

Applications de la biosurveillance

Irène Sari-Minodier, T Orsière, A Nikoyan, M De Méo, A Botta

Résumé

La biosurveillance, faisant appel à des biomarqueurs d'exposition et d'effet génotoxique, revêt un intérêt particulier dans l'évaluation et donc la prévention du risque cancérigène. Sa mise en œuvre doit répondre à des exigences spécifiques et faire l'objet d'un protocole établi par le laboratoire en collaboration avec le médecin du travail prescripteur. Le choix des analyses et tests à pratiquer est fonction des toxiques présents dans les ambiances de travail et des contraintes de réalisation sur le terrain. Nous présentons ici deux exemples de programmes de biosurveillance conduits par le Laboratoire de Biogénotoxicologie et Mutagenèse Environnementale, dans deux domaines distincts, les rayonnements ionisants d'une part, et les hydrocarbures aromatiques polycycliques d'autre part. L'intérêt de cette biosurveillance est de pouvoir alerter le préventeur de la pénétration de toxiques dans l'organisme et/ou de modifications biologiques contemporaines de l'exposition, reflet d'interactions avec le matériel génétique, ce qui souligne la nécessité de renforcer les mesures de prévention.

1. Place de la biosurveillance dans la prévention des cancers professionnels

La première étape de la démarche globale de prévention des cancers professionnels est celle d'identification des dangers, qui consiste à rechercher la présence d'agents cancérigènes ou mutagènes dans l'environnement de travail. Si cette étape d'identification des dangers révèle la présence de tels toxiques et que ces derniers sont actuellement irremplaçables, il s'agit de poursuivre l'évaluation des risques en analysant les modalités d'exposition des salariés à ces dangers. Cette caractérisation des expositions repose nécessairement sur l'analyse du travail réel et peut faire appel à différents outils de mesure. En premier lieu, l'exposition externe peut être quantifiée par la métrologie des ambiances de travail, ce qui permet notamment de vérifier le respect des valeurs limites d'exposition professionnelle. Mais cette approche n'est pas suffisante et pour conduire au mieux l'évaluation des risques cancérigènes, il apparaît primordial de pouvoir détecter, le plus précocement possible, l'exposition des individus à un agent génotoxique et/ou les premiers effets de celle-ci. L'approche

biologique peut répondre à ce besoin par la mise en œuvre de biomarqueurs d'exposition et d'effet, associés ou non à des biomarqueurs de susceptibilité.

Les biomarqueurs d'exposition, qui consistent à doser les toxiques ou leurs métabolites ou à mesurer l'activité mutagène des milieux biologiques (test d'Ames urinaire), permettent d'évaluer la pénétration des toxiques dans l'organisme et donnent ainsi une appréciation de la dose interne. Cette approche est tout à fait complémentaire de la métrologie des ambiances de travail. Elle présente comme principal intérêt de prendre en compte les différentes voies d'absorption, y compris la voie cutanée, ainsi que les conditions réelles d'exposition telles que le port d'équipements de protection individuelle.

Les biomarqueurs d'effet visent à mettre en évidence une action génotoxique, non spécifique de telle ou telle substance, au niveau de cellules prélevées sur des individus exposés (détection d'adduits à l'ADN, tests des comètes, test des micronoyaux).

Les biomarqueurs de susceptibilité ont pour objet de rendre compte de différences interindividuelles dans la réponse à une exposition génotoxique. Cette sensibilité individuelle vis-à-vis des nuisances environnementales peut résulter de polymorphismes des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques (tels que les gènes codant pour les isoenzymes des mono-oxygénases à cytochrome P450, les glutathion-S-transférases, les N-acétyl-transférases) et dans la réparation des lésions de l'ADN (tels que les gènes impliqués dans la réparation des bases : *hOGG1* ou *XRCC1* et dans la réparation des cassures double brin : *XRCC3*).

Adresse de correspondance et demande de tirés-à-part

Dr. Irène Sari-Minodier
Service de Médecine et Santé au Travail
Laboratoire de Biogénotoxicologie et Mutagenèse
Environnementale (EA 1784, IFR PMSE 112)
Faculté de Médecine
27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille cedex 5
Tél. 04 91 32 44 36
Fax 04 91 32 45 72
E-mail <irene.sari-minodier@medecine.univ-mrs.fr>

Les polymorphismes génétiques sont en relation avec des variations de séquences nucléotidiques sans conséquences délétères mais suffisantes pour permettre une variabilité interindividuelle. Ils sont donc à distinguer des mutations, ces dernières étant classiquement à l'origine de pathologies. A ce jour, les biomarqueurs de susceptibilité ne sont pas utilisés pour les actions de prévention des risques cancérigènes. Les facteurs impliqués sont en effet très complexes tant au niveau de la multiplicité des nuisances rencontrées en milieu de travail que de la multiplicité des voies métaboliques et des mécanismes de réparation de l'ADN. Par contre, leur intérêt principal pourrait résider dans leur capacité à fournir un éclairage nouveau sur l'interprétation collective des biomarqueurs d'exposition et d'effet, ce qui fait actuellement l'objet de nombreuses investigations.

