

Avancées et limites des outils de biomonitoring dans l'estimation de l'impact sanitaire des agents environnementaux

Samir EL JAAFARI | s.eljaafari@gmail.com

Université Moulay Ismail - Cluster de compétences en Santé-Environnement – Meknès - Maroc

Mots clés : **Biomarqueurs d'exposition, biomonitoring, épigénétiques, exposome, interaction gène-environnement, microARN, perturbateur endocrinien, pesticides**

Sur la base des connaissances actuelles et des preuves expérimentales, diverses substances polluantes d'origine environnementale peuvent être détectées dans la population, y compris les femmes enceintes. Capables de passer la barrière placentaire, ces agents chimiques atteignent le fœtus et pourraient contribuer d'une façon ou d'une autre à la perturbation du système endocrinien impliqué dans des étapes du développement de la petite enfance (1). Cette perturbation survenue à l'enfance ne peut se traduire cliniquement qu'à un âge adulte, ce qui réduit les possibilités de prise en compte d'un effet d'exposition intra-utérine/anténatale. Toutefois, les études épidémiologiques mettent en évidence des liens entre l'exposition et des troubles de plus en plus fréquents : problème de fertilité, anomalies génitales, augmentation d'incidence des cancers hormono-dépendants, maladies chroniques, etc. (2). Ceci suggère que les pathologies observées chez l'enfant et l'adulte dépendent de l'exposition à des périodes critiques, avec une vulnérabilité particulière pour la période fœtale et la petite enfance, donnant lieu à une hypothèse probable d'atteinte transgénérationnelle et de programmation épigénétique dès le stade fœtal (3). Ainsi, une compréhension plus globale de la contribution des facteurs environnementaux à la susceptibilité de l'enfant de développer une pathologie plus tard s'avère importante. Il est donc important de faire de l'environnement un enjeu de santé publique avec la mise en place d'études identifiant les marqueurs biologiques d'exposition précoce, exploitant l'exposome* et développant davantage le biomonitoring. La première publication décrite dans cette note étudie l'exposome de grossesse en intégrant plusieurs familles de l'exposition environnementale suspectées ou avérées d'être des perturbateurs endocriniens* (PE), en utilisant différentes méthodes de surveillance allant du biomonitoring humain dans différentes matrices biologiques à la modélisation géo-spatiale via les questionnaires. La seconde étude vient compléter la première en mettant en évidence les microARN* urinaires comme biomarqueurs potentiels de l'exposition environnementale du couple mère/enfant, portant dans ce cas particulier sur l'exposition aux pesticides.

Cette note conclut sur l'intérêt d'adopter des outils de biomonitoring pour l'évaluation des interactions gène-environnement* et l'étude des effets liés à différentes expositions environnementales précoces, dans une approche globale de sécurité sanitaire.

L'exposome de grossesse: expositions environnementales multiples dans la cohorte de naissance INMA - Sabadell

Robinson O, Basagaña X, Vrijheid M, et al. The Pregnancy Exposome: Multiple Environmental Exposures in the INMA-Sabadell Birth Cohort. *Environ. Sci. Technol.*, 2015, **49** (17), pp 10632–10641.

Résumé

INMA (Infancia y Medio Ambiente) est une étude de cohorte de naissance en Espagne portant sur les femmes enceintes et le nouveau-nés/enfants, qui vise à examiner le rôle de polluants environnementaux pendant la grossesse et pour la croissance et le développement du petit enfant. La sous-cohorte Sabadell, rapportée ici, décrit les niveaux d'exposition au cours de la

grossesse pour des facteurs environnementaux marqueurs de la pollution de l'air intérieur et extérieur, les POP*, RFB*, les perfluoroalkyls (PFAS)*, les métaux, les phénols et phtalates, les insecticides ainsi que pour ceux concernant la pollution des eaux (sous-produits de désinfection de l'eau) et le tabagisme. Les auteurs de cet article avaient pour objectif d'analyser les corrélations entre les différentes expositions environnementales chez les femmes enceintes, en vue de mieux appréhender « l'exposome de grossesse ». Entre 2004 et 2006, 728 femmes enceintes ont été recrutées durant leur premier trimestre de grossesse, primipares, et avec une grossesse monofœtale. Un suivi par questionnaires et par mesures biologiques a eu lieu périodiquement (au troisième trimestre de grossesse, à la naissance, à six mois, à 1-1.5 année, à 2-2.5 années et à 4-5 ans). Les questionnaires ont permis de collecter des informations sur les facteurs sociaux et

