

● LES PRODUITS CHIMIQUES GÉNOTOXIQUES

Marja Sorsa

La surveillance biologique utilise des échantillons de liquides biologiques ou d'autres milieux biologiques faciles à prélever soit pour évaluer l'exposition à des substances spécifiques ou non spécifiques ou à leurs métabolites, soit pour évaluer les effets biologiques d'une telle exposition. La surveillance biologique permet de mesurer l'exposition totale subie par un individu par les différentes voies (poumons, peau, tractus gastro-intestinal) et sources d'exposition (air, alimentation, mode de vie ou profession). On sait qu'il n'est pas rare en milieu de travail que les travailleurs soient exposés à plusieurs produits ou facteurs de risque qui interagissent et majorent ou inhibent les effets de chaque produit considéré individuellement. Etant donné les différences interindividuelles de constitution génétique, les réponses à une exposition chimique varient d'un sujet à l'autre. Il est donc plus réaliste de rechercher directement les effets précoces chez les individus ou les groupes exposés que d'essayer de prévoir les risques potentiels des situations d'expositions complexes à partir de données se rapportant aux différents produits considérés isolément. C'est précisément la démarche adoptée pour la surveillance génétique des effets précoces, qui a recours à des techniques visant à rechercher les lésions cytogénétiques, les mutations ponctuelles ou les adduits à l'ADN dans des tissus humains représentatifs (voir l'article «Les principes généraux» du présent chapitre).

Qu'est-ce que la génotoxicité?

La génotoxicité d'un produit chimique est une caractéristique chimique intrinsèque dérivée du potentiel électrophile du produit, c'est-à-dire de son aptitude à se lier, dans les macromolécules cellulaires, à des sites nucléophiles tels que l'acide désoxyribonucléique (ADN), porteur de l'information génétique. La génotoxicité est donc une toxicité qui s'exerce sur le matériel génétique des cellules.

Figure 27.3 • Représentation schématique du processus génotoxique et de ses répercussions sur la santé humaine

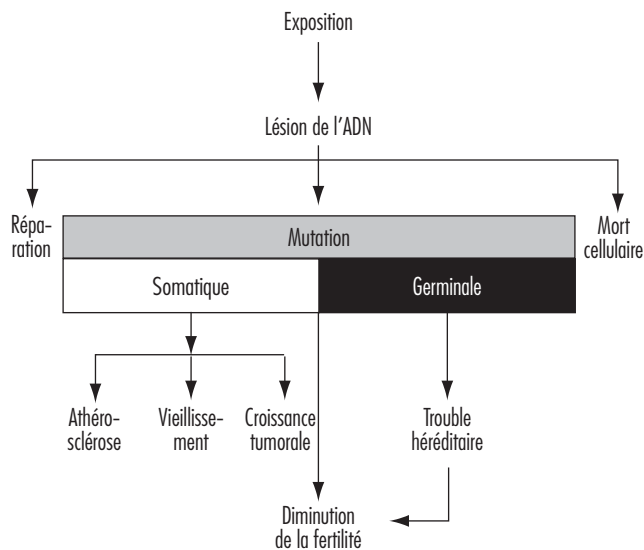


Tableau 27.3 • Exemples de techniques analytiques utilisées pour la surveillance biologique d'une exposition à des solvants organiques

Solvants	Produits chimiques recherchés	Urine/sang	Techniques analytiques
N,N-diméthylformamide	N-méthylformamide	Urine	Chromatographie en phase gazeuse avec détection thermo-ionique (CG-DTI)
2-Ethoxyéthanol et son acétate	Acide éthoxyacétique	Urine	Extraction, dérivation et chromatographie en phase gazeuse avec détection à ionisation de flamme (CG-FID)
Hexane	2,4-Hexanedione	Urine	Extraction, (hydrolyse) et CG-FID
	Hexane	Sang	CG-FID avec espace de tête
Méthanol	Méthanol	Urine	CG-FID avec espace de tête
Styrène	Acide mandélique Acide phénylglyoxylique Styrène	Urine	Filtration et CLHP-UV
		Urine	Filtration et CLHP-UV
		Sang	CG-FID avec espace de tête
Sulfure de carbone	Acide 2-thiothiazolidine-4-carboxylique	Urine	Chromatographie liquide haute performance avec détection ultraviolette (CLHP-UV)
Toluène	Acide hippurique o-Crésol	Urine	Filtration et CLHP-UV
		Urine	Hydrolyse, extraction et CG-FID
	Toluène	Sang	CG-FID avec espace de tête
	Toluène	Urine	CG-FID avec espace de tête
Trichloroéthylène	Acide trichloroacétique (TCA)	Urine	Colorimétrie ou estérification et chromatographie en phase gazeuse avec détection à capture d'électrons (CG-DCE)
		Urine	Oxydation et colorimétrie, ou hydrolyse, oxydation, estérification et CG-DCE
		Sang	CG-DCE avec espace de tête
Xylènes	Acides méthylhippuriques (trois isomères, séparés ou combinés)	Urine	CG-FID avec espace de tête

Source: d'après OMS, 1996.

La définition de la génotoxicité, telle qu'établie dans un rapport de consensus du Centre international de recherche sur le cancer (CIRC, 1992), est large et inclut à la fois des effets directs et indirects sur l'ADN: 1) induction de mutations (géniques, chromosomiques, génomiques, par recombinaison) qui, à l'échelle moléculaire, sont des événements semblables à ceux qui participent à

Figure 27.4 • Relations entre génotoxicité et cancérogénicité



la cancérogénèse; 2) événements indirectement associés à la mutagenèse (synthèse non programmée de l'ADN ou échange de chromatides sœurs); 3) lésions de l'ADN (formation d'adduits) pouvant conduire à des mutations.

La génotoxicité, la mutagenicité et la cancérogénicité

Les mutations sont des modifications héréditaires permanentes des lignées cellulaires, touchant soit les cellules somatiques, soit les cellules germinales (cellules sexuelles). Elles peuvent donc affecter l'organisme par modification des cellules somatiques ou être transmises à la descendance en raison des lésions induites au niveau des cellules sexuelles. La génotoxicité précède ainsi la mutagenicité, mais il faut rappeler que la plupart des lésions génotoxiques sont réparées et ne sont jamais exprimées sous forme de mutations. Les mutations somatiques sont induites au niveau cellulaire et, dans le cas où elles conduisent à la mort cellulaire ou à des atteintes malignes, elles peuvent se manifester par des troubles variés au niveau des tissus ou de l'organisme lui-même. Le vieillissement ou la formation de plaques d'athérosclérose sont vraisemblablement des effets liés à des mutations somatiques (voir figure 27.3 et le chapitre n° 2 «Le cancer»).

Les mutations de la lignée cellulaire germinale peuvent être transférées au zygote (l'œuf fécondé) pour s'exprimer à la génération suivante (voir également le chapitre n° 9 «Le système reproducteur»). Les troubles mutationnels les plus importants retrouvés chez le nouveau-né sont dus à une mauvaise séparation des chromosomes pendant la gamétogenèse (développement des cellules germinales), conduisant à des syndromes chromosomiques graves (par exemple, trisomie 21 ou syndrome de Down, et monosomie X ou syndrome de Turner).

La figure 27.3 représente de manière schématique le processus génotoxique, depuis l'exposition jusqu'aux effets prévisibles.

Différents arguments expérimentaux indirects permettent de confirmer la relation entre génotoxicité et cancérogénicité, comme le montre la figure 27.4.

C'est cette corrélation qui sert de fondement à l'utilisation des marqueurs biologiques de génotoxicité comme indicateurs du risque de cancer chez l'humain.

La toxicité génétique et l'identification du risque

Le rôle des altérations génétiques en cancérogénèse explique l'importance des tests de toxicité génétique aux fins de l'identification des agents cancérogènes potentiels. Différents tests à court terme permettent de détecter des signes de génotoxicité ayant un rapport probable avec le processus de cancérogénèse.

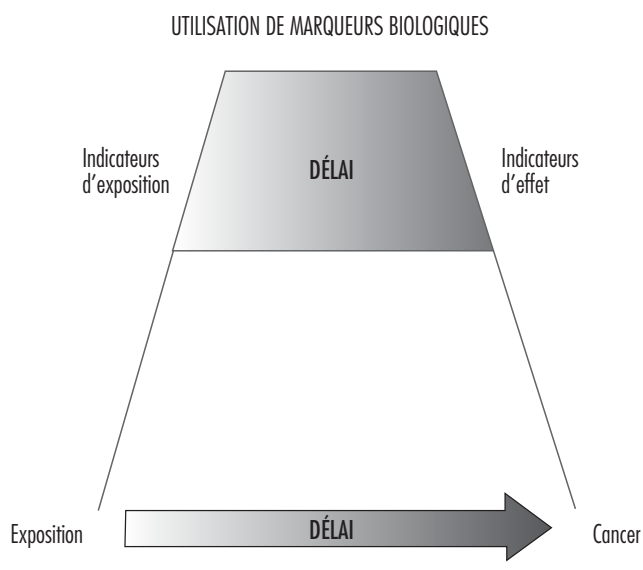
Plusieurs études à grande échelle ont été réalisées afin de comparer le pouvoir cancérogène de certains produits chimiques et les résultats obtenus lors de tests à court terme. Il est apparu qu'aucun test validé ne peut fournir à lui seul des informations suffisantes sur l'ensemble des risques génétiques mentionnés ci-dessus, et

Tableau 27.4 • Génotoxicité des produits chimiques évalués par le CIRC

Classification des agents cancérogènes	Rapport génotoxicité/ cancérogénicité	%
1: cancérogènes humains avérés	24/30	80
2A: cancérogènes humains probables	14/20	70
2B: cancérogènes humains potentiels	72/128	56
3: non classés	19/66	29

Sources: CIRC, 1987, 1989.

