

SOMMAIRE

RESUME	2
INTRODUCTION.....	3
MATERIELS ET METHODES.....	6
Patientes.....	6
Radiothérapie	7
Prélèvements.....	8
Réactifs	9
Immunomarquage	9
Test de cytométrie de flux PIG-A.....	9
Test du micronoyau	11
Analyse statistique des résultats	11
RESULTATS.....	12
Validation de la méthode de quantification des granulocytes GPI-déficients.....	12
Distribution de la dose de radiothérapie dans le volume osseux selon les groupes.....	14
Caractéristiques de la population.....	15
Evaluation clinique du test PIG A.....	17
Répétabilité du test	17
Stabilité des prélèvements dans le temps.....	17
Effet de la radiothérapie sur la fréquence de granulocytes GPI-déficients.....	17
Effet de la chimiothérapie avant le premier prélèvement sur la fréquence de granulocytes GPI-déficients.....	19
Effet du tabac (comparaison des fumeurs et non-fumeurs et relation avec la consommation en paquet-année) et effet de l'âge, sur la fréquence de granulocytes GPI-déficients	19
Test du micronoyau	19
Effet de la radiothérapie sur le TCMN	19
Effet de la chimiothérapie avant le premier prélèvement sur le TCMN.....	21
Effet du tabac (comparaison des fumeurs et non-fumeurs et relation avec la consommation en paquet-année) et effet de l'âge, sur le TCMN	21
DISCUSSION	22
CONCLUSION.....	27
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	28
ABREVIATIONS.....	31

RESUME

Introduction : Le gène PIG-A, impliqué dans la biosynthèse de l'ancre glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI), constitue un biomarqueur génotoxique chez les rongeurs. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer prospectivement, chez l'Homme, le test PIG-A en tant que biomarqueur de génotoxicité lors d'une radiothérapie externe à visée thérapeutique.

Matériels et méthodes : Trente patientes atteintes d'un cancer du sein, réparties en 2 groupes, radiothérapie mammaire exclusive (RTME) ou radiothérapie mammaire et ganglionnaire (RTMG) ont été incluses de janvier 2016 à juin 2017. La fréquence de granulocytes GPI-déficients a été déterminée par cytométrie de flux sur quatre prélèvements sanguins. L'induction de micronoyaux a été mesurée lors du premier et du troisième prélèvement.

Résultats : La radiothérapie n'a pas augmenté significativement la fréquence des granulocytes GPI-déficients, quel que soit le groupe ou la dose de rayonnement. Les taux de micronoyaux étaient significativement plus élevés à la fin de la radiothérapie chez tous les patients ($p = 3,1 \times 10^{-5}$), dans le groupe traité par RTME ($p = 0,016$), par RTMG ($p = 0,003$), et dans le groupe RTMG par rapport au RTME ($p = 0,012$). En analyse multivariée, les micronoyaux étaient significativement corrélés avec l'âge ($p = 0,043$) et l'irradiation ($p = 0,0001$).

Conclusion : Le test PIG-A sur granulocytes ne révèle pas la génotoxicité radio-induite. La confirmation du caractère génotoxique de l'irradiation mammaire par le test du micronoyau encourage à évaluer le test PIG-A après d'autres expositions génotoxiques ou dans d'autres cellules circulantes telles que les érythrocytes ou les réticulocytes.

Mots clés : Génotoxicité, PIG-A, cancer du sein, radiothérapie, chimiothérapie, cytométrie de flux, micronoyau.

INTRODUCTION

De nombreux cancers sont au moins partiellement causés par des expositions génotoxiques, qu'elles soient environnementales (pollutions, rayonnement UV), professionnelles (travailleurs exposés aux rayonnements ionisants dans le domaine médical ou industriel), iatrogènes (chimiothérapie, radiothérapie) ou liées au mode de vie (consommation d'alcool (effet indirect), tabagisme (effet direct)). Ces stimuli peuvent entraîner différents types de dommages à l'ADN (lésions primaires, mutations géniques ou chromosomiques) ayant des conséquences variables selon les individus (1). A ce jour, il n'existe pas de biomarqueur susceptible de rendre compte de l'impact génotoxique global de nos environnements, et la possibilité de pouvoir mesurer l'effet de ces expositions grâce à un test de génotoxicité, peu invasif, simple, fiable et reproductible représente un véritable enjeu de santé publique.

Le gène PIG-A (PIG-A chez l'Homme et le primate, Pig-a chez le rongeur) est impliqué dans la première étape de la biosynthèse de l'ancre glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI). L'ancre GPI est un complexe glycolipidique d'ancrage membranaire permettant la présence de nombreuses protéines à la surface cellulaire. Sa synthèse nécessite l'expression de 21 autres gènes pour obtenir une ancre fonctionnelle (2). Parmi ces gènes, PIG-A est le seul situé sur le chromosome X et se trouve à l'état hémizygote chez tous les sujets, y compris féminins, grâce au phénomène d'inactivation d'un chromosome X (3). En conséquence, une seule mutation du gène PIG-A devient inactivante et entraîne l'arrêt de la production de l'ancre GPI, qui se traduit phénotypiquement par la disparition des protéines membranaires dont l'ancrage dépend du GPI. La réciprocité entre une cellule mutée sur le gène PIG-A et une cellule déficiente en ancre GPI est désormais admise par L'International Workgroup on Genotoxicity Testing (IWGT) (4).

Chez l'Homme, la mutation acquise du gène PIG-A est responsable d'une pathologie rare, l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) (3). L'absence d'expression de protéines ubiquitaires inhibitrices du complément telles que le CD55 (Decay Accelerating Factor – DAF) ou le CD59 (Membrane Inhibitor of Reactive Lysis – MIRL), à la surface des cellules, en particulier celles des érythrocytes, rendent ces dernières sensibles à l'attaque du complément, constituant le point clé de la physiopathologie de l'HPN (5). Cependant des

cellules hématopoïétiques et des granulocytes porteurs de la mutation PIG-A (et du phénotype correspondant) sont présents chez des individus sains à une fréquence comprise entre 10 et 30 cellules déficientes pour 10^6 cellules totales. (6,7).

De ce fait, le gène PIG-A, est un gène dit « sentinelle », hautement conservé entre les espèces (8), dont la fréquence de mutation reflète les taux de mutations somatiques acquises (9). Plusieurs travaux ont permis le développement du « test PIG-A » qui estime la fréquence des cellules mutées pour le gène PIG-A par la mesure en cytométrie de flux de la fréquence des cellules circulantes déficientes en ancre GPI (6,8). Ce test est de nos jours couramment appliqué chez les rongeurs, et seuls quelques articles ont rapporté son utilisation chez l'homme exposé à des mutagènes. Chez les rongeurs, les auteurs ont retrouvé une augmentation significative de la fréquence de mutation du gène PIG-a dans des populations de réticulocytes et d'érythrocytes, après exposition à des agents de chimiothérapie (10–14), ou aux rayonnements ionisants X et γ (15–17). Chez l'Homme, peu d'études ont évalué le test PIG-A dans le but d'explorer la génotoxicité. Une augmentation du taux de mutation PIG-A a été observée sur des cultures cellulaires issues de patients présentant une prédisposition au cancer par défaut de réparation de l'ADN (anémie de Fanconi, ataxie télangiectasie, polypose héréditaire) ainsi que dans des lignées de cellules cancéreuses (18). Une étude récente a montré une fréquence plus élevée des globules rouges GPI-déficients chez les patients atteints d'un adénocarcinome de l'œsophage traités par chimiothérapie (19). Cependant, de telles augmentations n'ont pas été observées dans d'autres études chez des patients traités par chimiothérapie génotoxique ou chez des soldats exposés à l'uranium appauvri (18,20,21).

Le test PIG-A apparaît comme prometteur en tant que biomarqueur de mutagénicité. Chez le rongeur, il combine l'ensemble des qualités que les tests de génotoxicité doivent remplir : sensibilité et spécificité mais aussi diversité des lésions de l'ADN détectées et possibilité de répéter les tests sur le même individu (9). Cette technique permet la mesure *ex vivo*, sur un prélèvement de sang périphérique, de la fréquence de cellules mutées sans avoir recours à une étape préalable de culture cellulaire comme c'est le cas avec le test du micronoyau (MN) sur lymphocytes par exemple. L'expression ubiquitaire du gène PIG-A permet l'application du test à l'ensemble des cellules eucaryotes mais les lignées rouges (érythrocytes et réticulocytes) et granulocytaires sont principalement étudiées dans la littérature. Le test

PIG-A sur les granulocytes a été évalué dans le cadre du diagnostic de l'HPN et chez des volontaires sains (6,22). Dans cette population de cellules immunitaires circulantes, la fréquence de granulocytes PIG-A mutés est spontanément plus élevée que la population d'érythrocytes issus de précurseurs PIG-A mutés, ce qui laisse supposer une meilleure résistance des granulocytes GPI-déficients à l'attaque du complément (6). Cette particularité permet que la détection de l'effet mutagène ne soit pas masquée par la disparition des cellules d'intérêt en raison de l'attaque du complément. Toutefois, le test PIG-A n'a jusqu'ici pas été réalisé sur population de granulocytes humains dans le but d'évaluer une exposition génotoxique.

