

# Tests de génotoxicité : identifier des biomarqueurs d'effet lors des expositions à des agents cancérigènes

## EN RÉSUMÉ

Les effets sur la santé de substances ou de mélanges cancérigènes sont en général différés. Il est souvent difficile de relier ces effets à une exposition ancienne. La toxicologie dans ses approches de biologie moléculaire dispose d'outils capables d'identifier des biomarqueurs d'effets précoces, permettant ainsi d'apporter un début de réponse à cette problématique. Cet article évoque quelques-uns de ces outils de toxicologie développés et utilisés en recherche, notamment lors d'études épidémiologiques, en les illustrant avec des exemples.

### AUTEURS :

C. Darne, Y. Guichard, C. Seidel, L. Gaté, département Toxicologie et biométrie, laboratoire Cancérogénèse, mutagénèse et reprotoxicité, INRS

### MOTS CLÉS

CMR / Cancer / Cancérogène / Produit chimique / Produit génotoxique / Produit mutagène / Produit reprotoxique / Produit cancérigène mutagène et reprotoxique / Surveillance biologique / Biométrie

**L**a prévention des cancers d'origine professionnelle passe notamment par l'identification des agents suspectés d'être cancérigènes, mutagènes ou reprotoxiques (CMR), l'analyse des procédés de travail, la mesure de l'exposition des travailleurs et l'évaluation des risques. Elle vise à mettre en œuvre tous les moyens permettant d'éviter les atteintes à la santé.

Des disciplines comme l'épidémiologie, associées à des méthodes de biométrie\*, apportent des connaissances essentielles pour cette prévention. Par définition, l'épidémiologie « étudie la fréquence et la répartition dans le temps et dans l'espace des problèmes de santé dans des groupes humains, ainsi que le rôle des facteurs qui les déterminent ». Elle vise à identifier les causes des maladies et à évaluer leurs traitements et les moyens de prévention [1]. La biométrie, ou surveillance biologique, quand elle est utilisée en

milieu professionnel, participe à l'évaluation ou évalue l'exposition des travailleurs à des substances chimiques ou biologiques de l'environnement de travail. Elle s'appuie sur l'utilisation de biomarqueurs. Un biomarqueur étant défini par l'organisation mondiale de la santé (OMS) comme « toute substance, structure ou processus pouvant être mesuré(e) dans le corps humain ou les matrices biologiques, susceptible d'influencer ou de prédire l'incidence ou l'apparition d'une maladie ». On distingue ainsi des biomarqueurs d'exposition, des biomarqueurs d'effet et des biomarqueurs de susceptibilité [2].

Si les biomarqueurs d'exposition sont liés aux expositions professionnelles et requièrent des mesures pour caractériser des atmosphères de travail, les biomarqueurs d'effet mettent en évidence des conséquences de l'exposition à la ou aux substances sur l'organisme ; ils sont bien

\* Les mots mis en couleur tout au long de l'article trouvent leur définition dans l'encadré 1 page suivante.

**Tests de génotoxicité** : identifier des biomarqueurs d'effet lors des expositions à des agents cancérogènes

↓ Encadré 1

> GLOSSAIRE

**ADN** : Acide désoxyribonucléique, acide nucléique constitué de deux brins enroulés en double hélice, porteur de l'information génétique.

**Allèle** : Variante d'un gène.

**Anémie hémolytique corpusculaire** : Destruction des globules rouges à la suite d'une anomalie intrinsèque.

**Aneugène** : Qui provoque un nombre anormal de chromosomes.

**Aneuploïdie** : Nombre anormal de chromosomes dans une cellule.

**Aplasia médullaire** : Baisse de la production de cellules sanguines par la moelle osseuse.

**ARN** : Acide ribonucléique, produit par la **transcription** de l'ADN.

**Bases de l'ADN** : Les brins d'ADN sont constitués d'une succession de nucléotides. Chaque nucléotide est constitué par un groupement phosphate, un sucre (le désoxyribose) et une base azotée. Les bases peuvent être l'adénine, la thymine, la guanine ou la cytosine.

**Biomarqueur** : Toute substance, structure ou processus pouvant être mesuré(e) dans le corps humain ou les matrices biologiques, susceptible d'influencer ou prédire l'incidence ou l'apparition d'une maladie.

**Biomarqueur d'exposition** : Substance exogène, métabolite

primaire ou réponse à une interaction entre un agent xénobiotique et une molécule ou cellule-cible, mesurée dans un compartiment de l'organisme.

**Biomarqueur d'effets** : Altération biochimique, physiologique, comportementale ou autre, mesurable dans un organisme, qui selon son ampleur, peut être reconnue comme étant associée à une atteinte confirmée ou possible de l'état de santé ou à une maladie.

**Biomarqueur de susceptibilité** : Indicateur de la capacité innée ou acquise d'un organisme à répondre à l'exposition à une substance xénobiotique spécifique.

**Biométrie ou surveillance biologique** : Discipline scientifique ayant comme principal objectif l'évaluation du risque chimique et qui, en milieu professionnel, cherche à objectiver l'imprégnation de salariés ayant été exposés à des substances chimiques, ou biologiques (endotoxines, mycotoxines) au moyen de mesures de concentration de substances ciblées, et/ou de leurs métabolites, dans des matrices biologiques (urine, sang, condensat de l'air exhalé) recueillis lors de déplacement en entreprise.

**Caryotype** : Arrangement de l'ensemble des chromosomes d'une cellule, à partir d'une vue microscopique, par paire et par taille.

**Chromatide** : Un des deux filaments identiques qui constitue le chromosome, relié à l'autre au niveau du centromère.

**Chromatine** : ADN, ARN et protéine au sein du noyau sous une forme non structurée.

**Chromosome** : Constitué d'une molécule d'ADN et de protéines (histones et protéines non histones). Correspond à une structure condensée de l'ADN caractéristique en une forme de X, de Y ou de bâtonnet.

