

*Mécanismes d'action des anomalies
chromosomiques induites par les
particules PM2.5 dans le cadre du
programme PACTES-BMP : particules
atmosphériques : caractérisation, **toxicité**
et évaluation sociétale dans le bassin
minier Gardanne*

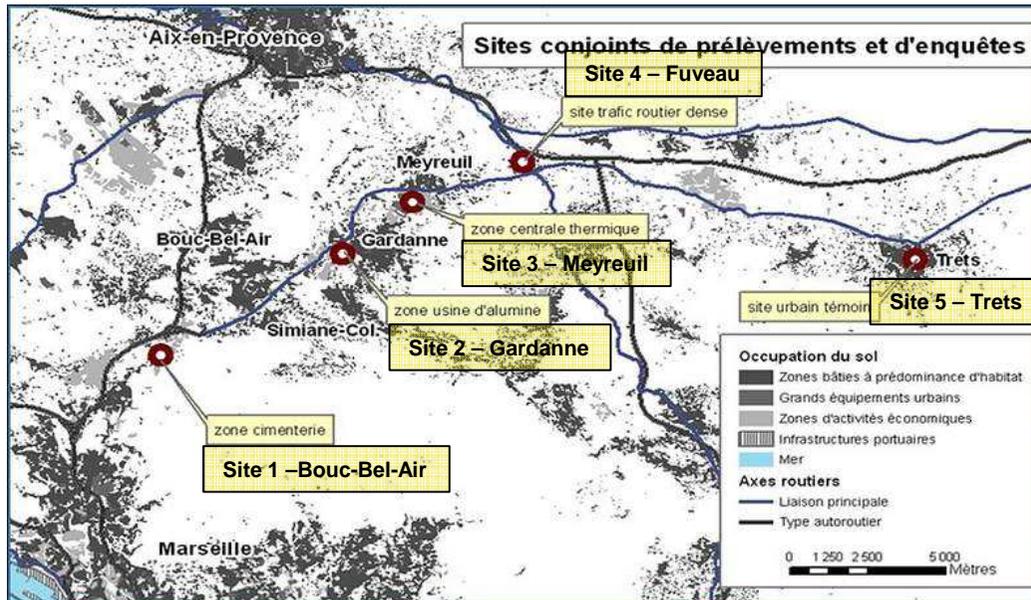
Aurélié Bonnefoy, Sophie Plumejeaud, Yves Noack,
Dominique Robin, Daniel Bley, Alain Botta, Grégory Gille,
Pascale Lozano, Virginie Tassistro, Thierry Orsière

Contexte et Objectifs

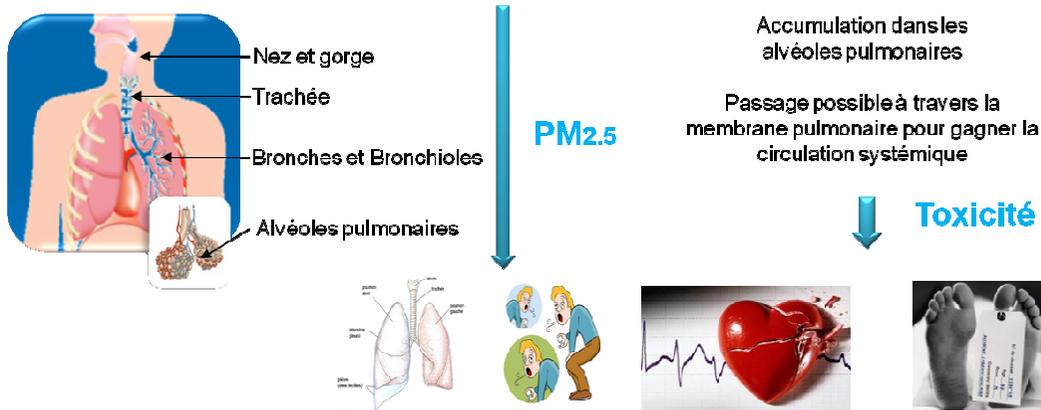
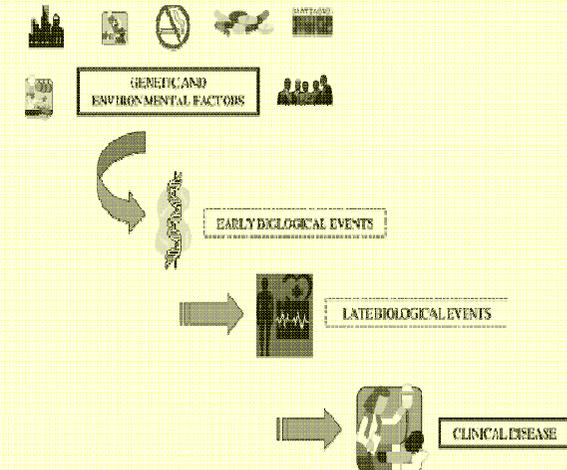
Naturelles