2. Modalités générales de mise en œuvre d'une surveillance biogénotoxicologique

La mise en œuvre d'une surveillance biogénotoxicologique nécessite le recours à un laboratoire spécialisé et la construction d'un protocole précis en collaboration étroite avec le médecin du travail prescripteur. Le choix des tests à réaliser va se baser sur différents éléments, en sachant qu'il est toujours plus informatif d'associer des indicateurs biologiques complémentaires, surtout si l'on est confronté à des expositions multiples ou différents modes de génotoxicité. Les principaux éléments à prendre en considération sont les suivants :

- les caractéristiques des agents génotoxiques présents dans l'environnement de travail (métabolisme, toxicocinétique, mécanisme d'action) et les modalités d'exposition ;
- les objectifs de cette biosurveillance : s'il s'agit d'évaluer l'efficacité de nouvelles mesures de prévention, il sera intéressant de suivre une chronologie de prélèvements avant/après mise en place de ces mesures et il faudra nécessairement recourir à des indicateurs de faible rémanence, et non à ceux de longue demi-vie, tels que les micronoyaux qui révèlent des mutations, c'est-à-dire des lésions fixées qui vont persister toute la vie de la cellule ;
- les contraintes de réalisation des tests à confronter aux contraintes de mise en œuvre sur le terrain.

Le protocole devra préciser les modalités de prélèvement, de conservation et d'acheminement des échantillons au laboratoire. Par ailleurs, les populations faisant l'objet de cette biosurveillance devront être clairement définies à partir de critères d'inclusion (par exemple, ancienneté minimale d'exposition, présence ou non de systèmes de protection collective) et de critères d'exclusion (par exemple, antibiothérapie pour le test d'Ames, antécédents de chimiothérapie ou radiothérapie pour les micronoyaux). Il est souvent nécessaire de recourir à une population témoin de référence, c'est-à-dire non exposée aux génotoxiques étudiés. Cette population témoin doit également répondre à des critères d'inclusion/exclusion ainsi qu'à des critères d'appariement avec la population exposée, appariement basé sur les principaux facteurs de confusion connus pour les tests utilisés (le plus souvent âge, sexe, tabagisme).

L'interprétation des tests repose ainsi le plus souvent sur une approche comparative exposés/témoins, obligatoire pour le test des micronoyaux notamment, et faisant appel à une analyse statistique dont la puissance est conditionnée par l'effectif des populations étudiées. D'autres indicateurs biologiques (test d'Ames urinaire, test des comètes, détection des adduits) peuvent se prêter à des comparaisons début et fin de poste, chaque sujet étant alors son propre témoin. Néanmoins, l'interprétation collective des tests doit toujours être celle à privilégier. Un questionnaire médico-professionnel est dans tous les cas nécessaire pour interpréter les résultats en fonction d'éventuels facteurs de confusion et des modalités d'exposition.

Enfin, les sujets inclus dans ces protocoles de surveillance biogénotoxicologique doivent être informés préalablement des objectifs, des modalités de réalisation pratique, de confidentialité, d'interprétation et de restitution des résultats. La participation doit se faire sur la base du volontariat après recueil du consentement éclairé par écrit.

3. Exemples d'applications

Le Laboratoire de Biogénotoxicologie et Mutagenèse Environnementale conduit régulièrement des programmes de biosurveillance du risque génotoxique. Nous avons choisi ici de présenter, à titre d'illustration, deux applications ayant trait à deux catégories de cancérigènes : un agent

physique, les rayonnements ionisants (RI) et un mélange d'agents chimiques, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

3.1. Rayonnements ionisants dans la pratique de la radiographie industrielle

Les RI ont la capacité d'induire différentes lésions de la molécule d'ADN, notamment des cassures double-brin, à l'origine d'aberrations chromosomiques et de micronoyaux. La recherche de tels remaniements chromosomiques au sein des lymphocytes périphériques de salariés exposés aux RI, constitue un indicateur de choix, largement documenté. De plus, en matière de RI, l'exposition externe ne peut être évaluée que par la dosimétrie physique et les biomarqueurs d'exposition ne concernent que les sources non scellées susceptibles d'induire une contamination interne, ce qui n'est pas le cas des radiologues industriels.