environnementaux et sur le mode de vie des participantes, ainsi que sur la santé maternelle et infantile. Les données de biosurveillance portaient sur les organochlorés et PFAS dans le sérum; le mercure dans le sang du cordon; les polybromodiphényléthers (PBDE) dans le lait maternel; les métaux, les phtalates, le bisphénol A et la cotinine dans les urines. Par ailleurs, l'estimation de la pollution de l'air incluant les oxydes d'azote et les matières particulaires ainsi que l'étude de l'environnement bâti et du bruit a été réalisée à l'aide de modélisation géo-spatiale et de télédétection. Quatre variables binaires liées à l'environnement familial ont également été incluses dans l'analyse grâce à un questionnaire mené durant le troisième trimestre de grossesse et portant sur la cuisson au gaz, l'utilisation domestique de pesticides, l'exposition à la fumée de tabac et les habitudes d'usage de l'eau. Les expositions ont été regroupées en familles en fonction de leurs structures (biomarqueurs individuels) ou de leurs sources. La corrélation de Pearson incluant l'ensemble des paires de valeurs complètes (pairwise) en cas de variables continues et les corrélations polychoriques impliquant des variables binaires ont été calculées entre chacune des expositions individuelles afin de produire une matrice de corrélation.

Les résultats de l'étude montrent une forte corrélation entre les agents environnementaux recherchés chez les femmes dans une même famille d'exposition et aussi entre les familles de molécules rencontrées dans l'environnement extérieur tels que les polluants de l'air, le bruit, la température et l'environnement bâti. De faibles niveaux de corrélation ont été rapportés entre les différentes familles d'exposition aux agents chimiques mesurés individuellement chez les femmes, et avec d'autres familles d'exposition.

Commentaire

Cette publication a un impact sur l'interprétation et la fiabilité des études qui ne s'intéressent qu'à une exposition. Elle présente l'intérêt de suivre une démarche globale d'évaluation de 81 expositions environnementales chez des femmes enceintes, ce qui permet d'estimer la prévalence de certaines expositions intra-utérine et à la naissance. En rapportant l'ampleur de ces expositions et les corrélations observées entre elles, l'étude interpelle sur la question de l'effet synergique potentiel de l'exposition à une gamme très large de polluants. L'étude statistique des résultats a permis d'obtenir une information plus pertinente sur le niveau des corrélations entre les différentes expositions étudiées en se rapportant à 40 variables expliquant la variance de toutes les données. Dans ce sens, de fortes corrélations ont été observées au sein d'une même famille d'expositions (Organochlorés, PFAS, ...), suggérant que les résultats rapportés pour les expositions individuelles doivent être interprétés à la lumière de leurs corrélations à d'autres expositions au sein de leurs familles respectives. Par ailleurs, de plus fortes corrélations ont été retrouvées entre les familles des expositions rencontrées dans l'environnement extérieur (polluants de l'air, bruit, température, etc.), remettant en question les études qui se focalisent sur une seule exposition et indiquant de ce fait que

les études portant sur l'une de ces familles doivent être interprétées avec prudence.

Si ce travail de recherche n'a pas permis de conclure sur la structure de l'exposome durant la période *in utero*, ni même sur l'implication des résultats de corrélation en matière de santé environnementale, il a été l'occasion de développements et combinaisons méthodologiques tout à fait intéressants, et tout spécialement concernant la démarche par biomonitoring, géo-spatiale, par télédétection et par questionnaire dans le cadre d'une étude d'expositions environnementales multiples. Cette approche globale de prise en compte des différentes expositions, si elle est adoptée dans de futures études avec un jeu des combinaisons et synergies potentielles, devrait permettre de fournir des estimations de risque plus appropriées.

