



HAL
open science

The PIG- A gene, a new marker for mutagenesis

Pierre Castel, Xavier Carcopino, Stéphane Robert, Remi Bonetto, Didier Cowen, Thierry Orsiere

► **To cite this version:**

Pierre Castel, Xavier Carcopino, Stéphane Robert, Remi Bonetto, Didier Cowen, et al.. The PIG-A gene, a new marker for mutagenesis: Evidence of concept and presentation of the technique. *Médecine/Sciences*, 2017, 33 (4), pp.432-439. 10.1051/medsci/20173304014 . hal-01681525

HAL Id: hal-01681525

<https://hal.science/hal-01681525>

Submitted on 1 May 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

► Les tests de mutagenèse actuels ne permettent pas la détection directe des mutations géniques chez l'homme et nécessitent souvent une étape préalable de culture cellulaire. Le test PIG-A sur sang total est fondé sur la mesure de la fréquence de mutation du gène sentinelle *PIG-A* par la révélation par cytométrie en flux de cellules circulantes déficientes en ancre GPI (glycosylphosphatidyl-inositol). Il consiste à identifier les cellules mutées pour le gène *PIG-A* après marquage des cellules par des fluorochromes spécifiques de l'ancre GPI ou des protéines qui lui sont associées. Les dernières avancées ont permis d'améliorer la sensibilité et le débit d'analyse. Les résultats de ce biomarqueur d'effet nouveau et prometteur, réalisable chez l'homme ou le rongeur, sont désormais disponibles en moins de deux heures après le prélèvement. ◀

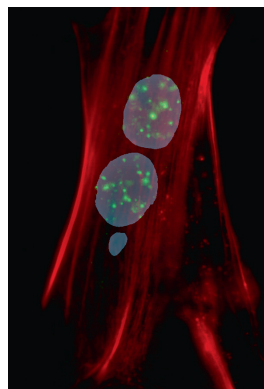
Les champs d'application de la détection de mutations induites par l'environnement sont aussi larges que la démonstration d'innocuité en toxicologie réglementaire, le diagnostic clinique ou l'étude de la susceptibilité individuelle à des expositions génotoxiques environnementales ou anthropiques¹. Les tests actuels permettant de mesurer les effets de ces expositions sont souvent fastidieux à mettre en œuvre et coûteux. Les délais pour obtenir les résultats sont généralement de plusieurs jours et aucun ne permet encore la détection *in vivo* de mutations géniques chez l'homme. Pourtant, la mise au point d'un test simple, fiable, reproductible et rémanent capable de détecter un large spectre d'expositions génotoxiques est un réel enjeu pour la recherche en oncologie et en toxicologie réglementaire et environnementale.

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-ino-

Le gène *PIG-A*, nouveau marqueur de mutagenèse

Preuves de concept et exposé de la technique

Pierre Castel¹, Xavier Carcopino^{1,2}, Stéphane Robert³, Rémi Bonetto⁴, Didier Cowen⁴, Thierry Orsiere¹



¹Institut Méditerranéen de Biodiversité et d'écologie (IMBE), équipe Biogénotoxicologie, Santé Humaine et Environnement, Aix-Marseille Université (AMU), CNRS, IRD, Avignon Université, Faculté de Médecine de Marseille, 27, boulevard Jean Moulin, 13005 Marseille, France ;

²Département d'obstétrique et de gynécologie, Hôpital Nord, APHM, Aix-Marseille Université (AMU), Marseille, France ;

³Vascular Research Center of Marseille, Aix-Marseille Université (AMU), UMR Inserm 1076, Faculté de Pharmacie, Marseille, France ;

⁴Département de Radiothérapie, Hôpital Nord, APHM, Aix-Marseille Université (AMU), Marseille, France.

thierry.orsiere@imbe.fr

sitol (GPI) [1] (voir *Figure 1* p. 436). Il s'agit d'un gène sentinelle, hautement conservé entre les espèces [2], dont la fréquence de mutation est le reflet de celle des mutations somatiques acquises [3]. À ce titre, il a récemment fait l'objet de nombreuses recherches ayant permis le développement du « test PIG-A » qui estime la fréquence des cellules mutées pour le gène *PIG-A* par la mesure de la fréquence des cellules circulantes déficientes en ancre GPI [2, 4]. Le caractère innovant de cette approche réside dans la possibilité de mesurer *ex vivo*, au niveau du sang périphérique, une fréquence de cellules mutées sans avoir recours à une étape préalable de culture cellulaire.

Cette revue présente les divers aspects conceptuels et techniques ainsi que les perspectives d'utilisations du test PIG-A en recherche fondamentale et en recherche clinique.

Le gène *PIG-A* et l'ancre membranaire GPI : implications cliniques

L'ancre GPI est un complexe glycolipidique d'ancrage membranaire qui permet l'expression de nombreuses protéines au niveau de la membrane plasmique de la cellule. Le gène *PIG-A* code une sous-unité enzymatique impliquée dans la première étape de la synthèse

Vignette (Photo © IMBE BSHE - Thierry Orsiere).

¹ Relatif à l'activité humaine.

de l'ancre GPI, l'obtention d'une ancre fonctionnelle nécessitant l'expression de 21 autres gènes [1]. Parmi ces différents gènes, *PIG-A* est le seul qui soit situé sur le chromosome X. Il se trouve à l'état hémizygoté chez tous les sujets, y compris féminins, grâce au phénomène d'inactivation du chromosome X [5-7] (→).

En conséquence, une seule mutation rendant le gène inactif entraînant dans la cellule l'arrêt de la production de l'ancre GPI dont la traduction phénotypique est la disparition des protéines membranaires ancrées par le GPI. Parmi ces protéines figurent de multiples *clusters* de différenciation (CD) tantôt spécifiques de la cellule qui les porte, comme le CD66b qui est exprimé par les granulocytes, tantôt non spécifiques comme des protéines régulatrices du complément qui sont ubiquitaires telles que le CD55 (*decay accelerating factor* - DAF) ou le CD59 (*membrane inhibitor of reactive lysis* - MIRL) [8]. Dans ce dernier cas, l'absence de ces protéines à la surface des cellules circulantes les rend sensibles à l'attaque du complément et constitue le point clé de la physiopathologie d'une maladie hématologique, l'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN) [9]. Il s'agit d'une anémie hémolytique rare (prévalence : 1 à 10/1 000 000) dans laquelle, en raison d'une mutation acquise du gène *PIG-A*, la moelle osseuse produit de manière clonale des cellules hématopoïétiques déficientes en GPI et par conséquent en CD55 et CD59 [9]. L'absence de ces protéines de surface est responsable d'une hémolyse intravasculaire relayée par le complément à l'origine des manifestations cliniques : anémie, thromboses, insuffisance rénale chronique ou dystonie musculaire lisse [9].

Fréquence des mutations du gène *PIG-A* par mesure de la fréquence des cellules GPI-déficientes

Les mutations du gène *PIG-A*, situé sur le chromosome X, sont les seules pouvant statistiquement aboutir au phénotype de déficience en ancrage GPI. En effet, tous les autres gènes impliqués dans la synthèse du GPI sont autosomiques. Deux mutations inactivant les deux allèles du même gène seraient donc nécessaires pour produire une déficience avec une fréquence théorique évaluée à 2×10^{-14} , soit dix millions de fois plus faible que celle estimée pour des mutations spontanées du gène *PIG-A* [10]. L'*International Workgroup on Genotoxicity Testing* (IWGT) admet aujourd'hui la réciprocité entre une cellule mutée sur le gène *PIG-A* et une cellule déficiente en ancre GPI grâce à l'établissement de deux relations réciproques [11]. D'une part, les recherches sur l'HPN ont montré que le phénotype GPI-déficient était lié à une mutation de *PIG-A* et que la transfection d'un gène *PIG-A* sauvage dans une cellule de phénotype HPN restaurait la présence de l'ancre GPI et des protéines GPI-ancrées à la surface de la cellule [5]. D'autre part, chez l'animal, après exposition génotoxique contrôlée, le séquençage du gène *PIG-A* a identifié des mutations acquises uniquement dans les cellules GPI-déficientes [12-14]. L'ensemble de ces résultats permet d'affirmer que la mutation du gène *PIG-A* est responsable d'un phénotype GPI-déficient et, réciproquement, qu'une cellule GPI-déficiente est porteuse d'une mutation touchant le locus *PIG-A*.

(→) Voir la Nouvelle de S. Augui et E. Heard, *m/s* n° 6-7, juin-juillet 2008, page 584, et la Dernière Heure de C. Vallot et C. Rougeulle, *m/s* n° 2, février 2013, page 223

De très faibles fréquences de populations de granulocytes et d'érythrocytes circulants GPI-déficients ont été découvertes chez les sujets sains (entre 10 et 50 cellules déficientes pour 10^6 cellules totales) [4, 15]. Le séquençage du gène *PIG-A* dans les cellules circulantes GPI-déficientes a identifié, chez un même donneur sain, des mutations qui se sont révélées différentes au cours du temps, alors même que la fréquence des cellules GPI-déficientes dans le sang circulant restait identique [4]. Ceci, ne pouvant être expliqué que par l'acquisition de mutations *de novo* par les précurseurs hématopoïétiques à mesure que d'autres disparaissent, a conduit à proposer la fréquence des mutations du gène *PIG-A*, estimée par la mesure de la fréquence des cellules GPI-déficientes, comme un marqueur de mutations somatiques acquises. La fréquence spontanée des cellules GPI-déficientes mesurée (entre 10 et 30×10^{-6}) est comparable à celle observée avec les tests fondés sur l'analyse des gènes codant l'hypoxanthine phosphoribosyltransférase (*hprt*), la glycophorine A ou le HLA-A (*human leucocyte antigen A*) (entre 0,5 et 30×10^{-6}) qui sont utilisés pour estimer la fréquence des mutations somatiques spontanées [16].

Le test *PIG-A* et son évolution

Le test *PIG-A* consiste à réaliser un immunomarquage à l'aide d'anticorps fluorescents spécifiques de protéines ancrées par le GPI ou de ligand dirigé vers le GPI lui-même, suivi de la quantification par cytométrie en flux de la fréquence des cellules déficientes en ancre GPI présentes dans l'échantillon, reflet de la fréquence des mutations qui entraînent l'inactivation du locus *PIG-A*. Les cellules ne présentant pas de fluorescence sont indifféremment appelées « cellules GPI-déficientes », « mutants » ou parfois « cellules *PIG-A* mutées ». Cette technique permet l'analyse automatisée et à haut débit de plusieurs millions de cellules selon des spécifications techniques (paramétrage du cytomètre en flux, populations cellulaires d'intérêt, choix des couples anticorps-fluorochromes) ayant fait l'objet de recommandations [17]. La technique est inspirée du diagnostic et du suivi de patients HPN chez lesquels le nombre de cellules GPI-déficientes peut représenter jusqu'à plus de 98 % des cellules circulantes, soit plusieurs dizaines de millions de mutants par millilitre de sang total [18]. En conséquence, l'analyse d'un grand nombre d'événements (au moins un million de cellules d'intérêt) est nécessaire pour atteindre la sensibilité optimale pour une détermination fiable de la fréquence des mutants, ce qui rend la technique extrêmement sensible à la présence de faux négatifs² [19]. De ce

² Des cellules non fluorescentes alors qu'elles ne sont pas mutées.

Type cellulaire	Avantages	Inconvénients
Érythrocyte	Concentration de cellules dans le sang total (10^9 /ml)	Fréquence spontanée des globules rouges <i>PIG-A</i> déficients plus faible Latence entre l'exposition et la détection dans le sang d'environ 15 jours chez le rat
Réticulocyte	Durée de vie courte Réponse précoce après exposition génotoxique	Nécessité d'un marqueur supplémentaire pour les différencier des globules rouges Concentration de cellules dans le sang total environ 200 fois plus faible (50×10^6 /ml)
Granulocyte	Durée de vie intravasculaire courte (24 h) Pas de preuve d'une durée de vie réduite pour les mutants	Fréquence plus faible (1 à 10×10^6 /ml) Durée de vie <i>in vitro</i> très courte (quelques heures)

Tableau 1. Caractéristiques des différents types cellulaires sanguins pouvant influencer les résultats d'un protocole utilisant le test PIG-A.

fait, les choix des populations cellulaires analysées, des anticorps utilisés et des paramètres du cytomètre sont des points critiques dans la mise au point du test PIG-A.

Populations cellulaires sanguines circulantes

Les travaux réalisés sur des patients HPN et des sujets sains ont permis de démontrer que chez les sujets sains, les rares cellules GPI-déficientes sont polyclonales et issues de progéniteurs hématopoïétiques, probablement au niveau du premier progéniteur myéloïde, la CFU-GEMM (*colony forming unit-granulocyte erythrocyte monocyte megakaryocyte*) [15]. Les cellules GPI-déficientes qui circulent apparaissent donc après un délai appelé temps d'expression phénotypique qui correspond au temps nécessaire pour la production des cellules et leur différenciation en cellules matures circulantes [20, 21]. L'expression ubiquitaire du gène *PIG-A* rend le test applicable à l'ensemble des cellules eucaryotes mais les lignées érythrocytaire et granulocytaire sont principalement étudiées dans la littérature (Tableau 1). Cela s'explique par le fait, d'une part, que les prélèvements d'autres cellules seraient trop invasifs et, d'autre part, que les techniques de préparation de suspensions de cellules isolées d'un tissu ou d'un organe altèrent systématiquement les protéines de surface des cellules.

Les érythrocytes sont les cellules circulantes les plus abondantes, de l'ordre du milliard par millilitre. Ils permettent donc la réalisation du test PIG-A sur de très petits volumes sanguins³. Il faut cependant noter que la fréquence spontanée des érythrocytes GPI-déficients est plus faible que celle des autres populations cellulaires⁴ [4, 22, 23] et que l'érythrocyte étant la cellule mature de la lignée érythroïde, le temps d'expression phénotypique des mutants correspond à la durée d'une érythropoïèse, soit 18 à 20 jours chez l'homme [24].

Les réticulocytes, précurseurs immédiats des érythrocytes, constituent une autre population d'intérêt. Présents à une fréquence d'environ

50 millions par millilitre de sang, l'analyse d'un million de réticulocytes nécessite un tri cellulaire préalable et l'utilisation d'un marqueur supplémentaire pour les différencier des érythrocytes. Leur durée de vie dans la circulation, de 24 à 48 heures, rend les mutants moins soumis à l'action du complément et l'expression phénotypique après exposition génotoxique est plus précoce de 7 jours [20, 25-32].

Chez l'homme, les granulocytes, majoritairement des polynucléaires neutrophiles, sont retrouvés avec une fréquence de 4 à 10 millions par millilitre de sang total chez l'adulte sain. Leur durée de vie courte (24 heures) les expose peu à l'attaque du complément et il n'existe pas de preuve quant à une lyse possible des granulocytes GPI-déficients par le complément [3]. La fréquence des granulocytes GPI-déficients ($22/10^6$) est légèrement plus élevée que celle des érythrocytes GPI-déficients chez l'homme ($8/10^6$) [4]. Cependant, après prélèvement, leur durée de vie est très courte (quelques heures à température ambiante) et leur analyse nécessite des prélèvements plus importants.

Immunomarquage

La qualité de l'immunomarquage qui précède l'analyse en cytométrie de flux est primordiale pour l'interprétation des résultats. En effet, le critère permettant de discriminer une cellule GPI-déficiente d'une cellule non mutée est l'absence du signal de fluorescence associé à un marqueur GPI-dépendant. En conséquence, toute cause pouvant générer des faux négatifs⁵ doit être absolument évitée. Les moyens de limiter le nombre de

³ Ceci est particulièrement intéressant dans les études sur petits animaux comme le rat ou la souris.

⁴ La diminution de fréquence des érythrocytes GPI-déficientes est principalement expliquée par leur durée de vie (120 jours chez l'homme), offrant une fenêtre d'exposition au complément particulièrement longue [22].

⁵ Par exemple : marquage de mauvaise qualité, épitope faiblement exprimé sur la membrane plasmique de la population cellulaire choisie, quantité d'anticorps non saturante, etc.

Population	Sélection cellulaire	Marqueur GPI-dépendant
Érythrocytes	CD235a	CD59 ± CD55
Granulocytes	CD15	Association de 2 marqueurs au minimum parmi : CD24/CD66b/CD16a/FLAER CD55 et CD59 déconseillés
Monocytes	CD33/CD64	Idem

Tableau II. Anticorps et marqueurs fluorescents recommandés selon le type cellulaire étudié, d'après les recommandations de bonne pratique de laboratoire pour le diagnostic et le suivi de patients HPN [17]. FLAER : fluorescein-labeled proaerolysin ; HPN : hémoglobinurie paroxystique nocturne.

faux négatifs ont été déterminés [3] : d'une part, la sélection de la population d'intérêt doit être réalisée par l'expression d'au moins un épitope GPI-indépendant spécifique du type cellulaire étudié ; d'autre part, la détermination de la fréquence des mutants doit être établie par la perte de fluorescence simultanée de deux à trois marqueurs GPI-dépendants⁶ [19]. Chez l'homme, le panel (ensemble des anticorps utilisés simultanément pour l'analyse) préconisé en fonction du type cellulaire étudié a fait l'objet de recommandations pour le phénotypage à haut débit du sang de patients HPN (Tableau II) [17]. Il comprend, quel que soit le type cellulaire, au moins un anticorps de sélection cellulaire dirigé contre un épitope GPI-indépendant et deux marqueurs GPI-dépendants.

Cytométrie de flux

L'acquisition du signal des anticorps GPI-dépendants est donc précédée d'une étape de sélection de la population d'intérêt. Les stratégies de sélection sont relativement semblables dans les protocoles publiés (Tableau III). La caractérisation des événements (c'est-à-dire des cellules prises en considération lors de l'analyse) est réalisée selon les paramètres de diffraction de la lumière permettant une sélection des cellules selon leur morphologie, en excluant les doublets (association de deux événements qui se confond avec un élément unique). La population cellulaire d'intérêt est ensuite isolée selon l'expression des marqueurs spécifiques GPI-indépendants utilisés. La fluorescence des marqueurs GPI-dépendants sera finalement analysée dans la population ainsi sélectionnée.

Pour obtenir une puissance statistique suffisante, la lecture de très nombreux événements est nécessaire : au moins un million de cellules de la population d'intérêt [19]. La détermination des seuils de fluorescence au-dessous desquels une cellule sera considérée comme négative et donc GPI-déficiente est capitale. Plusieurs approches ont été proposées (Tableau III). Les recommandations de bonne pratique pour le phénotypage sanguin de patients HPN préconisent, en l'absence de témoin positif (c'est-à-dire de sang provenant de patient diagnostiqué HPN), de créer des faux positifs en incubant l'échantillon avec les anticorps GPI-indépendants seulement [19]. Ainsi, l'absence de marquage des

épitopes GPI-dépendants génère une population témoin de faux positifs de marquage. Elle permet, en mélangeant dans des proportions variables des échantillons de sang marqués et non marqués en anticorps GPI-dépendants, le bon positionnement des seuils d'analyse.

Évolution de la technique

Le test PIG-A a été particulièrement développé dans le domaine de la mutagenèse environnementale et réglementaire. Son intérêt réside, en partie, dans les faibles volumes de sang nécessaires pour l'examen permettant ainsi des analyses itératives, par exemple sur le même animal dans les études de toxicologie à administrations répétées. Les protocoles appliqués actuellement chez le rongeur permettent d'analyser en quelques minutes plus d'un million d'érythrocytes ou de réticulocytes à partir d'un prélèvement sanguin de 100 µl [27]. Si le principe du test reste inchangé, le protocole a progressivement été amélioré afin d'augmenter ses performances tout en limitant le nombre d'événements totaux analysés. Ces avancées reposent sur un enrichissement de l'échantillon en une population cellulaire s'avérant minoritaire afin d'augmenter la proportion de cellules d'intérêt dans l'échantillon analysé. L'enrichissement magnétique permet ainsi d'augmenter la proportion de cellules d'intérêt selon des critères phénotypiques. Il consiste à marquer la population cellulaire ciblée avec un anticorps spécifique fixé sur des billes magnétiques. Un champ magnétique permettra de retenir les cellules marquées fixées sur les billes. L'analyse sera réalisée soit sur les cellules retenues [4, 30], soit sur les cellules non marquées, et donc libres, qui seront récupérées dans l'éluat [27].

Potentiel du test

Les caractéristiques du gène *PIG-A* en font un marqueur fidèle de l'impact mutagène d'agents chimiques ou

⁶ À la surface d'une cellule sauvage, la probabilité de mesurer une faible fluorescence de manière concomitante sur 2 à 3 épitopes est considérée comme statistiquement nulle.

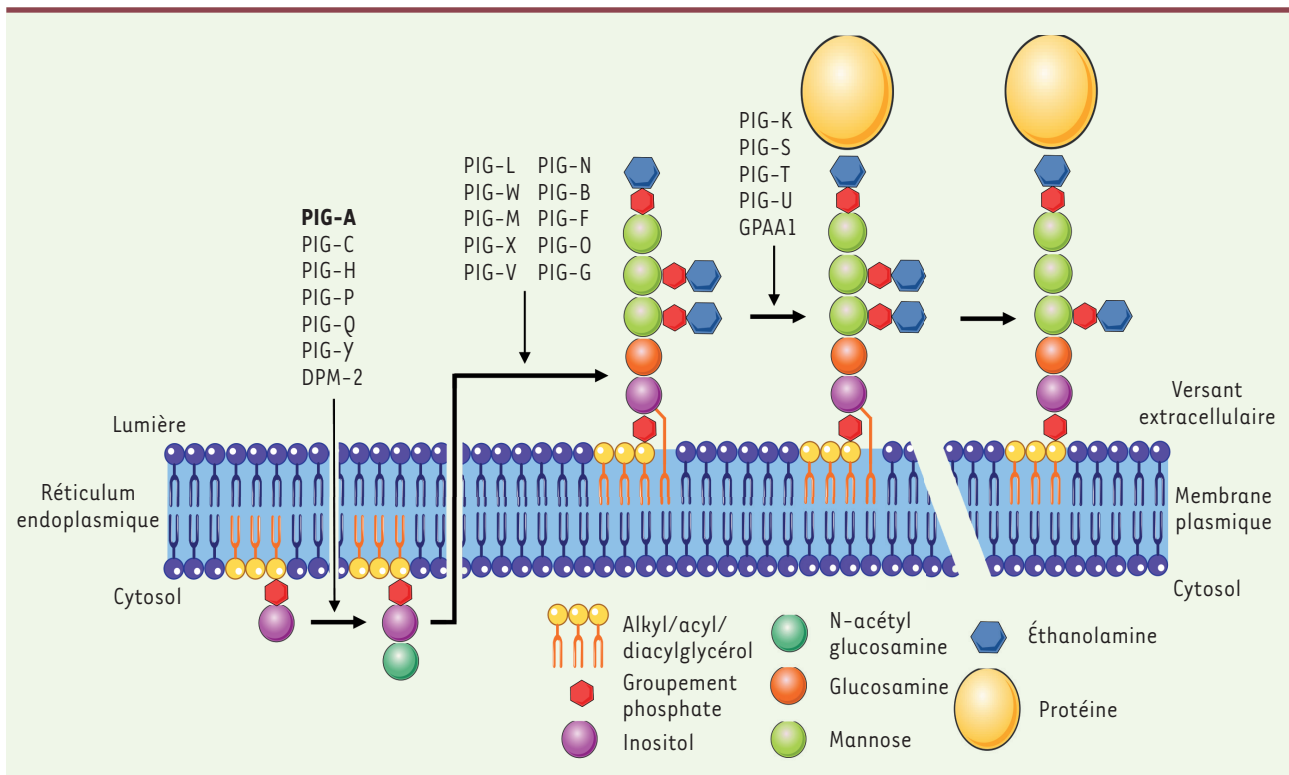


Figure 1. Biosynthèse de l'ancre glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI) et gènes impliqués (d'après [1]).

de contaminants de l'environnement : sa localisation sur le génome en fait un gène sentinelle reconnu pour la mesure de la fréquence des mutations somatiques *in vivo* [3] et sa sensibilité à des modes d'actions génotoxiques très divers est démontrée [33]. Le séquençage du gène *PIG-A* réalisé sur des cellules issues de patients HPN et de sujets sains a ainsi identifié plus de 100 mutations inactivantes (parmi lesquelles des mutations non-sens, faux-sens, des décalages du cadre de lecture, des substitutions, et de larges délétions) aboutissant toutes au même phénotype de déficience en GPI, suggérant que le gène *PIG-A* puisse être sensible à un grand nombre de modes d'actions génotoxiques [15, 34]. Deux lacunes identifiées par l'IWGT en 2015 ont été comblées par la publication de deux études récentes : les performances du test ne dépendent en fait pas du nombre de copies du chromosome X portées par l'individu, les fréquences spontanées et induites de cellules mutées pour le gène *PIG-A* n'étant pas différentes entre mâles et femelles [23, 35, 36] ; l'érythroïse compensatoire observée après exposition à un agent hémolyseur non génotoxique (comme le 2-butoxyéthanol) n'entraîne pas d'augmentation de la fréquence des cellules GPI-déficientes [37].

Ces qualités ont initié l'évaluation du test *PIG-A in vitro* : le séquençage du gène *PIG-A* réalisé sur des lymphoblastes humains cultivés *in vitro* et soumis à divers génotoxiques connus, a révélé des résultats comparables à ceux obtenus *in vivo* chez la souris après exposition aux mêmes agents [38]. *PIG-A* est également un bon marqueur d'instabilité génomique *in vitro* : la fréquence de cellules GPI-déficientes est en effet augmentée dans des lignées de cellules cancéreuses coliques

et le séquençage de *PIG-A* dans ces cellules a mis en évidence 7 types de mutations [39]. Chez l'animal, le séquençage du gène *Pig-a* a révélé la survenue de mutations induites spécifiques du mode d'action du mutagène utilisé [12-14].

La sensibilité et la spécificité du test *PIG-A* évaluées dans diverses études, incluant les principaux mutagènes connus et des agents non-mutagènes, selon divers schémas d'administration, ont accru son intérêt en toxicologie réglementaire à tel point que l'IWGT (*International workshop on genotoxicity testing*) a proposé sa réalisation en complément du micronoyau⁷ au cours des tests réglementaires [11].

Le test *PIG-A* ne permettrait cependant pas de détecter l'impact potentiel, en termes de mutations géniques, d'expositions brèves et accidentelles, dans les heures ou jours qui suivent l'exposition. En effet, pour que ce biomarqueur puisse retranscrire la mutagénicité de l'exposition, celle-ci doit être suivie du délai nécessaire à l'expression phénotypique des mutants, qui intègrent ici le renouvellement de la population cellulaire d'intérêt. Le test *PIG-A* serait donc *a priori* plus adapté au suivi des expositions chroniques et éventuellement mul-

⁷ Le test du micronoyau permet d'évaluer les mutations chromosomiques ou génomiques générées par des agents génotoxiques en utilisant des lignées cellulaires.



Espèce	Type cellulaire	Enrichissement	Anticorps de sélection	Marqueur(s) du signal	Seuillage (cytométrie)	Référence
Homme	Granulocytes	Gradient de densité	CD11b/CD45	CD24/CD55/CD59	Seuil 4 % de la moyenne géométrique de fluorescence	[36]
	Granulo-HPN	Magnétique CD16*	CD16/CD11b	CD11b/CD55 CD59/CD235a	Isotypes contrôlés	[4]
	ERY	Aucun	CD235ab	CD59	Cellules non marquées : seuil 99 %	[40]
	ERY/RET	Gradient de densité + magnétique CD59 ⁻	CD45/CD61	CD55/CD59	Double marquage CD45/ CD61	[23]
Rat	LT/ERY	Aucun	CD45/7-AAD/TCR	CD48/CD59/FLAER	Seuillage avec cellules non marquées.	[14]
		ERY : magnétique CD59 ⁻ LT : magnétique CD48 ⁺	ERY : HIS49 LT : TCR/7AAD	ERY : CD59 LT : CD48	Seuillage avec cellules monomarquées HIS49	[13]
	ERY/RET	Aucun	CD45	CD59	Seuillage avec cellules non marquées. Seuil : 90 %	[21]
		Gradient de densité	SYT013	CD59	Solution 50 % CD59+SYT013 / 50 % SYT013 seul	[25, 26]
		Gradient densité + magnétique CD59 ⁻	CD61/SYT013	CD59	Solution 50 % CD59+SYT013 / 50 % SYT013 seul	[27, 35, 37]
		Gradient densité + soit magnétique CD59 ⁻ soit magnétique CD71 ⁺	Pig-a base : SYT013/ CD61 Pig-a modifié : SYT059/HIS49 PIGRET : CD71/HIS49	CD59	Non précisé	[41]
		Magnétique CD71 ⁺	HIS49/CD71	CD59	Seuillages avec cellules non et mono-marquées HIS49. Seuil : 99 % +/- 0,1 %	[30]
	ERY/RET/MO	Magnétique CD71 ⁺	HIS49/CD71/CD32	CD59	Seuillage avec cellules non et mono-marquées	[28]
Souris	ERY/RET	Gradient de densité	CD61/SYT013	CD24	Seuillage avec cellules non marquées	[20]
		Aucun	CD71/TER119	CD24	Non précisé	[29]
		Gradient de densité + enrichissement CD59 ⁻	CD61/SYT013	CD24	Solution 50 % CD61/CD24/ SYT013 / 50 % SYT013/CD61	[42]
	ERY/RET/MO	Magnétique CD71 ⁺	CD45/TER119/CD71	CD24	Seuillage avec cellules non et mono-marquées	[12]

Tableau III. Principaux paramètres des protocoles du test PIG-A utilisés dans la littérature. Les anticorps de sélection permettent un phénotypage cellulaire pendant l'analyse en cytométrie en flux et une sélection précise des cellules sur lesquelles sera analysé le signal GPI. L'enrichissement est une technique d'augmentation pré-analytique du nombre de cellules GPI-déficientes dans la population d'intérêt, afin de limiter le nombre d'événements totaux lus par le cytomètre. L'enrichissement magnétique consiste en l'utilisation d'anticorps de sélection couplés à des billes magnétiques : après soumission de l'échantillon à un champ magnétique et élimination du surnageant, la proportion de cellules d'intérêt est augmentée. Seuillage : détermination du seuil de positivité ; ERY : érythrocytes ; RET : réticulocytes ; LT : lymphocyte T ; MO : moelle osseuse ; PIGRET : test PIG-A sur réticulocytes. FLAER : *fluorescein-labeled proaerolysin* ; TCR : *T cell receptor* ; SYT013 : colorant d'acides nucléiques fluorescent vert ; 7AAD : intercalant fluorescent ; TER119 et HIS49 : anticorps monoclonaux (d'après [28]).

tiples à de faibles niveaux de doses, telles que l'on peut en rencontrer en milieu professionnel. Ce test n'est réalisable que sur des cellules circulantes. Adapté aux effets systémiques, il ne sera donc pas informatif dans le cas d'une génotoxicité limitée à un organe spécifique.

Conclusion

Le phénotype GPI-déficient est associé, chez l'homme, à une grande diversité de variations de séquence du gène *PIG-A*. Chez l'animal, il est relié à l'effet d'expositions génotoxiques de modes d'actions très divers. Ces deux informations nous permettent de supposer que l'identification de cellules GPI-déficientes est susceptible de révéler certaines expositions de l'homme à des agents génotoxiques présentant des modes d'action mutagène variés. La quantification de la fréquence de mutation du gène *PIG-A* pourrait ainsi apporter des informations utiles si elle s'inscrit dans le cadre du suivi d'enquêtes épidémiologiques de populations professionnellement exposées à des mutagènes, dans le suivi de volontaires sains ou de patients lors d'essais cliniques afin de comparer les fréquences obtenues à celles acquises dans des modèles expérimentaux différents lors des phases de développement précliniques.

Enfin, la possibilité de réaliser le test *ex vivo* permet une évaluation rapide, globale et intégrée de la sensibilité de l'individu à un environnement génotoxique, tenant compte de la variabilité interindividuelle induite par les polymorphismes génétiques, notamment concernant les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et/ou dans le métabolisme des xénobiotiques. Après expression phénotypique des conséquences d'une exposition mutagène et renouvellement de la population de cellules analysées postérieurement à l'exposition que l'on veut renseigner, le test *PIG-A* permet, en estimant la fréquence des cellules circulantes mutées pour le gène *PIG-A*, de disposer des résultats d'un biomarqueur d'effet moins de 2 h après la réalisation du prélèvement sanguin. ♦

SUMMARY

The *PIG-A* gene as a new biomarker of mutagenesis: proof of concept and technical specifications

Gene mutations are not directly detected by current genotoxicity assays and most of them need a cell culture step. The whole blood *PIG-A* assay consists in the detection of the mutation frequency within the *PIG-A* sentinel gene by identification of glycosyl-phosphatidylinositol (GPI-) deficient cells. *PIG-A* mutated/GPI-deficient cells can be detected by flow cytometry as they no longer express surface fluorescence for GPI-linked markers. The last researches have focused on cell enrichment techniques leading to increased throughput and sensitivity. The results of this new and promising biomarker of mutagenesis, performed in humans or rodents, are now available within 2 hours after blood collection. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Kinoshita T. Biosynthesis and deficiencies of glycosylphosphatidylinositol. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2014 ; 90 : 130-43.
2. Kawagoe K, Takeda J, Endo Y, et al. 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* 1994 ; 23 : 566-74.
3. Peruzzi B, Araten DJ, Notaro R, et al. 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* 2010 ; 705 : 3-10.
4. Araten DJ, Nafa K, Pakdeesuwan K, et al. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 5209-14.
5. Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, et al. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the *PIG-A* gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 1993 ; 73 : 703-11.
6. Augui S, Heard E. Inactivation du chromosome X. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 584-5.
7. Vallot C, Rougeulle C. Inactivation du chromosome X chez l'humain. *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 223-5.
8. Rosse WF. Dr Ham's test revisited (editorial). *Blood* 1991 ; 78 : 547-50.
9. Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2014 ; 124 : 2804-11.
10. Clive D, Flamm WG, Machesko MR, et al. A mutational assay system using the thymidine kinase locus in mouse lymphoma cells. *Mutat Res* 1972 ; 16 : 77-87.
11. Gollapudi BB, Lynch AM, Heflich RH, et al. The *in vivo* *Pig-a* assay: a report of the International Workshop On Genotoxicity Testing (IWGT) Workgroup. *Mutat Res* 2015 ; 783 : 23-35.
12. Kimoto T, Suzuki K, Kobayashi X mei, et al. Manifestation of *Pig-a* mutant bone marrow erythroids and peripheral blood erythrocytes in mice treated with N-ethyl-N-nitrosourea: direct sequencing of *Pig-a* cDNA from bone marrow cells negative for GPI-anchored protein expression. *Mutat Res* 2011 ; 723 : 36-42.
13. Dobrovolsky VN, Revollo J, Pearce MG, et al. CD48-deficient T-lymphocytes from DMBA-treated rats have de novo mutations in the endogenous *Pig-a* gene. *Environ Mol Mutagen* 2015 ; 56 : 674-83.
14. Miura D, Dobrovolsky VN, Mittelstaedt RA, et al. Development of an *in vivo* gene mutation assay using the endogenous *Pig-A* gene: II. Selection of *Pig-A* mutant rat spleen T-cells with proaerolysin and sequencing *Pig-A* cDNA from the mutants. *Environ Mol Mutagen* 2008 ; 49 : 622-30.
15. Hu R, Mukhina GL, Piantadosi S, et al. *PIG-A* mutations in normal hematopoiesis. *Blood* 2005 ; 105 : 3848-54.
16. Albertini RJ, Nicklas JA, O'Neill JP, et al. *In vivo* somatic mutations in humans: measurement and analysis. *Annu Rev Genet* 1990 ; 24 : 305-26.
17. Borowitz MJ, Craig FE, DiGiuseppe JA, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry* 2010 ; 78B : 211-30.
18. Parker C. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2005 ; 106 : 3699-709.
19. Sutherland DR, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry* 2012 ; 82B : 195-208.
20. Phonetheswath S, Bryce SM, Bemis JC, et al. Erythrocyte-based *Pig-A* gene mutation assay: Demonstration of cross-species potential. *Mutat Res* 2008 ; 657 : 122-6.
21. Miura D, Dobrovolsky VN, Kimoto T, et al. 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* 2009 ; 677 : 86-92.
22. Ware RE, Rosse WF, Hall SE. Immunophenotypic analysis of reticulocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 1995 ; 86 : 1586-9.
23. Dertinger SD, Avlasevich SL, Bemis JC, et al. Human erythrocyte *PIG-A* assay: an easily monitored index of gene mutation requiring low volume blood samples. *Environ Mol Mutagen* 2015 ; 56 : 366-77.
24. Wickrema A, Crispino JD. Erythroid and megakaryocytic transformation. *Oncogene* 2007 ; 26 : 6803-15.
25. Phonetheswath S, Franklin D, Torous DK, et al. *Pig-A* mutation: kinetics in rat erythrocytes following exposure to five prototypical mutagens. *Toxicol Sci* 2010 ; 114 : 59-70.
26. Dertinger SD, Phonetheswath S, Franklin D, et al. Integration of mutation and chromosomal damage endpoints into 28-day repeat dose toxicology studies. *Toxicol Sci* 2010 ; 115 : 401-11.