Selon les données du Comité scientifique des Nations Unies pour l'étude des effets des rayonnements ionisants (UNSCEAR), l'utilisation médicale des rayonnements représente 98% de la dose transmise à la population par toutes les sources artificielles et représente 20% de l'exposition totale de la population aux rayonnements ionisants. En France, l'exposition médicale aux rayonnements ionisants est estimée en moyenne à 35% hors radiothérapie, selon le dernier rapport de l'Institut national de recherche et de sécurité (IRSN) datant de 2016. L'UNSCEAR a estimé dans son rapport 2000 qu'une exposition de 1 Gy entraînerait jusqu'à 40 cassures d'ADN double brin, 1 000 cassures d'ADN simple brin, 500 dommages de bases, dont 150 pontages inter brins d'ADN par cellule. La radiothérapie dans le cadre du traitement du cancer est la plus irradiante des modalités d'irradiation médicale. Le cancer du sein étant le cancer le plus fréquent de la femme dans le monde, ces femmes constituent la plus grande population recevant une exposition génotoxique induite par irradiation et agents de chimiothérapie. Cette population semble être une des plus directement concernée par une génotoxicité radique.

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer prospectivement, chez l'Homme, le test PIG-A en tant que biomarqueur de génotoxicité, dans un environnement génotoxique contrôlé dans le cadre d'une radiothérapie externe à visée thérapeutique.

MATERIELS ET METHODES

Patientes

Les patientes ont été incluses sur une période de 18 mois allant de janvier 2016 à juin 2017. Elles étaient âgées de 18 ans ou plus, avaient été diagnostiquées pour un cancer du sein localisé, avaient déjà été opérées et présentaient une indication de radiothérapie externe adjuvante. Les patientes ont été incluses dans 2 groupes distincts, respectivement radiothérapie mammaire exclusive (RTME ; n = 14) et radiothérapie mammaire et ganglionnaire (RTMG ; n = 16) (Figure 1). Pour chaque patiente, des données pertinentes sur les antécédents médicaux personnels ou familiaux, les habitudes de tabagisme, la consommation d'alcool, la consommation de drogue, un diagnostic récent par rayons X ont été obtenues via un questionnaire standard avant le premier prélèvement de sang. Un antécédent de traitement par radiothérapie était un critère d'exclusion. Un patient précédemment diagnostiqué pour une hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) et un sujet sain ont également été inclus pour la validation du protocole de cytométrie de flux. Toutes les patientes ont été informées de l'objectif de l'étude et ont donné leur consentement écrit. Le protocole de l'étude a reçu l'avis favorable d'un comité d'éthique (numéro 2015-A01753-46)

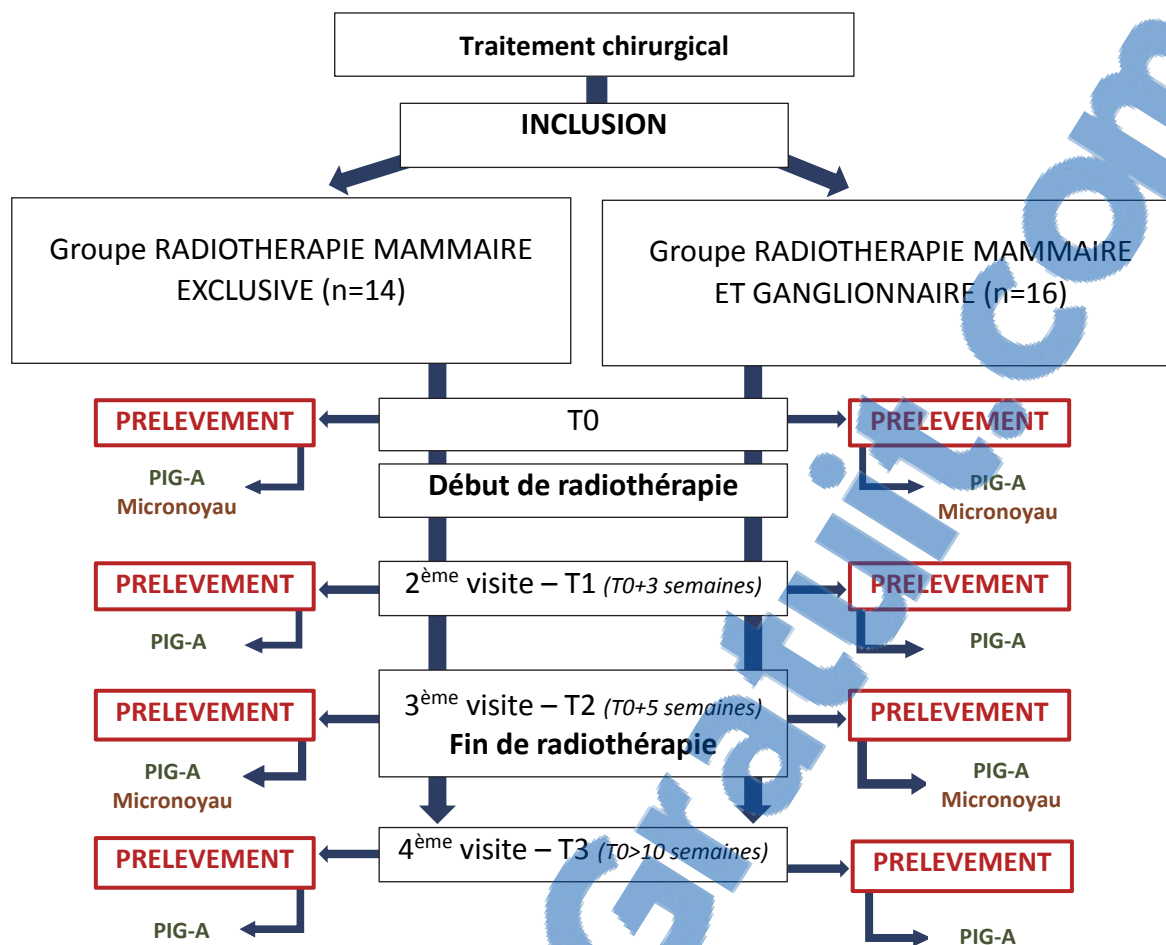


Figure 1 : Diagramme de flux et planning de prélèvements. Parmi les 30 patientes, 5 d'entre elles ont reçu une chimiothérapie avant l'inclusion, de manière adjuvante ou néoadjuvante.

Radiothérapie

La radiothérapie était délivrée selon une modalité conformationnelle 3D. La dose prescrite dans l'ensemble du sein ou de la paroi thoracique était de 50 Grays (Gy) en 25 fractions de 2 Gy, avec une surimpression de 16 Gy en 8 fractions de 2 Gy en cas de tumeur infiltrante, ou 10 Gy en 5 fractions au niveau de la cicatrice de mastectomie en fonction du risque de récurrence cutanée. L'irradiation des aires ganglionnaires sus-claviculaires et de la chaîne mammaire interne (CMI) était réalisée pour les patientes présentant un envahissement ganglionnaire ou une tumeur localisée aux quadrants mammaires internes. L'irradiation axillaire était réalisée en cas de macro-métastase chez les patientes refusant le curage ganglionnaire. Pour la CMI la dose de radiothérapie prescrite était de 50 Gy en 25 fractions de 2 Gy délivrée par une association de photons pour 20 Gy et d'électrons pour 30 Gy afin d'épargner les structures médiastinales. Pour l'aire sus-claviculaire et/ou axillaire la dose de radiothérapie prescrite

était de 46 Gy en 23 fractions de 2 Gy. Le traitement était délivré selon une technique de radiothérapie conformationnelle en 3 dimensions, sous un accélérateur de type Synergy Elekta®, avec un débit de dose de 0.4Gy/min.

Le volume osseux inclus dans l'isodose 0,5 Gy a été contourné pour chaque patiente sur le logiciel de planification de radiothérapie Pinnacle afin de prendre en compte les faibles doses correspondant à l'irradiation diffusée. De plus, nous avons retenu l'isodose 0.5 Gy en accord avec nos physiciens médicaux, car la capacité de calcul du logiciel de planification de la radiothérapie à des doses plus faibles aurait pu donner des données peu fiables.

Prélèvements

Chaque patiente incluse avait 4 prélèvements sanguins (Figure 1) :

- Un prélèvement initial réalisé immédiatement avant la radiothérapie (T0)
- Un prélèvement réalisé 3 semaines après le début de la radiothérapie (T1)
- Un prélèvement réalisé à la fin de la radiothérapie (T2)
- Un prélèvement réalisé > 10 semaines après T2, c'est à dire après la fin de la radiothérapie (T3).

Les prélèvements sanguins ont été recueillis dans des tubes à usage unique (Beckton-Dickinson Vacutainer) anti-coagulés par héparinate de lithium (pour le test du micronoyau) ou acide tétra-acétique éthylène diamine (EDTA) pour le test PIG-A. Tous les prélèvements étaient anonymisés. Après anonymisation, ils étaient adressés immédiatement après leur réalisation au laboratoire de Biogénotoxicologie, Santé Humaine & Environnement, IMBE - Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie - Faculté de médecine de Marseille. Immédiatement après leur réception, les prélèvements ont été exploités pour déterminer, la fréquence de granulocytes GPI-déficients et le TCMN. La technique d'analyse repose sur une détection indirecte de la mutation du gène Pig-A par analyse en cytométrie de flux. Elle repose sur la détection du GPI à la surface cellulaire. Les protéines du GPI seront ciblées par des anticorps spécifiques :

- un anticorps anti-GPI (FLAER)
- un anticorps anti-CD66B

La mutation était affirmée par une absence de l'expression de ces protéines et non par leur diminution.