**Clastogène** : Qui provoque des cassures dans la molécule d'ADN.

**Délétion** : Perte/suppression d'un fragment d'ADN.

**FISH (Fluorescent in situ hybridation)** : Technique utilisant des morceaux spécifiques d'une région de l'ADN, permettant de repérer avec un microscope à fluorescence la position d'un gène ou d'une séquence sur les chromosomes. Cela permet de repérer des positions anormales dues à des translocations par exemple.

**Histone** : Protéine du noyau se liant à l'ADN, indispensable pour former les différentes structures de l'ADN (chromatine, **chromatide**...), elles interviennent aussi dans l'expression des gènes.

**Hydrolyse** : Réaction chimique et enzymatique ayant pour effet de rompre une liaison covalente à l'aide d'une molécule d'eau.

**Hyperplasie** : Développement anormal par multiplication cellulaire.

**Inversion** : Renversement d'une portion d'ADN.

**Liaison covalente** : Liaison chimique où deux atomes partagent des électrons par

paire, c'est une liaison forte qui nécessite de l'énergie pour être rompue.

**Métabolite** : Composé issu d'une transformation biochimique d'une molécule initiale.

**Métaphase** : Phase de la mitose (processus de division des cellules somatiques) et de la méiose (processus de division des cellules germinales) consistant au rassemblement des chromosomes à l'équateur de la cellule avant d'être séparés lors de la phase suivante.

**Méthylation de l'ADN** : Ajout d'un groupe méthyle (CH<sub>3</sub>) au niveau principalement des cytosines et adénines de l'ADN.

**Phosphorylation** : Ajout d'un groupement phosphate.

**Polymorphisme** : Variation au sein d'une population créant des caractéristiques différentes entre les individus ou des groupes de population.

**Polymorphisme génétique** : variation dans l'information génétique créant un phénotype (caractère visible) différent.

**Thrombose** : Obstruction d'une veine ou d'une artère par un caillot.

**Transcription** : Synthèse d'ARN à partir d'ADN.

**Translocation** : Échange réciproque de régions, morceaux de chromosome entre des chromosomes non homologues.

**Xénobiotique** : Se dit d'une molécule étrangère à un organisme vivant et considérée comme toxique.

souvent reconnus comme étant la signature d'un effet biologique délétère. Compte tenu de leur importance, bon nombre de travaux s'attachent à décrire et valider de nouveaux marqueurs d'effet. Ceux-ci sont d'autant plus pertinents en prévention qu'ils sont précoces, c'est-à-dire qu'ils sont prédictifs d'une pathologie en lien avec une exposition sans pour autant que la pathologie ne soit déclarée. Idéalement, les meilleurs biomarqueurs d'effets devraient être suffisamment précoces pour que l'on puisse, en supprimant l'exposition, limiter l'évolution de la pathologie ou mieux, permettre la réversibilité de ses effets.

Pour la prévention des risques professionnels, l'identification de substances ou de mélanges cancérogènes pour l'Homme est une problématique majeure. Les effets cancérogènes de ces composés étant en général différés, et donc difficiles à relier à une exposition souvent ancienne, il est indispensable d'identifier ces agents et de caractériser les expositions le plus tôt possible, avant même que des effets sur la santé ne se manifestent. Dans un souci d'efficacité, il conviendrait de déterminer des marqueurs de cancérogenèse pertinents sur lesquels reposeraient des mesures de prévention avant même la survenue de la pathologie et de sa symptomatologie.

La toxicologie, dans ses approches de biologie moléculaire, peut d'ores et déjà fournir un certain nombre d'outils capables d'identifier des biomarqueurs d'effet précoces et de répondre ainsi aux exigences de la prévention. L'objectif de cet article est d'évoquer quelques techniques de toxicologie génétique développées et utilisées en épidémiologie, en les illustrant avec des exemples d'utilisation. Dans l'idéal, la mise en

œuvre de ces outils doit être facile, non invasive et de faible coût.

Les atteintes de l'**ADN (acide désoxyribonucléique)** mises en évidence au travers des tests de génotoxicité constituent des biomarqueurs d'effet. Certains de ces tests peuvent d'ores et déjà être utilisés dans le cadre d'études épidémiologiques et de biométrie. En dehors de ces domaines scientifiques spécifiques, leur utilisation reste limitée car ils nécessitent de l'expertise, un peu de matériel, et leur pertinence est associée à une connaissance approfondie du contexte (sujets, environnement de travail, facteurs de confusion, matrice utilisée...).

## AGENTS CANCÉROGÈNES ET OUTILS DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Les agents cancérogènes sont classés en deux groupes : le groupe des agents « génotoxiques », qui exercent une action directe sur l'ADN dans les premières phases de la cancérogenèse, et le groupe des agents « non génotoxiques », dont l'action n'est pas directe. Pour cette dernière catégorie, qui ne sera pas abordée dans le cadre de cet article, aucune modification de la séquence d'ADN n'est observée ; néanmoins, l'expression des gènes codés par cet ADN peut être modifiée par des mécanismes dits « épigénétiques » et se traduire par des modifications biochimiques de l'ADN (**méthylation**...), des modifications du métabolisme cellulaire, de la réponse immunitaire. Au niveau des organes ou de l'organisme, des modifications morpho-pathologiques peuvent être observées suite à l'intervention de mécanismes épigénétiques (inflammation, **hyperplasie**...).

Aujourd'hui, la plupart des méthodes utilisées en surveillance biologique sont celles détectant des effets génotoxiques des substances, donc celles qui mettent en évidence une altération du matériel génétique porteur de l'information, l'ADN contenu dans le noyau des cellules qui composent l'organisme. L'objectif de ces techniques n'est pas de mettre en évidence des cellules cancéreuses, mais de rechercher, dans des cellules normales, des atteintes de l'ADN pouvant conduire à des mutations qui, à long terme, pourraient induire des cancers.

Les cellules de l'organisme comportent un noyau contenant la molécule d'ADN. Cette molécule porte l'information génétique à la base de la constitution et du fonctionnement de l'organisme. L'ADN est compacté à l'aide de multiples familles de protéines mais la structure est dynamique et plusieurs états de l'ADN peuvent co-exister au sein du noyau. L'état sous forme de chromosome ne se retrouve que lorsque les cellules entament leur division. En dehors de cette période de division, l'ADN apparaît sous une forme moins structurée, appelée **chromatine**.