Anthropiques



Génotoxicité et cancérogénèse environnementale



OBJECTIFS

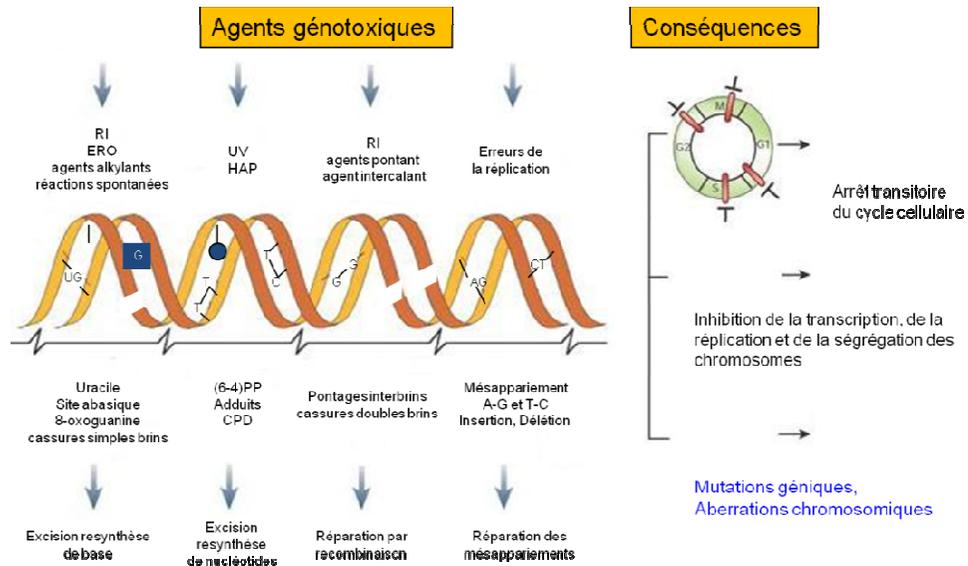
Caractérisation des PS, PM₁₀ et PM_{2.5}

Détermination de la génotoxicité des PM_{2.5}

Evaluation sociétale de la perception de la pollution atmosphérique par les populations