Dans cette étude assez riche, il aurait été souhaitable d'inclure d'autres composantes de l'exposome comme le régime alimentaire, l'activité physique et des facteurs socio-économiques qui auraient pu être facilement documentées par questionnaires ou encore d'examiner la réponse biologique à l'exposition incluant le métabolome, la méthylation de l'ADN, etc. Les empreintes omiques*, fondées sur les effets toxicogénomiques, auraient permis un regroupement plus approprié des expositions extérieures (4).

Les microARN urinaires comme biomarqueurs potentiels de l'exposition aux pesticides

Weldon BA, Shubin SP, Faustman EM, *et al.* Urinary microRNAs as potential biomarkers of pesticide exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2016.

Résumé

Stables à température ambiante et à long terme, les microARN* sont proposés comme marqueurs moléculaires pour la surveillance de maladies et de l'état de l'exposition. Alors que les microARN urinaires ont été utilisés cliniquement comme marqueurs potentiels dans le diagnostic des cancers du rein et de la vessie, leur utilité dans un contexte autre que clinique n'a pas encore été pleinement développée. Les auteurs de cet article se sont donnés comme objectif d'étudier le potentiel des microARN urinaires comme biomarqueurs de l'exposition aux pesticides et de la réponse biologique précoce. Dans ce but, ils ont identifié, à l'aide de PCR*, les microARN présents dans des échantillons d'urine prélevés pour 27 couples mère/enfant de l'état de Washington (USA), dont 16 agricultrices, et ont caractérisé la variabilité inter- et intra-individuelle de ces régulateurs épigénétiques. Les comparaisons ont pris en compte l'âge, les caractéristiques du ménage, la saison agricole et la profession.

Dés 384 microARN étudiés, 77% étaient détectables dans au moins un échantillon. Sept microARN étaient détectés dans au moins 50% des échantillons, et un microARN était présent dans 96% des échantillons. Des différences significatives ont été rapportées dans les profils des microARN entre les agricultrices et les non-ouvriers agricoles ainsi qu'entre les saisons. Six

microARN ont été positivement associés à la profession d'agriculteurs pendant la saison de post-récolte. L'expression de cinq de ces microARN tend vers une relation dose-effet avec les métabolites des organophosphorés chez les agriculteurs. Un changement des profils des microARN pour les faibles concentrations de métabolites d'organophosphorés a également été rapporté, impliquant des mécanismes épigénétiques dans les effets à faible dose de ces produits phytosanitaires. Ces résultats suggèrent que les microARN peuvent être de nouveaux biomarqueurs de l'exposition aux pesticides et de la réponse biologique précoce.

Commentaire

Aujourd'hui, les biomarqueurs moléculaires constituent une piste importante pour les études épidémiologiques étiologiques de maladies chroniques et de cancers. Dans cette étude, Weldon *et al.* présentent une méthodologie à la fois innovante et intéressante en matière de mise en évidence du potentiel émergent des microARN comme biomarqueurs de l'exposition environnementale. En plus des pesticides, ces régulateurs ont été rapportés pour être des biomarqueurs de l'exposition aux perturbateurs endocriniens, à la pollution de l'air, à la fumée de cigarettes et à d'autres contaminants environnementaux (5).

Studiés dans les urines, les microARN peuvent être d'un grand apport pour la surveillance biologique et l'étude des effets précoces sur la santé, d'abord de par la disponibilité du fluide biologique et la faiblesse de considérations d'ordre éthique, ensuite de par la facilité de pré-traitement et de détection (et/ou quantification) des micro-ARN contrairement au cas du sang et/ou du sérum pour lesquels la quantification se heurte à la nécessité d'éliminer des composés cellulaires (6) et enfin parce que les microARN sont impliqués dans le développement de l'organisme (7).

Les auteurs ont pu relever l'existence dans les urines de profils de microARN (miR-133b, miR-223) qui nuisent à l'expression d'enzymes susceptibles d'être impliquées dans le métabolisme des organophosphorés et autres pesticides (8).