Nous nous sommes intéressés aux radiologues industriels car ils sont comptés parmi les professionnels les plus exposés aux RI, ce qu'atteste le recueil des résultats des dosimètres photographiques de notre population sur les 5 dernières années précédant l'étude : moyenne des dosimétries cumulées sur 5 ans égale à $67 \text{ mSv} \pm 50$ (de 0 à 183 mSv), avec plus d'un tiers des sujets dépassant 20 mSv/an en moyenne sur la période étudiée (la limite réglementaire était alors fixée à 50 mSv). Nous avons appliqué le test des micronoyaux dans les lymphocytes de 29 radiologues industriels et 24 témoins appariés sur les critères d'âge, sexe et tabagisme. Il a été observé une élévation significative des taux de lymphocytes binucléés micronucléés chez les exposés par rapport aux témoins ($10,7 \% \pm 5,2$ vs $6,6 \% \pm 3,1$; $p < 0,01$). L'hybridation *in situ* fluorescente (FISH) de sondes pancentromériques a permis de rapporter cette élévation à une augmentation exclusive de la fréquence des micronoyaux "sans centromère", ces derniers représentant 74% des micronoyaux chez les exposés contre 29% chez les témoins ($p < 0,001$).

Au total, il a été mis en évidence dans les lymphocytes périphériques de ces radiologues industriels des remaniements chromosomiques, se manifestant par une augmentation des micronoyaux contenant des fragments chromosomiques acentriques, donc consécutifs à des cassures double-brin de l'ADN, ce qui est

en accord avec l'effet clastogène caractéristique des RI. Ces résultats, d'interprétation exclusivement collective, n'autorisent pas à conclure à un excès de risque pour la santé de ces travailleurs mais ils permettent néanmoins d'alerter sur la présence de modifications biologiques précoces et contemporaines de l'exposition radiologique, ce qui doit motiver la réduction de cette dernière. Cette étude se prolonge aujourd'hui par un programme régional de recherche-action, associant études de poste, dosimétrie physique et biosurveillance, dont la finalité est l'optimisation de la radioprotection, avec notamment la mise à jour de la *Charte de bonnes pratiques dans le domaine de la radiographie industrielle*.

3.2. Hydrocarbures aromatiques polycycliques dans divers secteurs d'activité

A l'initiative de médecins du travail de la région de l'Etang de Berre, un programme de caractérisation de l'exposition aux HAP a été mis en place en collaboration avec la CRAM Sud-Est et l'INRS. Le protocole associe, sur une même journée d'étude, l'observation de l'activité, un questionnaire individuel, le dosage de divers HAP dans les atmosphères de travail et une biosurveillance. Cette dernière est basée sur le dosage urinaire du 1-hydroxypyrene (1-OHP) et du 3-hydroxybenzo(a)pyrene (3-OHBP), métabolites respectifs du pyrene et du benzo(a)pyrene (BaP). Le 3-OHBP est un marqueur récemment mis au point par l'INRS et qui présente l'intérêt de refléter l'exposition à un cancérigène, le BaP, ce qui n'est pas le cas du pyrene. En tant que biomarqueur d'exposition génotoxique, le protocole prévoit la réalisation du test d'Ames urinaire (analyses en cours) à l'aide d'une batterie de souches de *Salmonella typhimurium* choisies pour leur complémentarité quant leur capacité à détecter une mutagenèse urinaire induite par des HAP ou leurs métabolites, par des nitroHAP ou par des amines aromatiques. Parmi les biomarqueurs d'effet génotoxique, le test des micronoyaux sur lymphocytes n'a pas été retenu car le lymphocyte ne paraît pas être un bon modèle cellulaire par la faiblesse de ses capacités métaboliques vis-à-vis des HAP. Notre choix s'est porté vers la recherche d'adduits à l'ADN sur des cellules facilement accessibles et en contact direct avec les HAP inhalés, à savoir les cellules endobuccales

prélevées par simple écouvillonnage en début et fin de poste. Les adduits recherchés, par immunohistochimie, sont ceux formés par le BaP-diolépoxyde (BPDE), un des métabolites du BaP. Enfin une étude du polymorphisme des gènes impliqués dans la biotransformation des HAP est également associée afin de rechercher une influence de ces polymorphismes sur les résultats des autres biomarqueurs (analyses en cours). Quatre échantillons d'urines ont été prélevés à l'aide du dispositif de recueil, de transport et de conservation mis au point par l'INRS : début de poste (après 36h au moins de non exposition), fin d'exposition, 4 et 16 heures après la fin d'exposition (correspondant respectivement aux pics d'excrétion du 1-OHP et du 3-OHBaP).

Une cinquantaine de salariés issus de 8 secteurs d'activité ont été inclus dans ce programme. Au vu des résultats de la métrologie atmosphérique et du dosage des métabolites urinaires, 6 types d'activité ont été considérés, dans les conditions étudiées, comme faiblement exposants aux HAP : incinération de déchets, fabrication de noir de carbone, raffinerie de pétrole, travaux routiers (épandage d'enrobés), transport de produits pétroliers et mécanique automobile. Lors de ces campagnes, les HAP n'ont pas été détectés dans l'atmosphère de travail ou étaient présents à des taux faibles ou modérés. Les taux urinaires de 1-OHP révélaient une discrète imprégnation par le pyrène lors d'opérations d'épandage d'enrobés, de fabrication ou ensachage de noir de carbone et d'incinération de déchets. Les valeurs les plus élevées (entre 0,5 et 0,6 $\mu\text{mole/mole}$ de créatinine), bien que modérées, ont été enregistrées pour le réglleur de table et le tireur de raclette lors de l'épandage d'enrobés. Concernant l'imprégnation en BaP, les valeurs de 3-OHBaP retrouvées dans ces secteurs d'activité étaient globalement en dessous du seuil de détection ou à des niveaux de l'ordre de ceux de la population générale.

Deux autres secteurs ont révélé des niveaux d'exposition beaucoup plus élevés. Il s'agit d'activités de production et de maintenance en cokerie et d'opérations de vidange d'un bac à goudron. Des campagnes complémentaires, avec recueil de toutes les mictions sur 48 heures, ont été menées avec l'INRS afin de mieux appréhender les voies de pénétration et les cinétiques d'excrétion des métabolites. Les

niveaux atmosphériques d'HAP étaient très élevés pour plusieurs salariés, dépassant largement la seule VME disponible, à savoir 150 ng/m^3 pour le BaP (recommandation CNAMTS). Le dosage des métabolites urinaires a permis de démontrer le plus souvent l'efficacité des équipements de protection respiratoire (masques P3 dont certains ventilés), les valeurs excrétées étant inférieures aux niveaux attendus à partir des concentrations atmosphériques. Cependant, il a été enregistré pour plusieurs salariés, notamment les agents de nettoyage industriels et de maintenance, des valeurs supérieures aux valeurs limites biologiques pour le personnel exposé. L'INRS retient actuellement, pour les travailleurs de cokerie, une valeur de 1-OHP de 2,3 $\mu\text{mole/mole}$ créatinine. Quant au 3-OHBaP, la limite proposée par l'INRS est de 0,35 nmole/mole créatinine, ce qui correspond à une exposition de 8h, uniquement respiratoire, à des concentrations atmosphériques de 150 ng/m^3 de BaP. Enfin, le dosage des métabolites urinaires a permis de mettre en évidence, dans certains cas, une imprégnation essentiellement cutanée, devant des valeurs atmosphériques faibles et des excrétions urinaires importantes et/ou devant un profil d'excrétion du 1-OHP caractéristique, c'est à dire en plateau s'étalant plusieurs heures après la fin de poste. Une exposition importante, à prédominance cutanée, a ainsi été objectivée lors de la dernière phase de nettoyage du bac à goudron, à savoir le nettoyage haute pression.

Nous disposons de résultats préliminaires concernant la détection d'adduits BPDE-ADN sur cellules endobuccales, pratiquée chez 6 salariés intervenant en cokerie. Les résultats montrent une augmentation significative du taux d'adduits en fin de poste par rapport au début de poste chez 5 salariés sur 6. Ces taux d'adduits sont supposés varier d'un individu à l'autre en fonction des taux de BaP atmosphériques, des protections respiratoires, du tabagisme mais sont également influencés par les capacités de l'individu à métaboliser du BPDE au niveau de ses cellules buccales, à former des adduits à l'ADN au sein de ces cellules et à réparer ces derniers. Des études portant sur des populations importantes de salariés seront nécessaires à la validation de ce biomarqueur.

Au total, dans les cas de fortes expositions aux HAP, les résultats de la biosurveillance ont

permis de sensibiliser les employeurs et salariés sur l'intérêt de protections respiratoires adaptées et correctement portées ainsi que sur la réalité de la pénétration cutanée des HAP, ce qui implique un nettoyage fréquent des bleus de travail et des sous-vêtements. Ce renforcement de la protection individuelle vient nécessairement en complément des programmes d'actions visant à diminuer les émissions d'HAP par le remplacement des portes de fours de cokerie par exemple.

4. Conclusion

La biosurveillance revêt un intérêt particulier dans l'évaluation et donc la prévention du risque cancérigène, en complément de la métrologie atmosphérique pour les toxiques chimiques et de la dosimétrie physique pour les rayonnements ionisants. Cependant, la mise en œuvre de cette biosurveillance doit répondre à des exigences spécifiques, inscrites dans un protocole établi par le laboratoire en collaboration avec le médecin du travail prescripteur.

L'interprétation des tests de toxicologie génétique est délicate et les conclusions doivent toujours être prudentes et mesurées. On ne peut en effet conclure qu'en fonction du test pratiqué et au niveau des cellules analysées, en se gardant d'extrapoler abusivement les résultats aux mutations de l'ADN non spécifiquement détectées par ce test et associées à une forte probabilité de transformation néoplasique, ou à d'autres cellules de l'organisme, telles que celles du tissu cible de l'action cancérigène suspectée. De plus, les conclusions sont portées à l'échelle d'un groupe de travailleurs. En l'état actuel des connaissances, elles n'ont pas de valeur prédictive quant à l'évolution de l'état de santé (notamment en terme de survenue de cancers). L'intérêt de la biosurveillance du risque cancérigène est de pouvoir alerter le préventeur de la pénétration de génotoxiques dans l'organisme et/ou de modifications biologiques contemporaines de l'exposition, reflet d'interactions avec le matériel génétique, ce qui souligne la nécessité de renforcer les mesures de prévention.

Références bibliographiques

1. Pillière F, Conso F. BIOTOX : Guide biotoxicologique pour les médecins du travail. Inventaire des laboratoires effectuant des dosages biologiques de toxiques industriels. INRS, ED 791. Disponible sur le site Erreur! Signet non défini.
2. Kirsch-Volders M., De Boeck M., Lison D. Génotoxicité et activité professionnelle. *Encycl. Méd. Chir, Toxicologie-Pathologie professionnelle*, 16-537-C-10, 2002c, 9 p.
3. Kirsch-Volders M., De Boeck M., Lison D. Tests de génotoxicité. *Encycl. Méd. Chir, Toxicologie-Pathologie professionnelle*, 16-537-C-11, 2002c, 4 p.
4. Norppa H. Cytogenetic biomarkers and genetic polymorphisms. *Toxicol Lett*, 2004, 149(1-3) : 309-334.
5. Sari-Minodier I, Orsière T, Bellon L, Pompili J, Sapin C, Botta A. Cytogenetic monitoring of industrial radiologists using the micronucleus assay. *Mutat Res*, 2002, 521 : 37-46.
5. Gendre C, Lafontaine M, Morelle Y, Payan JP, Simon P. Relationship between urinary levels of 1-hydroxypyrene and 3-hydroxybenzo[a]pyrene for workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 2002, 22 : 761-769.
6. Brossard R, Certin JF, Gendre JC, Calvez MJ, Koutchevsky MA, L'Hour P, Tregoat C, Verhelst C. Evaluation de l'exposition aux fumées de bitume lors de travaux routiers. *Arch. mal. prof.*, 2003, 64(3) : 157-164.

Remerciements

L'étude auprès des radiologues industriels a été financée par la DRTE-FP PACA. Celle sur les HAP a été conduite dans le cadre d'un contrat de plan Etat-Région PACA.

Nous remercions toutes les personnes ayant collaboré à ces travaux au sein des structures suivantes :

- EA 1784 : L. Bellon, Dr JL. Bergé-Lefranc, F. Chaspoul, Dr C. Delgrossi, Pr P. Gallice, Dr G. Garoyan, F. Gobin, J. Pompili, Dr B. Sourdet CRAM - Sud-Est : J. Catani, P. Mardelle
- INRS : C. Gendre-Champmartin, M. Lafontaine, P. Simon
- Services de Santé au Travail (médecins du travail) : Docteurs P. Arrighi, T. Barla, Y. Birembaut, M. Cavin-Rey, D. Charrier, Y. Cuvelier, A.M. Evrard, M. Fabié, C. Fabre, G. Gazazian, J.P. Georges, J.P. Giocanti, M. Joseph, P. Morelli, S. Pondaven, D. Rivière, V. Zabaloueff