet S, Vitale I, Kauffmann A et coll. (2006). *Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells*. *EMBO Journal* 25: 2584-2595.
- Caux C, Viau C, Guibert L et Roy DJ (2005). *Les aspects éthiques de l'utilisation des bioindicateurs en santé au travail*. Rapport numéro R-404, 77 p, (IRSST, Montréal).
- Cavallo D, Ursini CL, Bavazzano P, Cassinelli C, Frattini A et coll. (2006). *Sister chromatid exchange and oxidative DNA damage in paving workers exposed to PAHs*. *The Annals of Occupational Hygiene* 50: 211-218.
- Cavallo D, Ursini CL, Rondinone B et Iavicoli S (2009). *Evaluation of a suitable DNA damage biomarker for human biomonitoring of exposed workers*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 50: 781-790.
- Cazaux C (2010). *L'instabilité génétique, moteur de l'oncogénèse*. *Bull Cancer* 97: 1241-1251.
- Celik M, Donbak L, Unal F, Yuzbasioglu D, Aksoy H et coll. (2007). *Cytogenetic damage in workers from a coal-fired power plant*. *Mutation Research* 627: 158-163.
- Celik M, Yilmaz S, Aksoy H, Unal F, Yuzbasioglu D et coll. (2009). *Evaluation of the genotoxicity of Fusarium mycotoxin moniliformin in human peripheral blood lymphocytes*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 50: 431-434.

- Chandhok NS et Pellman D (2009). *A little CIN may cost a lot: revisiting aneuploidy and cancer*. *Current Opinion in Genetics and Development* 19: 74-81.
- Chang LW, Chang YC, Ho CC, Tsai MH et Lin P (2007). *Increase of carcinogenic risk via enhancement of cyclooxygenase-2 expression and hydroxyestradiol accumulation in human lung cells as a result of interaction between BaP and 17-beta estradiol*. *Carcinogenesis* 28: 1606-1612.
- Cheng YW, Hsieh LL, Lin PP, Chen CP, Chen CY et coll. (2001). *Gender difference in DNA adduct levels among nonsmoking lung cancer patients*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 37: 304-310.
- Chilson OP et Kelly-Chilson AE (1989). *Mitogenic lectins bind to the antigen receptor on human lymphocytes*. *European Journal of Immunology* 19: 389-396.
- Cho YH et Chung HW (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: 37-44.
- Chung HW, Kang SJ et Kim SY (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.
- Cimino MC (2006). *Comparative overview of current international strategies and guidelines for genetic toxicology testing for regulatory purposes*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 47: 362-390.
- Cloos J, Nieuwenhuis EJ, Boomsma DI, Kuik DJ, van der Sterre ML et coll. (1999). *Inherited susceptibility to bleomycin-induced chromatid breaks in cultured peripheral blood lymphocytes*. *Journal of the National Cancer Institute* 91: 1125-1130.
- Collins AR, Duthie SJ et Dobson VL (1993). *Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA*. *Carcinogenesis* 14: 1733-1735.
- Colognato R, Coppede F, Ponti J, Sabbioni E et Migliore L (2007). *Genotoxicity induced by arsenic compounds in peripheral human lymphocytes analysed by cytokinesis-block micronucleus assay*. *Mutagenesis* 22: 255-261.
- Combes R, Grindon C, Cronin MT, Roberts DW et Garrod J (2007). *Proposed integrated decision-tree testing strategies for mutagenicity and carcinogenicity in relation to the EU REACH legislation*. *Altern Lab Anim* 35: 267-287.
- Comings DE (1973). *A general theory of carcinogenesis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3324-3328.
- Corvi R, Albertini S, Hartung T, Hoffmann S, Maurici D et coll. (2008). *ECVAM retrospective validation of in vitro micronucleus test (MNT)*. *Mutagenesis* 23: 271-283.
- Crebelli R, Carta P, Andreoli C, Aru G, Dobrowolny G et coll. (2002). *Biomonitoring of primary aluminium industry workers: detection of micronuclei and repairable DNA lesions by alkaline SCGE*. *Mutation Research* 516: 63-70.

- Custer L, Zajc B, Sayer JM, Cullinane C, Phillips DR et coll. (1999). *Stereospecific differences in repair by human cell extracts of synthesized oligonucleotides containing trans-opened 7,8,9, 10-tetrahydrobenzo[a]pyrene 7,8-diol 9,10-epoxide N2-dG adduct stereoisomers located within the human K-ras codon 12 sequence*. *Biochemistry* 38: 569-581.
- Dabrowska D, Kot-Wasik A et Namiesnik J (2008). *Stability studies of selected polycyclic aromatic hydrocarbons in different organic solvents and identification of their transformation products*. *Polish Journal of Environmental Studies* 17: 17-24.
- Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC et coll. (1982). *Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79: 7824-7827.
- Dauer A, Hensel A, Lhoste E, Knasmuller S et Mersch-Sundermann V (2003). *Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of Hamamelis virginiana L. in metabolically competent, human hepatoma cells (Hep G2) using single cell gel electrophoresis*. *Phytochemistry* 63: 199-207.
- Decordier I, Cundari E et Kirsch-Volders M (2008). *Survival of aneuploid, micronucleated and/or polyploid cells: crosstalk between ploidy control and apoptosis*. *Mutation Research* 651: 30-39.
- Delacôte F et Lopez BS (2008). *Importance of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance: the trans-S double-strand break repair model*. *Cell Cycle* 7: 33-38.
- DeMarini DM (2004). *Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review*. *Mutation Research* 567: 447-474.
- Depault F, Cojocar M, Fortin F, Chakrabarti S et Lemieux N (2006). *Genotoxic effects of chromium(VI) and cadmium(II) in human blood lymphocytes using the electron microscopy in situ end-labeling (EM-ISEL) assay*. *Toxicology In Vitro* 20: 513-518.
- Dhillon V, Thomas P et 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.
- Dhillon VS, Thomas P, Iarmarcovai G, Kirsch-Volders M, Bonassi S et coll. (2011). *Genetic polymorphisms of genes involved in DNA repair and metabolism influence micronucleus frequencies in human peripheral blood lymphocytes*. *Mutagenesis* 26: 33-42.
- Dideberg V et Bours V (2005). *Intégration de la pharmacogénétique dans la pratique médicale*. *Revue Medicale de Liege* 60: 918-922.
- Digue L, Orsiere T, De Meo M, Mattei MG, Depetris D et coll. (1999). *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. Environmental and Molecular Mutagenesis* 34: 269-278.
- Divi RL, Beland FA, Fu PP, Von Tungeln LS, Schoket B et coll. (2002). *Highly sensitive chemiluminescence immunoassay for benzo[a]pyrene-DNA adducts: validation by comparison with other methods, and use in human biomonitoring. Carcinogenesis* 23: 2043-2049.
- Donbak L, Rencuzogullari E, Yavuz A et Topaktas M (2005). *The genotoxic risk of underground coal miners from Turkey. Mutation Research* 588: 82-87.
- Donmez-Altuntas H, Dumlupinar G, Imamoglu N, Hamurcu Z et Liman BC (2007). *Effects of the mycotoxin citrinin on micronucleus formation in a cytokinesis-block genotoxicity assay in cultured human lymphocytes. Journal of Applied Toxicology* 27: 337-341.
- Donmez-Altuntas H, Hamurcu Z, Imamoglu N et Liman BC (2003). *Effects of ochratoxin A on micronucleus frequency in human lymphocytes. Nahrung* 47: 33-35.
- Doornaert B, Pichard A et Gillet C (2003). *Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). Évaluation de la relation dose-réponse pour des effets cancérogènes: Approche substance par substance (facteurs d'équivalence toxique - FET) et approches par mélanges. Évaluation de la relation dose-réponse pour des effets non cancérogènes: Valeurs toxicologiques de référence (VTR). Rapport numéro 03DR177, 64 p, (INERIS, Verneuil-en-Halatte).*
- Dorrenhaus A, Muller T et Roos PH (2007). *Increased CYP1A1 expression in human exfoliated urothelial cells of cigarette smokers compared to non-smokers. Archives of Toxicology* 81: 19-25.
- Dreij K, Seidel A et Jernstrom 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: 655-664.
- Duffus JH, Nordberg M et Templeton DM (2007). *Glossary of terms used in toxicologie, 2nd edition. Pure and Applied Chemistry* 79: 1153-1344.
- Eastmond DA, Hartwig A, Anderson D, Anwar WA, Cimino MC et coll. (2009). *Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. Mutagenesis* 24: 341-349.
- Edgar BA et Orr-Weaver TL (2001). *Endoreplication cell cycles: more for less. Cell* 105: 297-306.
- El-Zein RA, Fenech M, Lopez MS, Spitz MR et Etzel CJ (2008). *Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay biomarkers identify lung cancer cases amongst smokers. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 17: 1111-1119.
- Elhajouji A, Lukamowicz M, Cammerer Z et Kirsch-Volders M (2011). *Potential thresholds for genotoxic effects by micronucleus scoring. Mutagenesis* 26: 199-204.
- Elhajouji A, Santos AP, Van Hummelen P et 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: 307-313.

Environnement Canada (2010). Inventaire national des rejets des polluants – données sur la pollution. Dernière mise à jour : 2010-05-06. Page consultée le 2010-02-08.

<http://www.ec.gc.ca/inrp-npri/default.asp?lang=Fr&n=4A577BB9-1>

Environnement Canada (2007). Exposition au rayonnement cosmique et voyages en avion. Dernière mise à jour : 2007-03-09. Page consultée le 2010-05-11.

<http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/radiation/comsic-cosmique-fra.php>

Espinoza F, Silverman D, Kogevinas M, Creus A, Fernandez F et coll. (2008). *Micronuclei assessment in the urothelial cells of women using hair dyes and its modulation by genetic polymorphisms*. *Cancer Letters* 263: 259-266.

Falk M, Lukasova E, Gabrielova B, Ondrej V et Kozubek S (2007). *Chromatin dynamics during DSB repair*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773: 1534-1545.

Falk M, Lukasova E et Kozubek S (2010). *Higher-order chromatin structure in DSB induction, repair and misrepair*. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 704: 88-100.

Farmer PB et Singh R (2008). *Use of DNA adducts to identify human health risk from exposure to hazardous environmental pollutants: the increasing role of mass spectrometry in assessing biologically effective doses of genotoxic carcinogens*. *Mutation Research* 659: 68-76.

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: 35-44.

Fenech M (2005). *The Genome Health Clinic and Genome Health Nutrigenomics concepts: diagnosis and nutritional treatment of genome and epigenome damage on an individual basis*. *Mutagenesis* 20: 255-269.

Fenech M (2007). *Cytokinesis-block micronucleus cytome assay*. *Nature Protocols* 2: 1084-1104.

Fenech M, Baghurst P, Luderer W, Turner J, Record S et coll. (2005). *Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability--results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia*. *Carcinogenesis* 26: 991-999.

Fenech M et Bonassi S (2011). *The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes*. *Mutagenesis* 26: 43-49.

Fenech M, Bonassi S, Turner J, Lando C, Ceppi M et coll. (2003). *Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in*

- binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project.* Mutation Research 534: 45-64.
- Fenech M et Morley AA (1985). *Measurement of micronuclei in lymphocytes.* Mutation Research 147: 29-36.
- Fentiman IS, Allen DS et Hamed H (2005). *Smoking and prognosis in women with breast cancer.* International Journal of Clinical Practice 59: 1051-1054.
- Ferguson-Smith MA (2008). *Cytogenetics and the evolution of medical genetics.* Genetics in Medicine 10: 553-559.
- Finnstrom N, Ask B, Dahl ML, Gadd M et Rane A (2002). *Intra-individual variation and sex differences in gene expression of cytochromes P450 in circulating leukocytes.* Pharmacogenomics Journal 2: 111-116.
- Flowers-Geary L, Harvey RG et Penning TM (1993). *Cytotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinones in rat and human hepatoma cells.* Chemical Research in Toxicology 6: 252-260.
- Flowers L, Ohnishi ST et Penning TM (1997). *DNA strand scission by polycyclic aromatic hydrocarbon o-quinones: role of reactive oxygen species, Cu(II)/Cu(I) redox cycling, and o-semiquinone anion radicals.* Biochemistry 36: 8640-8648.
- Fontana L, Lasfargues G, Ughetto S, Rogier S, Masdieu E et coll. (2001). *The micronucleus assay in human exfoliated urothelial cells: application in a genotoxicity study of workers exposed to a mineral jelly containing sodium nitrite and N-phenyl-1-naphthylamine.* Mutagenesis 16: 449-452.
- Forni A, Guanti G, Bukvic N, Ferri G et Foa V (1996). *Cytogenetic studies in coke oven workers.* Toxicology Letters 88: 185-189.
- Frenzilli G, Bosco E et Barale R (2000). *Validation of single cell gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds.* Mutation Research 468: 93-108.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W, Wood RD, Schultz RA et coll. *DNA repair and mutagenesis*, 2ième édition. (ASM Press, Washington DC., 2006), 1118 pages.
- Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM et coll. (1986). *A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma.* Nature 323: 643-646.
- Fukui K (2009). *Structural analyses of chromosomes and their constituent proteins.* Cytogenetic and Genome Research 124: 215-227.
- Gajski G, Ravlic S, Capuder Z et Garaj-Vrhovac V (2007). *Use of sensitive methods for detection of DNA damage on human lymphocytes exposed to p,p'-DDT: Comet assay and new criteria for scoring micronucleus test.* Journal of Environmental Science and Health Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes 42: 607-613.
- Ganem NJ et Pellman D (2007). *Limiting the proliferation of polyploid cells.* Cell 131: 437-440.

- Ganem NJ, Storchova Z et Pellman D (2007). *Tetraploidy, aneuploidy and cancer*. Current Opinion in Genetics and Development 17: 157-162.
- Garcia-Sagredo JM (2008). *Fifty years of cytogenetics: a parallel view of the evolution of cytogenetics and genotoxicology*. Biochimica et Biophysica Acta 1779: 363-375.
- Gautier M (2009). *La découvreuse oubliée de la trisomie 21*. La Recherche 10: 57-59.
- Gaziev AI, Sologub GR, Fomenko LA, Zaichkina SI, Kosyakova NI et coll. (1996). *Effect of vitamin-antioxidant micronutrients on the frequency of spontaneous and in vitro gamma-ray-induced micronuclei in lymphocytes of donors: the age factor*. Carcinogenesis 17: 493-499.
- Georgiadis P, Topinka J, Stoikidou M, Kaila S, Gioka M et coll. (2001). *Biomarkers of genotoxicity of air pollution (the AULIS project): bulky DNA adducts in subjects with moderate to low exposures to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and their relationship to environmental tobacco smoke and other parameters*. Carcinogenesis 22: 1447-1457.
- Geraud G, Laquerriere F, Masson C, Arnoult J, Labidi B et coll. (1989). *Three-dimensional organization of micronuclei induced by colchicine in PtK1 cells*. Experimental Cell Research 181: 27-39.
- Gerbal-Chaloin S, Duret C, Raulet E, Navarro F, Blanc P et coll. (2010). *Isolation and culture of adult human liver progenitor cells: in vitro differentiation to hepatocyte-like cells*. Methods in Molecular Biology 640: 247-260.
- Ghosh P, Basu A, Mahata J, Basu S, Sengupta M et coll. (2006). *Cytogenetic damage and genetic variants in the individuals susceptible to arsenic-induced cancer through drinking water*. International Journal of Cancer 118: 2470-2478.
- Giarelli E et Jacobs LA (2005). *Modifying cancer risk factors: the gene-environment interaction*. Seminars in Oncology Nursing 21: 271-277.
- Gibbs GW et Sévigny M (2007). *Mortality and cancer experience of Quebec aluminum reduction plant workers, part 4: cancer incidence*. Journal of Occupational and Environmental Medicine 49: 1351-1366.
- Gilgenkrantz S et Rivera EM (2003). *The history of cytogenetics. Portraits of some pioneers*. Annales de Genetique 46: 433-442.
- Godinho SA, Kwon M et Pellman D (2009). *Centrosomes and cancer: how cancer cells divide with too many centrosomes*. Cancer and Metastasis Reviews 28: 85-98.
- Gomez-Mendikute A, Etxeberria A, Olabarrieta I et Cajaraville MP (2002). *Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo(a)pyrene*. Marine Environmental Research 54: 431-436.
- Gonzalez-Barrera S, Cortes-Ledesma F, Wellinger RE et Aguilera A (2003). *Equal sister chromatid exchange is a major mechanism of double-strand break repair in yeast*. Molecular Cell 11: 1661-1671.

- Gonzalez Borroto JI, Creus A et Marcos R (2001). *Genotoxic evaluation of the furylethylene derivative 2-furyl-1-nitroethene in cultured human lymphocytes*. Mutation Research 497: 177-184.
- Gonzalez Cid M, Loria D, Vilensky M, Miotti JL et Matos E (1991). *Leather tanning workers: chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes and micronuclei in exfoliated cells in urine*. Mutation Research 259: 197-201.
- Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E et Horsthemke B (1989). *Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma*. Human Genetics 83: 155-158.
- Groupe scientifique sur l'eau (2006). Arsenic, Dans *Fiches synthèses sur l'eau potable et la santé humaine*, INSPQ (ed)^(eds), (Institut national de santé publique, Québec), pages 1-9.
- Gunter MJ, Divi RL, Kulldorff M, Vermeulen R, Haverkos KJ et coll. (2007). *Leukocyte polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adduct formation and colorectal adenoma*. Carcinogenesis 28: 1426-1429.
- Guyen GS, Guven M, Onaran H, Ulutin T et Hacınefioglu S (2006). *Individual sensitivity to cytogenetic effects of benzo[alpha]pyrene in cultured human lymphocytes: Influence of glutathione S-transferase M1 genotype*. Genetics & Molecular Biology 29: 142-147.
- Gyorffy E, Anna L, Gyori Z, Segesdi J, Minarovits J et coll. (2004). *DNA adducts in tumour, normal peripheral lung and bronchus, and peripheral blood lymphocytes from smoking and non-smoking lung cancer patients: correlations between tissues and detection by 32P-postlabelling and immunoassay*. Carcinogenesis 25: 1201-1209.
- Haas CE, Brazeau D, Cloen D, Booker BM, Frerichs V et coll. (2005). *Cytochrome P450 mRNA expression in peripheral blood lymphocytes as a predictor of enzyme induction*. European Journal of Clinical Pharmacology 61: 583-593.
- Hamza VZ et Mohankumar MN (2009). *Cytogenetic damage in human blood lymphocytes exposed in vitro to radon*. Mutation Research 661: 1-9.
- Hanahan D et Weinberg RA (2000). *The hallmarks of cancer*. Cell 100: 57-70.
- Hanawalt PC (2001). *Controlling the efficiency of excision repair*. Mutation Research 485: 3-13.
- Hartman J (2000). *Analysis of covariance (regression approach)*. Dernière mise à jour: 2000-12-11. Page consultée le 2010-05-07.
<http://bama.ua.edu/~jhartman/689/tutintro.html>
- Hatzi VI, Terzoudi GI, Stavropoulou C, Malik SI, Makropoulos V et coll. (2011). *Lack of association between GSTT1 polymorphism and endogenous or benzo[a]pyrene-induced sister chromatid exchanges as analyzed in metaphase or G2-phase lymphocytes*. Molecular Biology Reports 38: 3959-3966.
- Heddle JA et Bielias JH (2005). *Unifying concept of DNA repair: The polymerase scanning hypothesis*. Environmental and Molecular Mutagenesis 45: 143-149.