Les seuls aspects peu convaincants de cette étude portent sur le nombre restreint de l'échantillon (27 femmes), l'absence de différences significatives des profils microARN chez les enfants qui devrait inciter les auteurs à revoir la sensibilité de la méthode proposée, et enfin le manque d'exploitation des résultats en termes de comparaison entre les données d'analyse chez les enfants et leurs mères et de connexions causales.

Les résultats de l'approche par RT-PCR avec la méthode $\Delta\Delta Ct$ utilisée pour la quantification des microARN sont également à remettre en question. Notoirement biaisée, cette méthode considère que les paires d'amorces utilisées doublent la quantité de l'ADNc à chaque cycle de PCR, alors que c'est variable selon les paires d'amorces. Dans ce sens, quoique l'approche soit qualitativement assez précise, les valeurs présentées dans l'article devraient être interprétées avec précaution.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'essentiel des travaux en santé et environnement jusqu'à présent a porté sur l'association d'un agent environnemental à un risque de pathologie à travers un mécanisme de toxicité. Or, la limitation consistant à ne considérer qu'un seul contaminant et un seul effet sanitaire est raisonnablement controversée. Cette approche ne reflète malheureusement pas la réalité des expositions, qui sont généralement multiples et complexes, et ceci a conduit à une littérature fragmentée d'études épidémiologiques.

Dans le contexte actuel de la multiplication des contaminants environnementaux et du poids de la charge morbide attribuable à l'environnement concernant les enfants, il ressort de cette note la nécessité d'amener les questions de recherche basées sur l'exposome en tête des priorités scientifiques et de développer et valider les biomarqueurs d'exposition précoce.

Dans ce sens, les deux publications sélectionnées traitent de la complexité de documenter les effets sanitaires des contaminants environnementaux de la façon la plus complète et spécifique possible. La mise en relation de ces deux articles permet de mettre en évidence les possibilités offertes en combinant plusieurs méthodes pour procéder à l'évaluation des risques du couple mère/enfant. Parmi ces possibilités le biomonitoring humain, l'analyse géo-spatiale et les questionnaires pour l'analyse de sources d'expositions multiples et de leur niveau de corrélation (article 1) et le développement de nouveaux protocoles facilement exploitables pour la détection et la quantification de biomarqueurs potentiels (MicroARN urinaires) pour l'évaluation des risques environnementaux et professionnels sur la santé (article 2).

Un complément de bibliographie suggère le manque d'études analysant la susceptibilité individuelle aux agents environnementaux. Tout comme une nouvelle génération d'outils scientifiques a pu fournir la possibilité d'évaluer efficacement la susceptibilité génétique, il y a un besoin crucial de développer des méthodes pour caractériser les expositions environnementales, avec une résolution biologique pertinente. Il est donc nécessaire de multiplier les études des interactions gène-environnement et de l'exposome et d'interpréter les effets de l'exposition à un perturbateur endocrinien ou à tout autre agent environnemental à la lumière de sa corrélation à d'autres expositions.

La création de groupes de collaboration internationale permettrait de mutualiser les compétences et de confronter les résultats pour une meilleure compréhension des risques dans une approche globale de sécurité sanitaire. C'est le cas des technologies GWAS* et EWAS* qui devraient être multipliées.

GENERAL CONCLUSION

The essential of environment and health research focuses on the association of an environmental agent with a mechanism of toxicity, resulting on a risk. However, limiting the impact of the environment on health to a single chemical substance and an associated single health effect is adverse. This approach isn't realistic and leads to fragmented epidemiological studies.

With regard to the increasing number of environmental exposures and disease burden attributable to different environmental hazards among children, this note highlights the need of mapping the Exposome and of developing and validating new generation of biomarkers of early biological effects. In this sense, papers discussed here are demonstrating the difficulty to document health effects of environmental exposure in the most total and specific way. Moreover, these two papers taken together allow highlighting the interest of combining several methods for environmental risk assessment among mother/child pairs. The first paper combines in its methodology, human biomonitoring, geo-spatial modeling and questionnaires to describe the correlation structure of the exposome during pregnancy and to better understand the relationships between and within families of exposure. The second paper raises interesting questions about the assessment of environmental and occupational health risks and suggests the interest of profiling urinary MiRNA as potential exposure biomarkers.