Les cellules humaines sont dotées de mécanismes de réparation de l'ADN qui, en cas de dommages, réparent et permettent de conserver l'intégrité de l'ADN. Lorsque ces mécanismes sont dans l'impossibilité de réparer les dommages, ou de corriger les erreurs d'écriture du code génétique, la cellule enclenche alors un processus de mort cellulaire programmée, appelée apoptose. Mais dans certaines situations, les dommages à l'ADN peuvent persister sans pour autant entraîner la mort de la cellule. Des erreurs (mutations - réarrangements chromosomiques) sont ainsi introduites dans l'ADN,

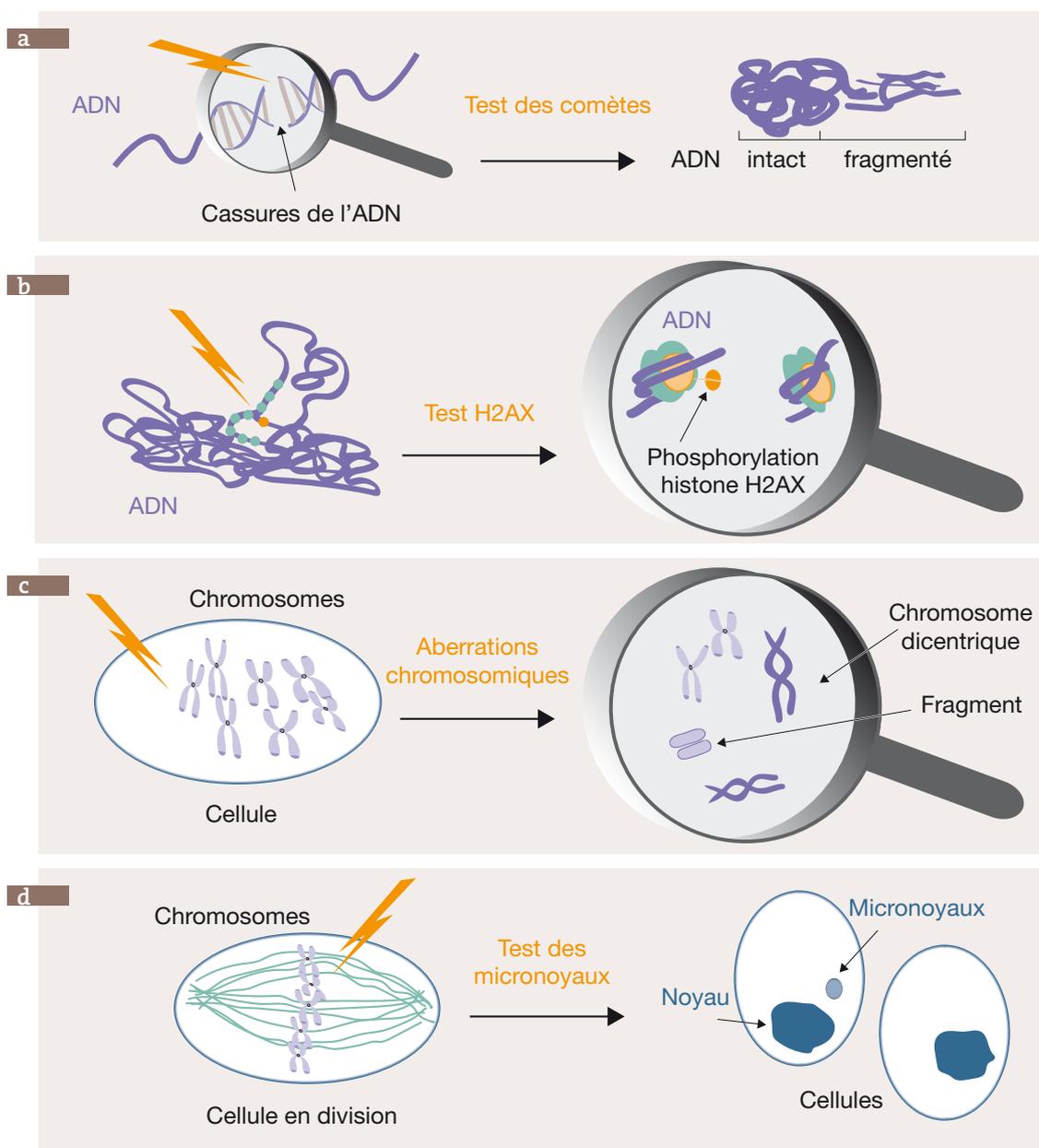
**Tests de génotoxicité** : identifier des biomarqueurs d'effet lors des expositions à des agents cancérogènes

ce qui peut conduire à la formation de cellules cancéreuses. Un ensemble de tests est aujourd'hui disponible, faisant appel à des méthodologies devenues classiques en toxicologie et constituant des outils faciles à mettre en œuvre pour la mise en évidence

des atteintes directes de l'ADN par les agents cancérogènes qui possèdent cette propriété. Le test des comètes (figure 1a) détecte les cassures de l'ADN, le test des aberrations chromosomiques (figure 1c) détecte les anomalies de réarrangements, des cassures de chromo-

somes, consécutives à des erreurs lors de la division cellulaire, le test des micronoyaux (figure 1d) met en évidence la présence d'ADN extra nucléaire, le test H2AX (figure 1b) recherche la présence d'une histone phosphorylée à proximité d'une cassure.

Figure 1 : Les tests utilisés pour la mise en évidence des effets des agents cancérogènes génotoxiques.