Réactifs

La solution tampon utilisée était du PBS 1X sans calcium ni magnésium (Life Technologies®, Carlsbad, CA, USA). La solution de lyse des érythrocytes a été préparée avec du chlorure d'ammonium 154 mM, de l'hydrogénocarbonate de potassium 10 mM, d'EDTA 0,1 mM et de l'eau distillée (q.s.p 1 litre de solution finale). La solution a été conservée à 4 ° C et renouvelée mensuellement. Les anticorps utilisés étaient : CD15-Pacific Blue (clone 80H5), CD33-PhycoérythrineCyanine7 (clone D3HL60.251), CD45-Krome Orange (clone J33) et CD66b-AlloPhyoCyanine (clone 80H3) de Beckman-Coulter® (Immunotech SAS, a Beckman-Coulter Company, France) Le marqueur utilisé était l'aérollysine fluorescente (FLAER-Alexa488) (Cedarlane®, Burlington, Caroline du Nord, États-Unis).

Immunomarquage

Deux millilitres de sang frais anti-coagulé ont été mélangés avec 20 ml de solution de lyse érythrocytaire pendant 10 minutes. Après centrifugation, l'immunomarquage a été réalisé directement sur le culot en ajoutant 10 µl de CD15-PB, 10 µl de CD33-PC7, 10 µl de CD45-Krome Orange, 10 µl de CD66b-APC et 20 µl de FLAER-Alexa488 pour une incubation d'une période de 30 minutes dans le noir. Le culot a été lavé, remis en suspension dans du PBS1X, avant une analyse immédiate en cytométrie.

Test de cytométrie de flux PIG-A

Les paires anticorps-fluorochrome ont été choisies en fonction des recommandations des bonnes pratiques de laboratoire pour le diagnostic et le suivi des patients atteints d'HPN. Pour la sélection, les paires marqueur-fluorochrome ont été sélectionnées en fonction de leur capacité à isoler les granulocytes dans le sang total : CD15-PB, CD33-PC7, CD45-KO. Les marqueurs d'intérêt pour l'identification des cellules déficientes en GPI dans la population de granulocytes étaient CD66b-APC, un anticorps spécifique des granulocytes dépendant de GPI, et FLAER-A488, un marqueur spécifique de GPI.

L'analyse a été réalisée sur un cytomètre de flux Gallios, fabriqué par Beckman-Coulter (Villepinte, France), comprenant 3 lasers d'excitation (violet / bleu / rouge) et capable de détecter 10 couleurs d'émission. Les résultats ont été exprimés en cytogrammes.

Le protocole de phénotypage était le suivant : premièrement, les doublets de cellules ont été éliminés en utilisant les paramètres de surface de diffusion directe par rapport aux paramètres de hauteur de diffusion directe. La positivité de l'expression de CD45 a permis de focaliser l'analyse sur les populations immunes. Dans ce cadre, deux graphes CD45 versus structure cellulaire puis CD45 versus CD33 ont permis de limiter l'analyse à des populations immunes non lymphoïdes. Deux marqueurs myéloïdes GPI indépendants, CD15 et CD33, ont été utilisés pour limiter l'analyse aux granulocytes. Les granulocytes sélectionnés étaient définis comme CD15+/CD33 faibles et la sélection des granulocytes concernait les 95% des granulocytes les plus marqués en CD15, afin d'augmenter la spécificité. Enfin, parmi ces granulocytes, les cellules FLAER négatives et CD66b négatives correspondent aux mutants. L'analyse a été réalisée sur au moins 1.10^6 granulocytes et le taux d'acquisition a été limité à 4 000 événements par seconde pour améliorer la précision de l'analyse.

La première étape du processus d'optimisation a consisté à définir le temps d'incubation, les concentrations d'anticorps et les paramètres cytométriques en flux (données non présentées). L'optimisation et la validation de la détection des granulocytes GPI-déficients ont été effectuées à l'aide d'échantillons de sang d'un donneur sain et d'un patient atteint d'HPN. Pour confirmer que notre protocole est en mesure de noter avec précision les cellules GPI-déficientes dans un échantillon contenant moins de 50 cellules mutantes, nous avons effectué des dilutions en série de granulocytes colorés provenant du patient atteint d'HPN et les avons soumises à une analyse.

Test du micronoyau :

La détermination du TCMN en culture a été réalisée sur les échantillons T0 et T2. Ces échantillons de sang héparinés, envoyés au laboratoire dans un délai de 2 heures, ont été utilisés pour l'établissement des cultures de lymphocytes. Un aliquot de sang total a été transféré dans des flasques et incubé à 37°C pendant 44 heures dans du X-Vivo 10 (Lonza Verviers, Sprl, Belgique) avec 1% d'héparine (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) et 1% de phytohématoglutinine. (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France). Les cellules ont été traitées avec de la cytochalasine B (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) et incubées pendant 24 h à 37 °C.

A la fin de l'incubation, les cellules ont été centrifugées (220 g, 10 min à 20 °C), puis traitées avec du KCl 0,075 mM et centrifugées à nouveau (150 g, 1 min à 20 °C) avant que le surnageant ne soit jeté. Les échantillons ont ensuite été traités avec un fixateur (méthanol : acide acétique 3 : 1) pendant 20 min à 4°C et centrifugés (300 g, 10 min, 20°C). Les culots cellulaires ont été remis en suspension dans un fixateur et stockés à 4°C. Les lymphocytes dans le fixateur frais ont été déposés sur des lames congelées, séchés à l'air et colorés dans du Giemsa à 2% (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). L'analyse MN a été réalisée en aveugle et en duplicata uniquement sur les lymphocytes avec cytoplasme préservé. Deux mille cellules binucléées (BN) ont été analysées pour chaque sujet. Les cellules ont été évaluées cytologiquement en utilisant l'approche cytomique pour évaluer le statut de viabilité (nécrose, apoptose), le statut mitotique (mononucléé, binucléé, multinucléé) et la présence de micronoyaux (23). L'indice de prolifération de la cytokinèse (CBPI) a été calculé selon la formule : $CBPI = (M1 + 2M2 + 3M3) / N$, où M1 – M3 représentent le nombre de cellules de 1 à 3 noyaux ou plus et N le nombre total de cellules viables analysées (à l'exclusion des cellules nécrotiques et apoptotiques). Les résultats sont rapportés sous forme de cellules MNBN / 1000 BN.

Analyse statistique des résultats :

Les critères de répétabilité du test PIG-A lors de l'échantillonnage T0 ont été analysés, grâce à la distribution des données, par la détermination de la moyenne et de l'écart type de la différence entre les deux mesures prises à T0. La comparaison de l'exposition a été effectuée en comparant les doses moyennes reçues dans chaque groupe par le test de Student. La comparaison des résultats des tests pendant l'exposition a été réalisée à l'aide du test de Wilcoxon. Une valeur bilatérale de $p < 0,05$ était considérée comme statistiquement significative.

RESULTATS

Validation de la méthode de quantification des granulocytes GPI-déficients

La stratégie de sélection des granulocytes GPI-déficients décrite en Matériels et Méthodes est illustrée dans la figure 2. Les sélections successives de cellules d'intérêt nous ont permis de détecter et de quantifier la fréquence de granulocytes mutés au locus PIG-A.

L'analyse d'un patient HPN (Figure 2F) et d'un volontaire sain (Figure 2G) nous ont permis d'obtenir des cytogrammes caractéristiques de suspensions cellulaires riches et pauvres en cellules mutées. Enfin, une expérience de dilution limite réalisée sur le prélèvement effectué sur le patient HPN nous a permis de démontrer que la mesure de la fréquence était stable jusque dans les dilutions où le nombre de cellules mutées sur le gène PIG-A était inférieur à 50.

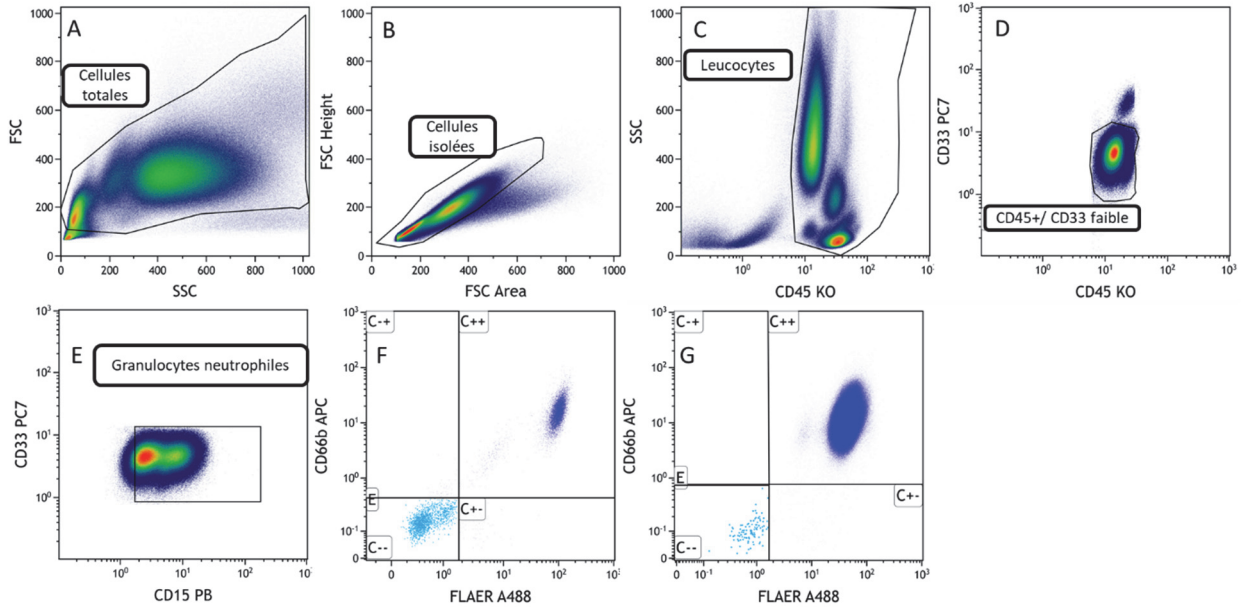


Figure 2 : Cytogrammes A – F : Cytogrammes représentatifs d’une acquisition au cours d’un test PIG-A. Cytogrammes B à E : l’analyse est menée sur les populations cellulaires sélectionnées à l’étape précédente. Cytogramme F : analyse finale d’un échantillon sanguin d’un patient atteint d’HPN (population cellulaire C -/-importante). Cytogramme G : analyse finale d’un échantillon sanguin d’un donneur sain (population cellulaire C -/-faible).