Objectif précis et méthode

Objectif : distinguer les anomalies chromosomiques de structure et de nombre

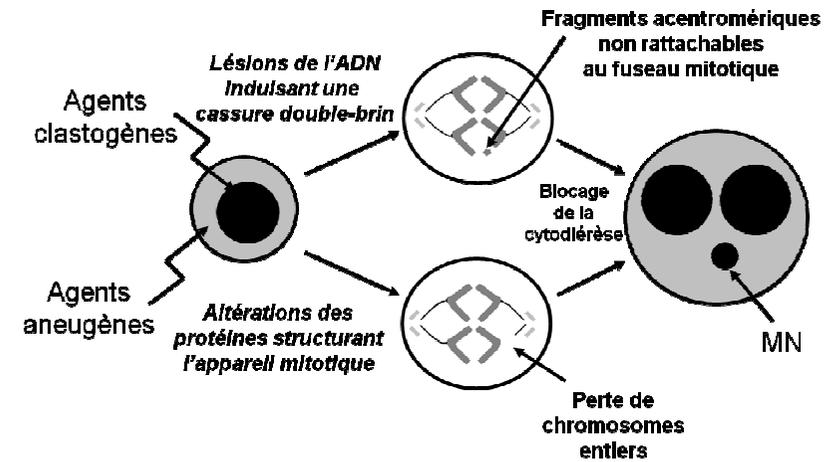
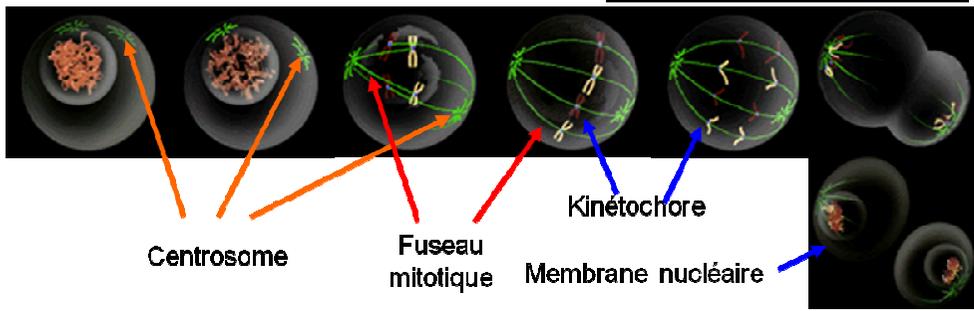


Processus de réparation

d'après Jan H. J. Hooijmakers, Nature 2001, vol 411, 366-374

Modifications du nombre de chromosomes

Aneuploidies ($2n \pm 1$; $2n \pm 2$...) **Origine épigénétique**



Immuno-marquage des centromères (CREST)

Cellules micronucléées

Cassures chromosomiques

Anomalies du fuseau

C-MN

C+MN

MN

Financement ECCOREV 2012

Méthodologie



→ Dosage des métaux par ICP-MS

→ Dosage des HAPs par GC-MS

Fraction hydrosoluble (1/2 filtre)

Fraction extractible par solvant (1/2 filtre)

+ H₂O

Récupération des particules
Ultrasons

+ CH₂Cl₂

Centrifugation

Filtration du surnageant

Evaporation totale

Pesée du culot

5 mg/ml H₂O (-40°C)

5 mg/ml DMSO (-40°C)