## CASSURES DE L'ADN

### TEST DES COMÈTES

Les cassures de l'ADN peuvent être mises en évidence à l'aide du test des comètes, également appelé SCGE (*Single cell gel electrophoresis*). Cette technique permet de mesurer des cassures de l'ADN induites directement par la substance chimique sur cette biomolécule, ou indirectement par des processus enzymatiques défectueux de réparation. Initialement mise au point par Oosting et Johanson, en 1984 [3], pour détecter les cassures double brin, la technique a ensuite été améliorée par Singh et al., en 1988 [4], avec l'adjonction d'un agent alcalin qui permet de détecter également les cassures simple brin et les sites alcali-labiles (sites sensibles aux conditions alcalines, conduisant à une cassure de l'ADN). Aujourd'hui l'introduction d'une étape de digestion enzymatique permet en plus de mettre en évidence des modifications des **bases composant l'ADN**.

Le principe de la technique est de soumettre à un champ électrique l'ADN cellulaire préalablement inclus dans un gel d'agarose et de le traiter en conditions alcalines. Sous l'effet du champ électrique, les fragments d'ADN se déplacent dans le gel d'agarose plus rapidement que l'ADN intact de plus grosse taille. Après marquage de l'ADN par un agent fluorescent, l'ensemble de l'ADN (intact et dégradé) est facilement visualisable et quantifiable avec un microscope à fluorescence. Les fragments clivés de l'ADN donnent la queue de la comète, l'ADN intact restant sous une forme compacte (**figure 1a**). C'est cet aspect de « comète » qui est révélateur de cassures de l'ADN et qui est quantifiable.

Le test nécessite l'obtention de cellules nucléées ou de leurs noyaux intacts. On l'utilise donc principalement en biosurveillance humaine à partir de prélèvements sanguins (lymphocytes), de cellules buccales ou de sperme.

À titre d'exemple, le test des comètes a été utilisé pour déterminer les effets génotoxiques de l'exposition au formaldéhyde et au dioxyde d'azote dans une ville italienne, à partir de prélèvements buccaux chez des enfants [5]. Au Brésil, c'est à partir de sang total, que l'équipe de Moro et al. a démontré que l'exposition au benzène a des effets génotoxiques sur des personnels de station d'essence [6].

Cette technique permet de quantifier les dommages à l'ADN et peut mettre en évidence des relations dose-effet. Elle est relativement sensible, mais n'est pas spécifique d'un agent. Elle nécessite donc d'être complétée par la recherche de marqueurs d'exposition (recherche de l'agent ou de ses **métabolites** chez les sujets testés). Par ailleurs, certains facteurs comme le tabac doivent être pris en compte car ce sont des facteurs confondants qui peuvent aussi induire des cassures de l'ADN. Si la réalisation du test ne nécessite que quelques heures, son analyse est un peu plus longue en raison de la nécessité d'acquiescer au minimum une centaine d'événements par échantillon afin de renforcer le traitement statistique. La technique nécessite un minimum de matériel : un microscope à fluorescence, un logiciel d'analyse d'image, le matériel d'électrophorèse... et un prélèvement cellulaire. Les cellules sanguines restent le matériel de choix dans ce type d'étude. L'avantage de tels échantillons sanguins est qu'ils peuvent

être traités immédiatement ou congelés pour être testés plus tard.

### PHOSPHORYLATION DE LA PROTÉINE $\gamma$ H2AX

H2AX est une protéine **histone**, distribuée de façon ubiquitaire sur tout le génome. Cette histone participe à la réparation de l'ADN. Pour cela, elle se lie à l'ADN à proximité des cassures double brin où elle est rapidement **phosphorylée**. Ainsi, le nombre de foyers de H2AX phosphorylés est corrélé au nombre de cassures double brin de l'ADN ; leur comptage permet donc de déterminer le nombre de cassures double brin de l'ADN (**figure 1b**).

Cette technique consiste à placer les cellules préalablement préparées en présence d'un anticorps spécifiquement dirigé contre la forme phosphorylée de H2AX et de le coupler ensuite avec un anticorps secondaire fluorescent afin de pouvoir dénombrer les foyers. Ainsi, l'analyse peut se faire par microscopie à fluorescence ou par cytométrie en flux (détection du marquage par passage d'un flux de cellules isolées devant un laser). Dans le cas de la biométrie, comme pour le test des comètes, un prélèvement sanguin est préférable, même si théoriquement tout type de cellules nucléées peut être utilisé.

Cette technique pourrait être une alternative intéressante car, à partir d'un prélèvement sanguin, le dénombrement des foyers et leur analyse peuvent être plus rapides que ceux du test des comètes. D'ailleurs, cette technique a été utilisée pour déterminer les effets génotoxiques du radon sur des lymphocytes prélevés chez des volontaires [7].

Cependant, si cette technique n'est pas encore pleinement

## Tests de génotoxicité : identifier des biomarqueurs d'effet lors des expositions à des agents cancérigènes

utilisée, c'est parce qu'elle souffre de quelques inconvénients. D'abord, il existe une grande variété de méthodes dans la littérature, ce qui rend la comparaison des résultats délicate. Ensuite, la réparation des cassures double brin est un processus cellulaire dynamique et complexe ; en effet la présence de  $\gamma$ H2AX apparaît rapidement (30 min) après l'apparition des cassures, mais une grande partie disparaît presque aussi rapidement, ce qui rend le dénombrement des foyers délicat et incertain compte tenu de l'étroitesse de la fenêtre d'analyse. Pour finir, il existe une grande variabilité d'expression de H2AX en fonction des cellules ou tissus explorés, ce qui complique l'interprétation des niveaux de  $\gamma$ H2AX.

### DÉTECTION DES ADDUITS À L'ADN [8]

Lorsqu'un agent chimique pénètre dans l'organisme, il peut être éliminé sous sa forme native, ou être métabolisé (transformé) *via* des réactions chimiques (conjugaison, oxydation, **hydrolyse**...). Le plus souvent, les métabolites sont moins réactifs et plus facilement éliminables. Cependant, certaines étapes conduisent à la formation d'intermédiaires réactifs qui réagissent avec des protéines, des lipides et également avec des acides nucléiques (ADN, **ARN**). Au niveau de l'ADN, ils se fixent par des **liaisons fortes, dites covalentes**. On parle alors d'adduits à l'ADN qui peuvent créer une déformation, une distorsion de la molécule qui aboutit en règle générale à une cassure de la molécule d'ADN. La formation de ces adduits est visible quelques heures ou quelques jours après l'exposition suivant la nature de la substance et les individus. Certains adduits provoquent des modifications des

bases de l'ADN dont la « lecture » peut être erronée lors de la réplication de l'ADN. La formation d'adduits peut ainsi conduire à l'apparition de mutations et au développement de cancers si ces adduits ne sont pas éliminés ou si l'ADN est mal réparé.