Distribution de la dose de radiothérapie dans le volume osseux selon les groupes

Le volume osseux recevant une dose minimale de 0,5 Gy a été déterminé pour chaque patient (Tableau 1). Le volume osseux irradié était significativement plus élevé dans le groupe RTMG que dans le groupe RTME ($589 \pm 101 \text{ cm}^3$ et $233 \pm 96 \text{ cm}^3$, respectivement ; $p = 1,37 \cdot 10^{-8}$). La dose moyenne reçue dans ce volume était de 7,96 Gy et n'était pas significativement différente entre les 2 groupes.

	Patientes			P
	Groupe complet (n=30)	RTME (n=14)	RTMG (n=16)	
Volume osseux dans l'isodose 0.5 Gy (cm^3)	423± 205	233 ± 96	589± 101	***
Dose minimale (Gy)	0.41± 0.07	0.45 ± 0.02	0.36± 0.06	***
Dose moyenne (Gy)	7.96 ± 2.12	7.35 ± 2.64	8.51 ± 1.40	NS
Dose maximale (Gy)	62.89 ± 10.53	64.33 ± 5.94	61.63 ± 13.42	NS

Tableau 1 : Caractéristiques dosimétriques des traitements de radiothérapie exprimées en moyenne \pm écart type. Des variations significatives ont été notées dans le volume osseux contenu dans l'isodose 0,5 Gy. La distribution de la dose était similaire entre les groupes. Abréviations : RTME : radiothérapie mammaire exclusive ; RTMG : radiothérapie mammaire et ganglionnaire. NS : non significatif ; ***: $p < 0,001$.

Caractéristiques de la population

Les patientes étudiées (Tableau 2) ont reçu une dose de radiothérapie allant de 50 à 66 Gy (moyenne = 63.6 Gy \pm 5.6). Quatorze patientes (46.6%) ont été incluses dans le groupe RTME et 16 (53.3%) dans le groupe RTMG. L'âge moyen était de 61.9 ans \pm 12. Cinq patientes (16%) avaient reçu une chimiothérapie dans les 5 mois précédant la radiothérapie, de manière adjuvante pour 4 d'entre elles et néoadjuvante pour 1. Toutes les patientes ont reçu une association d'épirubicine et de cyclophosphamide, 3 ont reçu du 5 fluoro-uracile, 2 ont reçu du docetaxel et 2 ont reçu du paclitaxel. Neuf patientes (30 %) étaient fumeuses, 6 actives et 3 étaient sevrées depuis au moins 2 ans. Toutes avaient au moins réalisé un TDM dans les 3 mois avant la radiothérapie (en comprenant le TDM de simulation de la radiothérapie). Dans les 3 mois précédant la radiothérapie, 10 patientes (33.3 %) avaient eu au moins une radiographie, 4 (13.3 %) avaient eu un TEP TDM, 10 patientes (33.3 %) avaient eu une scintigraphie et 3 patientes (10 %) avaient eu un épisode infectieux. Aucune patiente n'avait été exposée professionnellement aux radiations ionisantes et 1 (3.3 %) avait eu une exposition à l'amiante. Le temps écoulé entre le premier prélèvement sanguin (T0 avant la radiothérapie) et le deuxième (T1) était de 21,6 \pm 2,5 jours, le délai T0-T2 (troisième prélèvement, correspondant à la fin de la radiothérapie) était de 44,5 jours \pm 4,5 et le délai T0-T3 (dernier prélèvement, correspondant à la consultation de suivi) était de 212,4 jours \pm 84,2 jours. Toutes les caractéristiques des patientes sont résumées dans le tableau 2.

Patientes	Age (Années)	RTME/RTMG	Dose reçue dans le PTV (Gy)	Chimiothérapie	Tabagisme	T0	PIG A (10 ⁻⁶)			TCMN (%)	
							T1 (T0-T1 jours)	T2 (T0-T2 jours)	T3 (T0-T3 jours)	T0	T2
P1	67	RTMG	65,1	0	NF	3,3	0,8 (21)	11,7 (42)	2,4 (325)	ND	ND
P2	65	RTME	66,5	0	NF	12,4	3,5 (21)	29,5 (49)	28,9 (224)	4,5	5,5
P3	70	RTME	66,4	0	NF	2,3	4,7 (21)	4,2 (49)	2,7 (178)	9	20
P4	72	RTMG	66,6	0	A (30)	2,5	2,6 (21)	3,7 (49)	2,9 (178)	12,5	47
P5	52	RTMG	66,1	0	NF	11,1	11,1 (21)	11,4 (44)	9,6 (162)	ND	ND
P6	48	RTMG	50,1	1 (3 FEC + 3 TXT)	NF	16,1	6,2 (21)	7,7 (35)	0,6 (171)	8	43
P7	76	RTME	66,6	0	NF	2,2	2,2 (22)	1,6 (49)	2,1 (393)	ND	ND
P8	52	RTME	66,8	0	NF	8,1	3,1 (20)	14,5 (48)	12,3 (201)	ND	ND
P9	71	RTME	66,6	0	NF	4,1	3,5 (29)	6,9 (49)	1,1 (406)	7,5	29,5
P10	57	RTMG	60,1	0	NF	5,1	0,0 (27)	3,9 (41)	ND	6,5	23
P11	60	RTME	50,2	0	NF	9,6	7,7 (19)	7,9 (36)	5,7 (335)	ND	ND
P12	57	RTMG	66,2	0	A (10)	3,1	2,5 (21)	1,7 (47)	2,1 (343)	3	25,5
P13	73	RTME	66,4	0	NF	0,8	0,7 (21)	2,6 (45)	2,6 (303)	ND	ND
P14	67	RTME	66,3	0	A (6)	0,0	0,0 (21)	0,4 (50)	0,0 (282)	ND	ND
P15	81	RTMG	66,9	0	NF	3,7	2,0 (23)	0,0 (48)	ND	7,5	40
P16	65	RTME	66,3	0	NF	3,2	2,8 (24)	2,4 (49)	2,6 (221)	5	11,5
P17	59	RTME	66,2	0	S (30)	2,8	2,8 (22)	4,2 (46)	1,6 (177)	ND	ND
P18	79	RTMG	66,6	0	NF	0,7	1,6 (22)	2,4 (43)	0,0 (177)	9	45
P19	48	RTMG	66,6	0	A (27)	4,0	6,2 (21)	5,5 (48)	1,3 (176)	9,5	63,5
P20	90	RTMG	50,1	0	NF	0,3	0,3 (21)	1 (41)	ND	15	68,5
P21	61	RTME	66,5	0	NF	4,0	3,2 (21)	3,7 (43)	4 (170)	6	18,5
P22	56	RTME	50,3	0	S (5)	38,9	16,9 (22)	37,2 (35)	2,7 (203)	10	35
P23	47	RTMG	60,2	0	A (18)	3,0	4,7 (18)	1,5 (39)	0,0 (157)	ND	ND
P24	51	RTME	66,3	0	NF	5,0	0,9 (17)	1,1 (44)	0,0 (148)	ND	ND
P25	66	RTMG	66,5	0	NF	1,9	1,3 (28)	2,7 (52)	0,0 (141)	ND	ND
P26	38	RTMG	60,1	1 (4 EC + 9 PTX)	A (6)	8,2	6,1 (22)	4,7 (42)	0,0 (143)	4,5	31
P27	75	RTMG	67,0	0	NF	60,5	47,3 (21)	7,2 (42)	13,5 (146)	ND	ND
P28	52	RTME	66,3	1 (6 FEC)	S (15)	6,6	4,7 (20)	5,7 (45)	0,8 (121)	9,5	31
P29	51	RTMG	66,2	1 (3 FEC + 9 PTX)	NF	2,3	2,3 (21)	3,3 (42)	2,6 (125)	ND	ND
P30	51	RTMG	66,4	1 (3 FEC + 3TXT)	NF	4,4	2,1 (21)	2,2 (42)	0,4 (131)	ND	ND

Tableau 2: Caractéristiques des patientes et résultats des prélèvements. Le tabagisme était décrit comme non-fumeur (NF), actif (A) et sevré (S), UPA (Unité paquet-année). Abréviations : RTME : radiothérapie mammaire exclusive ; RTMG : radiothérapie mammaire et ganglionnaire ; PTV : planning target volume ; TCMN (Taux de cellules micronucléées). Les fréquences des granulocytes mutés PIG-A ont été exprimées selon 10⁶. Le nombre moyen de granulocytes analysés par prélèvement était de 2,7 x 10⁶. E : Épirubicine ; C : cyclophosphamide, F : 5 fluoro-uracile, TXT : docetaxel ; PTX : paclitaxel. ND : non déterminé.