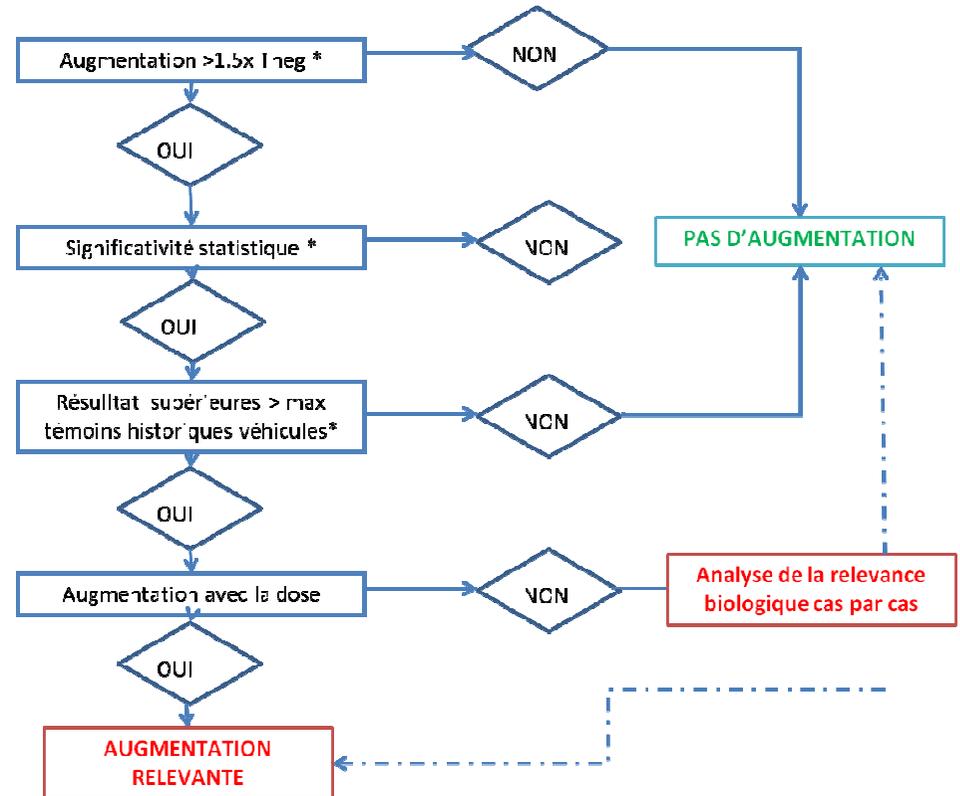
Test préliminaire de cytotoxicité

Choix des concentrations de travail

Test des micronoyaux ± CREST

Eccorev 2012

Arbre décisionnel d'interprétation de nos résultats

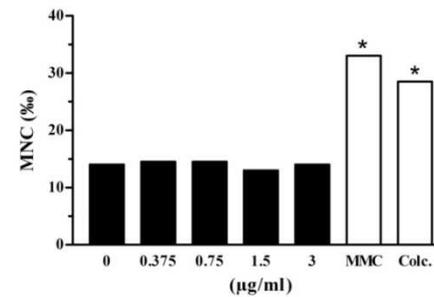
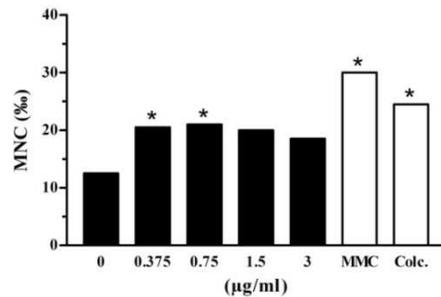


Résultats : Site 1 – Bouc Bel Air (1/2)

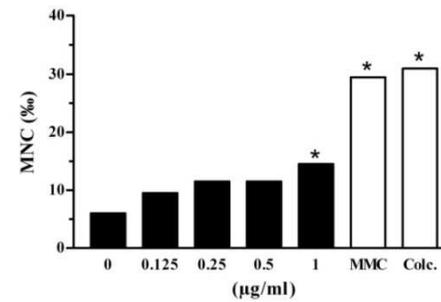
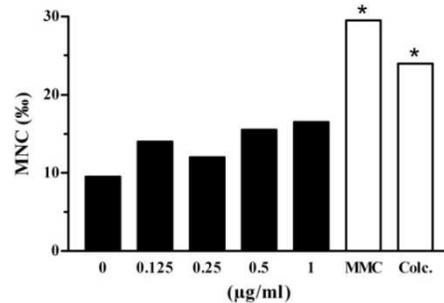
Eté

Hiver

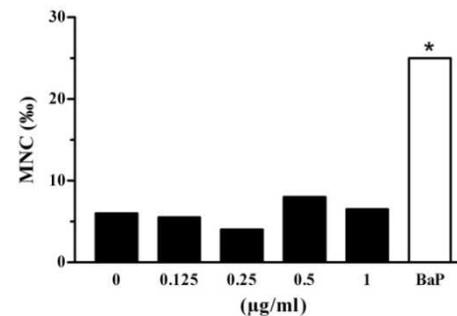
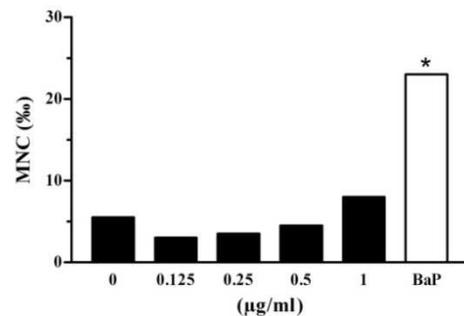
Fraction Hydrophile



Fraction Hydrophobe sans activation métabolique

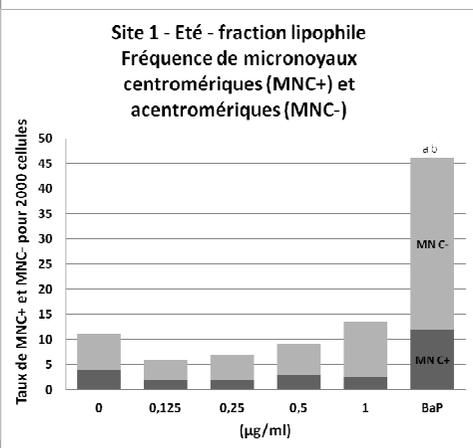
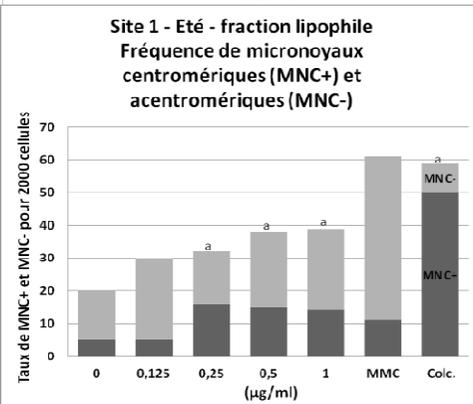
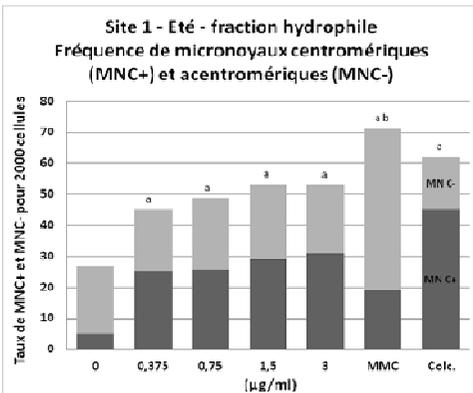


Fraction Hydrophobe avec activation métabolique



Résultats : Site 1 – Bouc Bel Air (2/2)

Eté



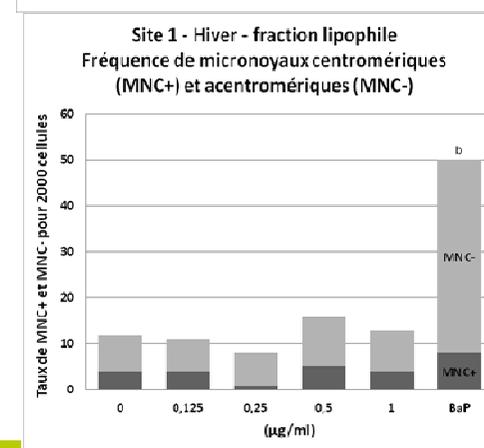
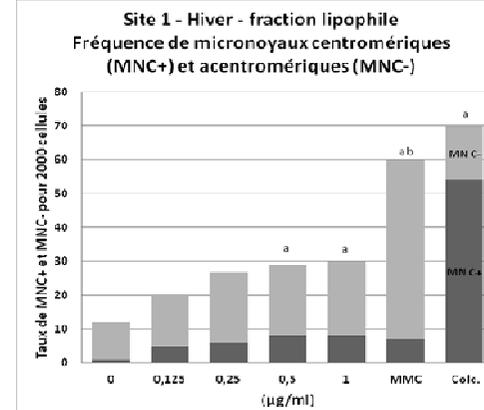
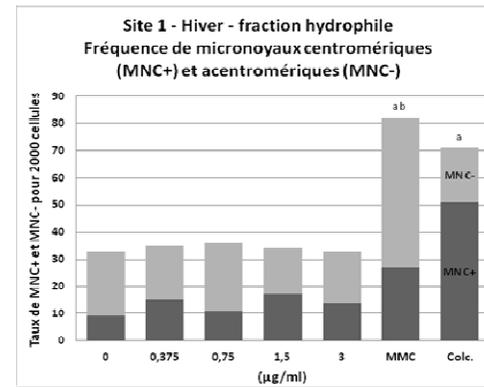
Eccorev 2012

Fraction Hydrophile

Fraction Hydrophobe sans activation métabolique

Fraction Hydrophobe avec activation métabolique

Hiver



Conclusion

Sites	Eté <i>Eccorev 2012</i>			Hiver <i>Eccorev 2012</i>		
	Génotoxicité	Clastogénèse	Aneugénèse	Génotoxicité	Clastogénèse	Aneugénèse
Bouc-Bel-Air	oui	non	oui	non	non	oui
Gardanne	oui	non	oui	oui	+	non
Meyreuil	oui	++	oui	oui	++	oui
Fuveau	oui	+++	oui	oui	+	non
Trets	oui	+++	oui	oui	++	oui

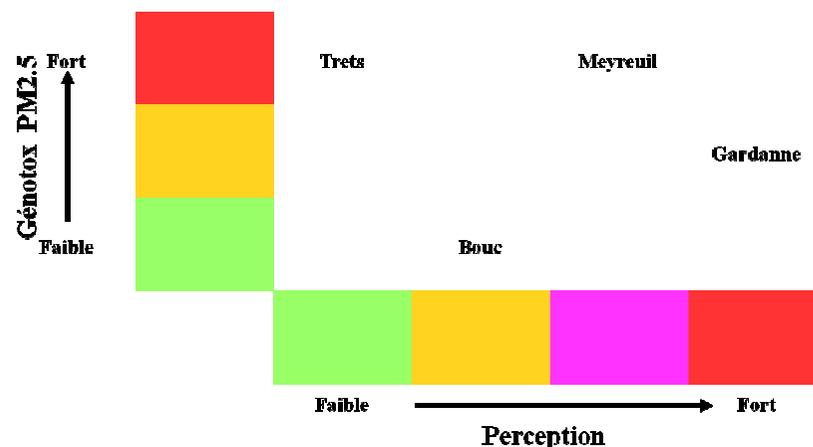
Sur fibroblastes pulmonaires in vitro :

aucune propriété clastogène des fractions testées n'a été observé **sur le site de Bouc-Bel-Air ni en été, ni en hiver.**

Le site de Gardanne ne présente pas d'activité clastogène en été et qu'une **faible activité clastogène en hiver.**

Une clastogénicité des fractions testées en hiver et en été **sur les sites de Meyreuil, Fuveau et Trets**

Hypothèse: Sur les sites 1 et 2, **une source de PM2.5 spécifiquement émises sur les sites 1 et 2 exempte de propriétés génotoxiques masque**, par effet de dilution, la génotoxicité des particules dont les sources sont communes à tous les sites.



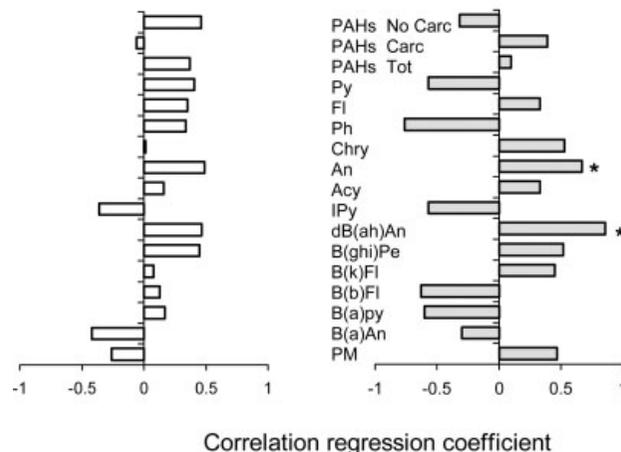
Auto-évaluation du projet

Objectifs du présent projet :

- Distinguer les micronoyaux selon le mécanisme clastogène et aneugène : **Entièrement réalisé!**
- Déterminer les effets de la bioactivation métabolique: **réalisé sur les fractions hydrophobes !**
- Le test des micronoyaux sans ses ajouts ne permettait pas de produire des informations graduées sur le potentiel génotoxique des PM2.5

Plus value capitale de la contribution ECCOREV 2012 : MERCI !!!

Questions



ME.Gutierrez-Castillo *et al.*,
Environmental and Molecular
Mutagenesis 47:199-211 (2006)

Production Scientifique

Chemical characterization and chromosome damaging effects of lipophilic fraction of fine particles (PM_{2.5}) collected in the mining area of Provence

Sophie PLUMEJEAUD (1), Aurélie BONNEFOY (1), Yves NOACK (2), Dominique ROBIN (3), Pierre DOUMENQ (4), Florence CHASPOUL (1), Virginie TASSISTRO (1), Alain BOTTA (1), Thierry ORSIERE (1)

(1) IMBE, Biogéotoxicologie, Santé Humaine & Environnement, UMR CNRS 7263, Aix-Marseille Université (AMU), FR CNRS 3008, ECOREY, Faculté de Médecine, 13005 Marseille, France
 (2) Centre Européen de Recherche et d'Enseignement des Géosciences de l'Environnement (CEREGE), UMR CNRS 7330, Europe Méditerranéenne de l'Air, 13545 Aix-en-Provence, France
 (3) AIPACA, 13008 Marseille, France
 (4) Laboratoire de Chimie Analytique de l'Environnement, UMR CNRS 6263 Aix-Marseille Université (AMU), Université Paul Cézanne, 13090 Aix-en-Provence, France
 sophie.plumejeaud@imbe.fr

Introduction
 Between Aix-en-Provence and Marseille, the former coal mining area constitutes a typical peri-urban zone including mining industries and heavy traffic. Fine atmospheric particles (PM_{2.5}) reaches high levels in this mining area of Provence.
 PM_{2.5} can lead to cardiovascular diseases, impairment in lung function and life expectancy decrease. These physiological disorders are due to various mechanisms of action including genotoxicity.

Aim of the study: Chemical profile and chromosome damaging effects of the PM_{2.5} lipophilic phase

Materials and methods
 Cells: Normal Human Lung Fibroblasts (NHLF)
 Sampling: High flow sampler, for a week in summer and winter
 Chemical characterization: ICP-MS for metal composition, GC-MS analysis for the 16 EPA-PAHs
 Extraction: Lipophilic phase extracted from filters by dichloromethane, then dissolved in DMSO at 5mg/ml
 Genotoxicity test: Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay + CREST antibodies (centromeric labeling to discriminate aneugenic and clastogenic events) ± S9mix (metabolic activation)
 NHLF were exposed to the lipophilic PM_{2.5} fraction for 3 hours and 24 hours respectively with and without S9mix.

Results
Metals: Summer DMSO fractions contained 3 metals: Cu > Zn > As [3416 – 5303 ppb]; Zn proportion was higher at Bouc-Bel-Air site. Winter DMSO fractions contained the same 3 metals [6131 – 20201 ppb], and lower amounts of Cr, Ni, V, Al; Fe was found on Bouc-Bel-Air and Gardanne sites, and Ti on all sites except Bouc-Bel-Air.

PAHs:

PAHs concentrations detected at the sampling sites vary from [0.099 - 0.492 ng/m³].
 For each site, higher levels of PAHs were observed in winter, especially for Gardanne, Fuveau and Trets.

CBMN + CREST:

Season	S9mix	Bouc-Bel-Air		Gardanne		Meyreuil		Fuveau		Trets	
		C-MN	C-MN	C-MN	C-MN	C-MN	C-MN	C-MN	C-MN	C-MN	C-MN
Summer	Without	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	With	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Winter	Without	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	With	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

C-MN: Micronucleus with centromeric labeling, loss of chromosome = aneugenic event
 C-MN: Micronucleus without centromeric labeling, loss of chromosome fragment = clastogenic event

Conclusion
Without S9mix: Increases in C-MN were noted in Meyreuil in summer and winter, and in Trets in winter only. Augmentations in C+MN were revealed in Bouc-Bel-Air in both seasons, in Meyreuil in winter, and in Trets in summer.
With S9mix: Increases in C-MN were shown in Fuveau and Trets in both seasons, and in Gardanne and Meyreuil only in winter.
 In winter, chromosomal breakages frequently found in presence of metabolic activation may be due to high levels of atmospheric PAHs concentrations. Also, chromosomal breakages and/or losses were observed in the absence of metabolic activation for three sites out of five, regardless of the season. PM_{2.5} found in the mining area of Provence, a peri-urban zone which is characterized by heavy traffic and various mining industries, have shown direct and indirect chromosome damaging properties.
 PM_{2.5} genotoxic characteristics and atmospheric levels may be useful in preventing long-term effects related to human exposure.

German-French DNA Repair Meeting on Epigenetics and Genome integrity, 7th-10th October 2013, Illkirch, France

Revue internationale :

Noack Y., Robert S., Bley D., Lozano P., Gille G., Capezza S. (2012). Étude et évaluation multidisciplinaire de la pollution atmosphérique particulaire en milieu périurbain : le projet PACTES-BMP. Méthodologie et premiers résultats. *Sud-Ouest Européen*, 33, 77-88

Une publication sur la génotoxicité en cours de rédaction

Congrès :

Bley D., Mbetoumou M., Noack Y., Robert S., Vernazza-Licht N. (2013). La pollution de l'air dans les centres urbains : entre environnement et santé, entre perceptions et mesures. mesures. *Colloque International « Dynamiques urbaines et enjeux sanitaires »*, 11-13 Septembre 2013, Nanterre, France.

Noack Y., Miche H., Gille G., Blouvac C., Lozano D., Soubise J. (2012). Particulate atmospheric pollution around an alumina factory, Gardanne, SE France. *9th Intern. Symp. Environ. Chem., Aveiro, Portugal, 15-21 July 2012*, Abstract, p. 112

Noack Y., Leoni C., Robert S., Reis A.P., Patinha C., Fleury J. (2012). Tree leaves as indicators of dispersion of a particulate atmospheric pollution. *9th Intern. Symp. Environ. Chem., Aveiro, Portugal, 15-21 July 2012*, Abstract, p. 250

Plumejeaud S., Bonnefoy A., Noack Y., Robin D., Doumenq P., Chaspoul S., Tassistro V., Botta A., Orsière T. (2013). Chemical characterization and chromosome damaging effects of lipophilic fraction of fine particles (PM_{2.5}) collected in the mining area of Provence. *German-French DNA Repair Meeting on Epigenetics and Genome Integrity*, 7-10 October 2013, Illkirch, France

Reis A.P., Patinha C., Noack Y., Robert S., Dias A.C. (2012). Assessing human health and exposure through dust ingestion in the Bassin Minier de Provence, France. *9th Intern. Symp. Environ. Chem., Aveiro, Portugal, 15-21 July 2012*, Abstract, p. 62

Nombreux Autres supports de Communication

Evolution du projet

- **Master M2** de Sophie Plumejeaud en 2011- 2012
- **Thèse** de Sophie Plumejeaud 01/2013 – 01/2016

Bourse de thèse financée par le Labex DRIHHM

*Titre : Caractérisation et génotoxicité de la pollution atmosphérique particulaire sur les territoires des **OHM BMP et Estarreja**.*

***Extension du projet** aux particules sédimentables susceptibles d'être ingérées par les enfants lors du contact main-bouche*

***Extension de la collaboration** : **REIS Amélia**, chercheur auxiliaire, GEOBIOTEC, Université de Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193, Aveiro, Portugal*

*Financement du projet **INGEST-CHILDREN** dans le cadre de l'appel d'offre **ROHM***

*Projet Soumis à l'appel d'offre **ANSES 2014** – Attente du retour sur notre lettre d'intention*