- Hess MT, Gunz D, Luneva N, Geacintov NE et Naegeli H (1997). *Base pair conformation-dependent excision of benzo[a]pyrene diol epoxide-guanine adducts by human nucleotide excision repair enzymes*. *Molecular and Cellular Biology* 17: 7069-7076.
- Himmelstein MW, Boogaard PJ, Cadet J, Farmer PB, Kim JH et coll. (2009). *Creating context for the use of DNA adduct data in cancer risk assessment: II. Overview of methods of identification and quantitation of DNA damage*. *Critical Reviews in Toxicology* 39: 679-694.
- Hirano S, Yamamoto K, Ishiai M, Yamazoe M, Seki M et coll. (2005). *Functional relationships of FANCC to homologous recombination, translesion synthesis, and BLM*. *EMBO Journal* 24: 418-427.
- Hirsch BA, Sentz KK et McGue M (1992). *Genetic and environmental influences on baseline SCE*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 20: 2-11.
- Hockley SL, Arlt VM, Brewer D, Te Poele R, Workman P et coll. (2007). *AHR- and DNA-damage-mediated gene expression responses induced by benzo(a)pyrene in human cell lines*. *Chemical Research in Toxicology* 20: 1797-1810.
- Hofer T, Karlsson HL et Moller L (2006). *DNA oxidative damage and strand breaks in young healthy individuals: a gender difference and the role of life style factors*. *Free Radical Research* 40: 707-714.
- Hoffelder DR, Luo L, Burke NA, Watkins SC, Gollin SM et coll. (2004). *Resolution of anaphase bridges in cancer cells*. *Chromosoma* 112: 389-397.
- Hofseth LJ, Dunn BP et Rosin MP (1996). *Micronucleus frequencies in urothelial cells of catheterized patients with chronic bladder inflammation*. *Mutation Research* 352: 65-72.
- Holland AJ et Cleveland DW (2009). *Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10: 478-487.
- Holland N, Fucic A, Merlo DF, Sram R et Kirsch-Volders M (2011). *Micronuclei in neonates and children: effects of environmental, genetic, demographic and disease variables*. *Mutagenesis* 26: 51-56.
- Holman RT, Deubig M et Hayes H (1966). *Pyrolysis chromatography of lipids. I. Mass spectrometric identification of pyrolysis products of hydrocarbons*. *Lipids* 1: 247-253.
- Holmen A, Karlsson A, Bratt I, Raihle G et Hogstedt B (1994). *Increased frequency of micronuclei in lymphocytes of Swedish chimney sweeps*. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 66: 185-187.
- Holz O, Krause T et Rudiger HW (1991). *Differences in DNA adduct formation between monocytes and lymphocytes after in vivo incubation with benzo[a]pyrene*. *Carcinogenesis* 12: 2181-2183.

- Hooven LA et Baird WM (2008). *Proteomic analysis of MCF-7 cells treated with benzo[a]pyrene, dibenzo[a,l]pyrene, coal tar extract, and diesel exhaust extract*. *Toxicology* 249: 1-10.
- Hosoya N, Sanada M, Nannya Y, Nakazaki K, Wang L et coll. (2006). *Genomewide screening of DNA copy number changes in chronic myelogenous leukemia with the use of high-resolution array-based comparative genomic hybridization*. *Genes, Chromosomes and Cancer* 45: 482-494.
- Hsu IC, Poirier MC, Yuspa SH, Grunberger D, Weinstein IB et coll. (1981). *Measurement of benzo(a)pyrene-DNA adducts by enzyme immunoassays and radioimmunoassay*. *Cancer Research* 41: 1091-1095.
- Hsu TM, Zhang YJ et Santella RM (1997). *Immunoperoxidase quantitation of 4-aminobiphenyl- and polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in exfoliated oral and urothelial cells of smokers and nonsmokers*. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 6: 193-199.
- Hu W, Feng Z et Tang MS (2003). *Preferential carcinogen-DNA adduct formation at codons 12 and 14 in the human K-ras gene and their possible mechanisms*. *Biochemistry* 42: 10012-10023.
- IARC-CIRC (2008). Polycyclic aromatic hydrocarbons, Dans *Air Pollution, Part 1, Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and some Industrial Exposures*, IARC (ed)^(eds), (Centre International de Recherche sur le Cancer, pages
- Iarmarcovai G, Bonassi S, Sari-Minodier I, Baciuchka-Palmaro M, Botta A et coll. (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 et Orsiere T (2006). *Number of centromeric signals in micronuclei and mechanisms of aneuploidy*. *Toxicology Letters* 166: 1-10.
- Iarmarcovai G, Botta A et Orsiere T (2007b). *[Changes in chromosome number, genetic instability, and occupational exposures]*. *Bull Cancer* 94: 381-388.
- Ichiba M, Hagmar L, Rannug A, Hogstedt B, Alexandrie AK et coll. (1994). *Aromatic DNA adducts, micronuclei and genetic polymorphism for CYP1A1 and GST1 in chimney sweeps*. *Carcinogenesis* 15: 1347-1352.
- ISO. *ISO 10993-3 Évaluation biologique des dispositifs médicaux -- Partie 3: Essais concernant la génotoxicité, la cancérogénicité et la toxicité sur la reproduction*, édition. 194 Ct, (Organisation Internationale de Normalisation, Genève, 2003), 17 pages.
- Jacobson-Kram D, Albertini RJ, Branda RF, Falta MT, Iype PT et coll. (1993). *Measurement of chromosomal aberrations, sister chromatid exchange, hprt mutations, and DNA adducts in peripheral lymphocytes of human populations at increased risk for cancer*. *Environmental Health Perspectives* 101 Suppl 3: 121-125.

- Jarvholm B, Nordstrom G, Hogstedt B, Levin JO, Wahlstrom J et coll. (1999). *Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and genotoxic effects on nonsmoking Swedish road pavement workers*. Scandinavian Journal of Work, Environment and Health 25: 131-136.
- Jen MH, Hwang JJ, Yang JY, Nabyvanets YB, Hsieh WA et coll. (2002). *Micronuclei and nuclear anomalies in urinary exfoliated cells of subjects in radionuclide-contaminated regions*. Mutation Research 520: 39-46.
- Jiang H, Gelhaus SL, Mangal D, Harvey RG, Blair IA et coll. (2007). *Metabolism of benzo[a]pyrene in human bronchoalveolar H358 cells using liquid chromatography-mass spectrometry*. Chemical Research in Toxicology 20: 1331-1341.
- Jie YM et Jia C (2001). *Chromosomal composition of micronuclei in mouse NIH 3T3 cells treated with acrylamide, extract of Tripterygium hypoglaucum (level) hutch, mitomycin C and colchicine, detected by multicolor FISH with centromeric and telomeric DNA probes*. Mutagenesis 16: 145-149.
- Johansson F, Lagerqvist A, Erixon K et Jensen D (2004). *A method to monitor replication fork progression in mammalian cells: nucleotide excision repair enhances and homologous recombination delays elongation along damaged DNA*. Nucleic Acids Res 32: e157.
- Johnson RD et Jasin M (2000). *Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells*. EMBO Journal 19: 3398-3407.
- Joseph P (2009). *Mechanisms of cadmium carcinogenesis*. ToxicolApplPharmacol 238: 272-279.
- Kalina I, Brezani P, Gajdosova D, Binkova B, Salagovic J et coll. (1998). *Cytogenetic monitoring in coke oven workers*. Mutation Research 417: 9-17.
- Kalthoff S, Ehmer U, Freiberg N, Manns MP et Strassburg CP (2010). *Interaction between oxidative stress sensor Nrf2 and xenobiotic-activated aryl hydrocarbon receptor in the regulation of the human phase II detoxifying UDP-glucuronosyltransferase 1A10*. Journal of Biological Chemistry 285: 5993-6002.
- Karahalil B, Burgaz S, Fisek G et Karakaya AE (1998). *Biological monitoring of young workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons in engine repair workshops*. Mutation Research 412: 261-269.
- Karp G. *Biologie cellulaire et moléculaire*, 3ième édition. (De Boeck, Bruxelles,, 2010), 840 pages.
- Kassie F, Darroudi F, Kundi M, Schulte-Hermann R et Knasmuller S (2001). *Khat (Catha edulis) consumption causes genotoxic effects in humans*. International Journal of Cancer 92: 329-332.
- Kasuba V, Sentija K, Garaj-Vrhovac V et Fucic A (1995). *Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes from control individuals*. Mutation Research 346: 187-193.

- Keshava C, Divi RL, Whipkey DL, Frye BL, McCanlies E et coll. (2005). *Induction of CYP1A1 and CYP1B1 and formation of carcinogen-DNA adducts in normal human mammary epithelial cells treated with benzo[a]pyrene*. *Cancer Letters* 221: 213-224.
- Kirkland D, Aardema M, Henderson L et Muller L (2005). *Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity*. *Mutation Research* 584: 1-256.
- Kirkland D, Reeve L, Gatehouse D et Vanparys P (2011). *A core in vitro genotoxicity battery comprising the Ames test plus the in vitro micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and in vivo genotoxins*. *Mutation Research* 721: 27-73.
- Kirsch-Volders M, Vanhauwaert A, De Boeck M et Decordier I (2002). *Importance of detecting numerical versus structural chromosome aberrations*. *Mutation Research* 504: 137-148.
- Kleinsasser NH, Wallner BC, Kastenbauer ER, Muenzenrieder RK et Harreus UA (2000). *Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the Comet assay*. *Mutation Research* 467: 21-30.
- Knudson AG (1971). *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68: 820-823.
- Knudson AG (2001). *Two genetic hits (more or less) to cancer*. *Nature Reviews Cancer* 1: 157-162.
- Knuutila S et Kovanen PE (1987). *Relative proportions of mitotic T and B cells in PHA-stimulated lymphocyte cultures*. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 29: 151-154.
- Kohle C et Bock KW (2007). *Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2*. *Biochemical Pharmacology* 73: 1853-1862.
- Komae N, Hibino Y et Sugano N (1999). *[Analysis of micronuclei induced under hyperthermic conditions in human lymphocyte culture by fluorescence in situ hybridization (FISH) and spectral karyotyping (SKY) methods]*. *Yakugaku Zasshi* 119: 763-772.
- Koo LC et Ho JH (1990). *Worldwide epidemiological patterns of lung cancer in nonsmokers*. *International Journal of Epidemiology* 19 Suppl 1: S14-23.
- Kopjar N, Miocic S, Ramic S, Milic M et Viculin T (2006). *Assessment of the radioprotective effects of amifostine and melatonin on human lymphocytes irradiated with gamma-rays in vitro*. *Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju* 57: 155-163.
- Kosmider B, Wyszynska K, Janik-Spiechowicz E, Osiecka R, Zyner E et coll. (2004). *Evaluation of the genotoxicity of cis-bis(3-aminoflavone)dichloroplatinum(II) in comparison with cis-DDP*. *Mutation Research* 558: 93-110.

- Koss LG et Melamed MR (2005a). Laboratory techniques, Dans *Koss' Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases*, Koss LG, Melamed MR (ed)^(eds), (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia), pages 1569-1635.
- Koss LG et Melamed MR (2005b). The lower urinary tract in the absence of cancer, Dans *Koss' Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases*, Koss LG, Melamed MR (ed)^(eds), (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia), pages 738-771.
- Koss LG et Melamed MR (2005c). The normal female genital tract, Dans *Koss' Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases*, Koss LG, Melamed MR (ed)^(eds), (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia), pages 183-226.
- Koss LG et Melamed MR (2005d). Tumors of the urinary tract in urine and brushings, Dans *Koss' Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases*, Koss LG, Melamed MR (ed)^(eds), (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia), pages 777-846.
- Kraemer SA, Meade EA et DeWitt DL (1992). *Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences*. Archives of Biochemistry and Biophysics 293: 391-400.
- Krishnaja AP et Sharma NK (2004). *Transmission of gamma-ray-induced unstable chromosomal aberrations through successive mitotic divisions in human lymphocytes in vitro*. Mutagenesis 19: 299-305.
- Krovat BC, Tracy JH et Omiecinski CJ (2000). *Fingerprinting of cytochrome P450 and microsomal epoxide hydrolase gene expression in human blood cells*. Toxicological Sciences 55: 352-360.
- Kubiak R, Belowski J, Szczeklik J, Smolik E, Mielzynska D et coll. (1999). *Biomarkers of carcinogenesis in humans exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons*. Mutation Research 445: 175-180.
- Labidi B, Gregoire M, Frackowiak S, Hernandez-Verdun D et Bouteille M (1987). *RNA polymerase activity in PtK1 micronuclei containing individual chromosomes. An in vitro and in situ study*. Experimental Cell Research 169: 233-244.
- Lacave R (2005). Histoire naturelle des cancers. Biologie des lésions précancéreuses., Dans *Cancérologie fondamentale*, Lacave R, Larsen C-J, Robert J (ed)^(eds), (Éditions John Libbey Eurotext, Montrouge), pages 165-172.
- Lagerqvist A, Hakansson D, Prochazka G, Lundin C, Dreij K et coll. (2008). *Both replication bypass fidelity and repair efficiency influence the yield of mutations per target dose in intact mammalian cells induced by benzo[a]pyrene-diol-epoxide and dibenzo[a,l]pyrene-diol-epoxide*. DNA Repair (Amst) 7: 1202-1212.
- Lai JS, Kuo HW, Liao FC et Lien CH (1998). *Sister chromatid exchange induced by chromium compounds in human lymphocytes*. International Archives of Occupational and Environmental Health 71: 550-553.
- Lanza A, Robustelli della Cuna FS, Zibera C, Pedrazzoli P et Robustelli della Cuna G (1999). *Somatic mutations at the T-cell antigen receptor in antineoplastic drug-*

- exposed populations: comparison with sister chromatid exchange frequency.* International Archives of Occupational and Environmental Health 72: 315-322.
- Larsen C-J (2005a). Oncogènes, Dans *Cancérologie fondamentale*, Lacave R, Larsen C-J, Robert J (ed)^(eds), (Éditions John Libbey Eurotext, Montrouge), pages 86-104.
- Larsen C-J (2005b). Transformation cellulaire maligne, Dans *Cancérologie fondamentale*, Lacave R, Larsen C-J, Robert J (ed)^(eds), (Éditions John Libbey Eurotext, Montrouge), pages 81-85.
- Latimer JJ, Johnson JM, Miles TD, Dimsdale JM, Edwards RP et coll. (2008). *Cell-type-specific level of DNA nucleotide excision repair in primary human mammary and ovarian epithelial cell cultures.* Cell and Tissue Research 333: 461-467.
- Lavoué J, Gérin M, Côté J et Lapointe R (2007). *Mortality and cancer experience of Quebec aluminum reduction plant workers. Part I: The reduction plants and coal tar pitch volatile (CTPV) exposure assessment.* Journal of Occupational and Environmental Medicine 49: 997-1008.
- Leach NT et 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.
- Lehucher-Michel MP, Amara-Mokrane YA, Devictor B, Catilina P et Botta A (1996). *Micronuclei kinetics of exfoliated urothelial cells.* Mutation Research 354: 1-7.
- Lejeune J, Gautier M et Turpin R (1959). *[Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children.]* Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences 248: 1721-1722.
- Leng S, Dai Y, Niu Y, Pan Z, Li X et coll. (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: 1631-1639.
- LeRoy G, Carroll R, Kyin S, Seki M et Cole MD (2005). *Identification of RecQL1 as a Holliday junction processing enzyme in human cell lines.* Nucleic Acids Res 33: 6251-6257.
- Lewtas J, Walsh D, Williams R et Dobias L (1997). *Air pollution exposure-DNA adduct dosimetry in humans and rodents: evidence for non-linearity at high doses.* Mutation Research 378: 51-63.
- Lieber MR, Gu J, Lu H, Shimazaki N et Tsai AG (2010). *Nonhomologous DNA End Joining (NHEJ) and Chromosomal Translocations in Humans.* Sub-Cellular Biochemistry 50: 279-296.
- Lieber MR, Yu K et Raghavan SC (2006). *Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations.* DNA Repair (Amst) 5: 1234-1245.
- Limsirichaikul S, Niimi A, Fawcett H, Lehmann A, Yamashita S et coll. (2009). *A rapid non-radioactive technique for measurement of repair synthesis in primary human*

- fibroblasts by incorporation of ethynyl deoxyuridine (EdU)*. *Nucleic Acids Res* 37: e31.
- Lin J, Swan GE, Shields PG, Benowitz NL, Gu J et coll. (2007). *Mutagen sensitivity and genetic variants in nucleotide excision repair pathway: genotype-phenotype correlation*. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 16: 2065-2071.
- Lin P, Hu SW et Chang TH (2003). *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*. *Toxicological Sciences* 71: 20-26.
- Lindberg HK, Falck GC, Jarventaus H et Norppa H (2008). *Characterization of chromosomes and chromosomal fragments in human lymphocyte micronuclei by telomeric and centromeric FISH*. *Mutagenesis* 23: 371-376.
- Liu AL, Lu WQ, Wang ZZ, Chen WH, Lu WH et coll. (2006). *Elevated levels of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, lymphocytic micronuclei, and serum glutathione S-transferase in workers exposed to coke oven emissions*. *Environmental Health Perspectives* 114: 673-677.
- Liu Q, Cao J, Li KQ, Miao XH, Li G et coll. (2009). *Chromosomal aberrations and DNA damage in human populations exposed to the processing of electronics waste*. *Environmental Science and Pollution Research International* 16: 329-338.
- Lloyd DR et Hanawalt PC (2000). *p53-dependent global genomic repair of benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide adducts in human cells*. *Cancer Research* 60: 517-521.
- Lo Jacono F, Stecca C et Duverger M (1992). *Mutagenic activation of benzo[a]pyrene by human red blood cells*. *Mutation Research* 268: 21-26.
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M et coll. *Biologie moléculaire de la cellule*, 3ième édition. (De Boeck, Bruxelles,, 2005), 1096 pages.
- Luch A (2005). *Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis*. *Nature Reviews Cancer* 5: 113-125.
- M'Bemba-Meka P, Lemieux N et Chakrabarti SK (2005). *Nickel compound-induced DNA single-strand breaks in chromosomal and nuclear chromatin in human blood lymphocytes in vitro: role of oxidative stress and intracellular calcium*. *Mutation Research* 586: 124-137.
- MacLean-Fletcher S et Pollard TD (1980). *Mechanism of action of cytochalasin B on actin*. *Cell* 20: 329-341.
- Madle S, Dean SW, Andrae U, Brambilla G, Burlinson B et coll. (1994). *Recommendations for the performance of UDS tests in vitro and in vivo*. *Mutation Research* 312: 263-285.

- Majer BJ, Laky B, Knasmuller S et Kassie F (2001). *Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials*. Mutation Research 489: 147-172.
- Major J, Jakab MG et Tompa A (1999). *The frequency of induced premature centromere division in human populations occupationally exposed to genotoxic chemicals*. Mutation Research 445: 241-249.
- Major J, Jakab MG et Tompa A (2001). *Working condition-related improvement in genotoxicological parameters of Hungarian road pavers*. Journal of Toxicology and Environmental Health 62: 319-331.
- Mamur S, Yuzbasioglu D, Unal F et Yilmaz S (2010). *Does potassium sorbate induce genotoxic or mutagenic effects in lymphocytes?* Toxicology In Vitro 24: 790-794.
- Mangal D, Vudathala D, Park JH, Lee SH, Penning TM et coll. (2009). *Analysis of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in cellular DNA during oxidative stress*. Chemical Research in Toxicology 22: 788-797.
- Manjer J, Malina J, Berglund G, Bondeson L, Garne JP et coll. (2001). *Smoking associated with hormone receptor negative breast cancer*. International Journal of Cancer 91: 580-584.
- Manno M, Viau C, Cocker J, Colosio C, Lowry L et coll. (2010). *Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA)*. Toxicology Letters 192: 3-16.
- Marie-Desvergne C, Maitre A, Bouchard M, Ravanat JL et Viau C (2010). *Evaluation of DNA adducts, DNA and RNA oxidative lesions, and 3-hydroxybenzo(a)pyrene as biomarkers of DNA damage in lung following intravenous injection of the parent compound in rats*. Chemical Research in Toxicology 23: 1207-1214.
- Marie C, Bouchard M, Heredia-Ortiz R, Viau C et Maitre A (2010). *A toxicokinetic 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, Maitre A, Douki T, Gateau M, Tarantini A et coll. (2008). *Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo[a]pyrene DNA adducts*. Journal of Applied Toxicology 28: 579-590.
- Matsuoka A, Matsuura K, Sakamoto H, Hayashi M et 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: 1-12.
- Matsuoka A, Ozaki M, Takeshita K, Sakamoto H, Glatt HR et coll. (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: 365-372.
- Mattiuzzo M, Fiore M, Ricordy R et Degrassi F (2006). *Aneuploidy-inducing capacity of two widely used pesticides*. Carcinogenesis 27: 2511-2518.