Figure 27.5 • Intérêt du pouvoir prédictif des marqueurs biologiques aux fins de la prévention des risques dans certaines populations



que tout produit chimique doit être soumis à plusieurs tests. La validité des tests de génotoxicité à court terme utilisés pour prévoir le potentiel cancérigène d'un produit chimique a fait l'objet de nombreuses discussions et synthèses. A partir de ces données, un groupe de travail du CIRC a conclu que la plupart des agents cancérigènes chez l'humain donnent des résultats positifs dans les tests à court terme courants, tels que le test sur *Salmonella* ou les tests d'aberrations chromosomiques (voir tableau 27.4). Il faut néanmoins souligner que les agents cancérigènes épigénétiques, qui peuvent majorer les processus génotoxiques sans pour autant être eux-mêmes génotoxiques (par exemple, composés à activité hormonale), ne sont pas détectés par les tests à court terme qui

Tableau 27.5 • Marqueurs biologiques utilisés pour la surveillance génétique en cas d'exposition à des produits génotoxiques. Echantillons cellulaires/tissulaires les plus couramment utilisés

Marqueurs de surveillance génétique	Echantillons cellulaires/tissulaires
Aberrations chromosomiques	Lymphocytes
Echanges entre chromatides sœurs	Lymphocytes
Micronoyaux	Lymphocytes
Mutations ponctuelles (gène HPRT, par exemple)	Lymphocytes et autres tissus
Adduits à l'ADN	ADN isolé de cellules/tissus
Adduits protéiniques	Hémoglobine, albumine
Cassures de brin d'ADN	ADN isolé de cellules/tissus
Activation d'oncogène	ADN ou protéines spécifiques isolées
Mutations/oncoprotéines	Différents tissus et cellules
Réparation d'ADN	Cellules isolées à partir d'échantillons sanguins

montrent uniquement l'activité génotoxique intrinsèque d'une substance.

La surveillance biologique génétique

La surveillance génétique applique les méthodes de toxicologie génétique à la surveillance biologique des effets génétiques ou à l'évaluation de l'exposition génotoxique de groupes d'individus exposés du fait de leur activité professionnelle, de leur environnement ou de leur mode de vie. La surveillance génétique peut ainsi identifier précocement les expositions génotoxiques auxquelles des groupes d'individus sont soumis, ce qui permet de mettre en évidence les populations à haut risque et de définir les priorités d'intervention. L'utilisation de marqueurs biologiques prédictifs dans une population exposée permet dans tous les cas de gagner du temps (par rapport aux techniques épidémiologiques) et d'intervenir avant que n'apparaissent des effets nocifs, comme une pathologie cancéreuse (voir figure 27.5).

Les méthodes employées actuellement pour la surveillance biologique des expositions génotoxiques et des effets biologiques précoces sont présentées dans le tableau 27.5. Les échantillons utilisés à cette fin doivent répondre à plusieurs critères, notamment être faciles à obtenir et être représentatifs du tissu cible.

Les altérations reconnaissables de la molécule d'ADN incluent la formation d'adduits à l'ADN et la réorganisation de la séquence d'ADN. Les lésions par formation d'adduits à l'ADN sont décelées par diverses techniques, comme le postmarquage au ^{32}P ou l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-adduits. La détection des cassures de brin d'ADN se fait traditionnellement à l'aide de techniques d'éluion alcaline ou de déroulement. Les mutations peuvent être mises en évidence par le séquençage de l'ADN d'un gène spécifique, comme le gène HPRT.

Plusieurs rapports méthodologiques détaillant les techniques utilisées (voir tableau 27.5) ont été publiés (CCE, 1987; CIRC, 1988, 1992, 1994).

La génotoxicité peut aussi être contrôlée indirectement par la détection des adduits protéiniques (sur l'hémoglobine, par exemple)

Figure 27.6 • Chromosomes de lymphocytes humains à la métaphase montrant une mutation chromosomique induite (flèche pointée vers un fragment acentrique)



ou par la détermination de l'activité réparatrice de l'ADN. En tant que stratégie de surveillance, les contrôles peuvent être effectués de manière ponctuelle ou continue; dans tous les cas, les résultats obtenus doivent contribuer à l'amélioration de la sécurité des conditions de travail.

La surveillance biologique cytogénétique

Des fondements théoriques et empiriques relient cancer et lésions chromosomiques. Les mutations touchant l'activité ou l'expression de gènes de facteurs de croissance sont des étapes clés de la cancérogenèse. De nombreux types de cancers ont été associés à des aberrations chromosomiques, spécifiques ou non. Dans plusieurs maladies héréditaires qui frappent l'être humain, on a pu établir une corrélation entre l'instabilité chromosomique et une sensibilité accrue au cancer.

La surveillance cytogénétique des personnes exposées à des produits chimiques ou à des rayonnements cancérogènes ou mutagènes permet de mettre en évidence les effets sur le matériel génétique. Mais alors que les aberrations chromosomiques sont étudiées depuis plusieurs dizaines d'années chez les personnes exposées à des rayonnements ionisants dans leur travail, seuls quelques agents cancérogènes ont donné lieu à des résultats clairement étayés dans la sphère des produits chimiques.

Les lésions chromosomiques observables en microscopie sont constituées par des aberrations chromosomiques structurales dans lesquelles on observe d'importantes modifications morphologiques et par des échanges de chromatides sœurs qui consistent en un échange symétrique de matériel chromosomique entre deux chromatides sœurs. Les micronoyaux proviennent de fragments acentriques de chromosomes ou de chromosomes entiers abandonnés. Ce type d'altérations est illustré à la figure 27.6.

Les lymphocytes humains circulants conviennent bien aux études de surveillance, car ils sont faciles à obtenir et permettent d'intégrer l'exposition sur une période relativement longue. L'exposition à de nombreux produits chimiques mutagènes peut accroître la fréquence des aberrations chromosomiques ou des échanges de chromatides sœurs dans les lymphocytes circulants des sujets exposés. L'intensité des lésions observées est pratiquement corrélée à l'exposition, bien que cette corrélation n'ait été démontrée que pour quelques produits chimiques.

Lorsque les tests cytogénétiques effectués sur des lymphocytes circulants révèlent une atteinte du matériel génétique, les résultats ne peuvent servir à estimer le risque qu'à l'échelle d'une population. Une augmentation de la fréquence des aberrations chromosomiques dans une population devrait être considérée comme le signe d'un risque accru de cancer, mais les tests cytogénétiques ne permettent pas de prévoir le risque de cancer sur une base individuelle.

Les lésions génétiques somatiques observées sur les lymphocytes circulants d'un prélèvement n'ont guère de signification à l'échelle individuelle puisque la plus grande partie des lymphocytes porteurs de lésions génétiques sont détruits et remplacés.

Les problèmes liés aux études de surveillance biologique chez l'humain

Il faut pouvoir compter sur un plan d'étude rigoureux pour assurer une surveillance biologique chez l'humain, car de nombreux facteurs individuels non liés à l'exposition au(x) produit(s) chimique(s) spécifiquement recherché(s) peuvent affecter les réponses biologiques étudiées. Dans la mesure où les études de surveillance biologique sont longues et difficiles, il est important de bien les planifier. La confirmation expérimentale du potentiel génotoxique d'un produit chimique est une condition préalable de toute étude cytogénétique chez l'être humain.

Deux causes majeures de variations peuvent survenir lors des études de surveillance biologique cytogénétique. La première peut

être due à des facteurs techniques liés à une discordance de lecture des lames ou aux conditions de culture, notamment au type de milieu, à la température ou à la concentration des substances chimiques ajoutées au milieu de culture (bromodésoxyuridine ou cytochalasine-B, par exemple). Le moment de l'échantillonnage peut également avoir une influence sur les résultats du test d'aberrations chromosomiques et, sans doute également, du test des échanges de chromatides sœurs, en raison de modifications au niveau des sous-populations lymphocytaires T et B. Dans le test des micronoyaux, les résultats obtenus dépendent étroitement de la méthodologie (par exemple, utilisation de cellules binucléées induites par la cytochalasine-B).

Les lésions causées à l'ADN lymphocytaire par l'exposition à des produits chimiques qui conduisent à des aberrations chromosomiques, à des échanges de chromatides sœurs ou à des micronoyaux doivent persister *in vivo* jusqu'au moment du prélèvement sanguin, puis *in vitro* jusqu'à ce que les lymphocytes en culture commencent à synthétiser de l'ADN. Il est donc important d'examiner les cellules immédiatement après leur première division (en cas d'aberrations chromosomiques ou de micronoyaux) ou après la seconde division (lors d'échanges de chromatides sœurs) afin d'estimer au mieux les lésions induites.

La lecture des résultats est un aspect capital de la surveillance biologique cytogénétique. Les lames doivent être randomisées et codées, afin d'éviter dans toute la mesure possible les biais liés à l'évaluation. Il est indispensable de se référer à des critères d'évaluation cohérents, d'assurer un contrôle de qualité et, enfin, de normaliser les analyses statistiques et la présentation des résultats. Il existe une deuxième cause importante de variation des résultats liée à des facteurs individuels: âge, sexe, prise de médicaments, infections ou encore sensibilité génétique aux produits présents dans l'environnement.

Il est essentiel de constituer un groupe témoin présentant des caractéristiques aussi proches que possible de celles du groupe étudié, tant pour le sexe et l'âge que pour les habitudes tabagiques, les infections virales et les vaccinations, la consommation d'alcool, la prise de médicaments et l'exposition aux rayons X. L'exposition professionnelle au(x) produit(s) génotoxique(s) suspecté(s) devra également être connue qualitativement (type de travail, ancienneté de l'exposition) et quantitativement (concentration du produit dans la zone respiratoire et métabolites spécifiques, si possible). Une attention particulière devrait être portée à l'analyse statistique des résultats.