La détection de ces adduits peut être faite par des techniques de post-marquage au phosphore 32 (incorporation de phosphore radioactif au niveau de l'adduit), d'immunomarquage (utilisation d'anticorps dirigés contre les adduits lorsqu'ils sont disponibles), mais la technique aujourd'hui privilégiée est celle de la chromatographie en phase liquide couplée à de la spectrométrie de masse (LC-MS), une technique très sensible qui permet de mettre en évidence des adduits à l'ADN spécifiques de substances chimiques et, le cas échéant, une relation dose-effet.

Parmi les agents connus pour former des adduits de l'ADN, on peut citer les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) [9], les nitrosamines [10], les mycotoxines [11]. Les matrices biologiques utilisées comme source d'ADN sont souvent le sang, les cellules buccales, les cellules retrouvées dans l'urine.

Aujourd'hui, une bonne corrélation a pu être établie entre la présence d'adduits et l'exposition à des cancérigènes, même si des précautions d'usage dans l'analyse sont nécessaires (recherche de facteurs confondants, capacité métabolique individuelle, polymorphisme – cf. *Les facteurs de confusion et les différences individuelles* pp. 126-127). La difficulté de la recherche des adduits réside dans la technique d'analyse par LC-MS qui nécessite un équipement lourd et onéreux.

## ALTÉRATIONS CHROMOSOMIQUES

### ABERRATIONS CHROMOSOMIQUES

La recherche d'aberrations chromosomiques est sans doute l'un des tests de génotoxicité parmi les plus anciens utilisés en biométrie. L'INRS l'avait utilisé dès la fin des années 80 pour déterminer les effets du chrome, du nickel et du manganèse chez des soudeurs [12]. La technique consiste à rechercher les anomalies au niveau du **caryotype** (l'ensemble des chromosomes). Des modifications du nombre de **chromosomes (aneuploïdie)** sont recherchées, ainsi que des anomalies de structure des chromosomes (**délétions, translocation, inversion...**) (**figure 1c**). Cette technique peut utilement être complétée par de l'hybridation *in situ* par fluorescence (**FISH**), qui permet de déterminer plus précisément les régions et séquences chromosomiques impactées, certaines d'entre elles étant connues pour leur rôle majeur dans le développement de cancers. Dans son principe, les cellules analysées doivent être au stade **métaphase** de la division cellulaire. Le plus souvent, les cellules sont cultivées puis bloquées au stade recherché avec de la colchicine (alcaloïde bloquant la division cellulaire). Les cellules doivent donc pouvoir se diviser, c'est pourquoi ce type d'analyse est réalisé sur des lymphocytes issus de prélèvements sanguins.

Les anomalies chromosomiques peuvent persister dans les lymphocytes, ce qui permet de mesurer les effets d'expositions antérieures et/ou cumulées. En revanche, cela ne permet pas de relier directement ces modifications chromosomiques à une exposition récente. Par ailleurs, cette technique néces-

site d'avoir une population témoin et d'établir une étude préalable du contexte d'intervention et des populations étudiées. À l'instar des autres tests, certains facteurs confondants doivent être identifiés lors de l'analyse. Pour finir, ce test est lourd et fastidieux, plus de 200 métaphases sont nécessaires pour réaliser une analyse fiable. C'est pourquoi le test des micronoyaux lui est préféré aujourd'hui.

#### FORMATION DE MICRONOYAUX ADN

Ce test consiste à mettre en évidence des « micronoyaux », qui sont en fait des fragments de chromosomes, ou des chromosomes entiers, résultants d'un dysfonctionnement au moment de la division cellulaire qui se retrouvent ensuite dans le cytoplasme (**figure 1d**). Ainsi, l'exposition à un agent chimique peut conduire, soit à un effet **clastogène** par cassure d'un chromosome, soit à un effet **aneugène** (élimination d'un chromosome entier au moment de la division cellulaire) en perturbant la ségrégation chromosomique. Schématiquement, à partir d'un prélèvement de cellules dont les noyaux ont été marqués, les micronoyaux sont recherchés sur des cellules ayant effectué au moins une division. L'augmentation du nombre des cellules anormales parmi les sujets exposés par rapport à une population témoin est le signe d'une exposition à un produit génotoxique, et des relations dose-effet peuvent être mises en évidence le cas échéant.

Aujourd'hui, la plupart des études de biométrie sont réalisées à partir de prélèvements sanguins. Les lymphocytes issus de ces prélèvements sont mis en culture et prolifèrent pendant 2-3 jours, avant d'être bloqués à la fin de leur division par un agent chimique

(la cytochalasine B) afin d'obtenir des cellules binucléées. Ces cellules binucléées sont le signe d'une division entamée mais non finie, permettant de conserver d'éventuels micronoyaux. Il ne reste plus qu'à déterminer la fréquence d'augmentation de cellules avec micronoyaux dans la population exposée par rapport à la population témoin. Chrome, nickel, [13], chlorure de vinyle [14], benzène [6], radiations ionisantes [15]... beaucoup d'études de biosurveillance mettent aujourd'hui en œuvre le test des micronoyaux sur lymphocytes.

Le test sur prélèvement de cellules buccales est de plus en plus utilisé car moins invasif que la prise de sang. À titre d'exemple, l'INRS mène actuellement, avec d'autres partenaires, une étude épidémiologique sur les effets des brouillards de fluides de coupe. Un des volets de cette étude consiste à évaluer les éventuels effets génotoxiques en réalisant un test des micronoyaux sur les cellules buccales de travailleurs volontaires exposés ou non lors de l'accomplissement de leurs tâches [16].