Evaluation clinique du test PIG A

Répétabilité du test

Pour évaluer la répétabilité de la détermination de la fréquence des granulocytes GPI-déficients, des échantillons de sang sur T0 (avant le début de la radiothérapie) ont été réalisés en duplicata pour chaque patiente. Pour 4 patientes, les données n'étaient pas disponibles en raison d'un problème technique sur une des deux analyses. Les moyennes des variances et de l'écart-type étaient de $13,95 \times 10^{-12}$ et $2,29 \times 10^{-6}$, avec une répétabilité de la détermination de la fréquence des granulocytes GPI-déficients pour une patiente de $2,29 \times 10^{-6}$.

Stabilité des prélèvements dans le temps

Pour évaluer la stabilité de la fréquence des granulocytes déficients en GPI dans le temps, les échantillons de T0 de 4 patientes ont été conservés à l'obscurité à 4 ° C. Le test PIG-A a été effectué à 24 h, 48 h et 72 h et les résultats ont été comparés à la valeur T0. Aucune différence significative n'a été trouvée à H24, H48 et H72 par rapport à H0 (test de Wilcoxon pour échantillons appariés).

Effet de la radiothérapie sur la fréquence de granulocytes GPI-déficients

Le test PIG-A a été réalisé chez 30 patientes avant irradiation (T0), en milieu (T1) et à la fin de l'irradiation (T2). Le prélèvement T3, pratiqué plus de 10 semaines après la radiothérapie a été réalisé sur 27 patients (3 patientes refusent le dernier échantillon). Les fréquences moyennes des granulocytes mutés PIG-A déterminées dans l'ensemble du groupe de patientes (y compris les patientes RTME et RTMG) étaient de $7,7 \times 10^{-6}$, $5,2 \times 10^{-6}$, $6,4 \times 10^{-6}$, $3,8 \times 10^{-6}$ à T0, T1, T2 et T3, respectivement (figure 3A). Des différences statistiquement significatives ont été observées entre T1 et T0 ($P = 0,0035$), T3 et T0 ($P = 0,006$). Aucune différence statistiquement significative n'a été observée entre T2 et T0 ($P = 0,8394$). Des observations similaires ont été notées lors de l'analyse de l'effet de la radiothérapie sur les fréquences de granulocytes mutés sur les groupes RTME et RTMG. (Figures 3B et 3C).

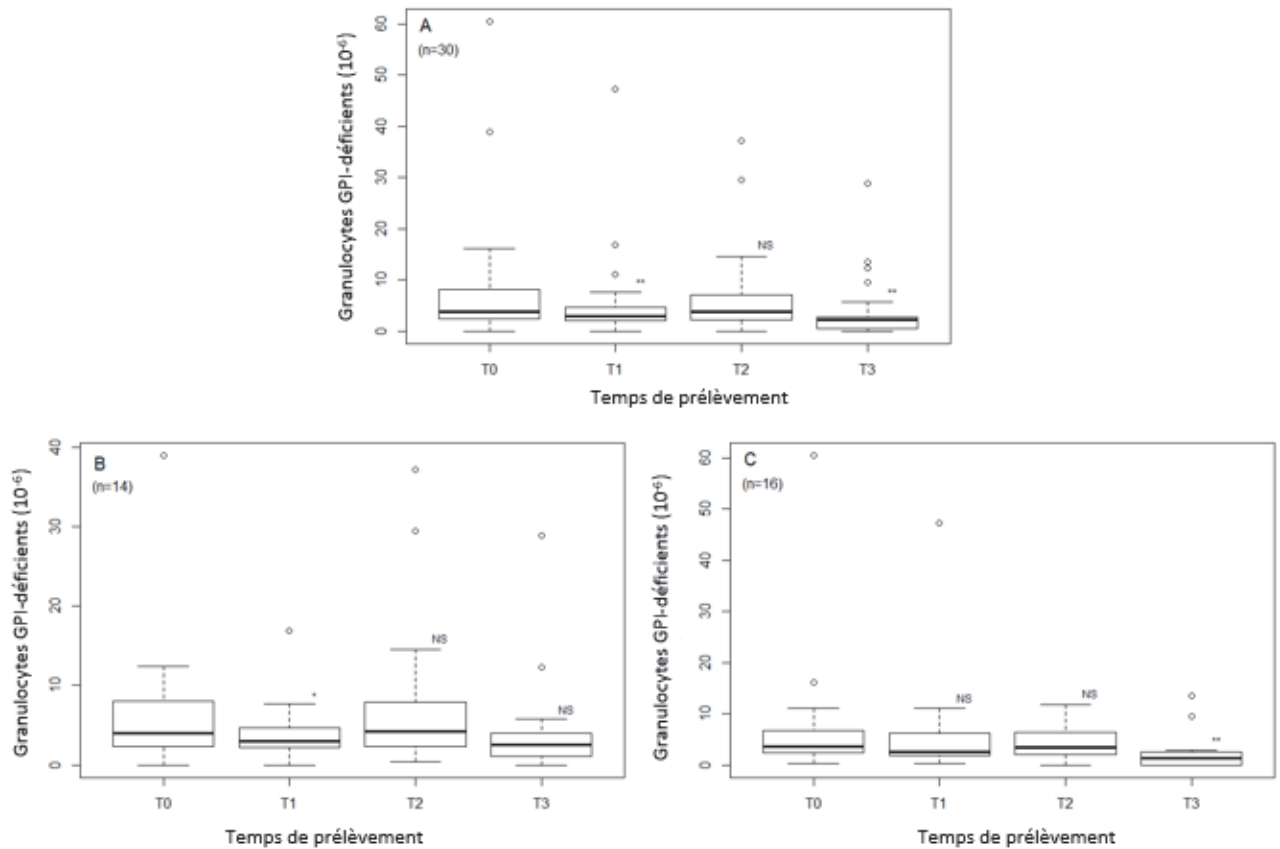


Figure 3 : Taux de granulocytes GPI-défectueux selon la dose de radiothérapie délivrée (T0, T1, T2 et T3), pour toutes les patientes (n = 30) (A), pour le groupe RTME (n = 14) (B), pour le groupe RTMG (n = 16) (C). La distribution des données était si rapprochée aux différents temps de prélèvements qu'aucune différence biologique n'a été retenue, bien que des différences statistiquement significatives aient été observées (NS : non significatif ; * : $P < 0,05$; ** : $P < 0,01$)

Effet de la chimiothérapie avant le premier prélèvement sur la fréquence de granulocytes GPI-déficients

Cinq patientes ont reçu une chimiothérapie avant la radiothérapie, 4 adjuvantes et 1 néoadjuvante. Le test PIG-A réalisé à l'échantillon T0, avant le début de la radiothérapie, chez ces 5 patientes, n'a pas montré de variation significative de la fréquence des granulocytes GPI-déficients ($P = 0,2$).

Effet du tabac (comparaison des fumeurs et non-fumeurs et relation avec la consommation en paquet-année) et effet de l'âge, sur la fréquence de granulocytes GPI-déficients

Les autres facteurs de confusion représentés par l'âge et le tabagisme ont été analysés. L'âge n'a pas influencé significativement la fréquence de granulocytes GPI-déficients. La comparaison entre non-fumeurs, fumeurs actifs ou sevrés et la relation avec la consommation en paquet-année n'a pas entraîné de modification significative du taux de granulocytes GPI-déficients dans chaque analyse univariée ainsi que dans l'analyse multivariée (les données ne sont pas présentées).

Test du micronoyau

Effet de la radiothérapie sur le TCMN

Le test du MN a été réalisé chez 16 patientes lors des prélèvements T0 et T2. Le TCMN était significativement plus élevé lors du prélèvement T2 à la fin de la radiothérapie comparativement au prélèvement contrôle T0 pour l'ensemble des patientes ($P = 3.1 \times 10^{-5}$), ainsi que respectivement dans le groupe RTME ($P = 0.015$) et RTMG ($P = 0.003$). Le TCMN était significativement plus élevé lors du prélèvement T2 dans le groupe RTMG en comparaison au groupe RTME ($P = 0.012$) (Figure 4).

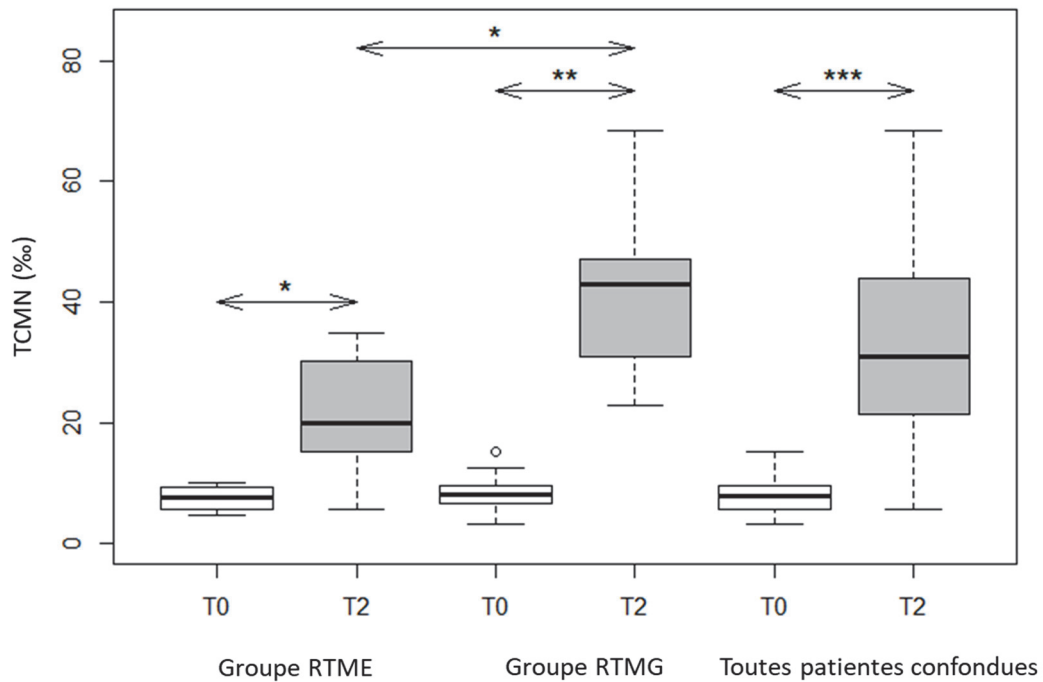


Figure 4 : Distribution des TCMN par 1000 cellules avant (prélèvements T0) et à la fin de la radiothérapie (prélèvements T2), pour le groupe RTME (n = 7), le groupe RTMG (n = 9) et toutes les patientes (n = 16) testées pour les TCMN. Les TCMN étaient significativement plus élevés après la radiothérapie selon le test de Wilcoxon, (sur échantillons appariés) chez l'ensemble des patients, dans le groupe RTME et dans le groupe RTMG. Les TCMN à T2 étaient significativement plus élevés dans le groupe RTMG que dans le groupe RTME. (* : P <0,05 ; ** : P <0,01 *** : P <0,001)

Effet de la chimiothérapie avant le premier prélèvement sur le TCMN

L'administration antérieure de chimiothérapie n'a pas influencé le TCMN à T0 (P = 0,89).

Effet du tabac (comparaison des fumeurs et non-fumeurs et relation avec la consommation en paquet-année) et effet de l'âge, sur le TCMN

En analyse multivariée, le TCMN était significativement corrélé à l'âge (p = 0,043) et à l'irradiation (p <0,001) mais pas à la chimiothérapie ni au statut tabagique (Tableau 3).

Test de	Variabes indépendantes	Coefficient	p-value
TCMN	Groupe de Radiothérapie	4.6	0.03
	Statut tabagique	4.1	0.11
	Chimiothérapie	2.94	0.36
	Radiothérapie (T0 vs T2)	12.8	<0.00011
	Age	11.7	0.04

Tableau 3 : Analyse multivariée du TCMN. Influence des différentes variables indépendantes (exposition à la radiothérapie catégorisée pour toutes les patientes et selon le groupe RTME ou RTMG, statut tabagique classé comme fumeur ou non-fumeur, chimiothérapie classée comme chimiothérapie ou pas de chimiothérapie) sur les niveaux de TCMN, testés selon une analyse de régression linéaire multivariée.

DISCUSSION

Le développement de nouveaux biomarqueurs de génotoxicité est crucial afin de mesurer l'impact des expositions mutagènes environnementales ou thérapeutiques, ainsi que la sensibilité individuelle à ces expositions. Aucun test n'est actuellement disponible pour mesurer de manière globale cette mutagénèse. Nous avons tenté de mettre au point un test simple, rapide, peu onéreux, afin de tenter de déterminer la fréquence de mutations du gène PIG-A chez l'Homme en cytométrie de flux, sur sang circulant, dans le but de proposer un test innovant applicable au suivi des expositions.

Le principe du test pratiqué dans cette étude est issu de celui utilisé en routine dans le cadre du diagnostic et du suivi de patients atteint d'HPN (24). Nous avons été amenés à optimiser la technique de phénotypage des cellules circulantes tout en gérant les contraintes de débit et de précision. La lignée granulocytaire a été choisie comme modèle cellulaire, à la suite des travaux d'Athens et al. qui ont suggéré que ce type cellulaire était peu ou pas soumis à l'attaque du complément, en raison de leur courte durée de vie intravasculaire (environ 24h) (25). Les populations cellulaires à durée de vie intravasculaire plus longue comme les érythrocytes (120j) présentent une fréquence spontanée de cellules PIG-A mutées plus faible que celle de leurs précurseurs immédiats, les réticulocytes, dont la durée de vie est d'environ 48h (respectivement $2,9 \cdot 10^{-6}$ vs $6,0 \cdot 10^{-6}$) (26).

Comme attendu, le volume osseux dans l'isodose à 0,5 Gy était significativement plus élevé dans le groupe RTMG que dans le groupe RTME, car le champ de radiothérapie est systématiquement plus grand en cas d'irradiation des aires ganglionnaires. La dose moyenne reçue dans ce volume n'était pas significativement différente entre les deux groupes

Le traitement de radiothérapie n'a pas majoré les fréquences de granulocytes GPI-déficients, même dans le groupe de patientes ayant le plus grand volume de moelle osseuse irradié (groupe RTMG). De manière surprenante, des diminutions statistiquement significatives des fréquences de granulocytes GPI-déficients ont été notées. Au total, les fréquences moyennes observées pour n'importe quel temps de prélèvement dans l'ensemble des groupes RTME et RTMG étaient comprises entre $3,8 \times 10^{-6}$ et $7,7 \times 10^{-6}$. Ces fréquences moyennes étaient

toujours inférieures à 10×10^{-6} et ont été déterminées en effectuant une analyse par cytomètre de flux sur un nombre total moyen de granulocytes de $2,7 \times 10^6$. Par conséquent, aucune différence biologiquement significative entre les fréquences de granulocytes GPI-déficients n'a été mise en évidence aux différents moments d'échantillonnage.

Dans notre étude, 5 patientes sur 30 ont reçu une combinaison d'anthracycline, de 5-fluorouracile, de cyclophosphamide et de taxane avant l'échantillonnage. Les 25 patientes restantes n'ont reçu aucun traitement anticancéreux avant l'échantillonnage. Les patientes traitées par chimiothérapie ne présentaient pas de fréquences de granulocytes GPI-déficients en GPI plus élevées à T0 en comparaison aux 25 autres patientes. Là encore, dans ce sous-groupe, le traitement par radiothérapie n'a pas entraîné d'augmentation de la fréquence des granulocytes GPI-déficients. Nous n'avons trouvé aucun effet lié à l'âge sur la fréquence des granulocytes GPI-déficients. Cependant, ce résultat doit être considéré avec prudence, car notre plus jeune patient avait 38 ans.

Le test du MN a été réalisé chez 16 patientes (7 dans le groupe RTME et 9 dans le groupe RTMG). Des augmentations des TCMN ont été notées après irradiation dans les groupes RTME et RTMG et l'induction de micronoyaux semble être corrélée au volume d'os irradié. Dans notre cohorte, aucune augmentation des TCMN n'a été constatée chez les patientes précédemment traitées par chimiothérapie. Les TCMN étaient également significativement corrélés à l'âge mais n'augmentaient pas chez les fumeurs actifs ou sevrés en analyse multivariée.

Les fréquences basales de granulocytes GPI-déficients étaient proches de celles rapportées par Rondelli et al. dans une population de 142 donneurs sains (de 1×10^{-6} à $37,5 \times 10^{-6}$; valeur médiane de $4,9 \times 10^{-6}$) (22). Horibata et al ont retrouvé des fréquences basales similaires chez des donneurs sains et chez les patients atteints de cancer (27).

À notre connaissance, seules quatre études ont tenté d'évaluer les conséquences d'une exposition humaine à des rayonnements ionisants et / ou à une chimiothérapie sur la fréquence des cellules circulantes GPI-déficientes.

MacDiarmid et al. n'ont pas observé d'augmentation du nombre de lymphocytes PIG-A mutés après une exposition à l'uranium appauvri chez les anciens combattants (21).

Horibata et al. ont évalué le test PIG A sur les globules rouges humains en utilisant une cohorte de 27 patients atteints de cancer traités par chimiothérapie et/ou radiothérapie. Dans cette étude, aucune augmentation du taux de cellules PIG A mutées n'a été observée chez tous les patients traités par radiothérapie (n = 14). Néanmoins, cette population était très hétérogène en termes de type de cancer, de chimiothérapie et de radiothérapie (dose allant de 6 à 60 Gy) (27). Conformément à nos conclusions, Horibata et al. n'ont signalé aucune augmentation statistiquement significative de la fréquence de mutation de PIG-A dans une population de patients cancéreux comparativement à des sujets sains. Les taux les plus élevés observés dans cette étude, concernaient deux patients et étaient compris entre $20,0 \times 10^{-6}$ et $49,7 \times 10^{-6}$. L'attribution de ces taux à l'impact génotoxique de la chimiothérapie ne peut être certain, car comme nous l'avons retrouvé dans notre étude, certaines patientes présentaient physiologiquement des taux de cellules mutées PIG-A élevés avant tout stimulus génotoxique.

Dobrovolsky et al. ont évalué le test PIG A sur des globules rouges dans une cohorte de 10 patients atteints de cancer traités par chimiothérapie. Six de ces patientes ont été traitées contre un cancer du sein, avec des agents chimio thérapeutiques similaires à ceux utilisés dans notre étude. Aucune d'entre elles n'a présenté d'augmentation de la fréquence des globules rouges déficients en CD59. Ces derniers ont retrouvé, une fréquence des globules rouges déficients en CD59, multipliée par 3 chez un patient traité avec une association de cisplatine et d'étoposide (20). Les auteurs ont constaté une faible corrélation avec l'âge et aucune variation en fonction du statut tabagique dans une population de 97 donneurs sains (20).