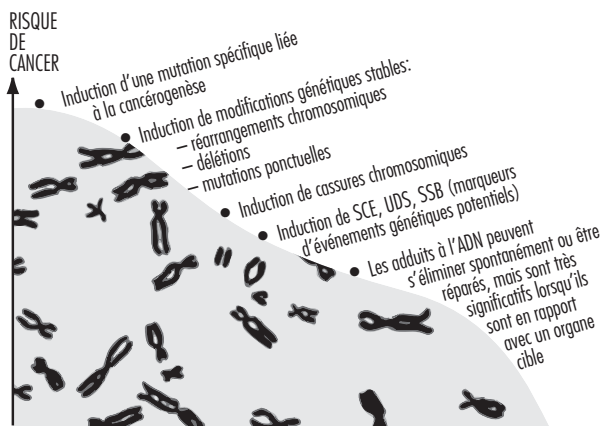
La pertinence de la surveillance biologique génétique aux fins de l'évaluation du risque de cancer

A ce jour, ce n'est que pour certains agents qu'il a été possible de démontrer de manière répétée qu'ils induisaient des modifications cytogénétiques chez l'humain, alors que la plupart des substances cancérogènes connues altèrent les chromosomes lymphocytaires.

L'importance des lésions est fonction du niveau d'exposition, comme cela a été notamment montré pour le chlorure de vinyle, le benzène, l'oxyde d'éthylène et les agents anticancéreux alkylants. Bien que les tests cytogénétiques n'aient pas encore une sensibilité et une spécificité suffisantes pour détecter les cas d'exposition à des substances toxiques dans le milieu professionnel, il reste qu'en présence de résultats positifs, des enquêtes d'hygiène du travail ont souvent été effectuées, même si la relation entre les lésions chromosomiques somatiques et les effets préjudiciables pour la santé n'était pas prouvée.

Les informations dont on dispose en matière de surveillance biologique cytogénétique proviennent pour l'essentiel des situations professionnelles à «forte exposition». Très peu de cas ont été confirmés par plusieurs études indépendantes et la plupart d'entre elles reposaient sur la détection des aberrations chromosomiques. Dans la version mise à jour des *Monographies* du CIRC (vol. 43 à

Figure 27.7 • Pertinence des marqueurs de surveillance biologique génétique pour la prévision des risques de cancer



50) figurent au total 14 cancérogènes professionnels de classe 1, 2A ou 2B pour lesquels des tests cytogénétiques se sont révélés positifs chez l'humain, avec confirmation de la plupart des résultats chez l'animal (voir tableau 27.6). Cette base de données limitée donne à penser que les produits chimiques cancérogènes ont tendance à être clastogènes, et que ce pouvoir clastogène est associé aux cancérogènes humains connus. Tous les cancérogènes n'induisent cependant pas de lésions cytogénétiques chez l'humain ou les animaux in vivo. Les cas où des données animales positives ne sont pas retrouvées chez l'humain peuvent être dus à des différences de niveau d'exposition. Il est aussi possible que les expositions professionnelles complexes et prolongées chez l'humain ne soient pas comparables aux expérimentations animales de courte durée.

Les études de génotoxicité effectuées chez les personnes exposées font appel à des tests très divers en dehors des tests chromosomiques, tels que les lésions de l'ADN, l'activité réparatrice de l'ADN ou les adduits à l'ADN et aux protéines. Certains de ces tests peuvent être plus pertinents que d'autres pour la prévision des risques cancérogènes. Les lésions génétiques stables (réarrangements chromosomiques, délétions et mutations ponctuelles, par exemple) sont très significatives, car leur relation avec la cancérogénèse est connue. La signification des adduits à l'ADN dépend de la méthode d'identification de l'agent chimique concerné et de la relation de cause à effet avec l'exposition. Certains des tests utilisés, comme ceux portant sur les échanges de chromatides sœurs (SCE), la synthèse non programmée de l'ADN (UDS), les protéines se fixant à l'ADN monobrin (SSB) ou les cassures de brin d'ADN sont des indicateurs ou des marqueurs génétiques potentiels, mais leur validité n'est pas établie, faute de connaître les mécanismes conduisant à des altérations génétiques. Il est clair que le marqueur génétique le plus pertinent chez l'humain serait l'induction d'une mutation spécifique ayant un rapport direct avec des processus cancéreux chez les rongeurs exposés au produit chimique étudié (voir figure 27.7).

Considérations éthiques et surveillance biologique génétique

Les progrès rapides des techniques de génétique moléculaire, l'évolution accélérée du séquençage du génome humain et la mise en évidence du rôle des gènes suppresseurs de tumeurs et des proto-oncogènes en cancérogénèse humaine soulèvent des questions de nature éthique quant à l'interprétation, à la communica-

Tableau 27.6 • Produits cancérogènes pour l'humain utilisés en milieu professionnel et ayant fait l'objet de tests cytogénétiques à la fois chez l'humain et chez l'animal (pouvoir cancérogène avéré, probable ou potentiel)

Produits/exposition	Tests cytogénétiques ¹					
	Humain			Animal		
	AC	SCE	MN	AC	SCE	MN
GROUPE 1: cancérogènes avérés chez l'humain						
Arsenic et composés arsenicaux	?	?		+		+
Amiante		?		-		-
Benzène	+			+	+	+
Bis(chlorométhyl)éther et chlorométhylméthyl éther (qualité technique)	(+)			-		
Chlorure de vinyle	+	?		+	+	+
Composés hexavalents du chrome	+	+		+	+	+
Composés du nickel	+	-		?		
Cyclophosphamide	+	+		+	+	+
Fumée de tabac	+	+	+		+	
Melphalan	+	+		+		
Radon	+			-		
GROUPE 2A: cancérogènes probables chez l'humain						
Acrylonitrile	-			-		-
Adriamycine	+	+		+	+	+
Cadmium et composés cadmiques	-	(-)		-		
Cisplatine		+		+	+	
Dibromure d'éthylène	-	-		-	+	-
Epichlorhydrine	+			?	+	-
Formaldéhyde	?	?		-		-
Oxyde d'éthylène	+	+	+	+	+	+
GROUPE 2B: cancérogènes potentiels chez l'humain						
Composés du plomb	?	?		?	-	?
DDT	?			+		-
Diméthylformamide	(+)			-		-
Herbicides chlorophénoxy (2,4-D et 2,4,5-T)	-	-		+	+	-
Styrène	+	?	+	?	+	+
2,3,7,8-Tétrachlorodibenzo-p-dioxine	?			-	-	-
Vapeurs de soudage	+	+		-	-	

¹ AC = aberrations chromosomiques, SCE = échanges de chromatides sœurs, MN = micronoyaux.
 (-) = relation négative dans une seule étude - = relation négative
 (+) = relation positive dans une seule étude + = relation positive
 ? = sans conclusion possible zone non renseignée = test non effectué

Source: CIRC, *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, vol. 43 à 50.

Tableau 27.7 • Etudes de surveillance biologique génétique en médecine du travail et principes éthiques liés au droit à l'information

Nature de l'information	Destinataires de l'information		
	Personne concernée	Médecin du travail	Employeur
Objet du test	●	●	
Justification du test	●		
Risques encourus	●		
Données confidentielles	●		
Mesures envisagées pour améliorer l'hygiène et réduire l'exposition		●	

tion et à l'utilisation des informations personnelles de ce type. Le développement rapide des techniques d'analyse des gènes humains permettra bientôt d'identifier de nouveaux gènes de sensibilité héréditaires chez les sujets sains asymptomatiques qui se prêteront aux dépistages génétiques (US Office of Technology Assessment, 1990).

De nombreuses questions d'ordre social et éthique se poseront si l'utilisation du dépistage génétique devient une réalité. Dès à présent, une cinquantaine de particularismes génétiques touchant le métabolisme, les polymorphismes enzymatiques, les systèmes de réparation de l'ADN sont soupçonnés d'être à l'origine d'une sensibilité accrue à diverses pathologies, et il existe des tests diagnostiques portant sur l'ADN pour environ 300 maladies génétiques. Plusieurs questions viennent spontanément à l'esprit. Le dépistage génétique est-il de mise en milieu de travail? Qui prendra la décision de faire subir un tel dépistage? Comment seront utilisées ces informations pour les décisions d'embauche ou de carrière? Qui y aura accès et comment les résultats seront-ils communiqués aux personnes concernées? Beaucoup de ces questions sont fortement liées aux normes sociales et aux valeurs éthiques qui ont cours. Le principal objectif doit être la prévention de la maladie et de la souffrance humaine, mais la volonté propre des individus et les principes éthiques ne sauraient pour autant être ignorés. C'est à ces questions d'ordre éthique qu'il faut apporter une réponse avant de mettre en place toute étude de surveillance biologique sur le lieu de travail (voir tableau 27.7 et le chapitre n° 19 «Les questions d'éthique»).

La phase de préparation de toute étude de surveillance biologique génétique nécessite du temps et des efforts. Toutes les parties concernées (personnel, employeur, service médical) doivent être clairement informées préalablement à l'étude et être mise au courant des résultats obtenus. Utilisée avec précaution et sous réserve de la fiabilité des résultats, la surveillance biologique génétique peut contribuer à améliorer la sécurité du travail et la santé des travailleurs.

● LES PESTICIDES

Marco Maroni et Adalberto Ferioli

Introduction

L'exposition humaine aux pesticides présente des caractéristiques différentes selon qu'elle survient lors de leur production industrielle ou de leur mise en œuvre (voir tableau 27.8). La formulation de

produits commerciaux (par mélange des principes actifs à d'autres constituants) entraîne cependant des conditions d'exposition comparables en partie à celles que l'on rencontre dans l'agriculture. La fabrication se fait dans de petites entreprises qui fabriquent de nombreux produits par opérations successives au cours desquelles les travailleurs sont exposés pendant un temps limité à toutes sortes de pesticides. Dans les programmes de santé publique comme dans l'agriculture, la règle générale est l'utilisation simultanée de différents produits, sauf pour certaines applications spécifiques où l'on se limite à un seul (par exemple, pour la défoliation du coton ou la prévention du paludisme).

Le mesurage des indicateurs biologiques d'exposition aux pesticides est particulièrement intéressant dans le cas des utilisateurs de pesticides pour lesquels les techniques classiques des contrôles d'ambiance sont difficilement applicables. La plupart des pesticides sont des substances liposolubles qui pénètrent dans la peau, d'où l'importance de l'utilisation d'indicateurs biologiques si l'on veut évaluer le niveau d'exposition.

Les insecticides organophosphorés

Les indicateurs biologiques d'effet. Les cholinestérases constituent les enzymes cibles responsables de la toxicité des organophosphorés chez les insectes et les mammifères. Il existe deux types principaux de cholinestérases dans l'organisme humain: l'acétylcholinestérase (AChE) et la cholinestérase plasmatique (PChE). Les organophosphorés produisent des effets toxiques chez l'humain par inhibition de l'acétylcholinestérase synaptique au niveau du système nerveux. L'acétylcholinestérase est également présente dans les hématies, où son rôle n'est pas connu. La cholinestérase plasmatique est un terme générique recouvrant un groupe hétérogène d'enzymes présentes dans les cellules gliales, le plasma, le foie et d'autres organes. La PChE est inhibée par les organophosphorés, mais son inhibition ne produit pas de perturbations fonctionnelles connues.

L'inhibition de l'activité de l'AChE et de la PChE dans le sang est fortement corrélée à l'intensité et à la durée d'exposition aux organophosphorés. L'AChE sanguine, qui est aussi la cible moléculaire responsable de la toxicité aiguë de ces insecticides sur le système nerveux, constitue un indicateur beaucoup plus spécifique que la PChE. La sensibilité de l'AChE et de la PChE sanguines à l'effet inhibiteur des organophosphorés varie cependant selon les produits, certains d'entre eux inhibant préférentiellement l'AChE, d'autres surtout la PChE.

Tableau 27.8 • Comparaison du profil d'exposition caractérisant la production et l'utilisation des pesticides

	Exposition liée à la production	Exposition liée à l'utilisation
Durée d'exposition	Continue et prolongée	Variable et intermittente
Niveau d'exposition	Relativement constante	Extrêmement variable
Type d'exposition	Un à plusieurs produits	Nombreux produits à la suite les uns des autres ou simultanément
Absorption cutanée	Facile à contrôler	Variable selon les méthodes de travail
Contrôles d'ambiance	Utile	Rarement informative
Surveillance biologique	Complémentaire des contrôles d'ambiance	Très utile lorsque disponible

Source: d'après OMS, 1982b.

Tableau 27.9 • Sévérité et pronostic de la toxicité aiguë des organophosphorés en fonction du niveau d'inhibition de l'acétylcholinestérase

Inhibition (%) de l'AChE	Sévérité de l'intoxication	Symptômes cliniques	Pronostic
50-60	Légère	Faiblesse, céphalées, vertiges, nausées, hypersalivation, larmolement, myosis, spasme bronchique modéré	Convalescence en 1-3 jours
60-90	Modérée	Faiblesse soudaine, troubles visuels, hypersalivation, hypersudation, vomissements, diarrhée, bradycardie, hypertonie, tremblements (mains et tête), troubles de la démarche, myosis, douleur thoracique, cyanose des muqueuses	Convalescence en 1-2 semaines
90-100	Sévère	Tremblements soudains, convulsions généralisées, troubles psychiques, cyanose intense, œdème pulmonaire, coma	Décès par arrêt respiratoire ou cardiaque

Il existe une assez bonne corrélation entre l'activité de l'AChE dans le sang et les signes cliniques de toxicité aiguë (voir tableau 27.9). La corrélation tend à être meilleure lorsque l'inhibition s'accélère; par contre, quand l'inhibition est lente, comme au cours des expositions chroniques à faible concentration, la corrélation avec la maladie devient faible, voire totalement inexistante. L'inhibition de l'AChE dans le sang n'est donc pas un prédicteur des effets chroniques ou différés.

Les valeurs normales de l'activité de l'AChE et de la PChE présentent des variations chez les sujets sains, de même que dans certaines conditions physiopathologiques spécifiques (voir tableau 27.10). La sensibilité de ces paramètres biologiques aux fins du suivi d'une exposition aux organophosphorés est donc meilleure si l'on prend comme référence les valeurs basales de chaque individu avant exposition pour les comparer aux activités cholinestérasiques constatées après exposition. Les valeurs de référence de la population ne devraient être retenues que si les taux individuels avant exposition sont inconnus (voir tableau 27.11).

Le sang devrait être prélevé de préférence dans les 2 heures suivant l'exposition. La ponction veineuse est préférable au prélèvement de sang capillaire recueilli au bout du doigt ou au lobe de l'oreille car, chez les sujets exposés, la peau risque d'être souillée par le pesticide à l'endroit du prélèvement. Il est recommandé de déterminer la valeur normale de base de chaque individu sur trois échantillons successifs prélevés avant exposition (OMS, 1982c).

Il existe diverses méthodes analytiques pour mesurer l'AChE et la PChE sanguines. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) recommande comme méthode de référence celle d'Ellman par spectrophotométrie (Ellman et coll., 1961).

Les indicateurs biologiques d'exposition. La surveillance d'une exposition aux organophosphorés est assurée grâce au dosage urinaire des métabolites dérivés de la partie alkylphosphate de la molécule d'organophosphorés ou des résidus d'hydrolyse de la liaison P-X (voir figure 27.8).

Les métabolites alkylphosphates. Le tableau 27.12 dresse la liste des métabolites urinaires alkylphosphates et des produits dont ils sont issus. Les alkylphosphates urinaires sont des marqueurs sensibles d'exposition aux organophosphorés, leur présence dans l'urine étant en effet décelable pour des niveaux d'exposition auxquels aucune inhibition de la cholinestérase plasmatique ou érythrocytaire n'est observée. L'excrétion urinaire des alkylphosphates a été mesurée dans différentes conditions d'exposition et avec divers organophosphorés (voir tableau 27.13). Quelques études ont établi une relation entre les doses externes de ce type d'insecticide et les concentrations urinaires d'alkylphosphates. Certaines ont démontré une relation significative entre l'activité cholinestérasique et les concentrations urinaires d'alkylphosphates.

En principe, les alkylphosphates sont excrétés rapidement dans l'urine. Les échantillons urinaires devraient donc être recueillis en fin de poste pour doser ces métabolites.

Le dosage des alkylphosphates urinaires nécessite une méthode analytique assez élaborée, basée sur la dérivation des composés et la détection par chromatographie en phase gazeuse (Shafik et coll., 1973a; Reid et Watts, 1981).

Tableau 27.10 • Activité de l'acétylcholinestérase (AChE) et de la cholinestérase plasmatique (PChE): variations chez le sujet sain et dans certaines conditions physiopathologiques

	Activité de l'AChE	Activité de la PChE
Sujets sains		
Variation interindividuelle ¹	10-18%	15-25%
Variation intra-individuelle ¹	3-7%	6%
Différence selon le sexe	Non	Supérieure de 10 - 15% chez les hommes
Age	Faible jusqu'à l'âge de 6 mois	
Masse corporelle		Corrélation positive
Cholestérol sérique		Corrélation positive
Variation saisonnière	Non	Non
Variation circadienne	Non	Non
Menstruation		Diminuée
Grossesse		Diminuée
Etats pathologiques		
Activité diminuée	Leucémie, néoplasie	Atteinte hépatique, urémie, cancer, insuffisance cardiaque, réactions allergiques
Activité augmentée	Polyglobulie, thalassémie, autres dyscrasies sanguines congénitales	Hyperthyroïdie, autres situations de métabolisme accéléré

¹ Source: Augustinsson, 1955; Gage, 1967.

Tableau 27.11 • Activités cholinestérasiques chez des sujets sains non exposés à des organophosphorés, mesurées par des méthodes de référence

Méthode	Sexe	AChE*	PChE*
Michel ¹ (ΔpH/h)	Hommes	0,77±0,08	0,95±0,19
	Femmes	0,75±0,08	0,82±0,19
Titrimétrie ¹ (μmol/mn ml)	Hommes/femmes	13,2±0,31	4,90±0,02
Ellman modifiée ² (UI/ml)	Hommes	4,01±0,65	3,03±0,66
	Femmes	3,45±0,61	3,03±0,68

* Moyenne ± écart-type.
Sources: ¹ Laws, 1991. ² Alcini et coll., 1988.

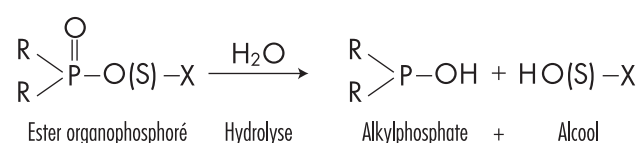
Les résidus d'hydrolyse. Le *p*-nitrophénol (PNP) est le métabolite phénolique du parathion, du méthylparathion et de l'éthylparathion. Le dosage du PNP urinaire (Cranmer, 1970) est un indicateur fiable qu'on emploie beaucoup pour surveiller les expositions au parathion. Il existe une bonne corrélation entre le PNP urinaire et la quantité de parathion absorbée. Une excrétion urinaire de PNP allant jusqu'à 2 mg/l, après absorption de parathion, ne s'accompagne d'aucun symptôme d'intoxication et d'aucune variation notable des activités cholinestérasiques. Le *p*-nitrophénol est rapidement excrété et les taux urinaires deviennent insignifiants dans les 48 heures qui suivent l'exposition. Les échantillons urinaires devraient donc être recueillis rapidement après l'exposition.

Les carbamates

Les indicateurs biologiques d'effet. Les pesticides carbamiques comprennent des insecticides, des fongicides et des herbicides. La toxicité des carbamates insecticides est due à l'inhibition de l'AChE synaptique, tandis que d'autres mécanismes de toxicité interviennent pour les carbamates herbicides ou fongicides. Seule l'exposition aux insecticides carbamiques est donc justiciable de la recherche de l'activité cholinestérasique érythrocytaire (AChE) ou plasmatique (PChE). L'AChE est habituellement plus sensible à l'effet inhibiteur des carbamates que la PChE. Les personnes exposées professionnellement aux carbamates présentent généralement des symptômes cholinergiques lorsque l'activité de l'AChE dans le sang est inférieure à 70% de la valeur basale individuelle (OMS, 1982b).

L'inhibition des cholinestérasés par les carbamates est rapidement réversible. C'est pourquoi des résultats faussement négatifs peuvent être observés si un délai trop long s'écoule entre l'exposition et le recueil de l'échantillon biologique, ou entre celui-ci et l'analyse. Pour éviter ces problèmes, il est recommandé de prélever les échantillons de sang et de les analyser dans les 4 heures qui

Figure 27.8 • Hydrolyse des insecticides organophosphorés



X = groupement alkylé

Tableau 27.12 • Pesticides organophosphorés: métabolites alkylphosphates retrouvés dans l'urine

Métabolites	Abréviations	Principaux produits de départ
Monométhylphosphate	MMP	Malathion, parathion
Diméthylphosphate	DMP	Dichlorvos, trichlorofon, mevinphos, malaaxon, diméthoate, fenclorphos
Diéthylphosphate	DEP	Paraoxon, déméton-oxon, diazinon-oxon, dichlorfenthiol
Diméthylthiophosphate	DMTP	Fenitrothion, fenclorphos, malathion, diméthoate
Diéthylthiophosphate	DETP	Diazinon, déméthon, parathion, fenclorphos
Diméthylidithiophosphate	DMDTP	Malathion, diméthoate, azinphos-méthyle
Diéthylidithiophosphate	DEDTP	Disulfoton, phorate
Acide phénylphosphorique		Leptophos, EPN

suivent l'exposition. La préférence devrait être donnée aux méthodes analytiques qui permettent de mesurer l'activité cholinestérasique immédiatement après la prise de sang, comme nous l'avons déjà mentionné pour les organophosphorés.

Les indicateurs biologiques d'exposition. Le dosage des métabolites urinaires comme méthode de surveillance d'une exposition humaine aux carbamates n'a été utilisé que pour quelques produits et dans un nombre limité d'études. Le tableau 27.14 en résume les principales données. Les carbamates étant rapidement excrétés dans l'urine, le dosage des métabolites devrait être effectué sur des échantillons recueillis peu après l'exposition. Les méthodes analytiques pour le dosage de ces métabolites urinaires ont été décrites par Dawson et coll. (1964), DeBernardinis et Wargin (1982) ainsi que Verberk et coll. (1990).

Tableau 27.13 • Exemples de concentrations urinaires d'alkylphosphates dans différentes conditions d'exposition à des organophosphorés

Produits	Conditions d'exposition	Voies d'exposition	Concentrations des métabolites ¹ (mg/l)
Parathion ²	Intoxication non mortelle	Orale	DEP = 0,5 DETP = 3,9
Disulfoton ²	Fabrication	Cutanée/ inhalation	DEP = 0,01-4,40 DETP = 0,01-1,57 DEDTP = <0,01-0,05
Phorate ²	Fabrication	Cutanée/ inhalation	DEP = 0,02-5,14 DETP = 0,08-4,08 DEDTP = <0,01-0,43
Malathion ³	Epannage	Cutanée	DMDTP = <0,01
Fenitrothion ³	Epannage	Cutanée	DMP = 0,01-0,42 DMTP = 0,02-0,49
Monocrotophos ⁴	Epannage	Cutanée/ inhalation	DMP = <0,04-6,3/24 h

¹ Pour les abréviations, voir tableau 27.12. ² Dillon et Ho, 1987. ³ Richter, 1993. ⁴ van Sittert et Dumas, 1990.

Tableau 27.14 • Concentrations urinaires de métabolites carbamiques enregistrées dans des études de terrain

Produits	Indices biologiques	Conditions d'exposition	Concentrations dans l'air	Résultats	Références
Carbaryl	α -naphthol	Fabrication	0,23-0,31 mg/m ³	x=18,5 mg/l ¹ , taux d'excrétion maximal = 80 mg/i	OMS, 1982a
	α -naphthol α -naphthol	Mélange/épandage Population non exposée		x=8,9 mg/l, limites = 0,2-65 mg/l limites = 1,5-4 mg/l	
Pirimicarbe	métabolites I ² et V ³	Epandage		limites = 1-100 μ g/l	Verberk et coll., 1990

¹ Des intoxications systémiques ont été occasionnellement signalées. ² 2-diméthylamino-4-hydroxy-5,6-diméthylpyrimidine. ³ 3-méthylamino-4-hydroxy-5,6-diméthylpyrimidine. x = écart-type.

Les dithiocarbamates

Les indicateurs biologiques d'exposition. Les dithiocarbamates, qui sont beaucoup employés comme fongicides, appartiennent à trois classes chimiques: thiourames, diméthylthiocarbamates et éthylène-bis-dithiocarbamates.

Le sulfure de carbone (CS₂) et son métabolite principal, l'acide 2-thiothiazolidine-4-carboxylique (TTCA), sont des métabolites communs à la plupart des dithiocarbamates. Une augmentation significative de leur concentration urinaire a été observée dans diverses conditions d'exposition et pour différents pesticides en contenant. L'éthylène-thiourée (ETU) est un métabolite urinaire important des éthylène-bis-dithiocarbamates. Ce composé peut également être présent sous forme d'impuretés dans les produits commerciaux. Compte tenu de son potentiel tératogène et cancérigène chez le rat et chez d'autres espèces, et de sa toxicité thyroïdienne, l'ETU est très utilisée pour la surveillance des expositions aux éthylène-bis-dithiocarbamates. L'éthylène-thiourée n'est pas spécifique d'un produit particulier puisqu'elle peut se former à partir du manèbe, du mancozèbe ou du zinèbe.

Le dosage des métaux présents dans les dithiocarbamates a été proposé comme autre méthode de surveillance des cas d'exposition à ces produits. Une augmentation de l'excrétion urinaire du manganèse a été observée chez les personnes exposées professionnellement au mancozèbe (voir tableau 27.15).

Il est courant de trouver du sulfure de carbone, du TTCA et du manganèse dans l'urine des sujets non exposés. Il est donc recommandé de mesurer les concentrations urinaires de ces composés avant toute exposition et de recueillir les échantillons d'urine le matin suivant l'arrêt de l'exposition. Les méthodes analytiques applicables au dosage du CS₂, du TTCA et de l'éthylène-thiourée ont été décrites par Maroni et coll. (1992).

Les pyréthriinoïdes de synthèse

Les indicateurs biologiques d'exposition. Les pyréthriinoïdes de synthèse sont des insecticides analogues aux pyréthrines naturelles. Des études réalisées sur des volontaires humains ont permis d'identifier les métabolites urinaires aux fins de la surveillance biologique. L'acide 3-(2,2'-dichloro-vinyl)-diméthyl-cyclopropane carboxylique (Cl₂CA), métabolite acide, est excrété chez les sujets traités *per os* par la perméthrine et la cyperméthrine, l'analogue bromé (Br₂CA) étant retrouvé chez les sujets traités par la delta-méthrine. Chez les volontaires traités par la cyperméthrine, un métabolite phénoxy, l'acide 4-hydroxy-phénoxy benzoïque (4-HPBA), a également été identifié. Ces métabolites ne sont cependant pas très employés pour la surveillance des expositions professionnelles en raison de la complexité des techniques analytiques nécessaires (Eadsforth, Bragt et van Sittert, 1988; Kolmodin-Hedman, Swensson et Akerblom, 1982). Chez les utilisateurs de cyperméthrine, les taux urinaires de Cl₂CA se situent entre 0,05 et 0,18 mg/l, alors que chez les ouvriers fabriquant l' α -cyperméthrine les taux urinaires de 4-HPBA sont inférieurs à 0,02 mg/l.

Il est recommandé de doser les métabolites dans les urines de 24 heures recueillies dès la fin de l'exposition.

Les organochlorés

Les indicateurs biologiques d'exposition. Les insecticides organochlorés très employés dans les années cinquante et soixante, ont cessé pour la plupart de l'être dans de nombreux pays en raison de leur persistance dans l'environnement.

La surveillance biologique de l'exposition aux organochlorés peut être assurée par le dosage des substances elles-mêmes ou de leurs métabolites dans le sang ou le sérum (Dale, Curley et Cueto,

Tableau 27.15 • Concentrations urinaires de métabolites dithiocarbamiques enregistrées dans des études de terrain

Produits	Indices biologiques	Conditions d'exposition	Concentrations dans l'air ambiant* ± écarts-types	Résultats ± écarts-types	Références
Zirame	Sulfure de carbone (CS ₂)	Fabrication	1,03 ± 0,62 mg/m ³	3,80 ± 3,70 μ g/l	Maroni et coll., 1992
Manèbe/mancozèbe	TTCA ¹	Fabrication		0,45 ± 0,37 μ g/l	Kurtio et coll., 1990
	ETU ²	Epandage		limites = 0,2-11,8 μ g/l	
Mancozèbe	Manganèse	Epandage	57,2 μ g/m ³	avant exposition: 0,32 ± 0,23 μ g/g créatinine; après exposition: 0,53 ± 0,34 μ g/g créatinine	Canossa et coll., 1993

* Valeur moyenne selon Maroni et coll., 1992.

¹ TTCA = acide 2-thiothiazolidine-4-carboxylique. ² ETU = éthylène-thiourée.

1966; Barquet, Morgade et Pfaffenberger, 1981). Après absorption, l'aldrine est rapidement métabolisée en dieldrine qui peut être dosée dans le sang. L'endrine a une demi-vie très courte dans le sang et son dosage ne peut donc s'effectuer qu'en cas d'exposition récente. Le dosage d'un métabolite urinaire, l'anti-12-hydroxy-endrine, peut également permettre de surveiller les expositions à l'endrine.

Une corrélation significative entre la concentration des indicateurs biologiques et la survenue d'effets toxiques a été mise en évidence pour certains composés organochlorés. Des signes d'intoxication après exposition à l'aldrine et à la dieldrine apparaissent à des concentrations sanguines de dieldrine supérieures à 200 µg/l. Une concentration sanguine de lindane de 20 µg/l est considérée comme le seuil critique d'apparition de signes et de symptômes neurologiques. Aucun effet nocif aigu n'a été observé chez les travailleurs exposés à des concentrations sanguines d'endrine inférieures à 50 µg/l. Aucun effet indésirable précoce (induction d'enzymes microsomaux hépatiques) n'a été signalé pour des expositions répétées à l'endrine entraînant des concentrations urinaires d'anti-12-hydroxy-endrine inférieures à 130 µg/g de créatinine et pour des expositions répétées au DDT correspondant à des concentrations sériques de DDT ou de DDE inférieures à 250 µg/l.

Les organochlorés peuvent être trouvés en faibles concentrations sanguines ou urinaires dans la population générale. Les concentrations mesurées dans le sang peuvent ainsi atteindre 1 µg/l pour le lindane, 10 µg/l pour la dieldrine et 100 µg/l pour le DDT ou le DDE, et les taux urinaires peuvent aller jusqu'à 1 µg/g de créatinine pour l'anti-12-hydroxy-endrine. Il est donc

recommandé de mesurer les taux de base initiaux, avant toute exposition.

Chez les sujets exposés, les échantillons sanguins devraient être prélevés dès la fin d'une exposition unique. En cas d'exposition de longue durée, le moment du prélèvement sanguin n'est pas critique. Des échantillons ponctuels d'urine devraient être recueillis en fin d'exposition en vue de doser les métabolites urinaires.

Les triazines

Les indicateurs biologiques d'exposition. Peu de travaux ont porté sur l'excrétion urinaire de l'atrazine et de ses métabolites triaziniques chez les sujets exposés. La figure 27.9 montre les profils d'excrétion urinaire des métabolites de l'atrazine après exposition cutanée à des concentrations d'atrazine de l'ordre de 174 à 275 µmol/poste de travail (Catenacci et coll., 1993). Etant donné que les autres chlorotriazines (simazine, propazine, terbuthylazine) présentent un métabolisme identique à celui de l'atrazine, il est possible de doser les métabolites triaziniques désalkylés pour surveiller l'exposition à tous les herbicides chlorotriaziniques.

La détermination qualitative des substances inchangées dans l'urine peut être utilisée pour identifier les composés responsables de l'exposition. Il est recommandé de rechercher les métabolites dans les urines de 24 heures recueillies à partir du début de l'exposition.

Un test, appelé test ELISA, a permis d'identifier un conjugué mercapturique de l'atrazine comme métabolite urinaire majeur chez les travailleurs exposés. Ce conjugué est retrouvé à des concentrations au moins dix fois supérieures à celles des métabolites désalkylés. La quantité totale de conjugué mercapturique excrétée sur une période de dix jours est corrélée à l'exposition cutanée et respiratoire cumulée (Lucas et coll. 1993).

Les dérivés coumariniques

Les indicateurs biologiques d'effet. Les rodenticides coumariniques inhibent l'activité des enzymes du cycle de la vitamine K dans le foie des mammifères, y compris chez l'humain (voir figure 27.10), provoquant ainsi une réduction dose-dépendante de la synthèse des facteurs de coagulation dépendant de la vitamine K, particulièrement des facteurs II (prothrombine), VII, IX et X. Les effets anticoagulants apparaissent lorsque les taux plasmatiques des facteurs de coagulation ont diminué d'environ 20% par rapport aux valeurs normales.

Ces antagonistes de la vitamine K ont été subdivisés en composés de «première génération» (comme la warfarine) et de «seconde génération» (brodifacoum, difenacoum, par exemple), ces derniers étant caractérisés par une très longue demi-vie biologique (100 à 200 jours).

On fait souvent appel au test du temps de Quick (taux de prothrombine) pour surveiller l'exposition aux dérivés coumariniques. Il faut préciser que ce test n'est sensible qu'à partir d'une diminution d'environ 20% des facteurs de coagulation plasmatiques par rapport à la normale. On ne peut donc pas l'employer pour déceler les effets précoces d'une exposition, pour lesquels il est recommandé de mesurer la concentration plasmatique de prothrombine.

A l'avenir, ces tests pourraient être remplacés par la détermination des facteurs précurseurs de la coagulation (PIVKA, ou protéine induite par les antivitamines K), substances retrouvées dans le sang uniquement en cas de blocage du cycle de la vitamine K par les coumarines.

Dans des conditions d'exposition prolongée, le moment des prélèvements sanguins n'est pas critique. En cas de surexposition aiguë, la surveillance biologique devrait être exercée pendant les cinq jours au moins suivant l'exposition, pour tenir compte du

Figure 27.9 • Profils d'excrétion urinaire des métabolites de l'atrazine

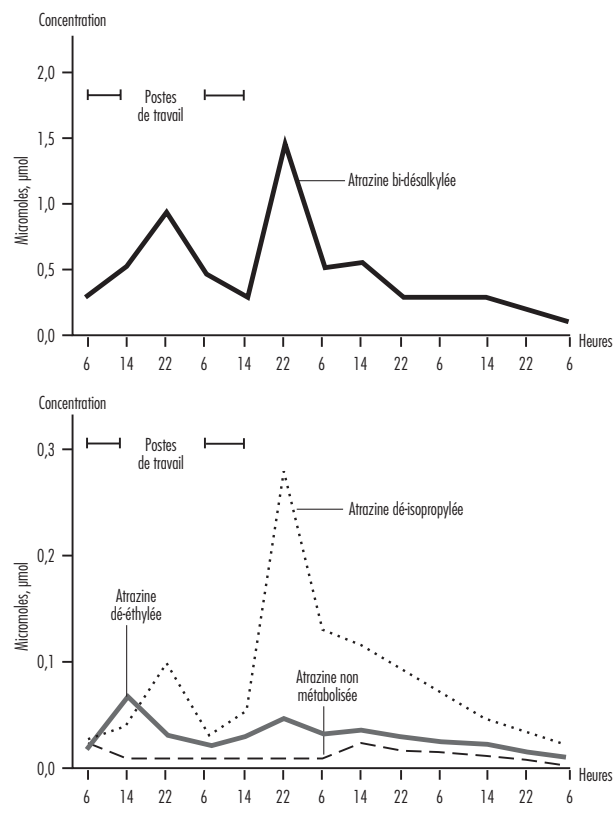
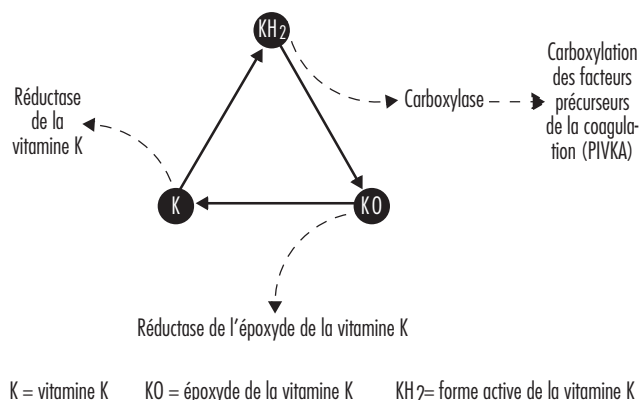


Figure 27.10 • Cycle de la vitamine K



délati de latence de l'effet anticoagulant. Il est recommandé de mesurer les valeurs initiales de base avant toute exposition, afin d'augmenter la sensibilité de ces tests.

Les indicateurs biologiques d'exposition. Le dosage sanguin des dérivés coumariniques natifs a été proposé pour surveiller l'exposition chez l'humain. L'application en reste cependant très limitée, car les techniques analytiques sont beaucoup plus complexes (et moins bien normalisées) que celles qui permettent de rechercher les effets sur la coagulation (Chalermchaikit, Felice et Murphy, 1993).

Les herbicides phénoxy

Les indicateurs biologiques d'exposition. Les herbicides phénoxy sont peu métabolisés chez les mammifères. Chez l'humain, plus de 95% de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) sont excrétés sous forme inchangée dans l'urine en cinq jours, et les acides 2,4,5-trichlorophénoxyacétique (2,4,5-T) et 4-chloro-2-méthylphénoxyacétique (MCPA) sont également excrétés dans l'urine (essentiellement sous forme inchangée) dans les quelques jours suivant leur absorption par voie orale. Le dosage urinaire des molécules natives est utilisé pour la surveillance des expositions professionnelles à ces herbicides. Dans des études de terrain réalisées chez des travailleurs exposés, on a mis en évidence des taux urinaires compris entre 0,10 et 8 µg/l pour le 2,4-D, entre 0,05 et 4,5 µg/l pour le 2,4,5-T et entre moins de 0,1 µg/l et 15 µg/l pour le MCPA. Pour doser les composés inchangés, il est recommandé de recueillir les urines des 24 heures qui suivent la fin de l'exposition. Draper (1982) a décrit des méthodes analytiques convenant au dosage urinaire des herbicides phénoxy.

Les composés ammoniums quaternaires

Les indicateurs biologiques d'exposition. Le diquat et le paraquat sont des herbicides faiblement biotransformés dans l'organisme humain. En raison de leur forte hydrosolubilité, ils sont facilement excrétés sous forme inchangée dans l'urine. Il n'est pas rare de trouver des concentrations urinaires inférieures à la limite de détection analytique (0,01 µg/l) chez les travailleurs exposés au paraquat; dans les régions tropicales, des concentrations allant jusqu'à 0,73 µg/l ont été mises en évidence après des erreurs de manipulation. Des concentrations urinaires de diquat inférieures à la limite de détection analytique (0,047 µg/l) ont été signalées chez des sujets exposés par voie cutanée à des concentrations de 0,17 à 1,82 µg/h, ou par inhalation à des concentrations inférieu-

res à 0,01 µg/h. Pour les dosages, il est recommandé d'utiliser un échantillon des urines de 24 heures recueillies en fin d'exposition. A défaut, on pourra se servir d'un échantillon prélevé ponctuellement en fin de poste.

Le dosage sérique du paraquat est utile au pronostic en cas d'intoxication aiguë, la survie étant probable lorsque les taux sériques ne dépassent pas 0,1 µg/l, 24 heures après l'ingestion.

Summers (1980) a dressé la synthèse des méthodes analytiques convenant au dosage du paraquat et du diquat.

Autres pesticides

Le 4,6-dinitro-o-crésol (DNOC). Le DNOC est un herbicide qui a fait son apparition en 1925, mais dont l'utilisation a progressivement diminué en raison de sa forte toxicité pour les plantes et pour l'humain. Etant donné que les concentrations sanguines de DNOC présentent une certaine corrélation avec la sévérité des effets nocifs, le dosage sanguin du DNOC inchangé a été proposé pour surveiller les expositions professionnelles et évaluer l'état clinique des sujets intoxiqués.

Le pentachlorophénol. Le pentachlorophénol (PCP) est un biocide à large spectre actif sur les plantes adventices, les insectes et les champignons. Les dosages sanguins et urinaires du PCP inchangé sont recommandés comme indicateurs de surveillance des expositions professionnelles (Colosio et coll., 1993), car ils renseignent bien sur la charge corporelle en PCP. Chez les travailleurs exposés de façon prolongée au PCP, le moment des prélèvements sanguins n'est pas critique, alors que les échantillons ponctuels d'urine devraient être recueillis le matin suivant la fin de l'exposition.

Une méthode universelle applicable au dosage des métabolites des pesticides halogénés et nitrophénoliques a été décrite par Shafik et coll. (1973b).

Tableau 27.16 • Autres indices proposés dans la littérature pour la surveillance biologique de l'exposition aux pesticides

Produits	Indices biologiques	
	Urine	Sang
Bromophos	Bromophos	Bromophos
Captane	Tétrahydrophthalimide	
Carbofurane	3-Hydroxycarbofurane	
Chlorodiméforme	Dérivés de la 4-Chloro- <i>o</i> -toluidine	
Chlorobenzilate	<i>p,p</i> -1-Dichlorobenzophénone	
Dichloropropène	Métabolites de l'acide mercapturique	
Fenitrothion	<i>p</i> -Nitrocrésol	
Ferbame		Thiurame
Fluazifop-Butyl	Fluazifop	
Flufenoxuron		Flufenoxuron
Glyphosate	Glyphosate	
Malathion	Malathion	Malathion
Produits organostanneux	Etain	Etain
Trifénomorph	Morpholine, triphénylcarbinol	
Zirame		Thiurame

Tableau 27.17 • Limites biologiques recommandées (1996)

Produits	Indices biologiques	BEI ¹	BAT ²	HBBL ³	BLV ⁴
Inhibiteurs de l'AcHE	AcHE dans le sang	70%	70%	70%,	
DNOC	DNOC dans le sang			20 mg/l,	
Lindane	Lindane dans le sang		0,02mg/l	0,02mg/l	
Parathion	PNP urinaire	0,5mg/l	0,5 mg/l		
Pentachlorophénol (PCP)	PCP urinaire PCP plasmatique	2 mg/l 5 mg/l	0,3 mg/l 1 mg/l		
Dieldrine/Aldrine	Dieldrine dans le sang				100 µg/l
Endrine	Anti-12-hydroxy-endrine urinaire				130 µg/l
DDT	DDT et DDE sériques				250 µg/l
Coumarines	Temps de Quick				10% au-dessus de la valeur basale
	Concentration plasmatique de prothrombine				60% de la valeur basale
MCPA	MCPA urinaire				0,5 µg/l
2,4-D	2,4-D urinaire				0,5 µg/l

¹ BEI = indices biologiques d'exposition recommandés par l'ACGIH (1995). ² BAT = limites de tolérance biologique recommandées par la DFG (Commission allemande de recherche sur les risques liés aux composés chimiques utilisés sur les lieux de travail) (1992). ³ HBBL = limites biologiques recommandées par un Groupe de travail de l'OMS (1982b). ⁴ BLV = limites biologiques proposées par un Groupe de travail du Comité scientifique sur les pesticides de la Commission internationale de la santé au travail (Tordoir et coll., 1994). En cas de dépassement, une évaluation des conditions de travail est exigée.

D'autres tests proposés pour la surveillance biologique de l'exposition aux pesticides sont présentés dans le tableau 27.16.

Conclusion

Les indicateurs biologiques permettant de surveiller l'exposition aux pesticides ont été utilisés dans de nombreux travaux expérimentaux et dans des études de terrain.

Certains tests pour lesquels des limites biologiques d'exposition ont été proposées (voir tableau 27.17) sont validés par une longue expérience. Il en est ainsi du dosage des cholinestérases dans le

sang ou du dosage sanguin ou urinaire de certains pesticides sous forme inchangée. D'autres tests, notamment ceux qui portent sur les métabolites sanguins ou urinaires, restent d'un emploi beaucoup plus limité en raison des problèmes analytiques ou des difficultés d'interprétation des résultats qu'ils posent.

La surveillance biologique est un domaine en pleine évolution. Vu l'importance que les indicateurs biologiques revêtent aux fins de la surveillance de l'exposition aux pesticides, le développement et la validation de nouveaux tests sont promis à une évolution constante.

Références bibliographiques

- Alcini, D., Maroni, M., Colombi, A., Xaiz, D. et Foà, V., 1988: «Evaluation of a standardised European method for the determination of cholinesterase activity in plasma and erythrocytes», *Medicina del Lavoro*, vol. 79, n° 1, pp. 42-53.
- Alessio, L., Apostoli, P., Minoia, L. et Sabbioni, E., 1992: «From macro- to micro-doses: Reference values for toxic metals», dans L. Alessio, P. Apostoli, L. Minoia et E. Sabbioni (directeurs de publication): *Science of the Total Environment* (New York, Elsevier Science).
- Alessio, L., Berlin, A. et Foà, V., 1987: «Influence factors other than exposure on the levels of biological indicators», dans V. Foà, F.A. Emmett, M. Maroni et A. Colombi (directeurs de publication): *Occupational and Environmental Chemical Hazards* (Chichester, Wiley).
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), 1995: *1995-1996 Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices* (Cincinnati).
- , 1997: *1996-1997 Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices* (Cincinnati).
- Augustinsson, K.B., 1955: «The normal variation of human blood cholinesterase activity», *Acta Physiologica Scandinavica*, vol. 35, pp. 40-52.
- Barquet, A., Morgade, C. et Pfaffenberger, C.D., 1981: «Determination of organochlorine pesticides and metabolites in drinking water, human blood, serum and adipose tissue», *Journal of Toxicology and Environmental Health*, vol. 7, n° 3-4, pp. 469-479.
- Berlin, A., Yodaiken, R.E. et Henman, B.A., 1984: *Assessment of Toxic Agents at the Workplace. Roles of Ambient and Biological Monitoring. Proceedings of the International Seminar held in Luxembourg, December 8-12, 1980* (Lancaster, Royaume-Uni, Martinus Nijhoff).
- Bernard, A. et Lauwerys, R., 1987: «General principles for biological monitoring of exposure to chemicals», dans M.H. Ho et K.H. Dillon (directeurs de publication): *Biological Monitoring of Exposure to Chemicals: Organic Compounds* (New York, Wiley).
- Brunone, F., Perbellini, L., Gaffuri, E. et Apostoli, P., 1980: «Surveillance biologique de l'exposition aux solvants industriels par prélèvement de l'air alvéolaire des travailleurs», *International Archives of Occupational and Environmental Health*, vol. 47, n° 3, pp. 245-261.
- Bullock, D.G., Smith, N.J. et Whitehead, T.P., 1986: «External quality assessment of assays of lead in blood», *Clinical Chemistry*, vol. 32, n° 10, pp. 1884-1889.
- Canossa, E., Angiuli, G., Garasto, G., Buzzoni, A. et De Rosa, E., 1993: «Dose indicators in farm workers exposed to mancozeb», *Medicina del Lavoro*, vol. 84, n° 1, pp. 42-50.
- Catenacci, G., Barbieri, F., Bersani, M., Ferioli, A., Cottica, D. et Maroni, M., 1993: «Biological monitoring of human exposure to atrazine», *Toxicology Letters*, vol. 69, pp. 217-222.
- Centre international de recherche sur le cancer (CIRC), 1987, 1989: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans — An Updating of (Selected) IARC Monographs from Volumes 1 to 42, Supplement 6: «Genetic and related effects»; Supplement 7: «Overall evaluations of carcinogenicity»* (Lyon).
- , 1988: «Method for detecting DNA damaging agents in humans: applications in cancer epidemiology and prevention. Proceedings of a symposium, Espoo, Finland, 2-4 September 1987», *IARC Scientific Publications* (Lyon), n° 89, pp. 1-518.
- , 1992: «Mechanisms of carcinogenesis in risk identification. IARC Working Group Meeting, Lyon, 11-18 June 1991», *ibid.*, n° 116 (Lyon), pp. 1-608.

- . 1994: «DNA adducts: Identification and biological significance. Proceedings of a meeting, Huddinge, Sweden, 18-21 November 1992», *ibid.*, n° 125 (Lyon), pp. 1-478.
- Chalermchaikit, T., Felice, L.J. et Murphy, M.J., 1993: «Simultaneous determination of eight anticoagulant rodenticides in blood serum and livers», *Journal of Analytical Toxicology*, vol. 17, pp. 56-61.
- Colosio, C., Barbieri, F., Bersani, M., Schlitt, H. et Maroni, M., 1993: «Markers of occupational exposure to pentachlorophenol», *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 51, pp. 820-826.
- Commission des Communautés européennes (CCE), 1983: *Indicateurs biologiques pour l'évaluation de l'exposition humaine aux produits chimiques industriels*, EUR 8676 EN (Luxembourg).
- . 1984: *Indicateurs biologiques pour l'évaluation de l'exposition humaine aux produits chimiques industriels: acrylonitrile, aluminium, chrome, cuivre, styrène, xylène, zinc*, EUR 8903 EN (Luxembourg).
- . 1986: *Indicateurs biologiques pour l'évaluation de l'exposition humaine aux produits chimiques industriels: composés alkylés du plomb, diméthylformamide, mercure, pesticides organophosphorés*, EUR 10704 EN (Luxembourg).
- . 1987: *Indicateurs biologiques pour l'évaluation de l'exposition humaine aux produits chimiques industriels: aldrine et dieldrine, arsenic, cobalt, endrine, vanadium*, EUR 11135 EN (Luxembourg).
- . 1988a: *Indicateurs biologiques pour l'évaluation de l'exposition humaine aux produits chimiques industriels: amines aromatiques, composés nitrés aromatiques, carbamates, nickel*, EUR 11478 EN (Luxembourg).
- . 1988b: «Indicators for assessing exposure and biological effects of genotoxic chemicals. Consensus and technical reports», A. Aitio, G. Becking, A. Berlin, A. Bernard, V. Foà, D. Kello, E. Krug, A. Léonard et G. Nordberg (directeurs de publication): *Proceedings of an International Workshop on Indicators in Human Biological Materials for Assessing Exposure to and/or Biological Effects of Genotoxic Chemicals, held in Luxembourg from 6 to 9 July 1987* (Luxembourg).
- . 1989: *Indicateurs biologiques pour l'évaluation de l'exposition humaine aux produits chimiques industriels: béryllium, oxyde de carbone, éthylbenzène, méthylstyrène, cumène, anesthésiques par inhalation, sélénium*, EUR 12174 EN (Luxembourg).
- Cranmer, M., 1970: «Determination of *p*-nitrophenol in human urine», *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 5, pp. 329-332.
- Dale, W.E., Curley, A. et Cucto, C., 1966: «Hexane extractable chlorinated insecticides in human blood», *Life Sciences*, vol. 5, pp. 47-54.
- Dawson, J.A., Heath, D.F., Rose, J.A., Thain, E.M. et Ward, J.B., 1964: «The excretion by humans of the phenol derived *in vivo* from 2-isopropoxyphenyl-N-methylcarbamate», *Bulletin of the World Health Organization*, vol. 30, pp. 127-134.
- DeBernardis, M.J. et Wargin, W.A., 1982: «High performance liquid chromatographic determination of carbaryl and 1 naphthol in biological fluids», *Journal of Chromatography*, vol. 246, pp. 89-94.
- Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), 1992: *Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und biologische Arbeitsstofftoleranzwerte 1992* (Weinheim, Allemagne, VCH, Verlagsgesellschaft GmbH).
- . 1996: *MAK- und BAT-Werte-Liste 1996* (Weinheim, Allemagne, VCH Verlagsgesellschaft GmbH).
- Dillon, H.K. et Ho, M.H., 1987: «Biological monitoring of exposure to organophosphorus pesticides», dans *Biological Monitoring of Exposure to Chemicals: Organic Compounds*, op. cit.
- Draper, W.M., 1982: «A multiresidue procedure for the determination and confirmation of acidic herbicide residues in human urine», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 30, pp. 227-231.
- Eadsforth, C.V., Bragt, P.C. et van Sittert, N.J., 1988: «Human dose-excretion studies with pyrethroid insecticides cypermethrin and alphacypermethrin: Relevance for biological monitoring», *Xenobiotica*, vol. 18, pp. 603-614.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. et Featherstone, R.M., 1961: «A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity», *Biochemistry and Pharmacology*, vol. 7, pp. 88-95.
- Gage, J.C., 1967: «The significance of blood cholinesterase activity measurements», *Residue Reviews*, vol. 18, pp. 159-167.
- Health and Safety Executive (HSE), 1992: *Biological Monitoring for Chemical Exposures in the Workplace*, Guidance Note EH 56 (Londres, HMSO).
- Kolmodin-Hedman, B., Swenson, A. et Akerblom, M., 1982: «Occupational exposure to some synthetic pyrethroids (permethrin and fenvalerate)», *Archives of Toxicology*, vol. 50, pp. 27-33.
- Kurtio, P., Vartiainen, T. et Savolainen, K., 1990: «Environmental and biological monitoring of exposure to ethylenebisdithiocarbamate fungicides and ethylenethiourea», *British Journal of Industrial Medicine*, vol. 47, pp. 203-206.
- Lauwerys, R. et Hoet, P., 1993: *Industrial Chemical Exposure: Guidelines for Biological Monitoring* (Boca Raton, Floride, Lewis).
- Laws, E.R., Jr., 1991: «Diagnosis and treatment of poisoning», dans W.J. Hayes, Jr. et E.R. Laws, Jr. (directeurs de publication): *Handbook of Pesticide Toxicology* (San Diego, Academic Press).
- Lucas, A.D., Jones, A.D., Goodrow, M.H. et Saiz, S.G., 1993: «Determination of atrazine metabolites in human urine: Development of a biomarker of exposure», *Chemical Research in Toxicology*, vol. 6, pp. 107-116.
- Maroni, M., Ferioli, A., Fait, A. et Barbieri, F., 1992: «Messa a punto del rischio tossicologico per l'uomo connesso alla produzione ed uso di antiparassitari», *Prevenzione Oggi*, vol. 4, pp. 72-133.
- Organisation mondiale de la santé (OMS), 1982a: *Evaluation externe de la qualité dans les laboratoires de santé. Rapport sur la réunion d'un groupe de travail de l'OMS, Bruxelles, 4-7 décembre 1979* (Copenhague, Bureau régional de l'Europe).
- . 1982b: *Field Survey of Exposure to Pesticides, Standard Protocol*, document n° VBC/82.1 (Genève).
- . 1982c: *Exposition aux pesticides: limites recommandées d'exposition professionnelle à visée sanitaire*, Série de rapports techniques, n° 677 (Genève).
- . 1996: *Biological Monitoring of Chemical Exposure at the Workplace: Guidelines* (Genève), vol. 1.
- Reid, S.J. et Watts, R.R., 1981: «A method for the determination of dialkyl phosphate residues in urine», *Journal of Analytical Toxicology*, vol. 5, n° 3, pp. 126-132.
- Richter, E., 1993: *Organophosphorus Pesticides: A Multinational Epidemiologic Study* (Copenhague, Bureau régional de l'Europe de l'OMS).
- Shafik, M.T., Bradway, D.E., Enos, H.R. et Yobs, A.R., 1973a: «Human exposure to organophosphorus pesticides: A modified procedure for the gas-liquid chromatographic analysis of the alkyl phosphate metabolites in urine», *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 21, pp. 625-629.
- Shafik, M.T., Sullivan, H.C. et Enos, H.R., 1973b: «Multi-residue procedure for halo- and nitrophenols: Measurements of exposure to biodegradable pesticides yielding these compounds as metabolites», *ibid.*, pp. 295-298.
- Summers, L.A., 1980: *The Bipyridylum Herbicides* (Londres, Academic Press).
- Tordoir, W.F., Maroni, M. et He, F., 1994: «Health surveillance of pesticide workers: A manual for occupational health professionals», *Toxicology*, vol. 91, n° 1, pp. 5-14.
- US Office of Technology Assessment, 1990: *Genetic Monitoring and Screening in the Workplace*, OTA-BA-455 (Washington, DC, US Government Printing Office).
- van Sittert, N.J. et Dumas, E.P., 1990: «Field study on exposure and health effects of an organophosphate pesticide for maintaining registration in the Philippines», *Medicina del Lavoro*, vol. 81, n° 6, pp. 463-473.
- Verberk, M.M., Brouwer, D.H., Brouwer, E.J., Bruyzeel, D.P., Emmen H.H., van Hemmen, J.J., Hooisma, J., Jonkman E.J., Ruijten, M.W., Salle, H.J. et coll., 1990: «Health effects of pesticides in the flower-bulb culture in Holland», *ibid.*, pp. 530-541.
- Westgard, J.O., Barry, P.L., Hunt, M.R. et Groth, T., 1981: «A multirule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry», *Clinical Chemistry*, vol. 27, n° 3, pp. 493-501.
- Whitehead, T.P., 1977: *Quality Control in Clinical Chemistry* (New York, Wiley).

Références complémentaires

- Brondeau, M.T. et Schneider, O., 1997: «Indicateurs biologiques d'exposition. Principes de base et valeurs-guides utilisables en France», *Cahier de notes documentaires — Hygiène et sécurité du travail*, n° 169, pp. 589-596.
- Clarkson, T., Friberg, L., Nordberg, G. et Sager, P., 1988: *Biological Monitoring of Toxic Metals* (New York, Plenum Press).
- Fiserova-Berferova, V. et Ogata, N., 1990: *Biological Monitoring of Exposure to Industrial Chemicals* (Cincinnati, ACGIH).
- Friberg, L., Nordberg, G. et Vouk, V., 1986: *Handbook on the Toxicology of Metals*, (Amsterdam, Elsevier Science), vol. II.
- Hayes, W.J., Jr. et Laws, E.R., Jr., 1991: *Handbook of Pesticide Toxicology* (New York, Academic Press).
- He, F., 1993: «Biological monitoring of occupational pesticide exposure», *International Archives of Occupational and Environmental Health*, vol. 65, pp. supplément n° 1, pp. 69-76.
- Krishnan, K. et Brodeur, J., 1991: «Toxicological consequences of combined exposure to environmental pollutants», *Archives of Complex Environmental Studies*, vol. 3, pp. 1-106.
- Organisation mondiale de la santé (OMS), 1980: *Tin and Organotin Compounds*, Environmental Health Criteria, n° 15 (Genève).
- . 1984a: *2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4D)*, *ibid.*, n° 29 (Genève).
- . 1984b: *Paraquat and Diquat*, *ibid.*, n° 39 (Genève).
- . 1986a: *Carbamate Pesticides: A General Introduction*, *ibid.*, n° 64 (Genève).
- . 1986b: *Organophosphorus Insecticides: A General Introduction*, *ibid.*, n° 63 (Genève).
- . 1988: *Dithiocarbamate Pesticides, Ethylenethiourea and Propylenethiourea: A General Introduction*, *ibid.*, n° 78 (Genève).
- . 1989a: *Aldrin and Dieldrin*, *ibid.*, n° 91 (Genève).
- . 1989b: *Cypermethrin*, *ibid.*, n° 82 (Genève).
- . 1989c: *Permethrin*, *ibid.*, n° 94 (Genève).
- . 1990a: *Deltamethrin*, *ibid.*, n° 97 (Genève).
- . 1990b: *Fenvalerate*, *ibid.*, n° 95 (Genève).
- . 1990c: *Tributyltin Compounds*, *ibid.*, n° 116 (Genève).
- . 1993: *Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles*, *ibid.*, n° 155 (Genève).