Aisé à mettre en œuvre et d'une lecture facile, le test des micronoyaux est aujourd'hui la technique la plus souvent utilisée. En revanche, il faut s'assurer que les cellules observées ont la capacité de se diviser. La formation de micronoyaux étant reliée au taux de renouvellement cellulaire, le moment de l'observation est à déterminer en fonction de la durée du cycle de division cellulaire. Ce test nécessite l'utilisation d'un microscope et l'analyse des échantillons est longue car il faut un nombre minimal de cellules à analyser, plus de 2 000 par échantillon. Des systèmes de lecture automatisée sont aujourd'hui disponibles : ils

permettent d'uniformiser les analyses, mais nécessitent des préparations de très bonne qualité, parfois délicates à obtenir en fonction de la provenance des échantillons.

#### MUTATIONS

Au-delà de ces tests « classiques » de mise en évidence des atteintes génomiques largement utilisés en toxicologie, d'autres pistes, d'autres biomarqueurs pourraient se révéler pertinents au fur et à mesure du développement des connaissances. La mise en évidence de mutations acquises est de toute évidence une piste à creuser. Les tests de mutagenèse actuels ne permettent pas encore la détection directe de mutations chez l'homme et nécessitent souvent une étape préalable de culture cellulaire. Mais la meilleure connaissance de l'hémogloburie paroxystique nocturne (HPN), connue depuis la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, et qui se caractérise par une **anémie hémolytique corpusculaire**, une **aplasie médullaire** et la survenue fréquente de **thromboses**, pourrait permettre certaines évolutions dans le domaine. En effet, les travaux de recherche ont permis de montrer que cette maladie était causée par la mutation acquise d'un gène codant pour une enzyme, la phosphatidyl inositol glycanase classe A (**PIG-A**) [17]. L'élément important est que la mutation d'un seul des deux **allèles** sur le chromosome suffit pour causer une HPN, ce qui en fait un facteur sensible et facile à mettre en évidence. Aujourd'hui, le test **PIG-A** sur sang total est fondé sur la mesure de la fréquence de cellules déficientes pour le gène **PIG-A** qui code une sous-unité enzymatique impliquée dans la synthèse de la protéine d'ancrage GPI (glycosylphosphatidyl-inositol). Les cellules

## Tests de génotoxicité : identifier des biomarqueurs d'effet lors des expositions à des agents cancérigènes

circulantes dépourvues d'ancre GPI, et donc déficientes pour *PIG-A*, peuvent être détectées par cytométrie en flux.

Ce gène peut donc être utilisé comme gène « sentinelle » ou « rapporteur » d'apparition de mutations. Grâce à une telle méthode, il devient donc possible, en mesurant des cellules déficientes pour l'ancre GPI, d'étudier et d'identifier des facteurs environnementaux qui influencent la fréquence de mutation. Cette technique est prometteuse, et de premières études sur des populations de travailleurs la mettent déjà en œuvre [18, 19], mais elle nécessite encore des développements et une bonne compréhension des effets observés pour être appliquée en biométrie humaine, notamment en raison des facteurs confondants comme l'âge, l'hygiène de vie... [20, 21].

### MISE EN ŒUVRE : LIMITES TECHNIQUES, RÉGLEMENTAIRES ET ÉTHIQUES

#### LES MATRICES BIOLOGIQUES

L'étude des biomarqueurs nécessite une matrice, un échantillon, en provenance des individus étudiés. Ongles, cheveux, lait, sperme, urine, cellules buccales, sang sont utilisés en fonction des objectifs de recherche, mais le caractère invasif de certains prélèvements est une limitation au déploiement de beaucoup de ces techniques. Pour la mise en œuvre des tests de génotoxicité, le principal écueil provient de la nécessaire obtention de cellules nucléées. Le prélèvement sanguin est la méthode la plus souvent retenue mais cette méthode est invasive, bien que des techniques de prélèvement nouvelles

et moins invasives apparaissent (prélèvement de goutte de sang séché). Le prélèvement de cellules buccales ou oro-nasales, moins invasif, est aussi possible mais les rendements sont faibles et les cellules présentes sont variées en type et en proportions. Ces mêmes limites sont applicables aux prélèvements urinaires et aux cellules exfoliées qu'ils contiennent, qui sont de provenance variée (tractus urogénital, rein...) et en faible quantité. L'utilisation de cellules germinales (sperme) est aussi possible mais ne concerne qu'un seul sexe, et l'utilisation de ces cellules aux caractéristiques particulières pose encore aujourd'hui des problèmes de méthodologie et d'interprétation lors de la réalisation des tests.

#### LES FACTEURS DE CONFUSION

Les biomarqueurs d'effet génotoxique sont influencés par des facteurs confondants dont il faut tenir compte dans l'analyse des résultats des tests évoqués ci-dessus. L'âge, l'hygiène de vie, le stress, l'alimentation, les traitements médicaux, l'environnement, le sexe sont autant de paramètres qui sont et doivent être pris en compte dans les études épidémiologiques et de biométrie en milieu professionnel. La plupart de ces facteurs sont connus et pris en compte depuis longtemps par les épidémiologistes. Les consommations de tabac ou d'alcool sont des facteurs cancérigènes établis. Les substances générées par la combustion du tabac et la fumée contiennent de nombreux cancérigènes qui peuvent induire des effets génotoxiques, dont des cassures de l'ADN. Ces dernières peuvent être mises en évidence au travers du test des comètes ou des micronoyaux. Il en va de

même pour certains traitements médicamenteux. L'avancée en âge est une autre source de biais, car le vieillissement impacte l'ADN. À titre d'exemple, les régions télomériques situées à l'extrémité des chromosomes se raccourcissent au fil des divisions cellulaires, entraînant une modification de l'information portée par les extrémités de l'ADN [22].