Haboubi et al. ont retrouvé une fréquence plus élevée des globules rouges GPI-déficients chez les patients atteints d'un adénocarcinome de l'œsophage comparativement aux donneurs sains ou aux patients présentant un état pré-néoplasiques (dysplasie), Ces derniers rapportent un taux 19 fois plus important chez les patients traités par chimiothérapie et 2 fois plus élevé chez les fumeurs (19).

L'augmentation des TCMN observée ici après une irradiation partielle a été largement décrite dans la littérature (28–30). Lee et al. ont signalé une relation linéaire entre les TCMN et la dose de radiothérapie reçue dans une population de 13 femmes irradiées à l'encontre d'un cancer du sein (28). Cette relation a également été observée dans l'irradiation des cancers de l'œsophage (29), ainsi que dans la maladie de Hodgkin et dans le cancer du col de l'utérus (30).

Kosar et al ont constaté une augmentation significative des TCMN après le même protocole de chimiothérapie chez une population de femmes traitées contre le cancer du sein (31), mais le test était effectué une heure avant et après le traitement, alors que notre test était effectué plusieurs semaines à plusieurs mois après la dernière cure de chimiothérapie. Il faut également prendre en compte l'important manque de puissance de ce point de comparaison car nous n'avions que 3 patientes ayant fait l'objet de ce test.

Fenech et al. ont publié une revue de la littérature sur l'effet de l'âge, du sexe, du régime alimentaire et du mode de vie sur les dommages chromosomiques, mesurés à l'aide de la fréquence des micronoyaux confirmant que le taux de micronoyaux est proportionnel à l'âge et plus élevé chez les fumeurs (32). L'absence de lien avec le tabagisme, dans notre étude, doit être en rapport avec un manque de puissance, en effet notre cohorte ne comptait que 6 patientes fumeuses actives et dont l'intoxication n'était pas quantitativement très importante.

Le protocole d'exposition et la localisation du cancer sélectionnés dans notre étude peuvent être discutés. Nous avons choisi d'inclure une population de femmes atteintes d'un cancer du sein car l'incidence élevée de cette maladie permet une inclusion prospective rapide. Les modalités d'irradiation mammaire adjuvante sont soumises aux recommandations internationales en termes de dose et de volume d'irradiation (33,34). Les variations des « clinical target volume » (volumes cibles) du sein et des aires ganglionnaires ont conduit à l'obtention de divers volumes de moelle osseuse irradiés pouvant être déterminés individuellement. En effet, à dose équivalente, le volume de moelle osseuse irradié varie entre chaque patiente et il devient possible de tenter de corrélérer le volume de moelle osseuse irradié au taux de granulocytes GPI-déficients.

Afin de prendre en compte les faibles doses correspondant à l'irradiation diffusée, le volume osseux inclus dans l'isodose 0,5 Gy a été choisi. L'Agence française de sûreté nucléaire a défini cette valeur comme le seuil au-delà duquel les effets déterministes commencent à être observés lors d'une exposition globale, même s'il est possible d'observer certains effets déterministes aux alentours de 0,3 Gy pour des expositions partielles. Ce niveau dose sur un important volume pourrait correspondre à ce que serait une irradiation accidentelle intéressant une grande partie de la moelle osseuse et pour laquelle la mesure de la génotoxicité aurait un intérêt en santé publique (accident nucléaire civil ou militaire, accident d'exposition des soignants). Il faut cependant souligner que dans notre cas la dose est fractionnée et n'est pas délivrée en une seule fois comme lors d'une exposition accidentelle.

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer nos résultats. Premièrement, le volume de la moelle osseuse contenue dans l'intégralité des côtes et le sternum représente respectivement 16.1 et 3.1 % de la totalité de la moelle osseuse hématopoïétique (35). Un protocole d'irradiation pelvien comme celui indiqué dans la prise en charge du cancer de la prostate, de l'utérus ou du rectum aurait permis une irradiation médullaire plus importante (environ 33% de la moelle).

Par ailleurs, l'absence d'induction de granulocytes mutés PIG-A, après l'irradiation, pourrait être attribuée à l'effet cytotoxique de la radiothérapie. Les doses totales sur la moelle osseuse, supérieures à 30 Gy, même de manière fractionnée, ont été décrites comme cytotoxiques sur la moelle osseuse (36). En raison des dommages causés au microenvironnement médullaire, les processus de recolonisation de la moelle osseuse par les cellules souches hématopoïétiques après une forte irradiation (> 40 Gy) peuvent prendre plusieurs années ou causer des lésions irréversibles à la micro vascularisation se manifestant par une fibrose irréversible de la moelle osseuse (> 50Gy) (36).

L'impact mutationnel de la radiothérapie peut se traduire cliniquement par le développement tardif de maladies hématopoïétiques malignes telle que la leucémie aigüe myéloïde et par l'apparition de cancers solides dit radio-induits dans les territoires irradiés ou à leur proximité immédiate (37–39). Ces cancers secondaires, majoritairement représentés par les cancers du sein et de la thyroïde, ont été principalement décrits chez les patients traités initialement pour

une maladie de Hodgkin au 20^{ème} siècle. Contrairement aux leucémies secondaires, ces cancers apparaissent tardivement, majoritairement > 10 ans après l'irradiation. Il apparaît qu'un jeune âge, de grands champs d'irradiation ainsi que les doses intermédiaires (cancers radio-induits fréquemment retrouvés en bordure de champs d'irradiation) augmentent le risque de développer un cancer radio-induit (38,39). La persistance de MN plus de 5 ans après l'irradiation, décrite par Lee et al, pourrait refléter cette réalité clinique suggérant la mutation pérenne d'un précurseur hématopoïétique (28).

Dans notre étude, cette génotoxicité radique a été clairement mise en évidence par le test du MN, considéré comme test de référence dans le design de notre étude. La positivité du test du MN n'est pas incompatible avec l'absence d'induction de la mutation PIG-A. Premièrement, les lymphocytes étudiés sont des cellules circulantes et ont donc un temps d'exposition plus court et donc une dose de rayonnement plus faible que les cellules souches hématopoïétiques myéloïdes, précurseurs des granulocytes, contenues dans le stroma médullaire, très probablement endommagé par l'irradiation. De plus, les précurseurs myéloïdes sont en mitose perpétuelle et sont donc probablement plus sensibles aux stimuli génotoxiques que les lymphocytes circulants en phase G0 du cycle cellulaire. Enfin, la détection de ces micronoyaux est également liée à la mise en culture, *ex vivo*, de ces lymphocytes, ce qui entraîne la reprise d'une activité mitotique et ainsi la révélation de lésions chromosomiques.

CONCLUSION

Malgré un test robuste, nos résultats suggèrent que le test PIG-A sur granulocytes ne permet pas de mettre en évidence un stress génotoxique radio-induit, dans une population de patientes traitées par radiothérapie externe à visée thérapeutique. La confirmation du caractère génotoxique de l'irradiation mammaire par le test du MN encourage à évaluer le test PIG-A dans d'autres contextes d'expositions génotoxiques ou dans d'autres cellules circulantes telles que les érythrocytes ou les réticulocytes, déjà utilisés chez les rongeurs.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Houtgraaf JH, Versmissen J, van der Giessen WJ. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc Revascularization Med Mol Interv.* sept 2006;7(3):165-72.
2. Kinoshita T. Biosynthesis and deficiencies of glycosylphosphatidylinositol. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2014;90(4):130-43.
3. Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, Iida Y, Endo Y, Fujita T, et al. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell.* 21 mai 1993;73(4):703-11.
4. Gollapudi BB, Lynch AM, Heflich RH, Dertinger SD, Dobrovolsky VN, Froetschl R, et al. The in vivo Pig-a assay: A report of the International Workshop On Genotoxicity Testing (IWGT) Workgroup. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 1 mai 2015;783:23-35.
5. Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood.* 30 oct 2014;124(18):2804-11.
6. Araten DJ, Nafa K, Pakdeesuwan K, Luzzatto L. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27 avr 1999;96(9):5209-14.
7. Hu R, Mukhina GL, Piantadosi S, Barber JP, Jones RJ, Brodsky RA. PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood.* 15 mai 2005;105(10):3848-54.
8. Kawagoe K, Takeda J, Endo Y, Kinoshita T. Molecular cloning of murine pig-a, a gene for GPI-anchor biosynthesis, and demonstration of interspecies conservation of its structure, function, and genetic locus. *Genomics.* oct 1994;23(3):566-74.
9. Peruzzi B, Araten DJ, Notaro R, Luzzatto L. The use of PIG-A as a sentinel gene for the study of the somatic mutation rate and of mutagenic agents in vivo. *Mutat Res.* sept 2010;705(1):3-10.
10. Phonetheswath S, Bryce SM, Bemis JC, Dertinger SD. Erythrocyte-based Pig-a gene mutation assay: demonstration of cross-species potential. *Mutat Res.* 8 déc 2008;657(2):122-6.
11. Phonetheswath S, Franklin D, Torous DK, Bryce SM, Bemis JC, Raja S, et al. Pig-a mutation: kinetics in rat erythrocytes following exposure to five prototypical mutagens. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* mars 2010;114(1):59-70.
12. Bhalli JA, Pearce MG, Dobrovolsky VN, Heflich RH. Manifestation and persistence of Pig-a mutant red blood cells in C57BL/6 mice following single and split doses of N-ethyl-N-nitrosourea. *Environ Mol Mutagen.* déc 2011;52(9):766-73.
13. Miura D, Dobrovolsky VN, Kimoto T, Kasahara Y, Heflich RH. Accumulation and persistence of Pig-A mutant peripheral red blood cells following treatment of rats with single and split doses of N-ethyl-N-nitrosourea. *Mutat Res.* juill 2009;677(1-2):86-92.
14. Dertinger SD, Avlasevich SL, Torous DK, Bemis JC, Phonetheswath S, Labash C, et al. Persistence of cisplatin-induced mutagenicity in hematopoietic stem cells: implications for secondary cancer risk following chemotherapy. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol.* 1 août 2014;140(2):307-14.

15. Ohtani S, Unno A, Ushiyama A, Kimoto T, Miura D, Kunugita N. The in vivo Pig-a gene mutation assay is useful for evaluating the genotoxicity of ionizing radiation in mice. *Environ Mol Mutagen.* oct 2012;53(8):579-88.
16. Ohtani S, Ushiyama A, Ootsuyama A, Kunugita N. Persistence of red blood cells with Pig-a mutation in p53 knockout mice exposed to X-irradiation. *J Toxicol Sci.* févr 2014;39(1):7-14.
17. Graupner A, Eide DM, Instanes C, Andersen JM, Brede DA, Dertinger SD, et al. Gamma radiation at a human relevant low dose rate is genotoxic in mice. *Sci Rep.* 6 sept 2016;6:32977.
18. Olsen A-K, Dertinger SD, Krüger CT, Eide DM, Instanes C, Brunborg G, et al. The Pig-a Gene Mutation Assay in Mice and Human Cells: A Review. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* sept 2017;121 Suppl 3:78-92.
19. Haboubi HN, Lawrence RL, Rees B, Williams L, Manson JM, Al-Mossawi N, et al. Developing a blood-based gene mutation assay as a novel biomarker for oesophageal adenocarcinoma. *Sci Rep.* 26 mars 2019;9(1):5168.
20. Dobrovolsky VN, Elespuru RK, Bigger CAH, Robison TW, Heflich RH. Monitoring humans for somatic mutation in the endogenous PIG-a gene using red blood cells. *Environ Mol Mutagen.* déc 2011;52(9):784-94.
21. McDiarmid MA, Albertini RJ, Tucker JD, Vacek PM, Carter EW, Bakhmutsky MV, et al. Measures of genotoxicity in Gulf war I veterans exposed to depleted uranium. *Environ Mol Mutagen.* août 2011;52(7):569-81.
22. Rondelli T, Berardi M, Peruzzi B, Boni L, Caporale R, Dolara P, et al. The frequency of granulocytes with spontaneous somatic mutations: a wide distribution in a normal human population. *PLoS One.* 2013;8(1):e54046.
23. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2007;2(5):1084-104.
24. Sutherland DR, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 1 juill 2012;82B(4):195-208.
25. Athens JW, Haab OP, Raab SO, Mauer AM, Ashenbrucker H, Cartwright GE, et al. Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. *J Clin Invest.* juin 1961;40:989-95.
26. Dertinger SD, Avlasevich SL, Bemis JC, Chen Y, MacGregor JT. Human erythrocyte PIG-A assay: an easily monitored index of gene mutation requiring low volume blood samples. *Environ Mol Mutagen.* mai 2015;56(4):366-77.
27. Horibata K, Ukai A, Ishikawa S, Sugano A, Honma M. Monitoring genotoxicity in patients receiving chemotherapy for cancer: application of the PIG-A assay. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 15 sept 2016;808:20-6.
28. Lee T-K, Allison RR, O'Brien KF, Naves JL, Karlsson UL, Wiley AL. Persistence of Micronuclei in Lymphocytes of Cancer Patients after Radiotherapy. *Radiat Res.* 2002;157(6):678-84.

29. Emamgholizadeh Minaei S, Mozdarani H, Motazakker M, Mansouri M, R Aghamiri SM. Evaluation of Cytogenetic Alterations in Peripheral Blood Lymphocytes of Esophageal Cancer Patients Treated with Radiotherapy or Chemoradiotherapy using Cytokinesis-Blocked Micronucleus Assay. *Acta Med Iran.* janv 2016;54(1):9-14.
30. Thierens H, Vral A, Van Eijkeren M, Speleman F, De Ridder L. Micronucleus induction in peripheral blood lymphocytes of patients under radiotherapy treatment for cervical cancer or Hodgkin's disease. *Int J Radiat Biol.* mai 1995;67(5):529-39.
31. Koşar PA, Koçer M, Çelik DA, Özçelik N. Cytogenetic findings in patients diagnosed with breast cancer having undergone adjuvant chemotherapy regimens. *Genet Mol Res GMR.* 18 mars 2016;15(1).
32. Fenech M, Bonassi S. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis.* janv 2011;26(1):43-9.
33. Offersen BV, Boersma LJ, Kirkove C, Hol S, Aznar MC, Biete Sola A, et al. ESTRO consensus guideline on target volume delineation for elective radiation therapy of early stage breast cancer. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* janv 2015;114(1):3-10.
34. Verhoeven K, Weltens C, Remouchamps V, Mahjoubi K, Veldeman L, Lengele B, et al. Vessel based delineation guidelines for the elective lymph node regions in breast cancer radiation therapy - PROCAB guidelines. *Radiother Oncol J Eur Soc Ther Radiol Oncol.* janv 2015;114(1):11-6.
35. Cristy M. Active bone marrow distribution as a function of age in humans. *Phys Med Biol.* mai 1981;26(3):389-400.
36. Mauch P, Constine L, Greenberger J, Knospe W, Sullivan J, Liesveld JL, et al. Hematopoietic stem cell compartment: acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 30 mars 1995;31(5):1319-39.
37. Wright JD, St Clair CM, Deutsch I, Burke WM, Gorrochurn P, Sun X, et al. Pelvic radiotherapy and the risk of secondary leukemia and multiple myeloma. *Cancer.* 15 mai 2010;116(10):2486-92.
38. Cosset J-M, Chargari C, Demoor C, Giraud P, Helfre S, Mornex F, et al. [Prevention of radio-induced cancers]. *Cancer Radiother J Soc Francaise Radiother Oncol.* sept 2016;20 Suppl:S61-68.
39. Travis LB. The epidemiology of second primary cancers. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol.* nov 2006;15(11):2020-6.

ABREVIATIONS

A :	Fumeur actif
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ANSM :	Agence Nationale de Sécurité du médicament et des produits de santé
BN :	Binucléé
C :	Cyclophosphamide
CBPI :	Indice de prolifération de la cytokinèse
CMI :	Chaîne mammaire interne
DAF :	Decay Accelerating Factor
E :	Epirubicine
EDTA :	Acide tétra-acétique éthylène diamine
F :	5-Fluoro-uracile
FLAER :	Aérollysine fluorescent
GPI :	Glycosyl-phosphatidyl-inositol
Gy :	Gray
HPN :	Hémoglobinurie paroxystique nocturne
HR :	Hasard ratio
IMBE :	Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'Ecologie
INRS :	Institut National de Recherche et de Sécurité
IWGT :	International Workgroup on Genotoxicity Testing
MIRL :	Membrane Inhibitor of Reactive Lysis
MN :	micro-noyau
ND :	Non déterminé
NF :	Non-fumeur
NS :	Non significatif
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PTV :	Planning Target Volume
PTX :	Paclitaxel
RT :	Radiothérapie
RTME :	Radiothérapie mammaire exclusive
S :	Fumeur sevré
RTMG :	Radiothérapie mammaire et ganglionnaire
TCMN :	Taux de cellules micronuclées
TXT :	Docetaxel
UNSCEAR :	United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation
UPA :	Unité paquet-année
UV :	Ultraviolet

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque.

RESUME

Introduction : Le gène PIG-A, impliqué dans la biosynthèse de l'ancre glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI), constitue un biomarqueur génotoxique chez les rongeurs. L'objectif principal de cette étude est d'évaluer prospectivement, chez l'Homme, le test PIG-A en tant que biomarqueur de génotoxicité lors d'une radiothérapie externe à visée thérapeutique.

Matériels et méthodes : Trente patientes atteintes d'un cancer du sein, réparties en 2 groupes, radiothérapie mammaire exclusive (RTME) ou radiothérapie mammaire et ganglionnaire (RTMG) ont été incluses de janvier 2016 à juin 2017. La fréquence de granulocytes GPI-déficients a été déterminée par cytométrie de flux sur quatre prélèvements sanguins. L'induction de micronoyaux a été mesurée lors du premier et du troisième prélèvement.

Résultats : La radiothérapie n'a pas augmenté significativement la fréquence des granulocytes GPI-déficients, quel que soit le groupe ou la dose de rayonnement. Les taux de micronoyaux étaient significativement plus élevés à la fin de la radiothérapie chez tous les patients ($p = 3,1 \times 10^{-5}$), dans le groupe traité par RTME ($p = 0,016$), par RTMG ($p = 0,003$), et dans le groupe RTMG par rapport au RTME ($p = 0,012$). En analyse multivariée, les micronoyaux étaient significativement corrélés avec l'âge ($p = 0,043$) et l'irradiation ($p = 0,0001$).

Conclusion : Le test PIG-A sur granulocytes ne révèle pas la génotoxicité radio-induite. La confirmation du caractère génotoxique de l'irradiation mammaire par le test du micronoyau encourage à évaluer le test PIG-A après d'autres expositions génotoxiques ou dans d'autres cellules circulantes telles que les érythrocytes ou les réticulocytes.

Mots clés : Génotoxicité, PIG-A, cancer du sein, radiothérapie, chimiothérapie, cytométrie de flux, micronoyau.