- Mattsson A, Jernstrom B, Cotgreave IA et Bajak E (2009). *H2AX phosphorylation in A549 cells induced by the bulky and stable DNA adducts of benzo[a]pyrene and dibenzo[a,l]pyrene diol epoxides*. *Chemico-Biological Interactions* 177: 40-47.
- Matullo G, Palli D, Peluso M, Guarrera S, Carturan S et coll. (2001). *XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects*. *Carcinogenesis* 22: 1437-1445.
- McKee GT (2003). Urinary tract cytology, Dans *Diagnostic Cytopathology*, Gray W, McKee GT (ed)^(eds), (Churchill Livingstone, London), pages 471-498.
- Melendez-Colon VJ, Luch A, Seidel A et Baird WM (2000). *Formation of stable DNA adducts and apurinic sites upon metabolic activation of bay and fjord region polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell cultures*. *Chemical Research in Toxicology* 13: 10-17.
- Merlo F, Bolognesi C, Peluso M, Valerio F, Abbondandolo A et coll. (1997). *Airborne levels of polycyclic aromatic hydrocarbons: 32P-postlabeling DNA adducts and micronuclei in white blood cells from traffic police workers and urban residents*. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology* 16: 157-162.
- Mielzynska D, Siwinska E, Kapka L, Szyfter K, Knudsen LE et coll. (2006). *The influence of environmental exposure to complex mixtures including PAHs and lead on genotoxic effects in children living in Upper Silesia, Poland*. *Mutagenesis* 21: 295-304.
- Migliore L, Bocciardi R, Macri C et Lo Jacono F (1993). *Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by four vanadium compounds and micronucleus analysis by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe*. *Mutation Research* 319: 205-213.
- Miller B, Potter-Locher F, Seelbach A, Stopper H, Utesch D et coll. (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*. *Gesellschaft fur Umwelt-Mutations-forschung*. *Mutation Research* 410: 81-116.
- Miller BM, Werner T, Weier HU et Nusse M (1992). *Analysis of radiation-induced micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) simultaneously using telomeric and centromeric DNA probes*. *Radiation Research* 131: 177-185.
- Miller K (1991). *Sister-chromatid exchange in human B- and T-lymphocytes exposed to bleomycin, cyclophosphamide, and ethyl methanesulfonate*. *Mutation Research* 247: 175-182.
- Miller KP et Ramos KS (2001). *Impact of cellular metabolism on the biological effects of benzo[a]pyrene and related hydrocarbons*. *Drug Metabolism Reviews* 33: 1-35.
- Miller ME, Holloway AC et Foster WG (2005). *Benzo-[a]-pyrene increases invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells via increased COX-II expression and prostaglandin E2 (PGE2) output*. *Clinical and Experimental Metastasis* 22: 149-156.

- Miner JK, Rom WN, Livingston GK et Lyon JL (1983). *Lymphocyte sister chromatid exchange (SCE) frequencies in coke oven workers*. Journal of Occupational Medicine 25: 30-33.
- Moller P (2006). *The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures*. Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology 98: 336-345.
- Monteiro P, Gilot D, Le Ferrec E, Rauch C, Lagadic-Gossmann D et coll. (2008). *Dioxin-mediated up-regulation of aryl hydrocarbon receptor target genes is dependent on the calcium/calmodulin/CaMKI α pathway*. Molecular Pharmacology 73: 769-777.
- Moore LE, Smith AH, Hopenhayn-Rich C, Biggs ML, Kalman DA et coll. (1997a). *Decrease in bladder cell micronucleus prevalence after intervention to lower the concentration of arsenic in drinking water*. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention 6: 1051-1056.
- Moore LE, Smith AH, Hopenhayn-Rich C, Biggs ML, Kalman DA et coll. (1997b). *Micronuclei in exfoliated bladder cells among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water*. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention 6: 31-36.
- Moore LE, Titenko-Holland N, Quintana PJ et Smith MT (1993). *Novel biomarkers of genetic damage in humans: use of fluorescence in situ hybridization to detect aneuploidy and micronuclei in exfoliated cells*. Journal of Toxicology and Environmental Health 40: 349-357.
- Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM et Hungerford DA (1960). *Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood*. Experimental Cell Research 20: 613-616.
- Motykiewicz G, Michalska J, Pendzich J, Malusecka E, Strozyk M et coll. (1998). *A molecular epidemiology study in women from Upper Silesia, Poland*. Toxicology Letters 96-97: 195-202.
- Motykiewicz G, Michalska J, Pendzich J, Perera FP et Chorazy M (1992). *A cytogenetic study of men environmentally and occupationally exposed to airborne pollutants*. Mutation Research 280: 253-259.
- Murray EB et Edwards JW (1999). *Micronuclei in peripheral lymphocytes and exfoliated urothelial cells of workers exposed to 4,4'-methylenebis-(2-chloroaniline) (MOCA)*. Mutation Research 446: 175-180.
- Murray EB et Edwards JW (2005). *Differential induction of micronuclei in peripheral lymphocytes and exfoliated urothelial cells of workers exposed to 4,4'-methylenebis-(2-chloroaniline) (MOCA) and bitumen fumes*. Reviews on Environmental Health 20: 163-176.
- Nagaraju G, Odate S, Xie A et Scully R (2006). *Differential regulation of short- and long-tract gene conversion between sister chromatids by Rad51C*. Molecular and Cellular Biology 26: 8075-8086.

- Natarajan AT, Obe G, van Zeeland AA, Palitti F, Meijers M et coll. (1980). *Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations. II. Utilization of Neurospora endonuclease for the study of aberration production by X-rays in G1 and G2 stages of the cell cycle*. Mutation Research 69: 293-305.
- Natarajan AT et Palitti F (2008). *DNA repair and chromosomal alterations*. Mutation Research 657: 3-7.
- Naushad SM, Pavani A, Digumarti RR, Gottumukkala SR et Kutala VK (2010). *Epistatic interactions between loci of one-carbon metabolism modulate susceptibility to breast cancer*. Molecular Biology Reports.
- Neri M, Fucic A, Knudsen LE, Lando C, Merlo F et coll. (2003). *Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review*. Mutation Research 544: 243-254.
- Neri M, Ugolini D, Bonassi S, Fucic A, Holland N et coll. (2006). *Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. II. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis*. Mutation Research 612: 14-39.
- Nordberg M, Duffus JH et Templeton DM (2007). *Explanatory dictionary of key terms in toxicology*. Pure and Applied Chemistry 79: 1583-1633.
- Nordling CO (1953). *A new theory on cancer-inducing mechanism*. British Journal of Cancer 7: 68-72.
- Norppa H (2004). *Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms*. Toxicology Letters 149: 309-334.
- Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, Hagmar L, Stromberg U et coll. (2006). *Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk*. Mutation Research 600: 37-45.
- Norppa H et Falck GC (2003). *What do human micronuclei contain?* Mutagenesis 18: 221-233.
- Nouspikel T et Hanawalt PC (2002). *DNA repair in terminally differentiated cells*. DNA Repair (Amst) 1: 59-75.
- Obe G, Beek B et Dudin G (1975). *The human leukocyte test system. V. DNA synthesis and mitoses in PHA-stimulated 3-day cultures*. Humangenetik 28: 295-302.
- Obe G et Durante M (2010). *DNA double strand breaks and chromosomal aberrations*. Cytogenetic and Genome Research 128: 8-16.
- Obe G, Johannes C et Schulte-Frohlinde D (1992). *DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation*. Mutagenesis 7: 3-12.
- OECD. *Test No. 479: In vitro sister chromatid exchange assay in mammalian cells*, édition. OECD Guidelines for the testing of chemicals. (OECD Publishing, Paris, 1986), 5 pages.

- OECD. *Test No. 473: In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test*, édition. OECD Guidelines for the testing of chemicals. (OECD Publishing, Paris, 1997), 10 pages.
- OECD. *Draft proposal for a new guideline 487: In vitro mammalian cell micronucleus test*, édition. (OECD Publishing, Paris, 2009), 24 pages.
- OECD (2010). *Chemical testing – Guidelines. Work plan for the Test Guidelines Programme (TGP) July 2010*. Dernière mise à jour: juillet 2010. Page consultée le 2010-07-29.
- http://www.oecd.org/department/0,3355,en_2649_34377_1_1_1_1_1,00.html
- Ohta M, Ozawa K, Okabe T, Urabe A et Takaku F (1985). *Induction of proliferation of human circulating monocytes in vitro by lectin-induced factor(s) from lymphocytes*. Biochemical and Biophysical Research Communications 126: 705-711.
- Ohtani-Fujita N, Fujita T, Aoike A, Osifchin NE, Robbins PD et coll. (1993). *CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene*. Oncogene 8: 1063-1067.
- Okano P, Miller HN, Robinson RC et Gelboin HV (1979). *Comparison of benzo(a)pyrene and (-)-trans-7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene metabolism in human blood monocytes and lymphocytes*. Cancer Research 39: 3184-3193.
- Okino ST, Quattrochi LC, Pookot D, Iwahashi M et Dahiya R (2007). *A dioxin-responsive enhancer 3' of the human CYP1A2 gene*. Molecular Pharmacology 72: 1457-1465.
- Onaran I, Guven G, Ozaydin A et Ulutin T (2001). *The influence of GSTM1 null genotype on susceptibility to in vitro oxidative stress*. Toxicology 157: 195-205.
- Orsiere T, Sari-Minodier I, Iarmarcovai G et Botta A (2006). *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*. Mutation Research 605: 30-41.
- Ostling O et Johanson KJ (1984). *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells*. Biochemical and Biophysical Research Communications 123: 291-298.
- Panigrahi AK et Pati D (2009). *Road to the crossroads of life and death: linking sister chromatid cohesion and separation to aneuploidy, apoptosis and cancer*. Critical Reviews in Oncology/Hematology 72: 181-193.
- Paques F et Haber JE (1999). *Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 63: 349-404.
- Park JH, Troxel AB, Harvey RG et Penning TM (2006). *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*. Chemical Research in Toxicology 19: 719-728.

- Pavanello S, Favretto D, Brugnone F, Mastrangelo G, Dal Pra G et coll. (1999). *HPLC/fluorescence determination of anti-BPDE-DNA adducts in mononuclear white blood cells from PAH-exposed humans*. *Carcinogenesis* 20: 431-435.
- Pavanello S, Kapka L, Siwinska E, Mielzynska D, Bolognesi C et coll. (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: 2795-2799.
- Peluso M, Munnia A, Piro S, Armillis A, Ceppi M et coll. (2010). *Smoking, DNA adducts and number of risk DNA repair alleles in lung cancer cases, in subjects with benign lung diseases and in controls*. *J Nucleic Acids* 2010: 386798.
- Perera FP, Hemminki K, Gryzbowska E, Motykiewicz G, Michalska J et coll. (1992). *Molecular and genetic damage in humans from environmental pollution in Poland*. *Nature* 360: 256-258.
- Perry P et Wolff S (1974). *New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids*. *Nature* 251: 156-158.
- Persily A et Hewett M (2010). *Using ASHRAE's new IAQ guide*. *ASHRAE Journal*: 75-82.
- Poirier MC (2004). *Chemical-induced DNA damage and human cancer risk*. *Nature Reviews Cancer* 4: 630-637.
- Poirier MC, Yuspa SH, Weinstein IB et Blobstein S (1977). *Detection of carcinogen-DNA adducts by radio-immunoassay*. *Nature (London)* 270: 186-188.
- Popp W, Vahrenholz C, Schell C, Grimmer G, Dettbarn G et coll. (1997). *DNA single strand breakage, DNA adducts, and sister chromatid exchange in lymphocytes and phenanthrene and pyrene metabolites in urine of coke oven workers*. *Occupational and Environmental Medicine* 54: 176-183.
- Potts PR, Porteus MH et Yu H (2006). *Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks*. *EMBO Journal* 25: 3377-3388.
- Prevedouros K, Brorstrom-Lunden E, C JH, Jones KC, Lee RG et coll. (2004). *Seasonal and long-term trends in atmospheric PAH concentrations: evidence and implications*. *Environmental Pollution* 128: 17-27.
- Ramamurthi M et Chuang JC (1997). *Field and Laboratory evaluations of a real-time PAH analyzer*. Rapport numéro EPA/600/R-97/034, 104 p, (US Environmental Protection Agency, Research Triangle Park).
- Randerath K, Reddy MV et Gupta RC (1981). *³²P-labeling test for DNA damage*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78: 6126-6129.
- Ranmuthugala G, Pilotto L, Smith W, Vimalasiri T, Dear K et coll. (2003). *Chlorinated drinking water and micronuclei in urinary bladder epithelial cells*. *Epidemiology* 14: 617-622.

- Rao CV, Yamada HY, Yao Y et Dai W (2009). *Enhanced genomic instabilities caused by deregulated microtubule dynamics and chromosome segregation: a perspective from genetic studies in mice*. *Carcinogenesis* 30: 1469-1474.
- Reali D, Di Marino F, Bahramandpour S, Carducci A, Barale R et coll. (1987). *Micronuclei in exfoliated urothelial cells and urine mutagenicity in smokers*. *Mutation Research* 192: 145-149.
- Reddy MV, Hemminki K et Randerath K (1991). *Postlabeling analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in white blood cells of foundry workers*. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 34: 177-185.
- Renaud J, Gagnon F, Michaud C et Boivin S (2007). *Évaluation de l'efficacité de la promotion du dépistage de l'arsenic dans les puis privés de l'Estrie*. *Bulletin d'information en santé environnementale* 18: 8-10.
- Rezaianzadeh A, Peacock J, Reidpath D, Talei A, Hosseini SV et coll. (2009). *Survival analysis of 1148 women diagnosed with breast cancer in Southern Iran*. *BMC Cancer* 9: 168.
- Richer CL, Senecal-Quevillon M et Duquette P (1987). *Analysis of low concentrations of 5-bromo-2-deoxyuridine on sister chromatid exchanges in human lymphocytes*. *Genome* 29: 165-168.
- Robertson AB, Klungland A, Rognes T et Leiros I (2009). *DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66: 981-993.
- Rodin SN et Rodin AS (2005). *Origins and selection of p53 mutations in lung carcinogenesis*. *Seminars in Cancer Biology* 15: 103-112.
- Rodrigues AS, Oliveira NG, Gil OM, Leonard A et Rueff J (2005). *Use of cytogenetic indicators in radiobiology*. *Radiation Protection Dosimetry* 115: 455-460.
- Ronald AR et Alfa MJ (1996). *Microbiology of the genitourinary system*, Dans *Medical microbiology*, Baron S (ed)^(eds), (The University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston), pages 1143-1157.
- Rooney DE et Czepulkowski BH. *Human Cytogenetics, a practical approach. Volume I: Constitutional analysis*, 2ième édition. Rickwood D, Hames BD, The practical approach series. (IRL press at Oxford University press, Oxford, 1992a), 274 pages.
- Rooney DE et Czepulkowski BH. *Human Cytogenetics, a practical approach. Volume II: Malignancy and acquired abnormalities.*, 2ième édition. Rickwood D, Hames BD, The practical approach series. (IRL press at Oxford University press, Oxford, 1992b), 293 pages.
- Rosefort C, Fauth E et Zankl H (2004). *Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay*. *Mutagenesis* 19: 277-284.
- Rosin MP et Anwar W (1992). *Chromosomal damage in urothelial cells from Egyptians with chronic Schistosoma haematobium infections*. *International Journal of Cancer* 50: 539-543.

- Rossella F, Campo L, Pavanello S, Kapka L, Siwinska E et coll. (2009). *Urinary polycyclic aromatic hydrocarbons and monohydroxy metabolites as biomarkers of exposure in coke oven workers*. *Occupational and Environmental Medicine* 66: 509-516.
- Ruan Q, Gelhaus SL, Penning TM, Harvey RG et Blair IA (2007). *Aldo-keto reductase- and cytochrome P450-dependent formation of benzo[a]pyrene-derived DNA adducts in human bronchoalveolar cells*. *Chemical Research in Toxicology* 20: 424-431.
- Rubin H (2001). *Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates*. *Carcinogenesis* 22: 1903-1930.
- Russo MT, De Luca G, Degan P et Bignami M (2007). *Different DNA repair strategies to combat the threat from 8-oxoguanine*. *Mutation Research* 614: 69-76.
- Ryberg D, Hewer A, Phillips DH et Haugen A (1994). *Different susceptibility to smoking-induced DNA damage among male and female lung cancer patients*. *Cancer Research* 54: 5801-5803.
- Saccone S, Pavlicek A, Federico C, Paces J et Bernardi G (2001). *Genes, isochores and bands in human chromosomes 21 and 22*. *Chromosome Research* 9: 533-539.
- Sadikovic B, Al-Romaih K, Squire JA et Zielenska M (2008a). *Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer*. *Current Genomics* 9: 394-408.
- Sadikovic B, Andrews J, Carter D, Robinson J et Rodenhiser DI (2008b). *Genome-wide H3K9 histone acetylation profiles are altered in benzopyrene-treated MCF7 breast cancer cells*. *Journal of Biological Chemistry* 283: 4051-4060.
- Sadikovic B et Rodenhiser DI (2006). *Benzopyrene exposure disrupts DNA methylation and growth dynamics in breast cancer cells*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 216: 458-468.
- Salama SA, Sierra-Torres CH, Oh HY, Hamada FA et Au WW (2001). *Variant metabolizing gene alleles determine the genotoxicity of benzo[a]pyrene*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 37: 17-26.
- Saleh-Gohari N, Bryant HE, Schultz N, Parker KM, Cassel TN et coll. (2005). *Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks*. *Molecular and Cellular Biology* 25: 7158-7169.
- Santé Canada (2008). Directives d'exposition concernant la qualité de l'air des résidences. Partie C. Substances faisant l'objet de recommandations pour la limitation de l'exposition. Dernière mise à jour : 2008-07-30. Page consultée le 2010-11-26. <http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/air/exposure-exposition/control-limitation-fra.php>
- Scherer G (2005). *Biomonitoring of inhaled complex mixtures--ambient air, diesel exhaust and cigarette smoke*. *Experimental and Toxicologic Pathology* 57 Suppl 1: 75-110.

- Schneider BL et Kulesz-Martin M (2004). *Destructive cycles: the role of genomic instability and adaptation in carcinogenesis*. Carcinogenesis 25: 2033-2044.
- Schoket B, Doty WA, Vincze I, Strickland PT, Ferri GM et coll. (1993). *Increased sensitivity for determination of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human DNA samples by dissociation-enhanced lanthanide fluoroimmunoassay (DELFLIA)*. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention 2: 349-353.
- Schoket B, Poirier MC, Mayer G, Torok G, Kolozsi-Ringelmann A et coll. (1999). *Biomonitoring of human genotoxicity induced by complex occupational exposures*. Mutation Research 445: 193-203.
- Schulte PA (1989). *A conceptual framework for the validation and use of biologic markers*. Environmental Research 48: 129-144.
- Schwartz D. *Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes*, 3ième édition. (Flammarion Médecine Sciences, Cachan, 1986), 318 pages.
- Seabright M (1971). *A rapid banding technique for human chromosomes*. Lancet (North American Edition) 2: 971-972.
- Sega GA, Owens JG et Cumming RB (1976). *Studies on DNA repair in early spermatid stages of male mice after in vivo treatment with methyl-, ethyl-, propyl-, and isopropyl methanesulfonate*. Mutation Research 36: 193-212.
- Sénécal-Quevillon M. Les échanges entre chromatides soeurs dans la sclérose en plaques: Anatomie, p 185 (Université de Montréal, 1985).
- Sénécal-Quevillon M, Duquette P et Richer CL (1986). *Analysis of sister-chromatid exchanges (SCEs) in familial and sporadic multiple sclerosis*. Mutation Research 161: 65-74.
- ISCN 2009: *An international system for human cytogenetic nomenclature*. Shaffer LG, Slovak ML et Campbell LJ (Eds). (S. Karger, Basel, 2009). 138 pages.
- Sharovskaja JJ, Vaiman AV, Solomatina NA et Kobliakov VA (2004). *Inhibition of gap junction intercellular communications in cell culture by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the absence of PAH metabolism*. Biochemistry 69: 413-419.
- Sherbet GV. *Genetic recombination in cancer*, édition. (Academic Press, Londres., 2003), 245 pages.
- Shi Q et King RW (2005). *Chromosome nondisjunction yields tetraploid rather than aneuploid cells in human cell lines*. Nature 437: 1038-1042.
- Shimada T (2006). *Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons*. Drug Metabolism and Pharmacokinetics 21: 257-276.
- Shimada T, Sugie A, Shindo M, Nakajima T, Azuma E et coll. (2003). *Tissue-specific induction of cytochromes P450 1A1 and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in engineered C57BL/6J mice of arylhydrocarbon receptor gene*. Toxicology and Applied Pharmacology 187: 1-10.

- Shinmura K, Iwaizumi M, Igarashi H, Nagura K, Yamada H et coll. (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: 365-374.
- Siest G, Jeannesson E, Marteau JB, Samara A, Marie B et coll. (2008). *Transcription factor and drug-metabolizing enzyme gene expression in lymphocytes from healthy human subjects*. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 36: 182-189.
- Siwinska E, Mielzynska D et Kapka L (2004). *Association between urinary 1-hydroxypyrene and genotoxic effects in coke oven workers*. *Occupational and Environmental Medicine* 61: e10.
- Skjelbred CF, Svendsen M, Haugan V, Eek AK, Clausen KO et coll. (2011). *Influence of GSTM1, GSTT1, GSTP1, NAT1, NAT2, EPHX1, MTR and MTHFR polymorphism on chromosomal aberration frequencies in human lymphocytes*. *Carcinogenesis* 32: 399-405.
- Slack JM (2002). *Conrad Hal Waddington: the last Renaissance biologist?* *Nature Reviews Genetics* 3: 889-895.
- Smart J et Daly AK (2000). *Variation in induced CYP1A1 levels: relationship to CYP1A1, Ah receptor and GSTM1 polymorphisms*. *Pharmacogenetics* 10: 11-24.
- Smith BJ, Curtis JF et Eling TE (1991). *Bioactivation of xenobiotics by prostaglandin H synthase*. *Chemico-Biological Interactions* 79: 245-264.
- Sram RJ, Beskid O, Binkova B, Chvatalova I, Lnenickova Z et coll. (2007a). *Chromosomal aberrations in environmentally exposed population in relation to metabolic and DNA repair genes polymorphisms*. *Mutation Research* 620: 22-33.
- Sram RJ, Beskid O, Rossnerova A, Rossner P, Lnenickova Z et coll. (2007b). *Environmental exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons--the interpretation of cytogenetic analysis by FISH*. *Toxicology Letters* 172: 12-20.
- Stich HF, Curtis JR et Parida BB (1982). *Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers*. *International Journal of Cancer* 30: 553-559.
- Stierum RH, Hageman GJ, Welle IJ, Albering HJ, Schreurs JG et coll. (1993). *Evaluation of exposure reducing measures on parameters of genetic risk in a population occupationally exposed to coal fly ash*. *Mutation Research* 319: 245-255.
- Storchova Z et Kuffer C (2008). *The consequences of tetraploidy and aneuploidy*. *Journal of Cell Science* 121: 3859-3866.
- Straif K, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F et coll. (2007). *Carcinogenicity of shift-work, painting, and fire-fighting*. *Lancet Oncology* 8: 1065-1066.
- Straif K, Baan R, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F et coll. (2005). *Carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons*. *Lancet Oncology* 6: 931-932.

- Suarez S, Rubio A, Sueiro RA et Garrido J (2003). *Sister chromatid exchanges and micronuclei analysis in lymphocytes of men exposed to simazine through drinking water*. Mutation Research Genetic Toxicology & Environmental Mutagenesis 537: 141-149.
- Surowy H, Rinckleb A, Luedeke M, Stuber M, Wecker A et coll. (2011). *Heritability of baseline and induced micronucleus frequencies*. Mutagenesis 26: 111-117.
- Szaefer H, Cichocki M, Brauze D et Baer-Dubowska W (2004). *Alteration in phase I and II enzyme activities and polycyclic aromatic hydrocarbons-DNA adduct formation by plant phenolics in mouse epidermis*. Nutrition and Cancer 48: 70-77.
- Szaefer H, Krajka-Kuzniak V et Baer-Dubowska W (2008). *The effect of initiating doses of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene on the expression of PAH activating enzymes and its modulation by plant phenols*. Toxicology 251: 28-34.
- Taioli E (2008). *Gene-environment interaction in tobacco-related cancers*. Carcinogenesis 29: 1467-1474.
- Tao GH, Yang LQ, Gong CM, Huang HY, Liu JD et coll. (2009). *Effect of PARP-1 deficiency on DNA damage and repair in human bronchial epithelial cells exposed to Benzo(a)pyrene*. Molecular Biology Reports 36: 2413-2422.
- Tarantini A, Maitre A, Lefebvre E, Marques M, Marie C et coll. (2009). *Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo[a]pyrene as a pure compound and in complex mixtures*. Mutation Research 671: 67-75.
- Tedeschi B, Cicchetti R, Argentin G, Caporossi D, Pittaluga M et coll. (2004). *Aphidicolin and bleomycin induced chromosome damage as biomarker of mutagen sensitivity: a twin study*. Mutation Research 546: 55-64.
- Tellez MG, Rodriguez HB, Olivares GQ, Sortibrán AN, Cetto AA et coll. (2007). *A phytotherapeutic extract of Equisetum myriochaetum is not genotoxic either in the in vivo wing somatic test of Drosophila or in the in vitro human micronucleus test*. Journal of Ethnopharmacology 111: 182-189.
- Terradas M, Martín M, Tusell L et Genescà A (2010). *Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell?* Mutation Research/Reviews in Mutation Research 705: 60-67.
- Testa A, Cordelli E, Stronati L, Marino C, Lovisolò GA et coll. (2004). *Evaluation of genotoxic effect of low level 50 Hz magnetic fields on human blood cells using different cytogenetic assays*. Bioelectromagnetics 25: 613-619.
- Thompson CL, McCoy Z, Lambert JM, Andries MJ et Lucier GW (1989). *Relationships among benzo(a)pyrene metabolism, benzo(a)pyrene-diol-epoxide:DNA adduct formation, and sister chromatid exchanges in human lymphocytes from smokers and nonsmokers*. Cancer Research 49: 6503-6511.
- Thompson LH et Hinz JM (2009). *Cellular and molecular consequences of defective Fanconi anemia proteins in replication-coupled DNA repair: mechanistic insights*. Mutation Research 668: 54-72.

- Thorpe PH, Gonzalez-Barrera S et Rothstein R (2007). *More is not always better: the genetic constraints of polyploidy*. Trends in Genetics 23: 263-266.
- Tian D, Ma H, Feng Z, Xia Y, Le XC et coll. (2001). *Analyses of micronuclei in exfoliated epithelial cells from individuals chronically exposed to arsenic via drinking water in inner Mongolia, China*. J Toxicol Environ Health A 64: 473-484.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A et coll. (2000). *Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing*. Environmental and Molecular Mutagenesis 35: 206-221.
- Titenko-Holland N, Moore LE et Smith MT (1994). *Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe*. Mutation Research 312: 39-50.
- Tornaletti S et Pfeifer GP (1994). *Slow repair of pyrimidine dimers at p53 mutation hotspots in skin cancer*. Science 263: 1436-1438.
- Tough IM, Buckton KE, Baikie AG et Court-Brown WM (1960). *X-ray-induced chromosome damage in man*. Lancet 2: 849-851.
- Tremblay C, Armstrong B, Theriault G et Brodeur J (1995). *Estimation of risk of developing bladder cancer among workers exposed to coal tar pitch volatiles in the primary aluminum industry*. American Journal of Industrial Medicine 27: 335-348.
- Trinkle-Mulcahy L et Lamond AI (2008). *Nuclear functions in space and time: gene expression in a dynamic, constrained environment*. FEBS Letters 582: 1960-1970.
- Triola MM et Triola MF. *Biostatistics for the Biological and Health Sciences with Statdisk*, édition. (Pearson Education, New York, 2006), 672 pages.
- Tsai KS, Yang RS et Liu SH (2004). *Benzo[a]pyrene regulates osteoblast proliferation through an estrogen receptor-related cyclooxygenase-2 pathway*. Chemical Research in Toxicology 17: 679-684.
- Tuimala J, Szekely G, Gundy S, Hirvonen A et Norppa H (2002). *Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: role in mutagen sensitivity*. Carcinogenesis 23: 1003-1008.
- Tuimala J, Szekely G, Wikman H, Jarventaus H, Hirvonen A et coll. (2004). *Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: effects on levels of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations*. Mutation Research 554: 319-333.
- Ulker OC, Ustundag A, Duydu Y, Yucesoy B et Karakaya A (2008). *Cytogenetic monitoring of coal workers and patients with coal workers' pneumoconiosis in Turkey*. Environmental and Molecular Mutagenesis 49: 232-237.
- Uppender MB, Habermann JK, McShane LM, Korn EL, Barrett JC et coll. (2004). *Chromosome transfer induced aneuploidy results in complex dysregulation of the cellular transcriptome in immortalized and cancer cells*. Cancer Research 64: 6941-6949.

- Uppstad H, Osnes GH, Cole KJ, Phillips DH, Haugen A et coll. (2011). *Sex differences in susceptibility to PAHs is an intrinsic property of human lung adenocarcinoma cells*. Lung Cancer 71: 264-270.
- USEPA (2008). *Fine Particles (PM_{2.5}) Designations - Basic information*. Dernière mise à jour : 2008-12-22. Page consultée le 2010-02-08.
<http://www.epa.gov/pmdesignations/basicinfo.htm>
- Utani K, Kawamoto JK et Shimizu N (2007). *Micronuclei bearing acentric extrachromosomal chromatin are transcriptionally competent and may perturb the cancer cell phenotype*. Molecular Cancer Research 5: 695-704.
- Valentin-Severin I, Thybaud V, Le Bon AM, Lhuguenot JC et Chagnon MC (2004). *The autoradiographic test for unscheduled DNA synthesis: a sensitive assay for the detection of DNA repair in the HepG2 cell line*. Mutation Research 559: 211-217.
- van Agen B, Maas LM, Zwingmann IH, Van Schooten FJ et Kleinjans JC (1997). *B[a]P-DNA adduct formation and induction of human epithelial lung cell transformation*. Environmental and Molecular Mutagenesis 30: 287-292.
- van Delft JH, Steenwinkel MS, van Asten JG, de Vogel N, Bruijntjes-Rozier TC et coll. (2001). *Biological monitoring the exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of coke oven workers in relation to smoking and genetic polymorphisms for GSTM1 and GSTT1*. Annals of Occupational Hygiene 45: 395-408.
- van Hoffen A, Natarajan AT, Mayne LV, van Zeeland AA, Mullenders LH et coll. (1993). *Deficient repair of the transcribed strand of active genes in Cockayne's syndrome cells*. Nucleic Acids Res 21: 5890-5895.
- Van Hummelen P, Gennart JP, Buchet JP, Lauwerys R et Kirsch-Volders M (1993). *Biological markers in PAH exposed workers and controls*. Mutation Research 300: 231-239.
- van Loon B, Markkanen E et Hubscher U (2010). *Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine*. DNA Repair (Amst) 9: 604-616.
- van Schooten FJ, van Leeuwen FE, Hillebrand MJ, de Rijke ME, Hart AA et coll. (1990). *Determination of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in white blood cell DNA from coke-oven workers: the impact of smoking*. Journal of the National Cancer Institute 82: 927-933.
- Vian L, Bichet N et Gouy D (1993). *The in vitro micronucleus test on isolated human lymphocytes*. Mutation Research 291: 93-102.
- Vlachodimitropoulos D, Norppa H, Autio K, Catalan J, Hirvonen A et coll. (1997). *GSTT1-dependent induction of centromere-negative and -positive micronuclei by 1,2:3,4-diepoxybutane in cultured human lymphocytes*. Mutagenesis 12: 397-403.
- Vral A, Fenech M et Thierens H (2011). *The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure*. Mutagenesis 26: 11-17.
- Wang H, Chen W, Zheng H, Guo L, Liang H et coll. (2007). *Association between plasma BPDE-Alb adduct concentrations and DNA damage of peripheral blood*

- lymphocytes among coke oven workers*. Occupational and Environmental Medicine 64: 753-758.
- Wang Y, Spitz MR, Zhu Y, Dong Q, Shete S et coll. (2003). *From genotype to phenotype: correlating XRCC1 polymorphisms with mutagen sensitivity*. DNA Repair (Amst) 2: 901-908.
- Warner ML, Moore LE, Smith MT, Kalman DA, Fanning E et coll. (1994). *Increased micronuclei in exfoliated bladder cells of individuals who chronically ingest arsenic-contaminated water in Nevada*. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention 3: 583-590.
- Warshawsky D, Livingston GK, Fonouni-Fard M et 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.
- Watson JD. *La double hélice : compte rendu personnel de la découverte de la structure de l'ADN* édition. (Hachette Littérature, Paris, 1984), 319 pages.
- Weis LM, Rummel AM, Masten SJ, Trosko JE et Upham BL (1998). *Bay or baylike regions of polycyclic aromatic hydrocarbons were potent inhibitors of Gap junctional intercellular communication*. Environmental Health Perspectives 106: 17-22.
- WHO (1993). *Biomarkers and risk assessment: concepts and principles*. Série Environmental Health Criteria, rapport numéro 155. World Health Organization.
- Wiencke JK, McDowell ML et Bodell WJ (1990). *Molecular dosimetry of DNA adducts and sister chromatid exchanges in human lymphocytes treated with benzo[a]pyrene*. Carcinogenesis 11: 1497-1502.
- Wiese FW, Thompson PA et Kadlubar FF (2001). *Carcinogen substrate specificity of human COX-1 and COX-2*. Carcinogenesis 22: 5-10.
- Wild CP (2009). *Environmental exposure measurement in cancer epidemiology*. Mutagenesis 24: 117-125.
- Wilms LC, Hollman PC, Boots AW et Kleinjans JC (2005). *Protection by quercetin and quercetin-rich fruit juice against induction of oxidative DNA damage and formation of BPDE-DNA adducts in human lymphocytes*. Mutation Research 582: 155-162.
- Wilson VL et Jones PA (1984). *Chemical carcinogen-mediated decreases in DNA 5-methylcytosine content of BALB/3T3 cells*. Carcinogenesis 5: 1027-1031.
- Wu J, Ramesh A, Nayyar T et Hood DB (2003). *Assessment of metabolites and AhR and CYP1A1 mRNA expression subsequent to prenatal exposure to inhaled benzo(a)pyrene*. International Journal of Developmental Neuroscience 21: 333-346.
- Wu X, Lippman SM, Lee JJ, Zhu Y, Wei QV et coll. (2002). *Chromosome instability in lymphocytes: a potential indicator of predisposition to oral premalignant lesions*. Cancer Research 62: 2813-2818.

- Wu X, Spitz MR, Amos CI, Lin J, Shao L et coll. (2006). *Mutagen sensitivity has high heritability: evidence from a twin study*. *Cancer Research* 66: 5993-5996.
- Wu X, Zheng Y-L et Hsu TC (2005). Mutagen-induced chromatid breakage as a marker of cancer risk, Dans *Molecular Toxicology protocols*, Keohavong P, Grant SG (ed)^(eds), (Humana press, New Jersey), pages 59-68.
- Xiao C, Chen S, Li J, Hai T, Lu Q et coll. (2002). *Association of HSP70 and genotoxic damage in lymphocytes of workers exposed to coke-oven emission*. *Cell Stress & Chaperones* 7: 396-402.
- Xue W et Warshawsky D (2005). *Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 206: 73-93.
- Yang X, Zheng J, Bai Y, Tian F, Yuan J et coll. (2007). *Using lymphocyte and plasma Hsp70 as biomarkers for assessing coke oven exposure among steel workers*. *Environmental Health Perspectives* 115: 1573-1577.
- Yasunaga J et Jeang KT (2009). *Viral transformation and aneuploidy*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 50: 733-740.
- Yeager RL, Reisman SA, Aleksunes LM et Klaassen CD (2009). *Introducing the "TCDD-inducible AhR-Nrf2 gene battery"*. *Toxicological Sciences* 111: 238-246.
- Yilmaz S, Unal F et Yuzbasioglu D (2009). *The in vitro genotoxicity of benzoic acid in human peripheral blood lymphocytes*. *Cytotechnology*.
- Yu D, Penning TM, Field JM et Berlin JA (2002). *Benzo[a]pyrene-7,8-dione is More Mutagenic than Anti -BPDE on p53 and is Dependent on the Generation of Reactive Oxygen Species*. *Polycyclic Aromatic Compounds* 22: 881-891.
- Yuzbasioglu D, Celik M, Yilmaz S, Unal F et Aksoy H (2006). *Clastogenicity of the fungicide afugan in cultured human lymphocytes*. *Mutation Research* 604: 53-59.
- Zeljezic D et Garaj-Vrhovac V (2004). *Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation*. *Toxicology* 200: 39-47.
- Zenz T, Mertens D, Dohner H et Stilgenbauer S (2008). *Molecular diagnostics in chronic lymphocytic leukemia - pathogenetic and clinical implications*. *Leuk Lymphoma* 49: 864-873.
- Zhang J, Ichiba M, Feng Y, Pan G, Hanaoka T et coll. (2000). *Aromatic DNA adducts in coke-oven workers, in relation to exposure, lifestyle and genetic polymorphism of metabolic enzymes*. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 73: 127-135.
- Zhang Y, Wu X, Guo D, Rechkoblit O, Geacintov NE et coll. (2002). *Two-step error-prone bypass of the (+)- and (-)-trans-anti-BPDE-N2-dG adducts by human DNA polymerases eta and kappa*. *Mutation Research* 510: 23-35.

Zijno A, Verdina A, Galati R, Leopardi P, Marcon F et coll. (2006). *Influence of DNA repair polymorphisms on biomarkers of genotoxic damage in peripheral lymphocytes of healthy subjects*. Mutation Research 600: 184-192.

Annexe I

Puissance statistique obtenue lors de l'analyse par ANOVA à mesures répétées des deux indicateurs au test des échanges entre chromatides-sœurs

Indicateur : Moyenne des ÉCS			
<i>Facteur</i>	<i>Effets intra-sujets</i>	<i>Contrastes intra-sujets</i>	<i>Effets inter-sujets</i>
Dose BaP	Test de sphéricité : 1,000	BaP 0 et BaP 0,1 : 1,000	1,000
		BaP 0,1 et BaP 1 : 1,000	Estimation de paramètre
		BaP 1 et BaP 5 : 0,820	- BaP 0 : 1,000 - BaP 0,1 : 1,000 - BaP 1 : 1,000 - BaP 5 : 1,000
Sexe (effets non-significatifs)	Test de sphéricité pour dose BaP en fonction du sexe : 0,16	<u>Dose BaP en fonction du sexe</u>	0,17
		BaP 0 et BaP 0,1 : 0,07	Estimation de paramètre
		BaP 0,1 et BaP 1 : 0,13	- BaP 0 : 0,08 - BaP 0,1 : 0,10 - BaP 1 : 0,22
		BaP 1 et BaP 5 : 0,13	- BaP 5 : 0,13
Indicateur : % CHF			
<i>Facteur</i>	<i>Effets intra-sujets</i>	<i>Contrastes intra-sujets</i>	<i>Effets inter-sujets</i>
Dose BaP	Test de sphéricité : 1,000	BaP 0 et BaP 0,1 : 0,99	1,000
		BaP 0,1 et BaP 1 : 1,000	Estimation de paramètre
		BaP 1 et BaP 5 : 0,98	- BaP 0 : 1,000 - BaP 0,1 : 0,98 - BaP 1 : 1,000 - BaP 5 : 1,000
Sexe (effets non-significatifs)	Test de sphéricité pour dose BaP en fonction du sexe : 0,16	<u>Dose BaP en fonction du sexe</u>	0,05
		BaP 0 et BaP 0,1 : 0,06	Estimation de paramètre
		BaP 0,1 et BaP 1 : 0,06	- BaP 0 : 0,15 - BaP 0,1 : 0,06 - BaP 1 : 0,07
		BaP 1 et BaP 5 : 0,34	- BaP 5 : 0,06

Annexe II

Modèles obtenus lors de l'analyse par régression linéaire multiple des biomarqueurs précoces, en tenant compte de la colinéarité existant entre certaines variables.

Variable dépendante : % CHF

<u>Variabiles explicatives</u>	<i>D</i>	<i>ddl</i>	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>p</i> (régression)
<i>Exposition au BaP</i>	20,52	27	0,664	0,441	1.2 x10 ⁻⁴
<u>Équation Modèle 1</u>					
% CHF = 22,61 + (5,01 × [BaP])					
<i>Exposition au BaP et adduits BPDE-ADN</i>	13,96	27	0,726	0,528	8.5 x10 ⁻⁵
<u>Équation Modèle 2</u>					
% CHF = 15,89 + (4,29 × [BaP]) + (0,01 × Adduits)					
<u>Variabiles exclues</u>					
Fréquence des MN, Fréquence des AC, BSB normalisés, MN par MNBN					

Variable dépendante : Moyenne des ÉCS

<u>Variable explicative</u>	<i>D</i>	<i>ddl</i>	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>p</i> (régression)
<i>Exposition au BaP</i>	18,15	27	0,641	0,411	2.4 x10 ⁻⁴
<u>Équation</u>					
Moyenne ÉCS = 10,12 + (0,66 × [BaP])					
<u>Variabiles exclues</u>					
Adduits BPDE-ADN, Fréquence des MN, Fréquence des AC, BSB normalisés, MN par MNBN					

Variable dépendante : Fréquence des AC

<u>Variable explicative</u>	<i>D</i>	<i>ddl</i>	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>p</i> (régression)
% CHF	13,10	27	0,579	0,335	0,001

Équation

$$\text{Fréquence AC} = 1,79 + (0,067 \times \% \text{ CHF})$$

Variables exclues

Exposition au BaP, Adduits BPDE-ADN, Moyenne des ÉCS, Fréquence des MN, BSB normalisés, MN par MNBN

Variable dépendante : Fréquence des MN

<u>Variable explicative</u>	<i>D</i>	<i>ddl</i>	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>p</i> (régression)
% CHF	5,25	38	0,353	0,124	0,028

Équation

$$\text{Fréquence MN} = 11,59 + (0,097 \times \% \text{ CHF})$$

Variables exclues

Exposition au BaP, Adduits BPDE-ADN, Moyenne des ÉCS, Fréquence des AC, BSB normalisés

Annexe III

Genotoxic effects of chromium(VI) and cadmium(II) in human blood lymphocytes using the electron microscopy *in situ* end-labeling (EM-ISEL) assay.

François Depault ^a, Marilena Cojocar ^{a,d}, Fléchère Fortin ^{a,d}, Saroj Chakrabarti ^b, Nicole Lemieux ^{a,c,d,*}

^aDépartement de pathologie et biologie cellulaire, Faculté de médecine, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

^bDépartement de santé environnementale et santé au travail, Faculté de médecine, Université de Montréal, C.P. 6128, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, H3C 3J7, Canada

^cDépartement de pathologie, Hôpital Sainte-Justine, 3175 chemin Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec, H3T 1C5, Canada

^dCentre de Recherche, Hôpital Sainte-Justine, 3175 chemin Côte Ste-Catherine, Montréal, Québec, H3T 1C5, Canada

Running title : In vitro genotoxicity of Cr(VI) and Cd(II)

* Corresponding author

Keywords: Genotoxicity; Chromium; Cadmium; DNA single-strand breaks; electron microscopy *in situ* end-labeling.

Abbreviations: EM : electron microscopy ; EM-ISEL : electron microscopy *in situ* end-labeling; IGP : immunogold particles; MMS : methyl methanesulfonate; S.D. : standard deviation; SSB : single-strand break.

Abstract

Evaluation of genotoxic effects of potassium chromate (K_2CrO_4) and cadmium chloride ($CdCl_2$) was carried out in human blood lymphocytes *in vitro* as measured by the electron microscopy *in situ* end-labeling (EM-ISEL). EM-ISEL was used to assess DNA single-strand breaks (SSBs) expressed as number of immunogold particles per μm^2 of chromatin at both chromosomal and nuclear DNA levels. Human lymphocytes were cultured in supplemented RPMI medium for 72 h including treatment for 2 h with K_2CrO_4 (0-150 μM), $CdCl_2$ (0-150 μM) or methyl methanesulfonate (500 μM) as a positive control. Quantification of SSBs by EM-ISEL showed that both compounds are genotoxic agents at non-cytotoxic concentrations. This study brings new information on the utility of EM-ISEL for the evaluation of genotoxicity and confirms the genotoxic effects induced by chromium and cadmium.

1. Introduction

Chromate is well known as human and animal carcinogens (IARC, 1990; De Flora, 2000). Occupational exposure to hexavalent chromate containing materials has been reported to occur during the production of chromate pigments (Davies, 1984), chrome plating (Sorahan et al., 1987; Gambelunghe et al., 2003), leather tanning (Stern et al., 1987) and stainless steel welding (IARC, 1990). Cadmium is also a toxic environmental contaminant that is carcinogenic in humans and laboratory animals (IARC, 1993; Waisberg et al., 2003). Occupational exposure to cadmium dusts and aerosols occurs during the smelting and refining of metal ores, during electroplating and welding, and during the manufacture of pigments, plastic stabilizers and batteries (IARC, 1993). Few studies have reported genotoxic effects in workers exposed to cadmium (Forni, 1992; Palus et al. 2003). However, the correlation between cadmium exposure and genotoxicity remains a subject of controversy.

A possible mechanism for metal-induced carcinogenesis may involve the interaction with DNA. Chromium causes a variety of DNA lesions such as DNA strand breaks, SCEs and mutations (De Flora et al., 1990; Wu et al., 2000; Hogdes et al., 2001, O'Brien et al., 2003). The oxidation state is the most important parameter for chromium toxicity. Cr(VI) can easily gain entry into cells via the sulphate transport protein, while Cr(III) is only poorly taken up by the cells. Furthermore, inside the cells, Cr(VI) is reduced by cellular reductants through reactive intermediates such as Cr(V) and Cr(IV), to the most stable Cr(III) state (Jennette, 1979; De Flora and Wettelhahn, 1989). Hydrogen peroxide (H₂O₂), normally present in cells, reacts with Cr(V) and leads to the formation of a hydroxyl radical via the Fenton reaction (Aiyar et al, 1990; Shi and Dalal, 1990). Formation of hydroxyl radicals seems to be the major cause of Cr(VI) genotoxicity (Kortenkamp et al., 1989). Unlike chromium, contradictory results regarding the DNA strand breaks inducing capacity of cadmium have been reported in the past two decades. Early investigations led to the conclusion that cadmium is a weak inducer of DNA breaks (Hartmann and Speit, 1994; Beyersmann and Hechtenberg, 1997), but subsequent studies revealed that even low micromolar concentrations of cadmium are efficient in inducing DNA breaks (Mikhailova et al., 1997; Mouron et al., 2001). Available evidences suggest that cadmium-induced DNA damage is the result of free radical generation; free radical scavengers and antioxidants are

indeed useful in protecting against cadmium-induced toxicity (Sugiyama, 1994; Forrester et al., 2000).

Several methods such as alkaline filter elution (Kohn et al., 1981), nick translation (Holz et al., 1993; Krause et al., 1993) and the single-cell gel electrophoresis assay (Singh et al., 1988) have been used to measure DNA single-strand breaks (SSBs). In this investigation, we have used the electron microscopy *in situ* end-labeling technique (EM-ISEL) originally proposed by Gosalvez et al. (1993) to further understand the usefulness of the DNA SSBs assay for assessing exposure to genotoxic substances. As this method does not require prior denaturation of the DNA using formamide, NaOH or heat, this enzymatic assay preserves the chromatin structure and allows a direct localization and quantification of DNA SSBs in both metaphase chromosomes and interphase nuclei at the electron microscopy (EM) level (Assad et al. 1997). Unlike the UDS assay (Kelly and Latimer, 2004), it does not necessitate radiolabeled isotopes and permits the detection of all DNA SSBs, whether they occur at sites being actively repaired or not. To date, the EM-ISEL method has been used by Fernandez et al. (1993) for the detection of DNA breaks in hydrogen peroxide-treated cells. In our laboratory, Assad et al. (1997) have adapted this method to measure biomaterial-induced genotoxicity *in vitro*.

The development of a more direct method of DNA SSBs detection using electron microscopy is of interest. This paper demonstrates a new *in vitro* method to complement existing techniques of DNA SSBs detection. Treatment with both Cr(VI) and Cd(II) at high concentrations has been previously shown, on many occasions, to induce DNA SSBs (Hartmann and Speit, 1994; Misra et al. 1998; De Flora et al. 2000). The main goal of this work was therefore to evaluate the efficiency of the new EM-ISEL technique to detect Cr(VI) and Cd(II) induced DNA breaks following non-cytotoxic, high dose exposure. To our knowledge, no study to date has utilized the EM-ISEL assay to evaluate the genotoxicity of heavy metals such as chromium and cadmium.

2. Materials and methods

2.1 Cells

Human peripheral blood was collected into sodium-heparinized vacutainers from a healthy non-smoking 24-year-old male subject without any apparent disease. All tests were repeated in three independent experiments to ensure reproducibility.

2.2. Chemicals

Potassium chromate (K_2CrO_4 , CAS no.: 7789-00-6; Sigma-Aldrich Canada Ltée, Oakville, Canada) and cadmium chloride ($CdCl_2$, CAS no.: 10108-64-2, Sigma-Aldrich Canada Ltée) were dissolved in required amounts of distilled water to prepare 10 mM stock solution, which was sterilized by filtration and stored at 4°C. Different aliquots of each stock solution were used to obtain the required final concentrations of Cr(VI) and Cd(II) in the culture medium. For each treatment, negative controls were prepared by omitting the metal ion treatment. Methyl methanesulfonate (MMS, CAS no.: 66-27-3, Sigma-Aldrich Canada Ltée) was used as a positive control.

2.3. Cytotoxicity testing

Isolation of lymphocytes from peripheral blood was done in Ficoll-Paque solution (Amersham Pharmacia Biotech Ltd, Oakville, Canada) as described by Fotino et al. (1971). The lymphocytes (1×10^6 cells/ml) were then cultured at 37°C in 2.45 ml aliquots of RPMI-1640 medium (Invitrogen Canada Inc., Burlington, Canada) supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen Canada Inc.), 0.1% gentamycin (Shering, Montreal, Canada), 1% glutamine (Invitrogen Canada Inc.) and 0.1% phytohemagglutinin (Murex Diagnostics, Dartford, England) (Lemieux et al., 1990). After 70 h of culture, cells were incubated for 2 h with 0.05 ml of either potassium chromate or cadmium chloride (0-150 μ M). Cytotoxicity was measured immediately after the 2 h treatment via the Trypan blue exclusion test (Basha et al. 1996). The percentage of viability was determined by using a hemocytometer.

2.4. Genotoxicity testing

2.4.1. Culture conditions and treatments

Aliquots of 0.3 ml of human peripheral blood in 5 ml of supplemented RPMI-1640 medium (Invitrogen Canada Inc.) were incubated for 72 h at 37°C including the 2 h treatment with 0.1 ml of either potassium chromate or cadmium chloride (0-150 µM) (Table 1, 2 and 3) which was introduced after 70 h. Finally, cells were arrested at metaphase by using colcemid (0.1 µg/ml, CAS no.: 64-86-8, Invitrogen Canada Inc.) 2 h before harvesting.

2.4.2. Harvesting and slide preparation

Cells were centrifuged and resuspended in KCl (0.075M, CAS no.: 7447-40-7, Sigma-Aldrich Canada Ltée), incubated at 37°C for 15 min, and fixed three times in absolute methanol glacial acetic acid (3:1 v/v, Fisher Scientific, Ottawa, Canada). Finally, chromosomes and nuclei were spread on cold slides.

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

DNA SSBs were detected using the electron microscopy *in situ* end-labeling assay according to Assad et al. (1997). The slides were incubated for 30 min at 37°C in a moist chamber with 100 units of *E. coli* Exonuclease III (New England Biolabs, Mississauga, Canada) (Figure 1a). *In situ* end-labeling was carried out using 25 µl of random primed labeling mix per slide, containing 24 µM dATP, dCTP, dGTP (Amersham, Oakville, Canada), 40 µM biotin-11-dUTP (Enzo Diagnostics, Farmingdale, NY), hexanucleotides primers and 1 unit of Klenow fragments at 37°C for 75 min (Figure 1b). Incorporated biotin-11-dUTP was detected immunocytochemically by successive incubations (at 37°C, 45 min each) with: 1% rabbit anti-biotin antibodies (RAB, Enzo Diagnostics), 1% biotinylated goat anti-rabbit antibodies (Invitrogen Canada Inc.), another 1% RAB incubation and, then, 10% anti-rabbit IgG-colloidal gold complexes of 10-nm particles (Sigma-Aldrich Canada Ltée) (Figure 1c). Finally, slide-selected areas containing mitoses and nuclei were transferred to electron microscopy nickel grids (J.B.E.M. Services, Montreal, Canada) following Messier et al. (1986).

Chromosomes and nuclei were observed and photographed with a Philips EM208 transmission electron microscope (Philips Electron Optics, Eindhoven, the Netherlands) at a magnification of 20 000X. DNA's density permits direct observation of interphase nuclei or metaphase chromosomes under EM. Labeling density was evaluated by counting the number of immunogold particles (IGPs) per μm^2 of chromatin in 10 chromosomes and 10 nuclei from different cells, per treatment. Only slides presenting a low background and a uniform immunogold labeling were chosen. Chromosomes were selected for their ease of identification and their small size for photographic purpose. Only cell nuclei with a round shape were selected.

Gold counts were performed on a Macintosh computer by using the public domain NIH Image program (written by Wayne Rasband at the U.S. National Institutes of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>). First, the threshold is fixed in order to subtract background, and the image is visualized in black and white by adjusting the greyscale. In this way, the gold particles (black dots) were clearly visible and were counted in a surface of one μm^2 .

2.4.4. Statistics

EM-ISEL data were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey-Kramer multiple comparison tests were used as post-*hoc* analysis. Statistics were performed using SPSS 10.0 for Macintosh (SPSS Inc., Chicago, USA).

3. Results

3.1. Cytotoxicity

Potassium chromate (K_2CrO_4) or cadmium chlorides (CdCl_2) were found non-cytotoxic for doses up to 150 μM after the 2 h treatment (data not shown).

3.2. Genotoxic effect as detected by EM-ISEL

The effects of 2 h exposure to either methyl methanesulfonate (MMS), potassium chromate (K_2CrO_4) or cadmium chloride (CdCl_2) on the induction of DNA SSBs in human lymphocyte interphase nuclei are shown in Table 1 and Fig. 1 a-f. The negative control

showed a low number of immunogold particles (IGPs) per μm^2 of chromatin (mean IGPs = 75). The positive control, MMS 500 μM , showed a three-fold increase of IGPs per μm^2 (mean IGPs = 223). The Tukey-Kramer test revealed a significant difference in the number of IGPs between the negative control and the following treatments: 500 μM MMS, 50, 150 μM of chromium and 25, 50, 150 μM of cadmium. There was no significant difference in the IGP number after treatment with 25 μM of chromium (mean IGPs = 73).

As compared with interphase nuclei, metaphase chromosome breaks seemed to be generally more abundant as shown in Table 2 and Fig. 2 a-f. The negative control exhibited a low IGP number (mean IGPs = 135). The positive control, MMS 500 μM , showed a 2.4-fold increase of IGPs per μm^2 (mean IGPs = 324). A significant difference was observed between the negative control and the following treatments: 500 μM MMS, 50, 150 μM of chromium and 25, 50, 150 μM of cadmium. There was no significant difference in the IGP number after treatment with 25 μM of chromium (mean IGPs = 120). As compared to the negative control, treated metaphase chromosomes showed increased uniform staining over the entire chromatin except for pericentromeric regions, which remained relatively unlabeled (Fig. 2 a-f).

4. Discussion

As previously reported by Assad et al. (1997, 1998, 1999), the EM-ISEL assay seems to be very efficient in detecting metal-induced DNA SSBs. As such, we have compared the genotoxic effects of cadmium and chromium with that of MMS, which has been used extensively as a standard model for the induction of DNA SSBs (Boerrigter et al., 1991). In our experiments, addition of cadmium chloride significantly caused an increase of DNA strand breaks in both metaphase chromosomes and interphase nuclei of human lymphocytes at different non-cytotoxic concentrations (25-150 μM) (Table 1, 2). However, no dose-response relationship for Cd-induced DNA SSBs was observed. This might indicate that mechanisms involved in Cd-mediated genotoxicity were saturated even at the lowest concentration of Cd (25 μM) used. Based on the literature reported so far, the

results concerning the genotoxic effect of cadmium are however contradictory. Cadmium was generally considered to be a weak genotoxic agent capable of generating DNA strand breaks only after treatment with high cytotoxic concentrations. For example, Hartmann and Speit (1994) reported no increase of DNA breaks in human lymphocytes at concentrations of Cd(II) below 500 μM after 2 h of exposure. Similarly, in four rat cell lines tested, increases in DNA damage (measured as DNA strand breaks and DNA-protein crosslinks) have been observed only at cadmium concentrations (50 μM and 100 μM for 24 h exposure) that completely arrested cell growth (Misra et al., 1998). Furthermore, no increase in DNA migration, as measured by the comet assay, was found in uncultured human lymphocytes obtained from 3 out of 4 human subjects tested, when exposed to 1 mM or 5 mM CdCl_2 for 3 h (Rozgaj et al., 2002). In the same study, a 3 h exposure to 100 μM CdCl_2 gave divergent results as only 2 out of 4 presented a significant increase in DNA migration. In contrast, other studies in human cell lines showed an increase of DNA breakage at low micromolar concentrations of cadmium (up to 50 μM) (Mikhailova et al., 1997; Mouron et al., 2001). Various exposure factors such as fetal calf serum concentrations, duration of treatment and different species of cadmium used have been reported to greatly influence cadmium genotoxicity (Mouron et al., 2001; Wang and Lee, 2001).

Our results also showed that potassium chromate can strongly increase DNA breaks in human blood lymphocytes at non-cytotoxic concentrations (50 and 150 μM) (Table 1, 2). These results agree with many previous studies reviewed by De Flora et al. (2000) demonstrating that hexavalent chromium induces DNA SSBs at micromolar concentrations in different systems. Surprisingly in our conditions, chromium at 25 μM concentration was unable to provoke a significant labeling increase at the EM level. Similar results have been reported by Hodges et al. (2001) who have found that chromium at concentrations lower than 50 μM is unable to significantly increase the frequency of DNA SSBs in human lymphocytes. Thus, chromium in the present study appears to be less genotoxic, immediately after 2 h exposure, than cadmium at low concentration (25 μM) and more genotoxic than cadmium at relatively higher concentration (150 μM) for both metaphase and interphase chromatin. Finally, all metal treatments have demonstrated a lower EM-ISEL labeling in nuclei compared to chromosomes. As already postulated by Assad et al.

(1999), the lower compaction present in nuclei may result in a lower density of DNA damage per μm^2 of chromatin compared to the metaphase chromosomes.

In conclusion, the present data confirms that Cr(VI) and Cd(II) can induce DNA SSBs in both metaphase and interphase human lymphocyte chromatin and that these can be scored using the EM-ISEL assay. Overall, this study shows that the EM-ISEL assay offers additional possibilities for the determination of genotoxic potential induced by metal compounds.

Acknowledgments

The authors sincerely thank the Department of Pathology (Hôpital Sainte-Justine, Montréal) for use of their EM facilities. They also thank Dr. C.L. Richer and Dr M. Assad for carefully reading this manuscript, as well as J. Léveillé for his excellent photographic work.

References

- Aiyar J., Berkovits H.J., Floyd R.A. and Wetterhahn K.E. (1990) Reaction of chromium(VI) with hydrogen peroxide in the presence of glutathione: reactive intermediates and resulting DNA damage. *Chemical Research in Toxicology* **3**, 595-603.
- Assad M., Lemieux N. and Rivard C.H. (1997) Immunogold electron microscopy *in situ* end-labeling (EM-ISEL): assay for biomaterial DNA damage detection. *Bio-Medical Materials & Engineering* **7**, 391-400.
- Assad M., Yahia L'H., Rivard C.H. and Lemieux N. (1998) *In vitro* biocompatibility assessment of a Nickel-Titanium alloy using electron microscopy *in situ* end-labeling (EM-ISEL). *Journal of Biomedical Materials Research* **41**, 154-161.
- Assad M., Rivard C.H., Yahia L'H. and Lemieux N. (1999) Comparative *in vitro* biocompatibility of nickel-titanium, pure nickel, pure titanium, and stainless steel: genotoxicity and atomic absorption evaluation. *Bio-Medical Materials & Engineering* **9**, 1-12.
- Basha G., Yap P. and Penninckx F. (1996) Comparative study of classical, colorimetric and immunologic staining method for the assessment of tumor cell viability. *Tumour Biology* **17**, 354-361.
- Beyersmann D. and Hechtenberg S. (1997) Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **144**, 247-261.
- Boerrigter M., Mullaart E. and Vijg J. (1991) Induction and disappearance of DNA strand breaks in human peripheral blood lymphocytes and fibroblasts treated with methyl methanesulfonate. *Experimental Cell Research* **192**, 61-66.
- Davies J.M. (1984) Lung cancer mortality among workers making lead chromate and zinc chromate pigments at three English factories. *British Journal of Industrial Medicine* **41**, 158-169.
- De Flora S., Bagnasco M., Serra D. and Zancchi P. (1990) Genotoxicity of chromium compounds, a review. *Mutation Research* **238**, 99-172.
- De Flora S. and Wetterhahn K.E. (1989) Mechanisms of chromium metabolism and genotoxicity. *Life Chemistry Reports* **7**, 169-244.

De Flora S. (2000) Threshold mechanisms and site specificity in chromium(VI). *Carcinogenesis* **21**, 533-541.

Fernandez J.L., Gosalvez J. and Goyanes V.J. (1993) Detection of DNA strand breaks induced by hydroxyl radicals in nuclear and chromosomal chromatin by electron microscopy. *Cytobios* **73**, 189-195.

Forni A. (1992) Chromosomal effects of cadmium exposure in humans. In: *Cadmium in human environment: toxicity and carcinogenicity Vol. 118*. Edited by Norberg G.F., Herbert R. & Alessio L. pp. 337-383. IARC Scientific Publication, Lyon.

Fotino M., Merson E.J. and Allen F.H. (1971) Micromethod for rapid separation of lymphocytes from peripheral blood. *Annals of Clinical Laboratory Science* **1**, 131-133.

Forrester L.W., Latinwo L.M., Fasanya-Odewumi C., Ikediobi C., Mbuya O. and Nwoga J. (2000) Comparative studies of cadmium-induced single-strand breaks in female and male rats and ameliorative effect of selenium. *International Journal of Molecular Medicine* **6**, 449-452.

Gambelunghe A., Piccinini R., Ambrogi M., Villarini M., Moretti M., Marchetti C., Abbritti G. and Muzi G. (2003) Primary DNA damage in chrome-plating workers. *Toxicology* **188**, 187-195.

Gosalvez J., Lopez-Fernandez C., Garcia de la Vega C., Mezzanotte R., Fernandez J.L. and Goyanes V. (1993) Selective digestion of mouse chromosomes with restriction endonucleases. Oligonucleotide priming of single-stranded DNA produced with exonuclease. *Genome* **36**, 230-234.

Hartmann A. and Speit G. (1994) Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the single cell gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **23**, 299-305.

Hodges N.J., Adam B., Lee A.J., Cross H.J. and Chipman J.K. (2001) Induction of DNA-strand breaks in human peripheral blood lymphocytes and A549 lung cells by sodium dichromate: association with 8-oxo-2-deoxyguanosine formation and inter-individual variability. *Mutagenesis* **16**, 467-474.

Holz O., Meissner R., Einhaus M., Koops F., Warncke K., Scherer G., Adlkofer F., Baumgartner E. and Rudiger H.W. (1993) Detection of DNA single-strand breaks in lymphocytes of smokers. *International Archives of Occupational and Environmental Health* **65**, 83-88.

International Agency for Research on Cancer, Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (1990) *Chromium, Nickel and Welding Vol. 49*. pp. 677. IARC Scientific Publication, Lyon.

International Agency for Research on Cancer, Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (1993) *Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry / IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Vol. 58*. pp. 444. IARC Scientific Publication, Lyon.

Jennette K.W. (1979) Chromate metabolism in liver microsomes. *Biological Trace Element Research* **1**, 55-62.

Kelly C.M. and Latimer J.J. (2004) Unscheduled DNA synthesis: a functional assay for global genomic nucleotide excision repair. In *Molecular Toxicology Protocols*. Edited by Phouthone K. and Grant S.G. pp. 303-320. Humana Press, Sweden.

Kohn K.W., Ewing R.A.G., Erickson L.C. and Zwelling D.A. (1981) DNA repair. In: *Laboratory manual*. Edited by: Friedberg E.C. & Hanawalt P.C. pp. 379-401. Marcel Decker, New-York.

Kortenkamp A., Ozolins Z., Beyersmann D. and O'Brien P. (1989) Generation of PM2 DNA breaks in the course of reduction of chromium(VI) by glutathione. *Mutation Research* **216**, 19-26.

Krause T., Einhaus M., Holz O., Meissner R., Baumgartner E. and Rudiger H.W. (1993) A novel technique for the detection of DNA single-strand breaks in human white blood cells and its combination with the unscheduled DNA synthesis assay. *International Archives of Occupational and Environmental Health* **65**, 77-82.

Lemieux N., Drouin R. and Richer C.L. (1990) High-resolution dynamic and morphological G-bandings (GBG and GTG): a comparative study. *Human Genetics* **85**, 261-266.

Messier P.E., Jean P. and Richer C.L. (1986) Easy transfer of selected mitoses from light to electron microscopy. *Cytogenetics and Cell Genetics* **43**, 207-210.

Mikhailova M.V., Littlefield N.A., Hass B.S., Poirier L.A. and Chou M.W. (1997) Cadmium-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation, DNA strand breaks and antioxidant enzyme activities in lymphoblastoid cells. *Cancer Letters* **115**, 141-148.

Misra R.R., Smith G.T. and Waalkes M.P. (1998) Evaluation of the direct genotoxic potential of cadmium in four different rodent cell lines. *Toxicology* **126**, 103-114.

Mouron S.A., Golijow C.D. and Dulout F.N. (2001) DNA damage by cadmium and arsenic salts assessed by the single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research* **498**, 47-55.

O'Brien T.J., Ceryak S. and Patierno S.R. (2003) Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutation Research* **533**, 3-36.

Palus J., Rydzynski K., Dziubaltowska E., Wyszynska K., Natarajan A.T. and Nilsson R. (2003) Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutation Research* **540**, 19-28.

Rozgaj R., Kasuba V. and Fucic A. (2002) Genotoxicity of cadmium chloride in human lymphocytes evaluated by the comet assay and cytogenetic tests. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **16**, 187-192.

Shi X. and Dalal N.S. (1990) Evidence for a Fenton-type mechanism for the generation of .OH radicals in the reduction of Cr(VI) in cellular media. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **281**, 90-95.

Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R. and Schneider E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* **175**, 184-191.

Sorahan T., Burges D.C. and Waterhouse J.A. (1987) A mortality study of nickel/chromium platers. *British Journal of Industrial Medicine* **44**, 250-258.

- Stern F.B., Beaumont J.J., Halperin W.E., Murthy L.I., Hills B.W. and Fajen J.M. (1987) Mortality of chrome leather tannery workers and chemical exposures in tanneries. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health* **13**, 108-117.
- Sugiyama,M. (1994) Role of cellular antioxidants in metal-induced damage. *Cell Biology and Toxicology* **10**, 1-22.
- Waisberg M., Joseph P., Hale B. and Beyersmann D. (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* **192**, 95-117.
- Wang T.C. and Lee M.L. (2001) Effect of fetal calf serum on the cadmium clastogenicity. *Mutation Research* **498**, 79-87.
- Wu F.Y., Tsai F.J., Kuo H.W., Tsai C.H., Wu W.Y., Wang R.Y. and Lai J.S. (2000) Cytogenetic study of workers exposed to chromium compounds. *Mutation Research* **464**, 289-296.

TABLE 1

Labeling density for DNA single-strand breaks (number of immunogold particles per μm^2 \pm standard deviation [S.D.]) by EM-ISEL in human lymphocyte nuclear chromatin.

Treatment ^a	Concentration (μM)	IGPs (per μm^2) ^b	S.D.
Negative control ^c	0	75	10
Positive control ^d	500	223*	12
K_2CrO_4	25	73	5
	50	195*	13
	150	298*	15
CdCl_2	25	190*	20
	50	205*	22
	150	164*	24

^a 2 hour-exposure

^b Particles were scored on 10 nuclei per treatment in three independent experiments.

^c Supplemented RPMI medium 1640 and colcemid.

^d Methyl methanesulfonate.

* $p < 0.001$ versus control.

TABLE 2

Labeling density for DNA single-strand breaks (number of immunogold particles per μm^2 \pm standard deviation [S.D.]) by EM-ISEL in human lymphocyte metaphase chromatin.

Treatment ^a	Concentration (μM)	IGPs (per μm^2) ^b	S.D.
Negative control ^c	0	135	28
Positive control ^d	500	324*	22
K_2CrO_4	25	120	21
	50	277*	17
	150	615*	33
CdCl_2	25	299*	46
	50	322*	44
	150	265*	35

^a 2 hour exposure.

^b Particles were scored on 10 chromosomes from 10 different metaphases per treatment in three independent experiments.

^c Supplemented RPMI medium 1640 and colcemid.

^d Methyl methanesulfonate.

* $p < 0.001$ versus control.

Legend to figures

Figure 1. The electron microscopy *in situ* end-labeling (EM-ISEL) technique. a) Chromosomes and nuclei were exposed to exonuclease III which amplifies DNA lesions by releasing nucleotides at 5' ends of breaks, b) the resulting single-stranded DNA was filled by the klenow fragment after hybridization of short hexanucleotides as primers, incorporating the biotinylated dUTP present in the reaction mixture, c) incorporation of biotin-11-dUTP was detected by immunogold binding (black dots).

Figure 2. Electron microscopy *in situ* end-labeling of lymphocyte nuclear-chromatin: (a) untreated, (b) 500 μ M MMS-treated, (c) 50 μ M Cr-treated, (d) 150 μ M Cr-treated, (e) 25 μ M Cd-treated, (f) 150 μ M Cd-treated. Original magnification 20 000X.

Figure 3. Electron microscopy *in situ* end-labeling of lymphocyte metaphase chromosomes: (a) untreated, (b) 500 μ M MMS-treated, (c) 50 μ M Cr-treated, (d) 150 μ M Cr-treated, (e) 25 μ M Cd-treated, (f) 150 μ M Cd-treated. Original magnification 20 000X.

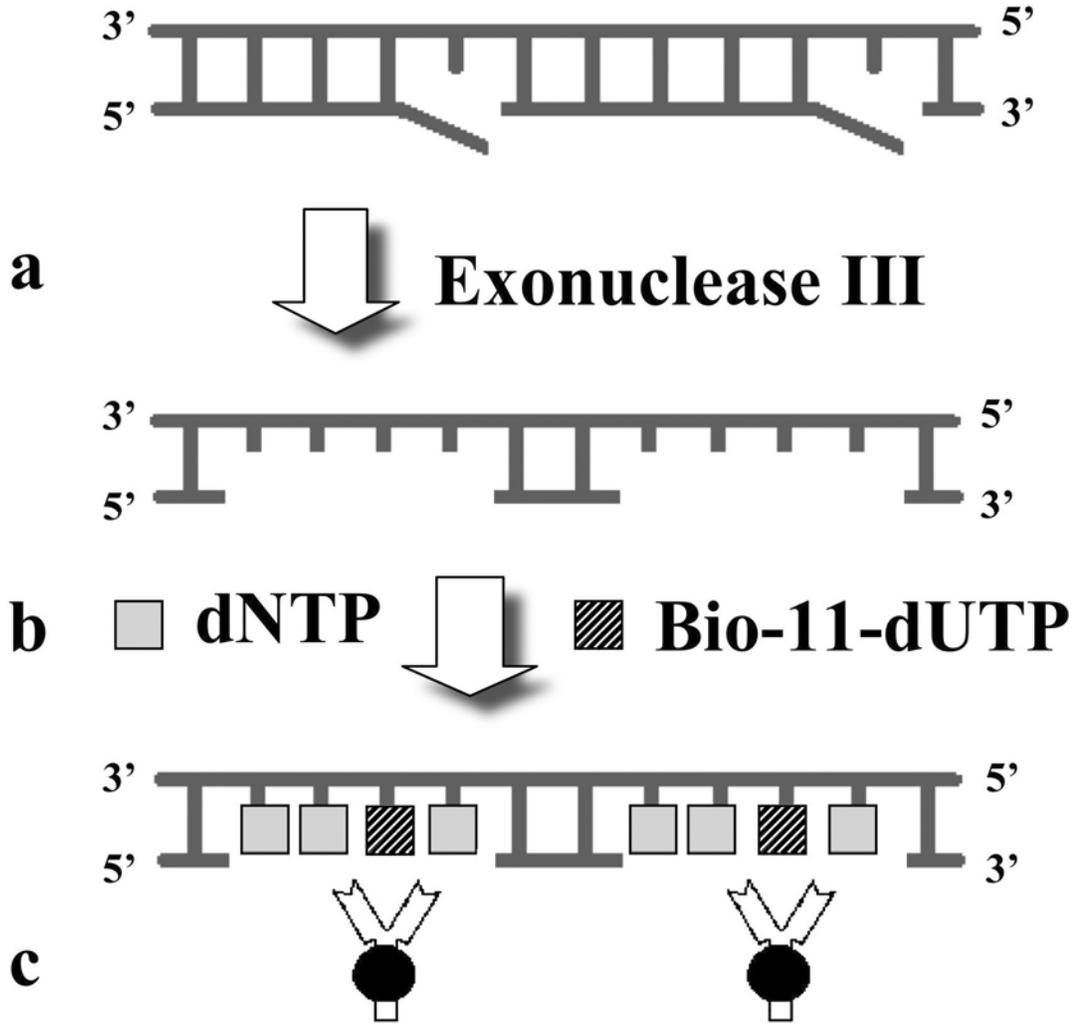


Figure 1

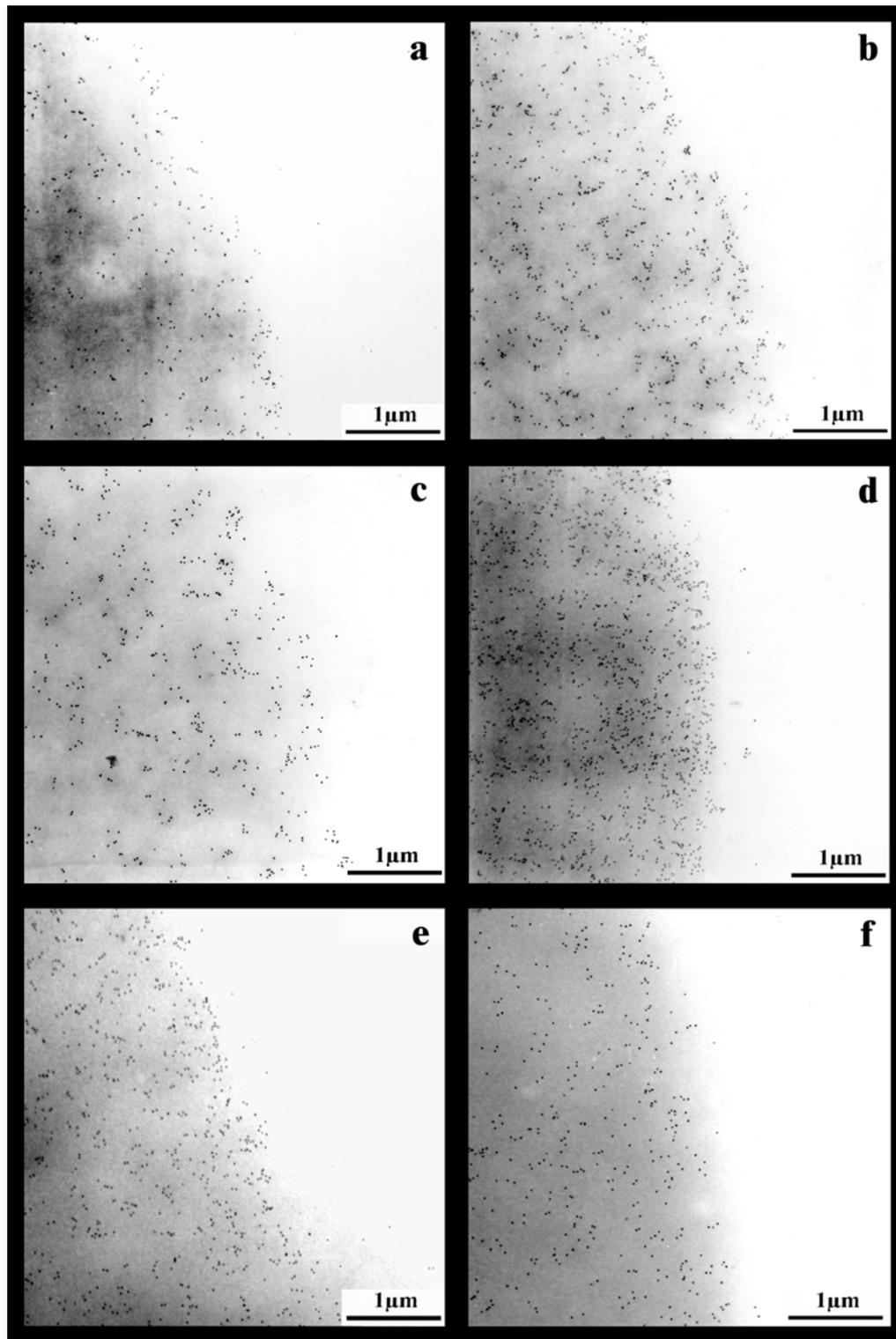


Figure 2

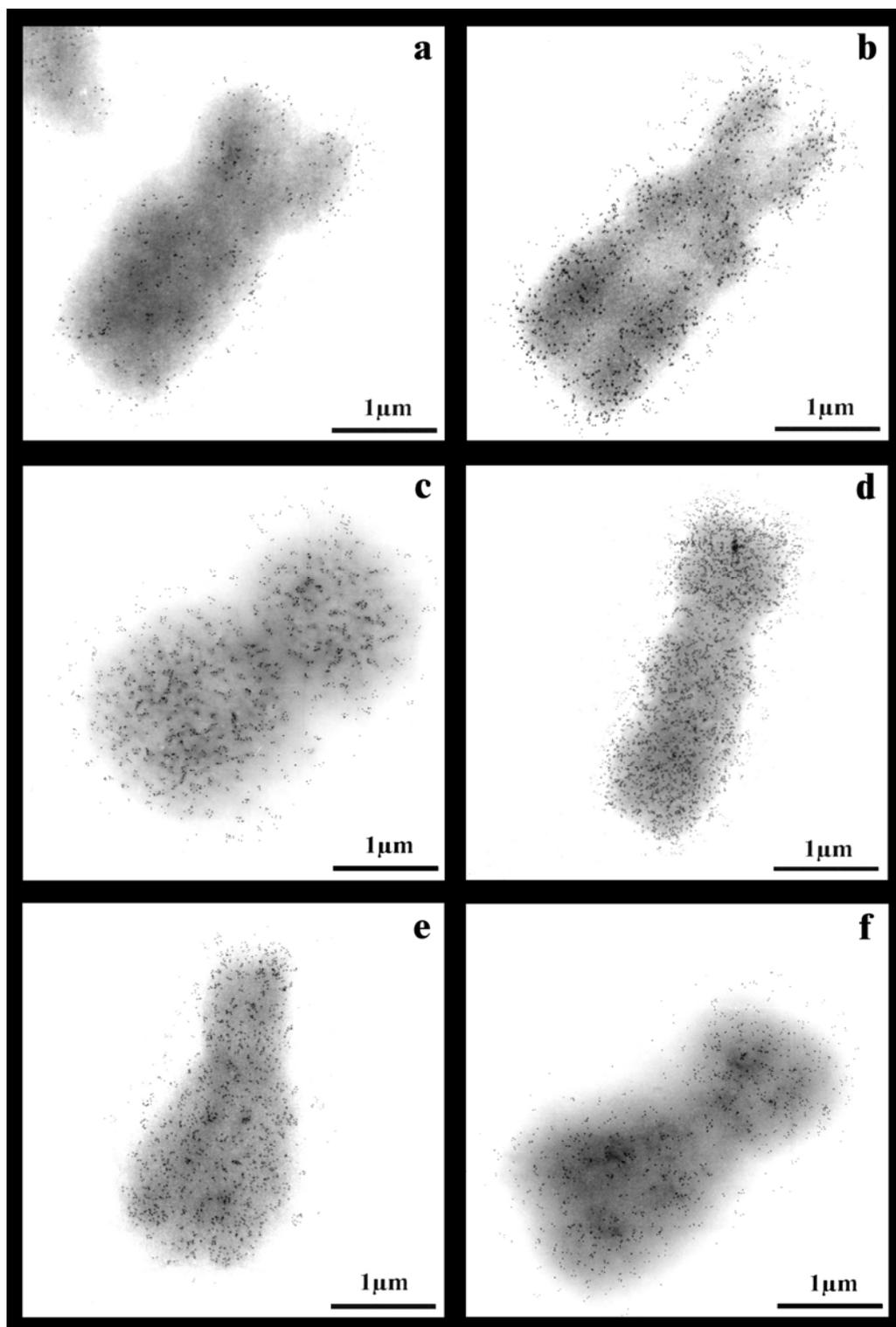
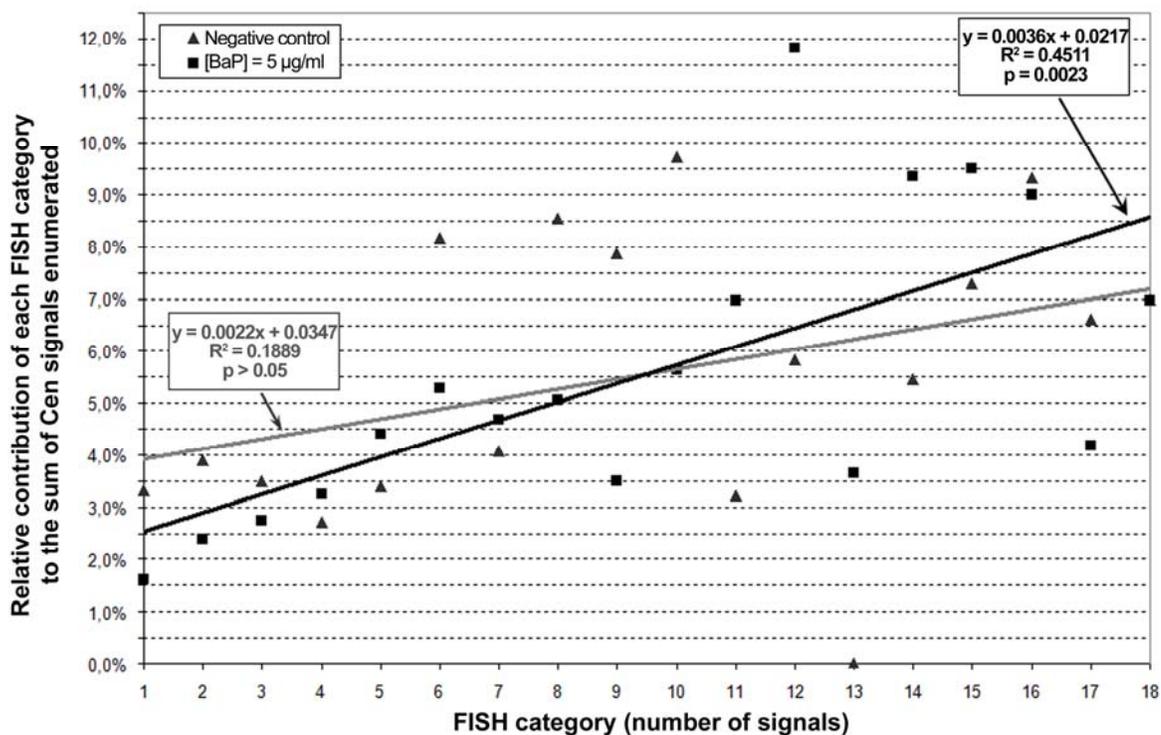


Figure 3

Annexe IV

Régression linéaire illustrant la contribution relative de chaque catégorie de signaux FISH à la somme de signaux énumérés lors de l'hybridation *in situ* en fluorescence des MNs avec une sonde pancentromérique, pour le contrôle négatif et la condition [BaP] = 5 µg/ml.

La ligne grise représente la régression linéaire de la condition contrôle négatif, alors que la ligne noire représente la régression linéaire de la condition [BaP] = 5 µg/ml. La comparaison statistique des droites de régression par ANCOVA montre qu'elles sont significativement différentes ($p = 1,5 \times 10^{-6}$).



Annexe V

Formulaire de consentement, projet CERFM-68(05)4#175

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

Titre du projet : Étude in vitro de la cytogénotoxicité du benzo-a-pyrène chez l'humain par EM-ISEL et ECS sur lymphocytes en culture: évaluation de la dose et du temps d'exposition minimaux génotoxiques, de la réponse interindividuelle, de l'effet de genre et de l'influence des polymorphismes enzymatiques.

(Étude des facteurs influençant les dommages causés à l'ADN humain par une exposition au benzo-a-pyrène des cellules du sang.)

Nom du ou des chercheur(s) :

Nicole Lemieux, Ph.D.

Professeure agrégée au département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal

Directrice du laboratoire de diagnostic clinique en cytogénétique au département de pathologie et chercheure affiliée au Centre de recherche, CHU Sainte-Justine

Claude Viau, D.Sc.

Professeur titulaire

Département de santé environnementale et santé au travail, Université de Montréal

Fléchère Fortin

Étudiante au doctorat

Département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal

Centre de recherche, Hôpital Sainte-Justine

Description du projet :

Le benzo-a-pyrène (BaP) est un Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dont la capacité à induire le cancer est considérée comme probable chez l'humain. Les HAPs sont émis lors de la combustion incomplète des matières organiques, sous forme de mélanges complexes 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) ou occupationnelles. Au Québec, c'est la production d'aluminium qui représente la plus grande source de production de HAPs.

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 HAP potentiellement cancérigènes. Pour exercer ses effets toxiques, le BaP doit être biotransformé dans la cellule en un composé instable et très réactif qui peut se lier au glutathion, permettant d'éliminer dans l'urine le métabolite indésirable. Il peut aussi s'inactiver en se liant à l'ADN, causant des lésions qui pourraient mener à l'apparition du cancer. Cependant, ce ne sont pas tous les individus exposés qui développeront ultimement un cancer. Il existe donc des variations entre les individus et la cause de ces variations n'est pas connue. Différents facteurs pourraient être impliqués, par exemple l'âge, le sexe ou encore l'activité plus ou moins importante des enzymes de biotransformation, de détoxification ou de réparation. L'étude de ces facteurs et de leur influence est encore peu étudiée chez l'homme et l'effet du sexe, en particulier, n'a jamais été évalué.

Le projet a comme objectif de déterminer si une variation de la réponse génotoxique existe entre les individus dont les lymphocytes ont été exposés *in vitro* au benzo-a-pyrène.

Si une telle variation existe, nous tenterons de l'expliquer par la présence de différents allèles d'enzymes de biotransformation et/ou de détoxification ou encore impliqués dans la réparation de l'ADN. De plus, l'étude permettra de déterminer s'il existe un effet de genre (hommes vs femmes) dans le niveau de dommages à l'ADN causés par le benzo-a-pyrène.

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

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.

Allèle : C'est la copie provenant du père ou de la mère d'un gène donné. Les allèles d'un même gène ne sont pas tous identiques, par exemple les groupes sanguins A, B et O.

Enzymes de biotransformation : Ces enzymes sont les outils de notre corps qui permettent de transformer les matières étrangères en substances qui pourront être mises dans nos déchets, comme l'urine et les selles.

Enzymes de détoxification : Ce sont des enzymes qui transforment un produit toxique en un produit non toxique pour le corps.

Enzymes de réparation : Ce sont des enzymes qui réparent les dommages faits au génome dans nos cellules.

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

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.

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 :

Les sujets intéressés doivent remplir un bref questionnaire sur leur santé et leurs habitudes de vie. Les sujets répondant aux critères d'admission doivent lire et signer le formulaire de consentement.

Par la suite, un rendez-vous sera pris au centre des prélèvements à l'Hôpital Sainte-Justine. Les sujets ne doivent pas avoir consommé d'alcool dans les 24 heures précédant le prélèvement. L'étudiante responsable du projet vous accompagnera pour effectuer cette prise de sang conventionnelle. Le rendez-vous est pris en matinée et il pourrait y avoir une attente de quelques minutes à une demi-heure avant le prélèvement qui sera effectué par une technologiste médicale d'expérience du centre des prélèvements. 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.

3 petits tubes héparinés de sang seront prélevés (environ 10ml chacun), identifiés avec un numéro codé afin d'assurer la confidentialité et remis à la personne-ressource qui vous accompagne.

Le prélèvement de sang hépariné sera séparé en deux parties :

Une partie du sang sera directement mis en culture dans le milieu requis et exposée au benzo-a-pyrène (BaP). Ces cellulesensemencées serviront à réaliser le test des échanges entre chromatides-sœurs et l'essai EM-ISEL. Les préparations chromosomiques 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.

Il est possible que certains sujets soient rappelés pour un deuxième prélèvement, soit en cas d'échec lors de la culture des cellules ou soit pour un test supplémentaire chez 20% des sujets (ceux qui auront répondu de façon plus marquée à la plus faible dose testée de BaP). Ce test supplémentaire consiste à évaluer le temps d'exposition minimal génotoxique.

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, au sujet des facteurs génétiques ou autres susceptibles de moduler cette génotoxicité 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.

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 sera effectué ce prélèvement.

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 confidentielle. Ces renseignements seront codés. 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 anonyme 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.

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.

- *Autres recherches*

Un nouveau consentement sera nécessaire pour que d'autres recherches soient effectuées sur votre échantillon d'ADN codé. Nous permettez-vous de vous recontacter dans le futur pour d'autres recherches?

Oui ou Non (encerclez)

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).

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 Madame 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 je pourrai me retirer en tout temps.

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 24 octobre 2005
- No de référence : CERFM-68(05)4#175
- Date de la version du présent formulaire : version du 2 novembre 2004 (DA)

Annexe VI

Formulaire de consentement, projet CERFM-94(08)4#308

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 Hydrocarbures aromatiques polycycliques (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 technologiste 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	Fumeur	Non-fumeur
Êtes vous :	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

Curriculum vitae abrégé

Formation académique universitaire

Université de Montréal	Ph. D. Pathologie et biologie cellulaires	2005-2011
Université de Montréal	M. Sc Pathologie et biologie cellulaires	2003-2005
Université de Montréal	B. Sc Sciences biomédicales	2000-2003

Bourses et prix

Bourses de formation à la maîtrise et au doctorat

Octroyées par les Fonds de la Recherche en Santé du Québec (2003 à 2005 et 2005 à 2008) et la Fondation du CHU Sainte-Justine/ Fondation des Étoiles (2008 à 2010).

Bourses d'excellence

Octroyées par la Banque Royale du Canada (2004), la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales (2006) et le département de pathologie et biologie cellulaire (2009), Université de Montréal.

Bourses de recherche

Octroyées par la compagnie Redicy inc (2003), le département de pathologie et biologie cellulaire de l'Université de Montréal (2003, 2004, 2008 à 2011), le Centre de recherche de l'hôpital Notre-Dame du CHUM (2005, 2008, 2009), le département de pathologie du CHU Sainte-Justine (2006 à 2009) et la Faculté des Études Supérieures et Postdoctorales (2010).

Bourse de voyage et prix de présentation pour des communications scientifiques

Remis par l'Institut de génétique des IRSC (2009) et le Réseau de Recherche en Santé Environnementale (2007, 2008, 2009).

Publications (outre les 4 articles inclus dans la thèse)

L'Abbé, Y, Lespinasse, J, Labine R, Walther M, Lemieux N, Goyette C, Fortin F. *Handicaps et retards de développement : Prévention et intervention précoce*. Béliveau éditeur, Montréal, Canada, 336 pages, 2010.

L'Abbé Y, Fortin F, Lemieux N. *Prévention du retard mental et des retards de développement chez l'enfant*. Dans : Participation et responsabilités sociales, Guerdan V, Petitpierre G, Moulin J-P, Haelewyck M-C (éds), Peter Lang SA (Pieterlen, Suisse), 2009, 514p. et 1 CD-ROM.

Fortin F, Beaulieu Bergeron M, Fetni R and Lemieux N. *Frequency of chromosome healing and interstitial telomeres in 40 cases of constitutional abnormalities*. Cytogenetic and Genome Research, 125(3): 176-185, 2009.

Fortin F, Viau C et Lemieux N. *Contribution de la cytogénétique à l'étude de la génotoxicité des HAP*, Dans: Actes du colloque francophone international «Les hydrocarbures aromatiques polycycliques, de la recherche à la prévention», Bulletin d'information en santé environnementale, 19(5) :12-14, 2008.

DesGroseilliers M, Fortin F, Lafrenière A-M, Brochu P, Lemyre E, Lemieux N. *Dynamic increase*

of a 45,X cell line in a patient with multicentric ring Y chromosomes. Cytogenetic and Genome Research, 115(1) :90-93, 2006.

DesGroseilliers M, Fortin F, Lemyre E, Lemieux N. *Complex mosaicism in sex reversed SRY+ male twins.* Cytogenetic and Genome Research, 112(1-2):176-179, 2006.

L'Abbé Y, Labine R, Lemieux N, Lespinasse J, Fortin F. *Prévention du retard mental : enjeux cliniques, éthiques et sociaux.* Éditions Sciences et Culture, Montréal, Canada, 364 pages, 2005.

L'Abbé Y, Labine R, Lemieux N, Lespinasse J, Fortin F. *Prévention du retard mental à l'aube du XXI^{ème} siècle. Causes et conduites préventives, enjeux cliniques, éthiques et sociaux.* Actes du colloque; 60 pages, 2005. <http://www.fpsm.qc.ca/prm.aspx>

L'Abbé Y, Labine R, Lemieux N, Lespinasse J, Fortin F. *Prévention du retard mental : Causes et conduites préventives à adopter.* Éditions Sciences et Culture, Montréal, Canada; 168 pages, 2004.

Résumés publiés de communications scientifiques

The Toxicologist CD — An official Journal of the Society of Toxicology, 2007; 96(S-1):1658.

American Journal of Human Genetics, 2004; 75(suppl 1):1016.

M/S Médecine-Sciences 2003; 19(suppl. 2):140.

American Journal of Human Genetics, 2003; 73(5) :210.

American Journal of Human Genetics, 2002; 71(4) :287, 328 et 701.

European Journal of Human Genetics, 2001; 9(1) :P0189 et P0316

Communication scientifiques

5 présentations comme conférencière invitée, dont 1 congrès international.

Comme premier auteur: 27 présentations orales (dont 6 congrès nationaux et 1 congrès international) et 21 présentations par affiche (dont 4 congrès nationaux et 4 congrès internationaux).

Comme co-auteur: 48 présentations (dont 3 congrès nationaux et 9 congrès internationaux).

Enseignement universitaire

Sous-gradué : Cours de *Génétique médicale* (MMD1022) pour les étudiants de l'année préparatoire de Médecine (environ 180 étudiants par année). 5 à 9 heures de cours par année, 2007 à 2010. Supervisée par le Dre Nicole Lemieux.

Cours de *Génétique médicale* (MMD1030) pour les étudiants de l'année préparatoire de Médecine (environ 180 étudiants par année). 9 heures, 2011.

Cours de *Génétique médicale* (MED1003) pour les étudiants de l'année préparatoire de Médecine – Campus de la Mauricie (36 étudiants). Charge de cours de 30 heures d'enseignement, 2011.

Cours de *Pathologie générale* (PBC1000, PBC1010, PBC1020) – leçon sur la Génétique Médicale de 2 heures (environ 250 étudiants par année), dispensée deux fois par année, 2006 et 2007. Supervisée par le Dre Nicole Lemieux.

Gradué : Cours de *Cytogénétique médicale* pour les étudiants gradués et les résidents en Médecine (3 à 8 étudiants par année). 7 heures de cours par année depuis 2007. 8 à 11 heures de travaux pratiques par année, depuis 1997. Supervisée par le Dre Nicole Lemieux.

Index

8

8-OH-dGiii, v, 20, 60, 65, 78, 80, 83, 87, 99, 141,
177, 179, 180, 189, 193, 194, 243, 257, 258, 266,
267, 269, 270, 271, 272, 282, 283, 294, 296, 299

A

A549 (carcinome pulmonaire) Voir Types cellulaires
Aberrations chromosomiques (AC)..... Voir Tests de
génomotoxicologie

ABL..... 2, 5

Absorption Voir Toxicocinétique

AC - Risque de cancer 70

Acétylation des histones..... Voir Épигénétique

Additifs alimentaires..... 32

Adduit dépurinant 60, 61, 141, 180

Adduits à l'ADN..... Voir Atteintes à l'ADN

Adduits BPDE-ADN..... .iii, iv, xix, xxiii, 19, 21, 22,
58, 61, 62, 64, 65, 77, 85, 88, 95, 103, 109, 110, 114,
117, 119, 129, 135, 177, 178, 179, 181, 182, 183,
185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194,
205, 206, 207, 211, 239, 240, 241, 242, 243, 245,
248, 249, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 265,
267, 269, 270, 272, 277, 282, 283, 293, 294, 295,
296, 299, 300

(-)-anti-BPDE.....57, 59, 61, 62, 264

(-)-syn-BPDE..... 57, 59, 62

(+)-anti-BPDE57, 59, 61, 62, 189, 262, 264

(+)-syn-BPDE57, 59, 62, 189, 262, 264

(±)-trans-BPDE 65

cis-BPDE..... 64

trans-(+)-anti-BPDE..... 61

trans-(-)-anti-BPDE 64

trans-(±)anti-BPDE-dG 63, 64, 189, 263

trans-BPDE..... 64

Adduits BPDE-dA 61, 62, 63

Adduits BPDE-dG 61, 62

Aflatoxine B₁ 2, 16, 77, 79, 85

AhR xxix, 22, 52, 54, 55, 56, 57, 66, 141, 180, 248

Air ambiant 38, 43, 246

Air pollué38, 141, 150, 180, 181, 190,
191, 192, 242, 259, 298

AKR 54, 56, 60, 189

Alumineries/ aluminium.....36, 37, 39, 40, 41, 42,
43, 45, 100, 115, 141, 180, 190, 216, 218, 246, 249,
259, lxx, lxxx

Ames Voir Tests de génotoxicologie

Analyse caryotypique..... Voir Cytogénétique

Aneugène.....iv, 9, 76, 96, 137, 257, 272, 274,
275, 276, 277, 278, 279, 280, 297, 298

Aneugène (*aneugenic*)vi, 135, 137, 139, 142,
151, 152, 153

Aneuploïdie

Aneuploïdie constitutionnelle 11, 26

Anomalies des centrosomes 2, 9, 12, 14, 152,
153, 271, 277, 297

Malségrégation.....12, 13, 96, 152, 279, 280, 281

Métaphases ayant des pertes et des gains de
chromosomes139, 145, 146, 148, 151,
152, 153, 165, 174

Non-disjonction 76, 96, 153, 280, 281

Perturbation de la cohésion des chromatides-sœurs.
.....9

Perturbation du fuseau mitotique 12, 13, 152, 153

Syndrome d'aneuploïdie en mosaïque 12

ANOVA à un critère..... Voir Statistiques

ANOVA pour mesures répétées Voir Statistiques

Apoptose..... 3, 4, 7, 14, 15

ARE..... 54

ARNT 52, 54, 141, 180

Atteintes à l'ADN

Aberrations complexes 145, 148

Adduits à l'ADN	3, 16, 19, 57, 77, 84, 194, 242, 250, 253, 258, 259, 264, 271
Bris double-brin à l'ADN	xxv, 16, 17, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 257, 265, 267, 269, 270, 273, 296
Bris double-brin à l'ADN (<i>double-strans break</i>)	xxv, 189, 193, 194
Bris simple-brin à l'ADN.....	iii, iv, v, vi, xix, xxv, 16, 17, 81, 82, 83, 84, 87, 88, 91, 103, 109, 110, 114, 117, 120, 121, 126, 130, 177,179, 181, 208, 209, 239, 240, 243, 244, 245, 249, 258, 262, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 286, 294, 296, 297, xlili, xlv, xlv, xlv, xlviii
Bris simple-brin à l'ADN (<i>single-strand break</i>).....	v, xxv, 177, 179, 181, 183, 184, 185, 186, 190, 207, 209, 210, xlv, xlv, xlviii, l, li, lii, liii, liv
Cassure chromatidienne et/ou chromosomique.....	3, 15, 17, 71, 72, 76, 89, 122, 129, 131,145, 148, 151, 193, 251, 253, 254, 273, 274, 295, 296, lii
Sites abasiques	8, 15, 60, 82, 83, 88, 260, 265, 267
Transversion	64, 65
Auto-induction	<i>Voir Métabolisme du BaP</i>

B

Bandes GTG	<i>Voir Cytogénétique</i>
3-OH-BaP	50, 55, 60, 264
BaP-1,6-dione	56, 58, 264
BaP-2,3-oxyde.....	58, 60
BaP-3,6-dione	56, 58, 60, 264
BaP-4,5-oxyde.....	58, 60
BaP-7,8-diol	iii, v, 53, 55, 57, 58, 60, 61, 62, 264
BaP-7,8-diol-9,10-époxyde (BPDE)	57, 141, 180
BaP-7,8-dione	55, 56, 58, 60, 267
BaP-9,10-oxyde.....	58, 60
BaP-équivalent	46, 48
Batterie de tests de génotoxicité.....	<i>Voir Tests</i> de génotoxicologie
BER	<i>Voir Systèmes de réparation de l'ADN</i>

Biodétoxification.....	7, 20, 68
Biotransformation.....	20, 55, 56, 57, 60, 66, 267, lxx, lxxi, lxxiii, lxxxiii
Bléomycine	16, 17, 251, 252, 254
Bris double-brin à l'ADN	<i>Voir Atteintes à l'ADN</i>
Bris simple-brin à l'ADN	<i>Voir Atteintes à l'ADN</i>

C

Cancer (types de)	
Cancer de l'estomac	45
Cancer de l'œsophage	45
Cancer de la peau	45, 141
Cancer de la vessie	45, 141, 217, 218, 228
Cancer du côlon	5
Cancer du pancréas	45
Cancer du poumon	44, 64, 65, 141, 248
Carcinome colorectal.....	5, 45
Carcinome rénal	45, 66
Leucémie myéloïde chronique	5
Leucémie myéloïde chronique (LMC)	5
Leucémies et lymphomes (non spécifié)	45
Lymphome de Burkitt	5
Rétinoblastome	6, 7
Cancérogène (<i>carcinogenic</i>).....	v, 139, 141, 179, 180, xlvii
Cancérogenèse.....	v, vi, 139, 141, 152, 153, 179, 180, xlvii
Groupe 1.....	45, 46
Groupe 2A.....	45, 46
Groupe 2B.....	46
Initiation/ initiateur	2, 3, 4, 7, 11, 139, 152, 298
Nombre de touches génétiques	4, 5, 6
Oncogène	2, 5, 7
Progression.....	iv, vi, 3, 4, 7, 13, 139, 152, 153, 277, 298
Promotion/ promoteur.....	2, 3, 4, 7, 52, 66, 298
Suppresseur de tumeur	2, 6, 65

- Transformation cellulaire2, 3, 4, 5, 6, 12, 13
- Caractérisation de l'air.....47, 48, 98, 99, 101
- Carcinome colorectal..... Voir Cancer (types de)
- Carcinome rénal Voir Cancer (types de)
- Cassure chromatidienne Voir Atteintes à l'ADN
- Cassure chromosomique Voir Atteintes à l'ADN
- Cellule binuclééexviii, 30, 75, 123, 124, 144, 145, 146, 147, 168
- Cellules à haute fréquence d'ÉCS (CHF).....xix, xxvi, 122, 131, 177, 178, 179, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 207, 210, 211, 214, 239, 247, 248, 249, 250, 251, 257, 258, 259, 268, 272, 293, 294, 295, 297, 300, xli, xliii, xlv
- Cellules épithéliales Voir Types cellulaires
- Cellules urothéliales Voir Types cellulaires
- Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) 44, 45, 46
- CHO-K1 Voir Types cellulaires
- Cigarette Voir Tabac
- cis*-BPDE Voir Adduits BPDE-ADN
- Clastogène17, 76, 96, 111, 137, 255, 272, 273, 274, 275, 276, 278, 279, 297
- Clastogène (clastogen) 140, 142, 151
- Clastogène (*clastogenic*).....vi, 135, 137, 139, 142, 152, 153
- Coloration au Giemsa Voir Cytogénétique
- Coloration de Papanicolaou..... xx, 217, 220, 222, 223, 224, 225, 226, 229, 231
- Combustion du bois.....36, 37, 39, 41, lxxx
- COMET Voir Tests de génotoxicologie
- Corrections ϵ de Greenhouse-Geisser et Huynh-Feldt Voir Statistiques
- Corrélation de Pearson Voir Statistiques
- Corrélation partielle Voir Statistiques
- Cosmétiques 32
- Courbe dose-réponse v, 150, 188, 189, 191, 193
- COX-1..... 60, 61
- COX-2..... 55, 57
- Cycle cellulaire..... 7, 8, 13, 14, 66, 69, 70, 74, 84, 88, 103, 243, 257, 260, 262, 267, 269, 270, 271, 289
- Phase G1.....8, 14, 84, 89, 91, 261, 273, 274
- Phase S.....8, 17, 84, 88, 89, 91, 92, 152, 243, 261, 267, 268, 269, 271, 273, 277
- Cycle d'oxydoréduction..... 60, 65, 141, 180, 189, 240, 267, 296
- CYP1A.....69
- CYP1A1.....xxix, 21, 22, 52, 53, 55, 56, 58, 141, 150, 180, 188, 192, 248, 294
- CYP1A2..... 53, 55, 57, 58, 189
- CYP1B1..... 52, 53, 55, 56, 57, 58, 66, 248, 294
- Cytochalasine B..... Voir Cytogénétique
- Cytocinèse.....9, 13, 14, 74, 110, 124, 284
- Cytogénétique
- Analyse caryotypique.....28
- Bandes GTG 28, 71
- Coloration au Giemsa..... 27, 144, 145, 220, 222, 223, 225, 226, 229
- Cytochalasine B..... 74, 117, 124, 143, 144, 149
- Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH).....28, 29, 72, 76, 96, 98, 104, 133, 137, 138, 139, 140, 142, 145, 146, 148, 151, 152, 153, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 287, 297, lxxvii
- Marquages et colorations.....27
- Obtention des chromosomes ... 27, 74, 144, 183, 184
- Peinture chromosomique 29, 30
- Phytohémagglutinine (PHA)27, 69, 74, 103, 116, 143, 183, 260
- SKY (*spectral karyotyping*) 77, 279
- Sonde centromérique 28, 30, 76, 281
- sonde pancentromériquexviii, 139, 142, 145, 152, 153, 166, 175, lxxvii
- Sonde pancentromérique29, 30, 76, 123, 137, 275, 278, 279, 297
- Sonde pantélomérique 29, 30
- Cytosquelette..... 14, 74, 277, 278

D

- Devis expérimental Voir Statistiques
- Diastéréoisomères 57, 59, 61, 189, 262

Différences interindividuelles

- Effet du sexe..... vi, 135, 139, 146, 147, 148, 149,
150, 151, 153, 177, 179, 181, 185, 191, 192, 194
- Études de jumeaux monozygotes..... 191
- Héritabilité.....191, 193, 252, 295
- Modulateurs environnementaux..... 193, 252,
255, 256, 285, 294, 295
- Modulateurs génétiques193, 194, 252, 294, 295
- Variabilité expliquée.....178, 188, 193, 194, 259,
272, 295
- Variation entre individus.....xix, 19, 69, 110,
133, 148, 181, 185, 186, 187, 190, 191, 194, 211,
249, 250, 251, 252, 256
- Diméthyle sulfoxyde (DMSO)..... xxvi, 115, 116, 143,
182, 183
- Distribution..... Voir Toxicocinétique
- Domages oxydatifs à l'ADN 60, 257
- Drogues pharmaceutiques 32, 33

E

- Échanges entre chromatides-sœurs (ÉCS) .. Voir Tests de
génotoxicologie
- Effet inter-sujet Voir Statistiques
- Effet intra-sujet..... Voir Statistiques
- Effets épigénétiques du BaP..... 66
- Émissions de benzo-a-pyrène 41, 42
- Épigénétique..... 6, 7, 33
- Acétylation des histones 66
- Hyperacétylation 66
- Hyperméthylation 7
- Hypoacétylation 66
- Hypométhylation..... 7, 66, 253
- Espèces réactives de l'oxygène (ERO)..... xxvi, 15, 16,
54, 55, 56, 58, 60, 84, 88, 180, 189, 240, 257, 269,
277, 296, 299
- Essai COMET Voir Tests de génotoxicologie
- Essai UDS Voir Tests de génotoxicologie

- Excès de risque de cancer 48, 248
- Excrétion..... Voir Toxicocinétique
- Exposition au BaP..... iii, iv, 21, 44, 48, 65, 66,
83, 88, 104, 105, 108, 111, 130, 131, 133, 134, 137,
143, 178, 183, 246, 249, 257, 258, 260, 265, 270,
272, 273, 275, 276, 277, 287, 293, 295, 296, 297,
298, 299, 300

F

- Facteur d'Équivalence Toxique 46, 48
- Feux de forêt 31, 36, 37, lxx, lxxx
- FISH..... Voir Cytogénétique
- Fixateur Carnoy I..... xx, 117, 118, 144, 145, 183,
184, 217, 220, 222, 223, 224, 225, 229, 231, 284
- Fours à coke.....44, 76, 97, 98, 99, 100, 150,
192, 193, 219, 242, 249, 253, 259

G

- Gap junctions Voir Jonctions communicantes
- GC-NER Voir Systèmes de réparation de l'ADN
- Génotoxicologie..... 1, 28, 29, 70, 299
- GSTM1 22, 53, 55, 58
- GSTP1.....xxx, 7, 53, 55, 58, 141, 180
- GSTT1..... 22, 53, 55, 58

H

- H358 (broncho-alvéolaires) Voir Types cellulaires
- HaCat (kératinocytes) Voir Types cellulaires
- HepG2..... Voir Types cellulaires
- Héritabilité Voir Différences interindividuelles
- HRR Voir Systèmes de réparation de l'ADN
- HSP90..... 52
- Hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)..... Voir
Cytogénétique
- Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).....
... iii, iv, v, vi, 1, 18, 19, 21, 24, 36, 37, 38, 43, 44, 46,

47, 48, 49, 51, 52, 53, 58, 64, 69, 75, 77, 79, 85, 88,
97, 98, 99, 101, 102, 103, 107, 108, 109, 113, 119,
138, 139, 140, 141, 142, 153, 178, 179, 180, 182,
190, 192, 215, 216, 218, 219, 242, 243, 246, 247,
248, 254, 258, 259, 273, 277, 283, 284, 285, 293,
294, 297, 298, 300, 302, lxx, lxxx, xci
Diméthyle-benz-a-anthracène (DMBA) 2
Pyrène 19, 24, 25, 36, 49, 98, 99, 101, 102
Hyperacétylation Voir Épigénétique
Hyperméthylation Voir Épigénétique
Hypoacétylation Voir Épigénétique
Hypométhylation Voir Épigénétique

I

IARC Voir Centre International de Recherche
sur le Cancer (CIRC)
Index de division nucléaire (NDI) xviii, xxvii, 144,
146, 147, 149, 167
Index mitotique (MI) xviii, 145, 146, 148, 149, 167
Initiation/ initiateur Voir Cancérogenèse
Instabilité chromosomique 4, 7, 8, 11, 15, 277,
279, 298

J

Jonctions communicantes (*gap junctions*) 51

K

K-ras 65

L

Leucémie myéloïde chronique (LMC) Voir
Cancer (types de)
Liaison du BaP à AhR 52
Lymphocytes et monocytes Voir Types cellulaires
Lymphome de Burkitt Voir Cancer (types de)

M

Malségrégation Voir Aneuploïdie
Marquage chromosomique Voir Cytogénétique
MCF-10A Voir Types cellulaires
MCF-7 Voir Types cellulaires
mEH 22, 53, 57, 58, 254
Mélange de HAP 47, 48, 78, 107, lxx, lxxx
Métabolisme du BaP 55
 Auto-induction 55
 Phase I 21, 54, 55, 67, 141, 240, 241, 248
 Phase II iii, v, 53, 54, 55, 67, 141, 179, 180,
 189, 193, 240, 242, 293
Métastase 7
Méthyltransférase 66
Micronoyaux *in vivo* (MN_{IV}) Voir Tests de
 génétoxicologie
Micronoyaux sanguins (MNs) Voir Tests de
 génétoxicologie
Micronoyaux urinaires (MNU) Voir Tests de
 génétoxicologie
Microscope à fluorescence 145
Microscope électronique à transmission 184
Microscope photonique 122, 124, 144, 145, 184, 222
MN - Risque de cancer 70
Mode d'action du benzo-a-pyrène 137, 239
Modulateurs environnementaux Voir Différences
 interindividuelles
Modulateurs génétiques Voir Différences
 interindividuelles
Modulation du calcium intracellulaire 52
MYC 5, 7

N

NER Voir Systèmes de réparation de l'ADN
NHEJ Voir Systèmes de réparation de l'ADN
Nombre de MN par cellule micronucléée (MN par
 MNBN) 146, 147, 161, 163, 168, 178, 187,
 193, 210, xliii, xlv
Nombre de touches génétiques Voir Cancérogenèse

Non-disjonction Voir Aneuploïdie
 NQO1..... 56, 58, 60
 NQO2..... 56
 NRF222, 54, 55, 56, 189, 240

O

Oncogène Voir Cancérogène

P

Peinture chromosomique Voir Cytogénétique
 Peroxyde..... 21, 60, 65
 Perturbation de l'assemblage du fuseau Voir Aneuploïdie
 Phase I Voir Métabolisme du BaP
 Phase II Voir Métabolisme du BaP
 Phytohémagglutinine (PHA) Voir Cytogénétique
 PM_{2,5}.....36, 37, 39, 40
 Polyploïdie9, 13, 142, 145, 274, 279
 Devenir des cellules tétraploïdes 14
 Instabilité chromosomique des cellules tétraploïdes 14
 Pouvoir cancérogène des cellules tétraploïdes 15
 Résistance à l'apoptose des cellules tétraploïdes .. 15
 Tétraploïdie 152
 Tétraploïdie par avortement de la cytotinèse..... 14
 Tétraploïdie spontanée 13
 Progression..... Voir Cancérogène
 Promotion/ promoteur..... Voir Cancérogène
 Pyrène .. Voir Hydrocarbures aromatiques polycycliques

Q

Qualité de l'air 36, 328
 Québecxxviii, 33, 43, 44, 82, 114, 142, 153, 182, 216, 243, 284, 286, xlv, lxx, lxxiv, lxxx, lxxxiv, xci
 Quinolés 58, 60

Quinones.....xxxi, 55, 56, 58, 60, 65, 141, 180, 189, 193, 240, 267, 268, 296, 299

R

Radical cation..... 58, 60
 Radical hydroxyl (OH[•])..... 60
 Radical superoxyde (O₂^{•-}) 60, 65
 Rayonnements (UV, gamma, etc.)2, 15, 16, 17, 29, 31, 71, 88, 252, 279
 RB1..... 2, 6, 7
 Régression linéaire multiple Voir Statistiques
 Relation dose-réponse..... xxiii, 23, 24, 102, 109, 110, 129, 130, 131, 132, 137, 139, 146, 147, 148, 149, 151, 152, 177, 184, 185, 205, 246, 268, 287, lii
 Courbe dose-réponse iii, 104, 110, 137, 177, 240, 242, 293
 Réparation des mésappariements (MMR.)..... Voir Systèmes de réparation de l'ADN
 Répartition cellulaire du BaP 51
 République Tchèque 43
 Rétinoblastome Voir Cancer (types de)

S

Saturation enzymatiquev, 14, 137, 139, 150, 179, 188, 193, 242, 293
 S-dépendant 142, 149, 151
 Silésie (Pologne).....43, 191, 192, 247, 249, 259
 Sillon majeur de l'ADN 63
 Sillon mineur de l'ADN..... 63
 S-indépendant 142
 Sites abasiques Voir Atteintes à l'ADN
 SKY (*spectral karyotyping*) Voir Cytogénétique
 Sonde centromérique Voir Cytogénétique
 Sonde pancentromérique Voir Cytogénétique
 Sonde pantélomérique Voir Cytogénétique
 Sources d'émission de HAP..... 36
 SSA..... Voir Systèmes de réparation de l'ADN

- Statistiques
- ANOVA à un critère126, 128, 130, 131, 286
- ANOVA pour mesures répétées.....109, 110, 127, 128, 129, 130, 131, 132
- Corrections ϵ de Greenhouse-Geisser et Huynh-Feldt 127
- Corrélation de Pearson..... xix, 133, 185, 187, 210, 268, 332
- Corrélation partielle..... 111, 134, 178, 185, 187, 188, 258, 282
- Devis expérimental 126
- Effet inter-sujet 127, 129
- Effet intra-sujet..... 127, 128
- Régression linéaire multiple..... 111, 134, 178, 179, 185, 193, 248, 259, 272, 282, 295, xliii
- Test de sphéricité 127, 128, 129, 130, 131, 132, xli
- Test des rangs signés de Wilcoxon109, 128, 130, 131, 132, 146, 161, 185, 205, 207
- Test post-hoc de Bonferroni 127, 184, 209, 213
- Test post-hoc T2 de Tamhane 127, 184, 209, 213
- Test t de Student pour des échantillons indépendants (bilatéral)129, 130, 131, 132, 146, 150, 185
- Test z de deux proportions indépendantes..... 129, 131, 132, 146, 166, 276
- Stress oxydatifiv, 21, 56, 65, 66, 111, 257, 266, 267, 282, 296
- Sulfotransférase (SULT) 55, 58
- Suppresseur de tumeur Voir Cancérogenèse
- Surveillance biologique.....18, 21, 23, 24, 25, 67, 70, 71, 75, 82, 97, 102, 103, 108, 141, 178, 180, 194, 216, 219, 220, 246, 284, 286, 293, 300
- Syndrome d'aneuploïdie en mosaïque Voir Aneuploïdie
- Systèmes de réparation de l'ADN
- Appariement d'ADN simple-brin (SSA) 8
- Excision de base (BER).....8, 15, 84, 86, 87, 88, 253, 254, 260, 262, 266, 267
- Excision des nucléotides (NER).....xxviii, 8, 16, 57, 63, 64, 65, 81, 84, 85, 86, 88, 95, 141, 180, 189, 190, 253, 255, 261, 262, 263, 267, 271
- GC-NER 95, 261, 262
- Recollage d'extrémités non homologues (NHEJ).....8, 84, 88, 89, 90, 91, 92, 274
- Recombinaison homologue (HRR).....iii, v, 8, 84, 88, 89, 91, 92, 93, 94, 95, 177,189, 190, 194, 243, 262, 268, 269, 271, 294, 296
- Réparation des mésappariements (MMR).....9
- Synthèse translésionnelle (TLS) 64, 262, 277
- TC-NER 85, 261, 262, 267

T

- T47-D Voir Types cellulaires
- Tabac..... 5, 19, 36, 38, 108, 141
- TC-NER Voir Systèmes de réparation de l'ADN
- Test de sphéricité..... Voir Statistiques
- Test des rangs signés de Wilcoxon..... Voir Statistiques
- Test post-hoc de Bonferroni Voir Statistiques
- Test post-hoc T2 de Tamhane..... Voir Statistiques
- Test t de Student pour des échantillons indépendants (bilatéral) Voir Statistiques
- Test z de deux proportions indépendantes Voir Statistiques
- Tests de génotoxicologie
- Aberrations chromosomiques (AC).... iii, iv, v, vi, xviii, 20, 22, 28, 29, 70, 71, 72, 88, 90, 96, 97, 98, 102, 104, 107, 108, 109, 110, 114, 117, 121, 130, 137, 139, 140, 141, 142, 146, 149, 150, 152, 164, 165, 172, 178, 179, 181, 187, 188, 192, 193, 194, 239, 240, 244, 252, 272, 273, 276,293, 295
- Ames 31, 33, 34
- Batterie de tests 30
- Échanges entre chromatides-sœurs (ÉCS)..... iii, v, vi, xix, 20,70, 72, 73, 74, 110, 177, 179, 180, 181, 182, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192,193, 194, 207, 210, 213, 239, 258, 268, 293, 295, 297, 300, xlvii, lxxii
- Essai COMET20, 33, 78, 80, 81, 82, 83, 99, 103, 245, 265, 266, 267, 282

C

Essai UDS	20, 33, 81, 262, xviii
Micronoyaux (MN)	74
Micronoyaux avec 3 centromères ou plus (MN C3+)	139, 140, 146, 149, 151, 152, 153, 166, 175
Micronoyaux avec centromères (MN C+).....	139, 140, 146, 149, 151, 152, 153, 166, 175, 176
Micronoyaux <i>in vivo</i>	31, 34
Micronoyaux sanguins (MNs)	iii, v, vi, xviii, xxvii, 20, 24, 29, 30, 31, 70, 74, 99, 101, 105, 109, 110, 117, 123, 124, 132, 133, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 144, 145, 146, 149, 150, 151, 152, 153, 163, 166, 168, 175, 179, 181, 187, 188, 191, 192, 193, 194, 245, 247, 250, 251, 256, 295, lxvii, lxxxii
Micronoyaux urinaires (MNU).....	xxvii, 75, 118, 125, 133, 215, 217, 219, 220, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 229, 231, 232, 233, 239, 284, 285, 286
Tétraploïdie	<i>Voir</i> Polyploïdie
Toxicocinétique	18, 19, 20, 49
Absorption.....	49
Distribution.....	49
Excrétion.....	50
Toxicogénétique	1
TP53 (p53).....	xxxii, 2, 7, 8, 14, 15, 64, 65, 66, 150, 152, 277
<i>trans</i> -BPDE.....	<i>Voir</i> Adduits BPDE-ADN
Transformation cellulaire	<i>Voir</i> Cancérogénèse
Transversion	<i>Voir</i> Atteintes à l'ADN
Types cellulaires	
A549 (carcinome pulmonaire).....	62
Cellules embryonnaires	69
Cellules épithéliales.....	51, 56, 68, 75, 81, 111
Cellules souches	69
Cellules urothéliales .	xx, xxiii, 75, 118, 125, 133, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 231, 239, 284, 285, 286, lxxix
CHO-1K	67, 70, 72, 74
H358 (broncho-alvéolaires) ...	60, 61, 62, 68, 262, 267

HaCat (kératinocytes)	61, 62, 68, 103, 188, 263, 264
HepG2.....	21, 27, 51, 56, 61, 62, 66, 68, 74, 102, 103, 107, 188, 189, 261, 263, 264, 266
Lymphocytes et monocytes.....	v, xviii, xix, xxiii, 51, 57, 69, 116, 135, 137, 139, 141, 149, 151, 153, 161, 163, 164, 167, 168, 172, 177, 180, 181, 188, 191, 192, 193, 194, 205, 206, 207, 208, 210, 211, 213, 214, 260, lii, liii
MCF-10A	56, 68
MCF-7.....	52, 66, 68, 189, 262, 278
T47-D.....	66, 68
V79.....	51, 67, 74, 152, 277

U

UDP-glucuronyl transférase.....	22, 58
UDS (unscheduled DNA synthesis)	<i>Voir</i> Tests de génotoxicologie
Urine	xxiii, 25, 50, 55, 61, 67, 77, 102, 115, 118, 215, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 229, 237, 284, lxx, lxxi, lxxx, lxxxi, lxxxiii

V

V79.....	<i>Voir</i> Types cellulaires
Variabilité expliquée	<i>Voir</i> Différences interindividuelles
Variation entre individus	<i>Voir</i> Différences interindividuelles
Voie cutanée.....	38
Voie intraveineuse.....	49, 50, 266
Voie orale.....	38, 48, 50
Voie pulmonaire	38, 46, 49

X

XRE.....	52, 54, 56
----------	------------