L'alimentation joue également un rôle majeur en affectant le métabolisme cellulaire ou la réponse cellulaire : sucres, lipides, aliments contenant des anti-oxydants, des hormones végétales ou animales, sont autant de substances pouvant affecter le fonctionnement cellulaire et conduire à des réponses cellulaires différentes en fonction de leur consommation. Dans une étude épidémiologique en milieu professionnel, il est donc très important de recenser et de prendre en compte toutes ces données pour ne pas produire une analyse erronée à partir des biomarqueurs étudiés.

#### LES DIFFÉRENCES INDIVIDUELLES

L'analyse des effets d'une exposition nécessite parfois l'appréciation et la recherche de facteurs de susceptibilité. Il s'agit de marqueurs reflétant une ou des caractéristiques d'un organisme le rendant plus sensible aux effets d'un agent après une exposition. On parle de biomarqueurs de susceptibilité, de **polymorphisme génétique** ou de susceptibilité individuelle. Après pénétration dans l'organisme, les **xénobiotiques** sont le plus souvent métabolisés, c'est-à-dire transformés par les cellules de l'organisme afin d'être éliminées. Les molécules ainsi créées sont le plus souvent moins toxiques mais ce n'est pas toujours le cas. Ce processus de transforma-

tion s'effectue grâce au « bagage » enzymatique des cellules qui peut être différent d'un individu à un autre, d'une population à une autre. Ainsi, la réponse cellulaire et la métabolisation des substances ne sont pas parfaitement identiques chez tous les individus.

Le cas du cytochrome P450 est un bon exemple. Il s'agit d'une famille de métalloprotéines impliquées dans des réactions d'oxydoréduction dans les cellules. Elles sont aussi impliquées dans la transformation de molécules exogènes. On compte aujourd'hui plusieurs centaines de cytochromes différents avec des activités enzymatiques différentes. La « composition » en cytochromes P450 et leur polymorphisme dans les populations modifieront donc la réponse à la présence d'un xénobiotique [23].

## ASPECTS RÉGLEMENTAIRES ET ÉTHIQUES

Après l'évaluation du danger des substances, la surveillance biologique est un excellent outil pour le repérage des effets infracliniques. La recherche et l'utilisation de biomarqueurs sont précieuses dans les études épidémiologiques afin de mettre en relation les expositions professionnelles et leurs effets précoces sur la santé. L'utilisation d'échantillons humains est précisément encadrée par la législation. Avant tout prélèvement, il faudra s'entourer de bon nombre de précautions comme l'obtention d'un consentement éclairé auprès des volontaires, la mise en œuvre de procédures et d'outils garantissant la sécurité et la confidentialité des données médicales individuelles et la gestion rigoureuse des échantillons biologiques. Ces mesures relèvent notamment du règlement général sur la protection des données (RGPD) et de la loi relative aux re-

cherches impliquant la personne humaine (loi Jardé).

Par ailleurs, il convient de toujours garder à l'esprit que les biomarqueurs de susceptibilité, choisis sur des critères de validité scientifique et de pertinence pour la protection des travailleurs, ne doivent pas être utilisés à des fins de dépistage et/ou d'assurance et/ou d'aptitude à tel ou tel emploi/tâche. Ces biomarqueurs devraient servir à réévaluer les valeurs limites d'exposition professionnelle ou à aménager les postes de travail pour protéger l'ensemble des travailleurs en tenant compte des plus sensibles. La biométrie est un outil utile pour améliorer les conditions de travail, mais elle ne doit pas entraîner de discrimination ou de réduction d'accès à l'emploi. La prévention des risques professionnels s'effectue d'abord par la substitution des agents dangereux s'ils ne peuvent pas être éliminés, et ensuite par le développement et la mise en place de protections collectives puis individuelles et le contrôle des expositions.

Lorsque les tests décrits ci-dessus sont utilisés dans des études de populations au travail, la restitution des résultats doit être réalisée en exposant le contexte des situations de travail et les résultats d'analyse des atmosphères de travail. Même si les résultats sont obtenus pour chaque individu, l'analyse de ces résultats doit se faire à l'échelle des groupes d'exposition caractérisés. Une analyse et une restitution pour chaque individu n'apparaissent pas recommandées, en raison de la sensibilité de ces tests aux facteurs confondants, susceptibilités individuelles, mécanismes de cassures et réparations endogènes qui génèrent un « bruit de fond » pouvant conduire à une mauvaise imputation des effets.

## CONCLUSION

L'utilisation des tests de génotoxicité décrits brièvement ci-dessus présente des avantages non négligeables pour les études portant sur la surveillance biologique de populations de travailleurs. Le premier d'entre eux est qu'au travers de ces analyses, ce n'est pas seulement l'exposition, mais également les effets biologiques qui sont déterminés. En conséquence, ils permettent d'évaluer le danger, et par extension le risque, encourus par les salariés exposés à des substances ou mélanges de substances CMR.

Autre avantage, les effets mesurés sont le reflet de l'exposition « totale ». Ils ne sont pas, le plus souvent (sauf conditions particulières), attribuables à un agent, mais au mélange présent dans l'atmosphère de travail. Il y a donc tout intérêt aujourd'hui à incorporer ce type de test, en plus des mesures d'expositions, dans les études épidémiologiques, lorsque les prélèvements de matrices biologiques nécessaires sont possibles.