Just as a new generation of scientific tools has provided the ability to efficiently assess genetic susceptibility, there is a crucial need to develop methods for characterizing environmental exposures at biologically-relevant resolution. It is therefore necessary to increase gene-environment interactions and exposome studies and to investigate the effects of exposure to endocrine disruptor or any other environmental agent regarding its correlation with other exposures, aiming of further health safety; which is the main challenge of initiating large-scale studies (GWAS and more recently EWAS).

Lexique

Cotinine : Principal métabolite de la nicotine de demi-vie comprise entre 16 et 22 h; marqueur de choix du tabagisme

Exposome : Complément du génome qui inclut les causes non-génétiques de la maladie, représenté par l'ensemble des expositions environnementales humaines.

Empreintes omiques : Profils résultant de l'utilisation de techniques à haut débit permettant une analyse simultanée d'un grand nombre de variables, comprenant principalement : la génomique, la transcriptomique (expression des gènes et leur régulation), la protéomique (analyse des protéines), la métabolomique (étude des métabolites produits).

EWAS (Epigenome-wide association studies) : type d'étude qui porte sur le profil épigénétique d'une population et qui évalue le degré d'association entre les modifications épigénétiques, notamment la méthylation de l'ADN, et un caractère ou une maladie.

GWAS (Genome-wide association studies) : étude d'association pangénomique visant à identifier les variants fréquents qui pourraient avoir un effet sur le risque de maladie. Ces études reposent sur le principe suivant: criblage de l'ensemble du génome de personnes malades afin d'identifier des marqueurs de variation génétique (SNPs) puis comparaison de leur génome à celui de population contrôle.

Interaction gène-environnement (G x E) : se produit quand deux génotypes différents répondent à une même variation environnementale de différentes manières.

MicroARN : Petit ARN non codant composé d'une vingtaine de nucléotides qui vont cibler certains ARNm afin d'inhiber leur traduction en protéines, causant ainsi une dérégulation globale des processus cellulaires.

Perfluoroalkyls (PFAS) : Composés fluorés possédant au moins un carbone de la chaîne carbonée complètement substitué par des atomes de fluor.

Perturbateur endocrinien (PE) : molécule qui mime, inhibe ou modifie l'action d'une hormone et perturbe le fonctionnement normal d'un organisme.

Polluants organiques persistants (POP) : Molécules organiques complexes définies par leur toxicité, leur persistance dans l'environnement, leur bioaccumulation et leur transport à longue distance.

Polybromodiphényléthers (PBDE) : Famille de 209 congénères produits industriellement à partir de mélanges contenant différents composés chimiques, qui partagent la même structure de base et du brome en présence de catalyseurs. Ils sont utilisés dans la fabrication des appareils électriques et électroniques, des tissus d'ameublement, des rideaux et des tentures. Ils peuvent se volatiliser directement dans l'atmosphère ou se combiner à la poussière au fur et à mesure que les matériaux vieillissent.

Polymerase Chain-Reaction (PCR) : L'amplification en chaîne par polymérase est une méthode de biologie moléculaire d'amplification génique *in vitro*, qui permet de dupliquer en grand nombre une séquence d'ADN ou

d'ARN connue, à partir d'une faible quantité d'acide nucléique et d'amorces spécifiques.

Retardateurs de flamme bromés (RFB) : Mélanges de produits chimiques synthétiques ajoutés à des formulations pour les rendre moins inflammables.

Publications de référence

1 De cock M, Quaak I, Van de Bor M, et al. Linkind EDCs in maternal nutrition to child health (LINC study) – protocol for perspective cohort to study early life exposure to environmental chemicals and child health. *BMC Public Health* 2016 ; 16(147) : 1-12.

2 Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Gore AC, et al. Endocrine-disrupting chemicals: An endocrine society scientific statement. *Endocr Rev.* 2009 ; 30(4): 293–342.