RÉFÉRENCES

27. Dertinger SD, Bryce SM, Phonetheswath S, et al. When pigs fly: immunomagnetic separation facilitates rapid determination of *Pig-a* mutant frequency by flow cytometric analysis. *Mutat Res* 2011 ; 721 : 163-70.
28. Kimoto T, Chikura S, Suzuki K, et al. Further development of the rat *Pig-a* mutation assay: measuring rat *Pig-a* mutant bone marrow erythroblasts and a high throughput assay for mutant peripheral blood reticulocytes. *Environ Mol Mutagen* 2011 ; 52 : 774-83.
29. Ohtani S, Unno A, Ushiyama A, et al. The *in vivo Pig-a* gene mutation assay is useful for evaluating the genotoxicity of ionizing radiation in mice. *Environ Mol Mutagen* 2012 ; 53 : 579-88.
30. Kimoto T, Horibata K, Chikura S, et al. Interlaboratory trial of the rat *Pig-a* mutation assay using an erythroid marker HIS49 antibody. *Mutat Res* 2013 ; 755 : 126-34.
31. Dertinger SD, Phonetheswath S, Avlasevich SL, et al. *Pig-a* gene mutation and micronucleated reticulocyte induction in rats exposed to tumorigenic doses of the leukemogenic agents chlorambucil, thiopeta, melphalan, and 1,3-propane sultone. *Environ Mol Mutagen* 2014 ; 55 : 299-308.
32. Itoh S, Hattori C, Nakayama S, et al. PIGRET assay can detect mutagenicity of ethyl methanesulfonate much earlier than RBC *Pig-a* assay. *Mutat Res* 2016 ; 811 : 102-5.
33. Dertinger SD, Phonetheswath S, Avlasevich SL, et al. Efficient monitoring of *in vivo Pig-a* gene mutation and chromosomal damage: summary of 7 published studies and results from 11 new reference compounds. *Toxicol Sci* 2012 ; 130 : 328-48.
34. Luzzatto L, Bessler M, Rotoli B. Somatic mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a blessing in disguise? *Cell* 1997 ; 88 : 1-4.
35. Labash C, Avlasevich SL, Carlson K, et al. Comparison of male versus female responses in the *Pig-a* mutation assay. *Mutagenesis* 2015 ; 30 : 349-57.
36. Rondelli T, Berardi M, Peruzzi B, et al. The frequency of granulocytes with spontaneous somatic mutations: a wide distribution in a normal human population. *PLoS One* 2013 ; 8 : e54046.
37. Kenyon MO, Coffing SL, Ackerman JI, et al. Compensatory erythropoiesis has no impact on the outcome of the *in vivo Pig-a* mutation assay in rats following treatment with the haemolytic agent 2-butoxyethanol. *Mutagenesis* 2015 ; 30 : 325-34.
38. Krüger CT, Hofmann M, Hartwig A. The *in vitro PIG-A* gene mutation assay: mutagenicity testing via flow cytometry based on the glycosylphosphatidylinositol (GPI) status of TK6 cells. *Arch Toxicol* 2014 ; 2429-43.
39. Chen R, Eshleman JR, Brodsky RA, et al. Glycophosphatidylinositol-anchored protein deficiency as a marker of mutator phenotypes in cancer. *Cancer Res* 2001 ; 61 : 654-8.
40. Dobrovolsky VN, Elespuru RK, Bigger CAH, et al. Monitoring humans for somatic mutation in the endogenous *pig-a* gene using red blood cells. *Environ Mol Mutagen* 2011 ; 52 : 784-94.
41. Bhalli JA, Shaddock JG, Pearce MG, et al. Sensitivity of the *Pig-a* assay for detecting gene mutation in rats exposed acutely to strong clastogens. *Mutagenesis* 2013 ; 28 : 447-55.
42. Labash C, Avlasevich SL, Carlson K, et al. Mouse *Pig-a* and micronucleus assays respond to *N*-ethyl-*N*-nitrosourea, benzo[*a*]pyrene, and ethyl carbamate, but not pyrene or methyl carbamate: Cross-species *Pig-a* and micronucleated reticulocyte assays. *Environ Mol Mutagen* 2016 ; 57 : 28-40.

TIRÉS À PART
T. Orsiere

De la jaunisse à l'hépatite C

5 000 ans d'histoire



2^e édition mise à jour
Jean-Louis Payen



ISBN : 978-2-8425-4136-1 128 pages

La jaunisse est un symptôme facilement identifiable ; il paraissait bien naturel que l'homme, confronté à une modification de la couleur de ses yeux et de sa peau ait de tous temps recherché les causes de cette transformation.

Il n'est donc pas surprenant que le premier traité de médecine, écrit 3 000 ans avant J.C. par un médecin sumérien, décrive déjà la jaunisse. À chaque époque de l'histoire de la médecine, les praticiens, influencés par les concepts médicaux de leur temps, attribuèrent une ou plusieurs explications particulières à ce symptôme. Ainsi, du démon *Ahhâzu* des Sumériens à la sophistication des biotechnologies qui permirent la découverte du virus de l'hépatite C, le lecteur cheminera sur une période de 5 000 ans au travers des différents continents.

Ici encore, l'histoire se révèle une formidable source de réflexion : le foie souvent impliqué dans l'apparition des jaunisses est-il le siège de l'âme ?

Les expérimentations humaines chez des volontaires ou chez des enfants handicapés mentaux étaient-elles justifiées pour permettre la découverte des virus des hépatites ?

Le formidable développement de la transfusion sanguine, des vaccinations, mais aussi de la toxicomanie explique-t-il les épidémies d'hépatites du XX^e siècle ?

Autant de questions qui sont abordées dans ce livre passionnant et accessible à tous.

À retourner à EDP Sciences, 109, avenue Aristide Briand - 92541 Montrouge Cedex
Tél. : 01 41 17 74 05 - Fax : 01 49 85 03 45 - E-mail : francois.flori@edpsciences.org

NOM : Prénom :

Adresse :

Code postal : Ville :

Pays :

Fonction :

Je souhaite recevoir l'ouvrage **De la jaunisse à l'hépatite C, 5 000 ans d'histoire** : 12 € + 3 € de port = **15 € TTC**

en exemplaire, soit un total de €

Par chèque, à l'ordre de **EDP Sciences**

Par carte bancaire : Visa Eurocard/Mastercard

Carte n° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Signature :

Date d'expiration : | | | | | |

N° de contrôle au dos de la carte : | | | |

BON DE COMMANDE