POINTS À RETENIR  
ET BIBLIOGRAPHIE



**Tests de génotoxicité** : identifier des biomarqueurs d'effet lors des expositions à des agents cancérigènes

## POINTS À RETENIR

- Les agents cancérigènes sont dits « génotoxiques » si leur action s'exerce directement sur l'ADN, en altérant le matériel génétique.
- Plusieurs tests toxicologiques sont disponibles pour mettre en évidence des atteintes directes de l'ADN.
- Le test des comètes et le test  $\gamma$ H2Ax mesurent les cassures de l'ADN.
- Le test des adduits à l'ADN met en évidence la fixation d'une substance ou de l'un ou de ses métabolites, sur l'ADN.
- Le test des micronoyaux et celui des aberrations chromosomiques mesurent les altérations chromosomiques.
- Le test *PIG A* met en évidence une mutation de l'ADN.
- Les études épidémiologiques en milieu professionnel qui utilisent ces tests doivent prendre en compte de nombreux facteurs de confusion et respecter un cadre réglementaire précis.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 | BOURGKARD E, DEMANGE V, AUBRY C - L'épidémiologie en santé au travail (I). Définitions et concepts. Pratiques et déontologie TM 9. *Doc Méd Trav*. 2007 ; 112 : 477-86.
- 2 | VINCENS F - Indicateurs biologiques d'effets précoces. Leur utilisation dans la prévention du risque chimique en santé au travail. Grand angle TC 149. *Ref Santé Trav*. 2015 ; 141 : 23-33.
- 3 | OSTLING O, JOHANSON KJ - Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984 ; 123 (1) : 291-98.
- 4 | SINGH NP, MCCOY MT, TICE RR, SCHNEIDER EL - A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 1988 ; 175 (1) : 184-91.
- 5 | MARCON A, FRACASSO ME, MARCHETTI P, DORIA D ET AL. - Outdoor formaldehyde and NO<sub>2</sub> exposures and markers of genotoxicity in children living near chipboard industries. *Environ Health Perspect*. 2014 ; 122 (6) : 639-45.
- 6 | MORO AM, CHARÃO MF, BRUCKER N, DURGANTE J ET AL. - Genotoxicity and oxidative stress in gasoline station attendants. *Mutat Res*. 2013 ; 754 (1-2) : 63-70.
- 7 | DING D, ZHANG Y, WANG J, WANG X ET AL. -  $\gamma$ -H2AX/53BP1/pKAP-1 foci and their linear tracks induced by in vitro exposure to radon and its progeny in human peripheral blood lymphocytes. *Sci Rep*. 2016 ; 6 : 38295.
- 8 | POIRIER MC - Linking DNA adduct formation and human cancer risk in chemical carcinogenesis. *Environ Mol Mutagen*. 2016 ; 57 (7) : 499-507.
- 9 | HAUGEN A, BECHER G, BENESTAD C, VAHAKANGAS K ET AL. - Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the urine, benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in lymphocyte DNA, and antibodies to the adducts in sera from coke oven workers exposed to measured amounts of polycyclic aromatic hydrocarbons in the work atmosphere. *Cancer Res*. 1986 ; 46 (8) : 4178-83.
- 10 | SHUKER DE, PREVOST V, FRIESEN MD, LIN D ET AL. - Urinary markers for measuring exposure to endogenous and exogenous alkylating agents and precursors. *Environ Health Perspect*. 1993 ; 99 : 33-37.
- 11 | GROOPMAN JD, DONAHUE PR, ZHU JQ, CHEN JS ET AL. - Aflatoxin metabolism in humans: detection of metabolites and nucleic acid adducts in urine by affinity chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 ; 82 (19) : 6492-96.
- 12 | ELIAS Z, MUR JM, PIERRE F, GILGENKRANTZ S ET AL. - Chromosome aberrations in peripheral blood lymphocytes of welders and characterization of their exposure by biological samples analysis. *J Occup Med*. 1989 ; 31 (5) : 477-83.
- 13 | DANADEVI K, ROZATI R, BANU BS, GROVER P - Genotoxic evaluation of welders occupationally exposed to chromium and nickel using the Comet and micronucleus assays. *Mutagenesis*. 2004 ; 19 (1) : 35-41.
- 14 | BOLOGNESI C, BRUZZONE M, CEPPI M, KIRSCH-VOLDERS M - The lymphocyte cytokinesis block micronucleus test in human populations occupationally exposed to vinyl chloride: A systematic review and meta-analysis. *Mutat Res*. 2017 ; 774 : 1-11.
- 15 | GERIĆ M, POPIĆ J, GAJSKI G, GARAJ-VRHOVAC V - Cytogenetic status of interventional radiology unit workers

occupationally exposed to low-dose ionising radiation: A pilot study. *Mutat Res.* 2019 ; 843 : 46-51.

16 | BOURGKARD E, DEMANGE V - Exposition aux fluides de coupe et biomarqueurs d'effets précoces : stress oxydant, inflammation et génotoxicité (OxiGenoCOM). Épidémiologie-Biométrie. Étude INRS ET2017-004. INRS, 2017 (<https://www.inrs.fr/inrs/recherche/etudes-publications-communications/doc/etude.html?refINRS=ET2017-004>).

17 | TAKEDA J, MIYATA T, KAWAGOE K, LIDA Y ET AL - Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell.* 1993 ; 73 (4) : 703-11.

18 | CAO Y, WANG T, XI J, ZHANG G ET AL - PIG-A gene mutation as a genotoxicity biomarker in human population studies: An investigation in lead-exposed workers. *Environ Mol Mutagen.* 2020 ; 61 (6) : 611-21.

19 | ALBERTINI RJ, NICKLAS JA, VACEK PM, CARTER EW ET AL - Longitudinal study of t-cell somatic mutations conferring glycosylphosphatidylinositol-anchor deficiency in gulf war I veterans exposed to depleted uranium. *Environ Mol Mutagen.* 2019 ; 60 (6) : 494-504.

20 | OLSEN AK, DERTINGER SD, KRÜGER CT, EIDE DM ET AL - The Pig-a Gene Mutation Assay in Mice and Human Cells: A Review. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2017 ; 121 (Suppl 3) : 78-92.

21 | CASTEL P, CARCOPINO X, ROBERT S, BONETTO R ET AL - Le gène PIG-A, nouveau marqueur de mutagenèse. Preuves de concept et exposé de la technique. *Méd Sci (Paris).* 2017 ; 33 (4) : 432-39.

22 | RIZVI S, RAZA ST, MAHDI F - Telomere length variations in aging and age-related diseases. *Curr Aging Sci.* 2014 ; 7 (3) : 161-67.

23 | LEE HS, YANG M - Applications of CYP-450 expression for biomonitoring in environmental health. *Environ Health Prev Med.* 2008 ; 13 (2) : 84-93.