3 WHO & UNEP. State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals – 2012. 2013 : 260p.

4 Edwards TM, Myers JP. Environmental exposures and gene regulation in disease etiology. *Environ Health Perspect.* 2007; 115(9): 1264–1270.

5 Vlaanderen J, Moore LE, Vermeulen R, et al. Application of Omics technologies in occupational and environmental health research : Current status and projections. *Occup Environ Med.* 2010 ; 67(2): 136–143.

6 Vrijens K, Bollati B, Nawrot TS. MicroRNAs as potential signatures of environmental exposure or effect: a systematic review. *Environ Health Perspect* 2015; 123(5): 399-411.

7 Wienholds E, Plasterk RH. MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* 2005; 579(26): 5911-5922.

8 Tiberio P, Callari M, Appierto V, et al. Challenges in using circulating miRNAs as cancer biomarkers. *BioMed Research International* 2015 : Article ID 731479, 10 pages.

Revue de la littérature

Patel CJ. Analytical complexity in detection of gene variant-by-environment exposure interactions in high-throughput genomic and exposomic Research. *Mechanisms of toxicity. Curr Envir Health Rpt* 2016.

Autres publications identifiées

Consales C, Toft G, Spano M, et al. Exposure to persistent organic pollutants and sperm DNA methylation changes in Arctic and European populations. *Environ. Mol. Mutagen.* 2016. *Il existe aujourd'hui des preuves probantes qui établissent un lien de cause à effet entre l'exposition aux polluants organiques persistants (POP) et les troubles de la reproduction, y compris les anomalies du sperme. Dans ce sens, l'intérêt de cette étude transversale réside dans le fait que le premier travail à explorer concernerait les effets de l'exposition aux POP en se référant aux niveaux de méthylation de l'ADN dans les cellules spermatiques. Bien que l'exposition aux POP semble avoir un*

impact négatif limité sur les niveaux de méthylation de l'ADN du sperme chez les adultes, les auteurs suggèrent que l'hypométhylation globale détectée nécessite pour son explication des études plus approfondies.

Kalfa N, Paris F, Sultan C, et al. Is Hypospadias associated with prenatal exposure to endocrine disruptors? A french collaborative controlled study of a cohort of 300 consecutive children without genetic defect. *Eur Urol* (2015).

Cette étude française concerne l'identification de l'effet des perturbateurs endocriniens dans les cas d'hypospadias non génétiques (malformations du pénis). Menée sur cinq ans (2009 – 2014), l'étude a porté sur un total de 710 petits garçons, 302 sains et 408 souffrant d'hypospadias. Les auteurs concluent qu'une exposition environnementale et/ou professionnelle des parents aux perturbateurs endocriniens augmente le risque de malformation génitale chez les enfants exposés in utero.

Dursun A, Yurdakok K, Dhawan A, et al. Maternal risk factors associated with lead, mercury and cadmium levels in umbilical cord blood, breast milk and newborn hair. *J Matern Fetal Neonatal Med,* 2015: 1-8.

Menée par des chercheurs turcs, cette étude vise déterminer le niveau d'exposition au plomb, mercure et cadmium durant la période prénatale et à prédire les voies d'exposition maternelle à ces métaux lourds. Les résultats attestent d'une exposition long-terme avant et pendant la grossesse et de niveaux de métaux dépassant les niveaux de sécurité dans le sang du cordon et dans le lait maternel.

Green BB, Karagas MR, Marsit CJ, et al. Epigenome-wide assessment of DNA methylation in the placenta and arsenic exposure in the New Hampshire birth cohort study (USA). *Environ Health Perspect* 2016 : 1-34.

Il s'agit d'une étude américaine qui examine la variation de la méthylation de l'ADN dans le placenta et sa relation avec l'exposition à l'arsenic chez 343 individus impliqués dans une cohorte de naissance au New Hampshire aux Etats-Unis. Les résultats de l'étude montrent le potentiel de l'arsenic, même à des niveaux communément tolérés, à modifier l'état de méthylation de l'ADN placentaire et soutiennent que l'arsenic influe sur la santé des enfants à long-terme.

Liens d'intérêts :

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt