

Génotoxicité et cancérogenèse

Jean-Claude PAIRON
Université Paris 12

Quelques définitions

- **Agent génotoxique** = agent dont une des activités biologiques (ou de l'un de ses métabolites) peut altérer l'information génétique codée par l'ADN.
- **Agent clastogène** = agent pouvant provoquer des cassures chromosomiques
- **Agent mutagène** = agent pouvant provoquer des mutations

Classification des agents cancérogènes

Classification des agents cancérogènes controversée +++

- Mécanismes génotoxiques :

- action directe sur l'ADN cellulaire

- Mécanismes non génotoxiques ou épigénétiques

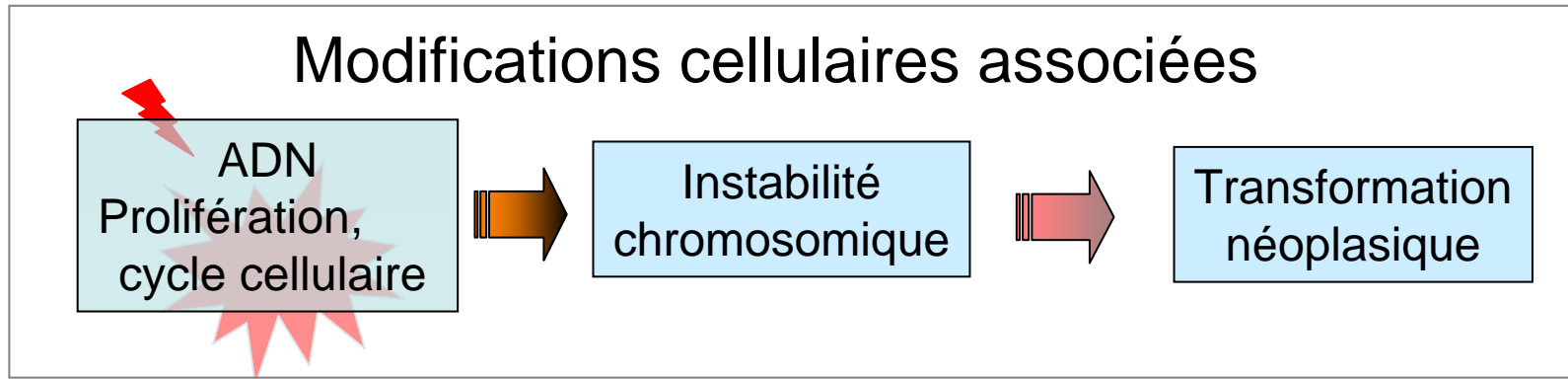
- Pas de modification structurale de l'ADN (séquence nucléotidique préservée)
- Expression de gènes pouvant être modifiée
- Modifications biochimiques (hyperméthylation de régions promotrice, synthèse d'ARN, régulation activité enzymatique...)
- Modifications morphopathologiques (inflammation, hyperplasie...)
- Modifications immunitaires...

Agents génotoxiques

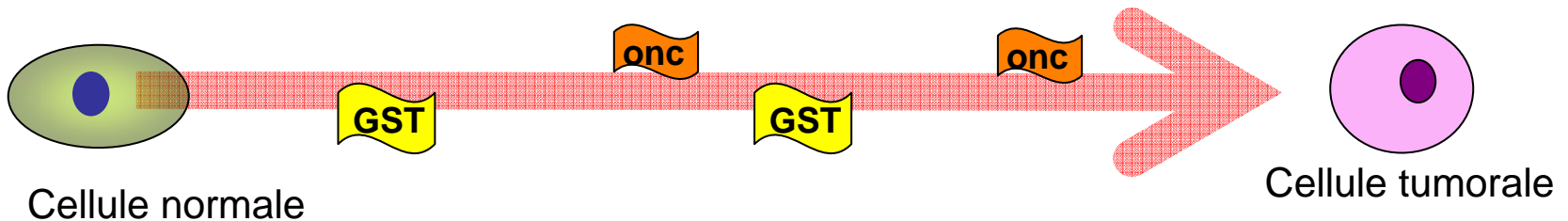
- Radiations ionisantes
- Rayonnements ultraviolets
- Fumée de tabac
- Certaines substances chimiques
 - amiante,
 - HAP,
 - Amines aromatiques,
 - métaux (chrome hexavalent, arsenic, cadmium, mercure, nickel, plomb),
 - espèces radicalaires,
 - insecticides organochlorés, hydrocarbures halogénés

Cancérogenèse

- **La cancérisation d'une cellule est un processus multi-étapes**

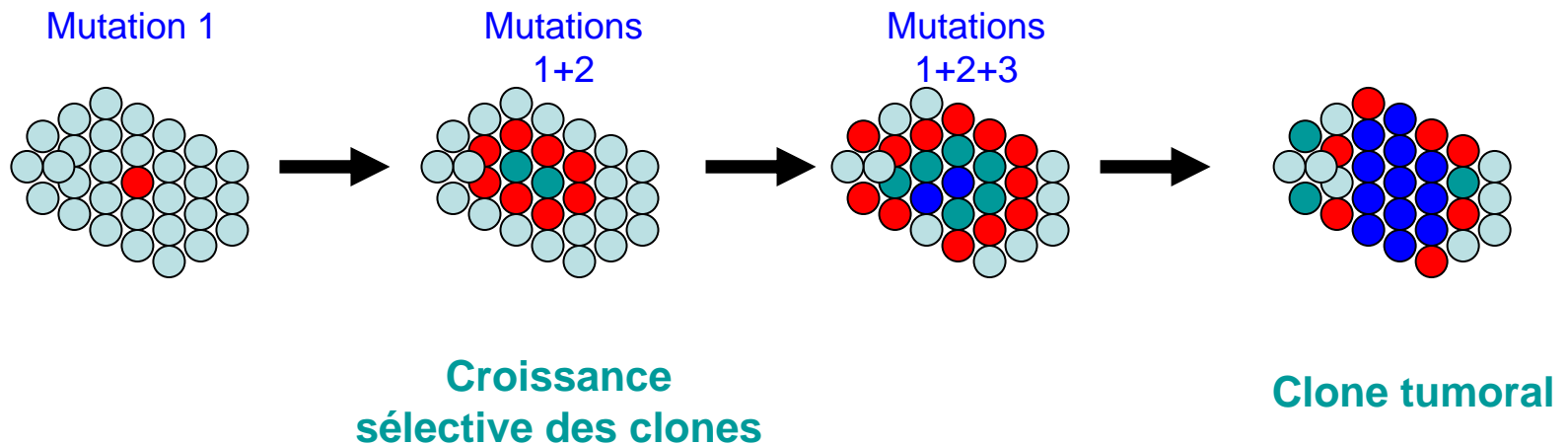


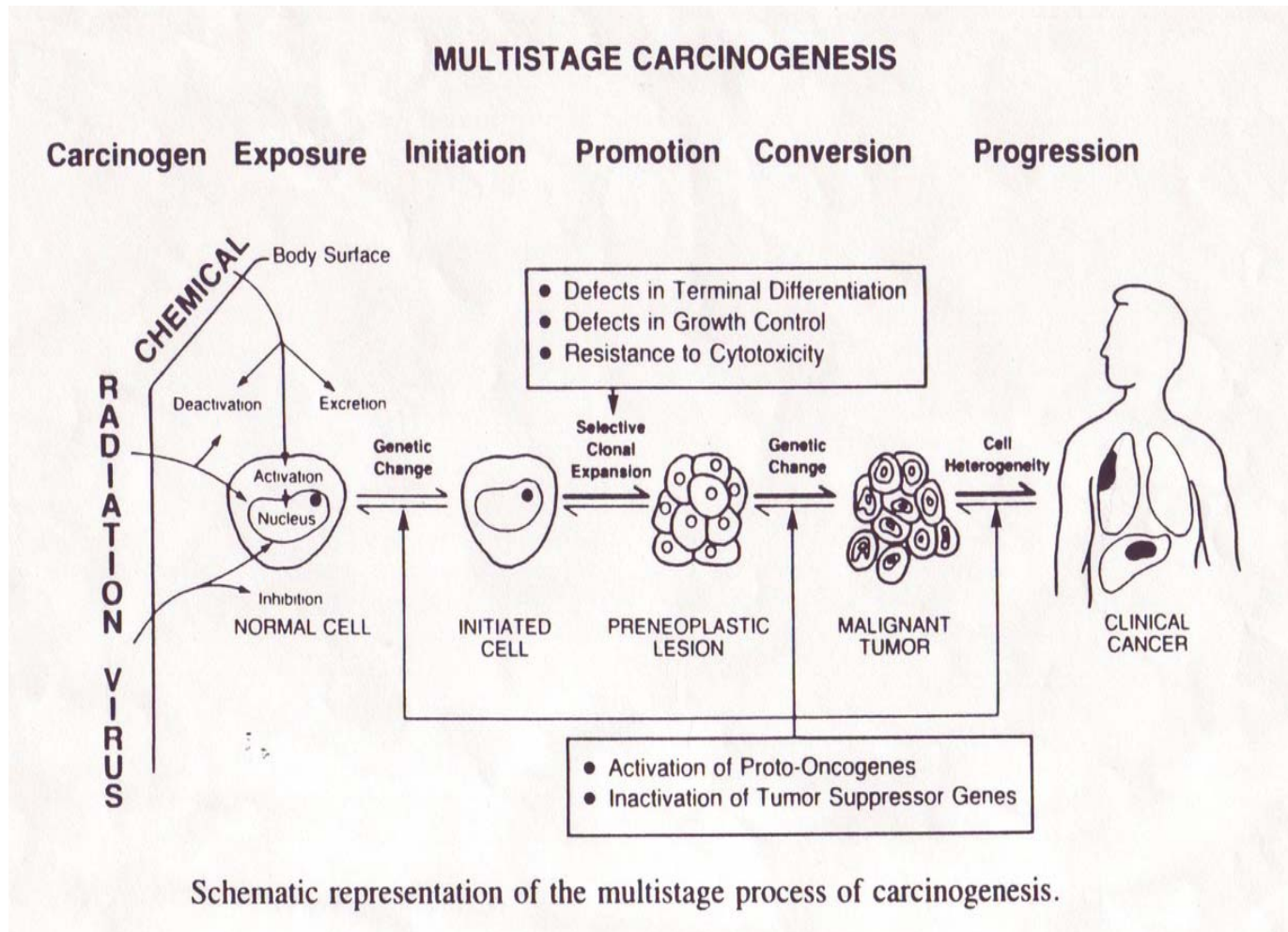
- Plusieurs gènes (oncogènes, suppresseurs de tumeur) sont altérés (mutations, méthylation) au cours du processus tumoral.



Cancer

- Rupture de l'homéostasie cellulaire
- Processus clonal multi-étape => Evolution clonale





From : CC Harris. Molecular epidemiology : overview of biochemical and molecular basis
 In : Molecular dosimetry and human cancer. JD Groopman, PL Skipper, 1991

Cancérogénèse

- Etapes d'initiation

- Produit électrophile = lésion ADN
- Lésion non réparée + multiplication \Rightarrow mutation
- Activation de proto-oncogènes
- Inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs

- Etapes promotion

- Stimulation de la prolifération cellulaire
- Inhibition d'apoptose
- Cellule initiée \Rightarrow lésion pré-tumorale

- Progression

- Instabilité génétique = mutations + prolifération cellulaire
Lésion pré-tumorale \Rightarrow Tumeur maligne \Rightarrow métastases

Altérations de l'ADN induites

- Agents chimiques

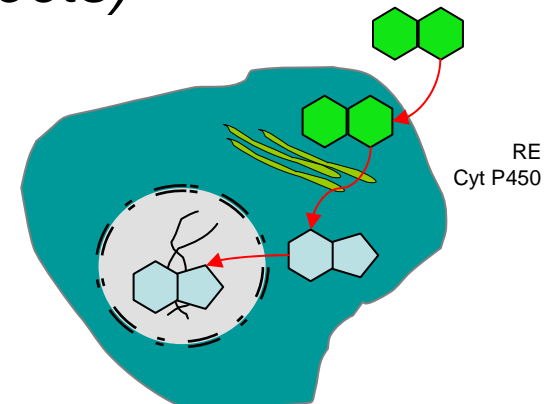
- à *action directe*

- Agents alkylants (MMS, EMS)
 - Agents intercalants
 - DNA-DNA cross links ; liaisons inter-brins, intra-brins (mitomycine, cis-platine)
 - DNA-protéines (agents alkylants, UV, RI)
 - Déamination (N₂O, sodium bisulfite)

- à *action indirecte (cancérogènes indirects)*

- Activation métabolique

- (AAF, B[a]P, DMBA, aflatoxines)



Altérations de l'ADN induites

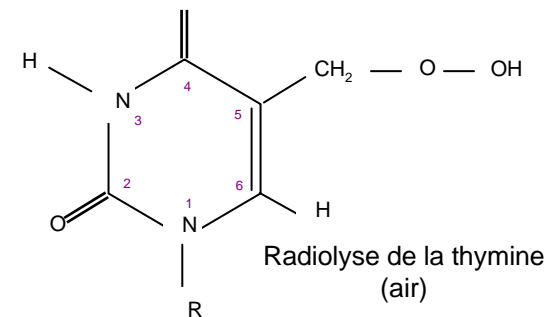
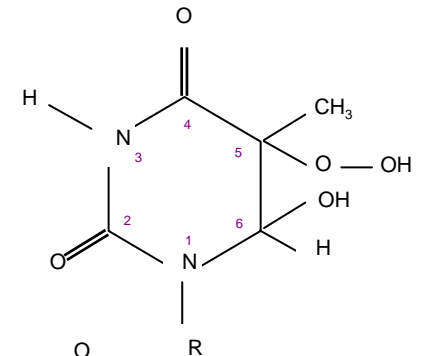
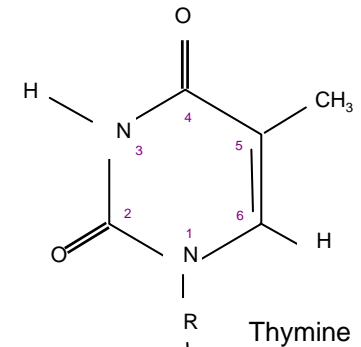
- Agents physiques

- Ultraviolets

- UV B : dimères de pyrimidine (T-T ou T-C)
 - UV A : production de radicaux oxygénés

- Radiations ionisantes

- Endommagement des bases (radiolyse de la thymine ; destruction du groupe imidazole des purines...)
 - Cassures (liaisons phosphodiester)



Méthodes d'évaluation de la génotoxicité: « endpoints »

- Mise en évidence des lésions
 - Cassures, alkylation, mutation, conséquence fonctionnelle de la mutation ...
- Détection d'aberrations chromosomiques
 - Numériques et structurales
- Transformation cellulaire
 - Sur cellules de mammifères
- Cancérogénicité
 - Etudes *in vivo*

Méthodes d'évaluation de la génotoxicité

- Altérations de l'ADN
 - Modification de bases
 - Anticorps (adduits de B[a]P)
 - Hydroxylation de bases (chromatographie, immunocytochimie)
 - Mutations
 - Séquençage de l'ADN
 - Conséquence fonctionnelle de la mutation
 - Cassures
 - Elution alcaline
 - Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE assay, COMET)

Méthodes d'évaluation de la génotoxicité

- Anomalies chromosomiques

Détection d'un effet aneugène (anomalies du nombre de chromosomes) ou clastogène (cassure / clivage des chromosomes)

- Anomalies numériques

- Cellules en métaphase, micronoyaux

- Anomalies structurales

- Aberrations (gaps, cassures, chromosomes retardés, ponts inter-chromosomiques)
- Micronoyaux
- Echanges de chromatides sœurs

Actuellement, il est admis que pour une large majorité d'agents cancérigènes chimiques, il existe une réaction entre le cancérigène ultime et l'ADN



Développement de tests à court terme de génotoxicité
(à partir de 1975 +++)

Objectifs :

- tests simples,
- coût peu élevé,
- facilement disponibles,
- facilement interprétables.

Pourquoi des tests à court terme ?

- Latence des processus de cancérogénèse :
10 à 40 ans
→ nécessité d'évaluation précoce d'un potentiel cancérogène
- Coût des études expérimentales (in vivo) +++
- Elucider le mécanisme d'action d'une molécule donnée

Tests à court terme

- Classification des tests :
 - selon le modèle cellulaire employé : bactéries, cellules de mammifères, cellules humaines...
 - selon le type de test :
 - Dommages primaires de l'ADN,
 - Mutations géniques (mutagénèse),
 - Aberrations chromosomiques.

A part : tests de transformation cellulaire

- Génotoxique direct versus après activation
Utilisation de la fraction S9

Tests à court terme

On distingue :

1 – Les dommages primaires du DNA

2 – Mutations géniques

3 – Effets chromosomiques

4 – Transformation cellulaire

Tests à court terme

Dommmages primaires du DNA

- Liaison covalente à l'ADN (adduits),
- Inductions de cassure de l'ADN/réparation (ex: SOS chromotest),
- Survie de bactéries déficientes en mécanisme de réparation de l'ADN
- Test des comètes.

Tests à court terme

Mutations géniques

- Altérations héréditaires de phénotype ou génotype : substitution, « frameshift »

Ex : Ames – perte de production d'un gène, changement de fonction par mutation reverse...

Peuvent concerner le génome nucléaire, mitochondrial ou plasmidique

Tests à court terme

Effets chromosomiques

- Nombre de chromosome (aneuploïdie),
- Structure des chromosomes (aberrations chromosomiques),
- Echanges de chromatides sœurs (SCE),
- Micronoyaux,
- Test de dominance létale.

Tests à court terme

Transformation cellulaire

- Simulation des étapes essentielles de la cancérogenèse cellulaire.
- Production de cellules prénéoplasiques ou néoplasiques en culture.

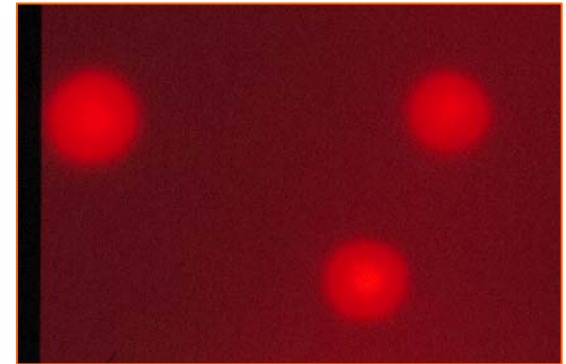
Types de tests à court terme / classification

	Activité génétique			Transformation cellulaire
	Dommages primaires de l'ADN	Mutation	Effets chromosomiques	
Procaryotes	SOS chromotest	Ames		
Levures/végétaux				
Insectes		Drosophile		
Cellules de mammifères (in vitro)	UDS Comètes	HPRT Thymidine Kinase	Aberrations chromosomiques (AC) Micronoyau	+
Cellules de mammifères (in vivo)	UDS Adduits	HPRT Thymidine Kinase Spot test souris	AC Micronoyau	
Homme (in vivo)	UDS Adduits		AC Micronoyau	

PRINCIPE DU TEST DES « COMÈTES »

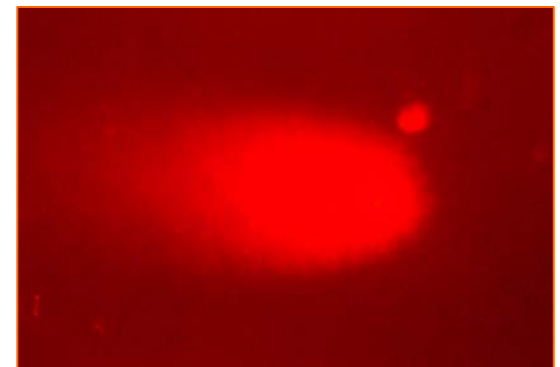
Single Cell Gel Electrophoresis assay

- Traitement des cellules ; marquage par de l'iodure de propidium
- Dénaturation alcaline - Electrophorèse
- Microscopie en fluorescence
- Analyse d'image (Fenestra Komet) ; 150 cellules au hasard
- Test Mann Whitney



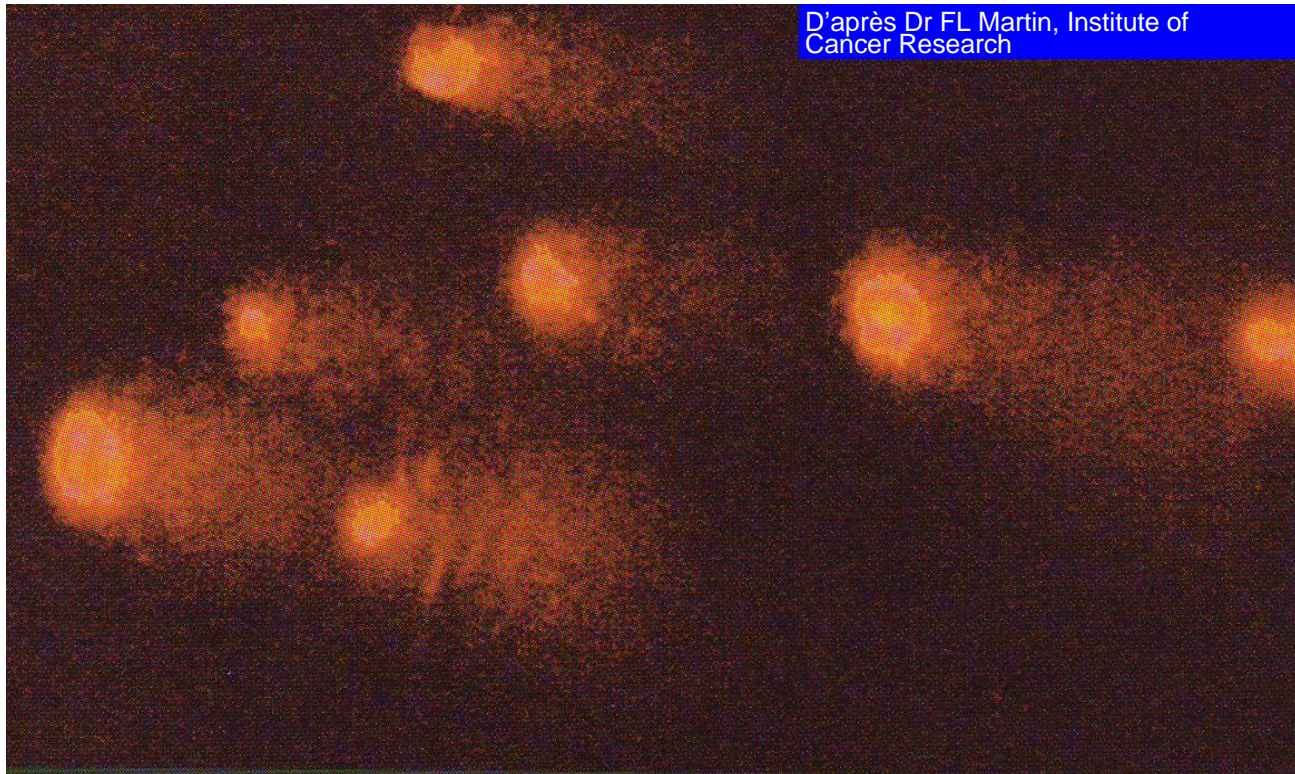
Paramètres déterminés :

- **Longueur de la queue de la comète** = distance entre le bord du noyau et l'extrémité de la queue
- **Pourcentage d'ADN** dans la tête et dans la queue par rapport à l'ADN total
- **Moment de la queue de la comète** = longueur de la queue x % d'ADN
- **MTM** = moyenne arithmétique des moments



Détection de cassures

Test des comètes



Fragments d'ADN nucléaire de cellules épithéliales de cancer du sein

Test d'Ames

Salmonella Typhi murium

- souches rendues histidine dépendantes (incapables de proliférer en milieu dépourvu d'histidine)

- . rfa + (perméabilité)
- . UVR B + (réparation)
- . pKM 101 ± (sensibilité à certains mutagènes)

- substitution	}	TA 100	TA 102	TA 104	TA 1535
frameshift	}	TA 97	TA 98	TA 1537	TA 1538

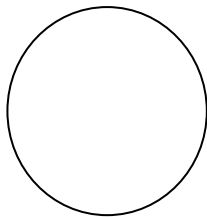
Salmonelles **HIS -**

± S9 + NADP (cofacteur P450)

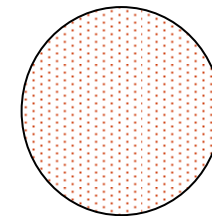
+ X (C1, C2, C3), ou Témoin+ ou Témoin-

en milieu dépourvu d'histidine

48 h à 72 h



Pas de mutation
HIS -



Mutation
HIS +

(test dit de **mutation reverse**)

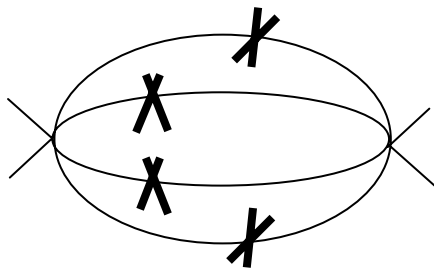
Résultat à rapporter aux bactéries survivantes

Limites des tests de mutagenèse (Ames)

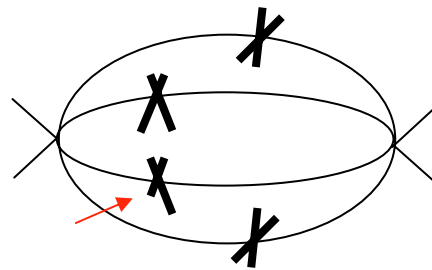
- 1 – Pas de relation quantitative
 - Pouvoir mutagène sur bactéries / intensité de l'effet cancérogène sur organisme supérieur
- 2 – Ne détectent pas les cancérogènes ne produisant pas de lésion sur l'ADN (hormone)
- 3 – Ne détectent pas les « promoteurs »
- 4 – Ne détectent pas les cancérogènes agissant sur le nombre et la répartition des chromosomes
- 5 – « Simplification » excessive (ex : métabolisation...)

Tests sur cellules : micronoyau

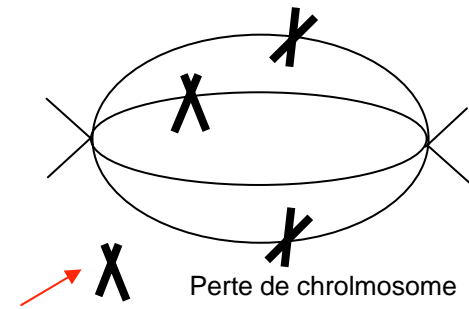
- Test mettant en évidence un effet clastogène/aneugène
 - Incubation des cellules avec la substance à tester (24h)
 - Addition de cytochalasine (prévention de la cytokinèse)
 - Etalement des cellules sur lame de verre
 - Analyse des noyaux (coloration)



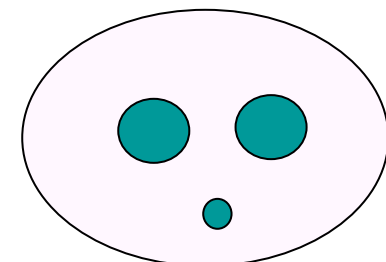
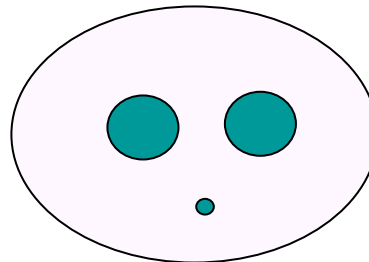
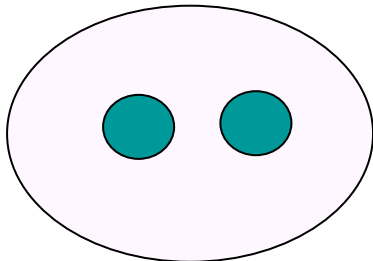
Contrôle



Cassure de chromosome



Perte de chromosome



Test du micronoyau (1)

Moelle osseuse in vivo (souris)

Sang périphérique

Principe

. Des cellules en division sont soumises à un produit x à tester

→ Lésions de chromosomes

Mitoses → morceau de chromosome ou chromosome isolé ⇒ micronoyau

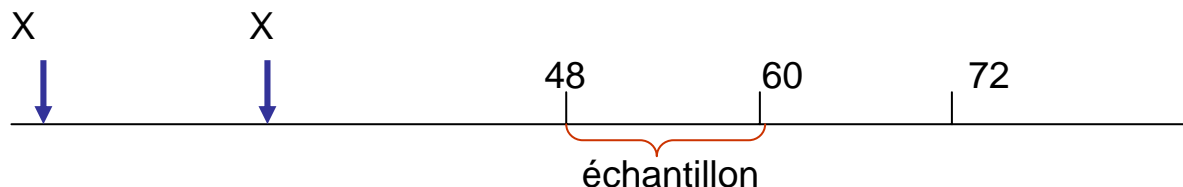
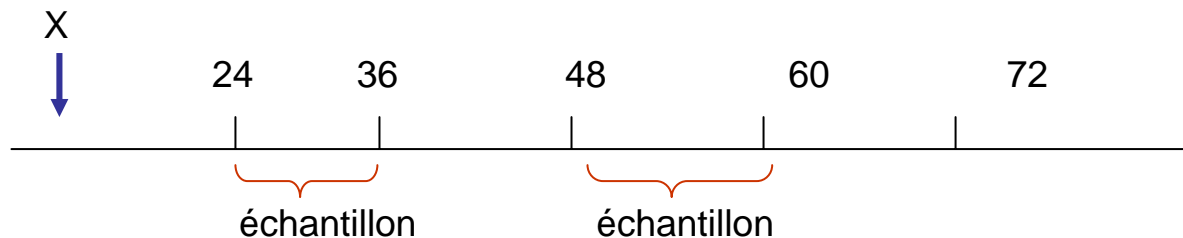
. Détermination des micronoyaux dans les érythrocytes néoformés (polychromatophiles: PCE) : témoins des dommages chromosomiques ou de l'aneuploïdie induite par X

Test

. In vivo Moelle osseuse

Souris +++ (rat, hamster chinois)

2 sexes



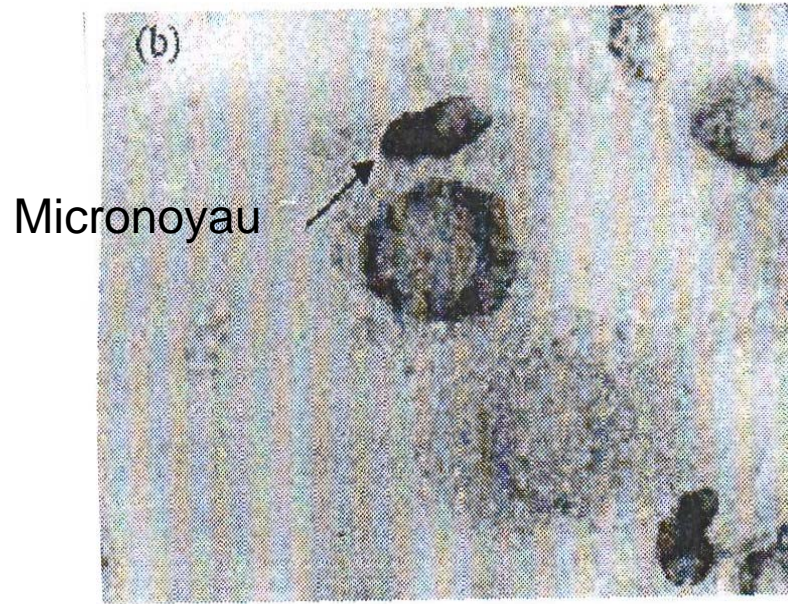
Test du micronoyau (2)

Comptage des micronoyaux sur PCEs

(au moins 20 000 PCEs/sexe/dose donc 2000/animal)

- IN VIVO sang périphérique
idem avec 24 H de délai supplémentaire
NB : PCEs = 5 % des érythrocytes
si 1 %, toxicité médullaire
- EX VIVO
- IN VITRO

Test du micronoyau (3)



D'après Wei et al, J. Radiat Res, 2006

Transformation cellulaire

Principe :

- production de cellules prénéoplasiques ou néoplasiques en culture, sous l'action du composé testé
- simule les étapes essentielles de la cancérogénèse. La transformation cellulaire n'implique pas nécessairement une modification génétique
- le plus souvent : test morphologique (aspect des colonies – perte de l'inhibition de contact)

Injection des cellules à l'animal → production de tumeurs

Transformation cellulaire

Réalisation : Fibroblastes

cellules SHE (hamster), BALB 3T3 (souris) C3H10T1/2 (souris),
BHK21CL13 (hamster)

Composé X à tester
C1, C2, C3 ± S9

7-10 jours

Morphologie des
colonies en milieu
liquide

4-8 semaines

comptage des foyers
de transformation sur
la monocouche (perte
de l'inhibition de contact)

3 semaines

colonies en agar

A noter : 80 % des cancers proviennent de cellules épithéliales

Interprétation des tests

Plusieurs éléments :

- Aucune batterie de tests idéale
- Bien connaître les pièges des tests à court terme
- Signification du test + : indicateur d'un potentiel génotoxique dans les conditions du test

MAIS

- Quelle est la capacité du produit testé à produire un effet in vivo ou chez l'homme ?
(inactivation du produit, concentration à l'organe-cible, diffusion, métabolisme préalable, atteinte de l'organe...)
 - Signification d'un test \oplus obtenu uniquement à la forte dose ?
 - inhibition index mitotique $\geq 50 \%$
- et/ou - limite de solubilité atteinte
- et/ou - cytotoxicité $\geq 50 \%$

Test à court terme

Surtout utiles pour les génotoxiques

≥ 100 tests actuellement

Recommandations IARC

- Système utilisé valide pour la substance à étudier (Cf animal, structure chimique → structures chimiques d'alerte)
- Système métabolique approprié, durée d'exposition, dose suffisante
- Témoin approprié
- Pureté du composé testée (ou mélange connu représentatif)

Confiance dans résultat (+) si :

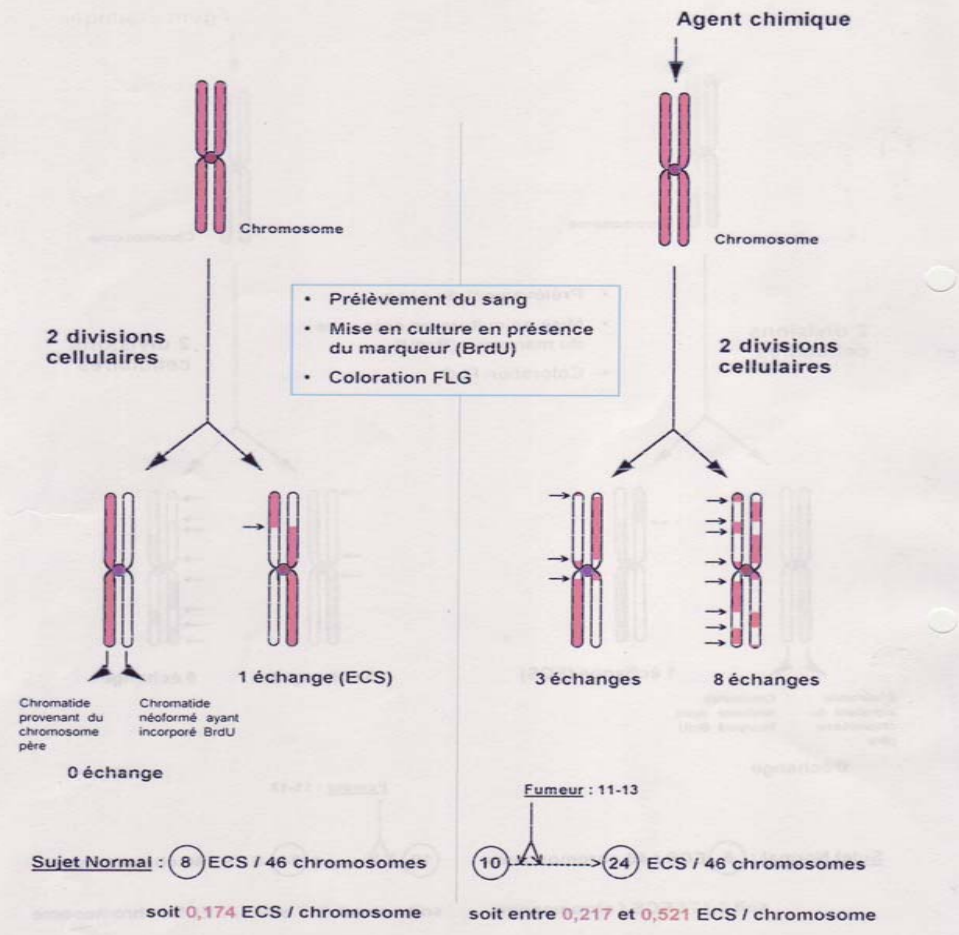
- relation dose-réponse,
- Plusieurs études indépendantes (+)

Tests de génotoxicité

« organisme »	Dommmage primaire de l'ADN	Mutation génique	Aberrations chromosomiques	Transformation cellulaire
Bactérie	SOS chromotest	Ames		
Champignons Levures Plantes Insectes				
Culture de cellules (in vitro)	comètes	HPRT	AC micronoyau	
Cellules in vivo (de mammifères)	Adduits Cassures ADN simple brin	HPRT	AC micronoyau	
Humain	Adduits comètes		AC micronoyau	



Echange Chromatides Soeurs



Echanges de chromatides-soeurs (sur CHO, V79, lymphocytes)

• Principe : **représentation cytologique indirecte de lésions de l'ADN**

- Sang périphérique → isolement des lymphocytes
- Mise en culture avec un mitogène (PHA) + 5-bromodeoxyuridine durant 2 cycles cellulaires
- Blocage des mitoses (colchicine) en métaphase. Choc hypotonique → étalement des chromosomes

Coloration (agent fluorescent Hoechst + UV + May Grunwald Giemsa)

→ comptage des échanges de chromatides soeurs (ECS), témoignant d'une cassure de l'ADN double brin avec permutation des chromatides (coloration différentielle)

- Application :
 - In vitro (cellules traitées par X)
 - In vivo chez l'animal
 - In vivo chez l'homme (après exposition à X)
- Expression des résultats.
 - Comptage sur ≥ 50 métaphases
 - millions ECS / métaphase (N = 7 à 10)
 - Cellules à haute fréquence de SCE (HFC) (sur 80 métaphases)

Pièges des tests à court terme

1 – Problèmes liés à l'agent testé

- pureté +++
- stabilité dans le solvant employé
- stabilité dans le milieu de culture (T50 à connaître)
- modifications induites du pH du milieu, de la P osmotique, cytotoxicité

2 – Conditions de traitement

- durée de traitement, dose
- nombre d'administration

Pièges des tests à court terme

3 – Type de test → limites propres

- Ames

Faux négatifs

- produits agissant sur la division cellulaire (vinblastine)
- produits agissant après fixation sur un récepteur (DES)
- produits qui déplètent en HIS (cadmium)

Le test ne peut pas détecter les produits contenant de l'HIS ou du TRP, ou intervenant dans la synthèse de ces acides aminés, ou les bactéricides !

- AC

Le résultat dépend du type cellulaire

Etude expérimentale de cancérogénèse

Réalisation pratique

- Importance +++ de :
 - La caractérisation précise de l'agent étudié (en particulier dans l'expérience d'inhalation),
 - Monitoring de la dose administrée,
 - Dose administrée : survie traités/contrôles (toxicité),
 - 2 sexes étudiés,
 - Randomisation,
 - Durée d'observation.

Des tumeurs bénignes peuvent être combinées aux tumeurs malignes dans l'évaluation lorsqu'elles représentent une étape dans la progression vers la malignité.

Etudes expérimentales de cancérogénèse

- Des tumeurs bénignes et malignes peuvent survenir en l'absence d'exposition
- Plusieurs types différents de tumeurs se développent spontanément dans les 2 sexes chez le rat et la souris, mais à des taux différents
- Le « bruit de fond » des tumeurs d'une espèce peut être inhabituel dans une autre espèce (ex : adénome testicule = fréquent chez rat male, rare chez souris male ; tumeurs hépatiques 10 fois plus fréquentes chez la souris male que le rat male)
- Variation du « bruit de fond » des tumeurs selon le sexe dans une même souche d'une espèce donnée (ex : phéochromocytome rat male F344 = 7 fois plus fréquent que rat femelle)
- Variation du bruit de fond tumoral inter-essais
→ importance des témoins +++

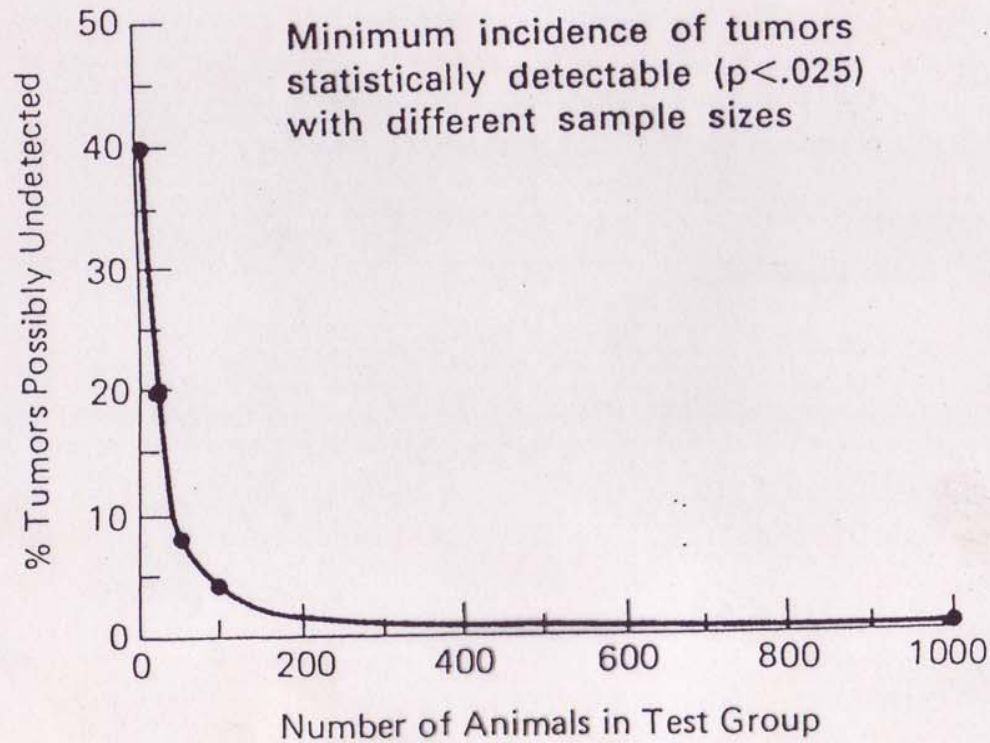


Figure 2-9. Statistical limitations in the power of experimental animal studies to detect tumorigenic effects.

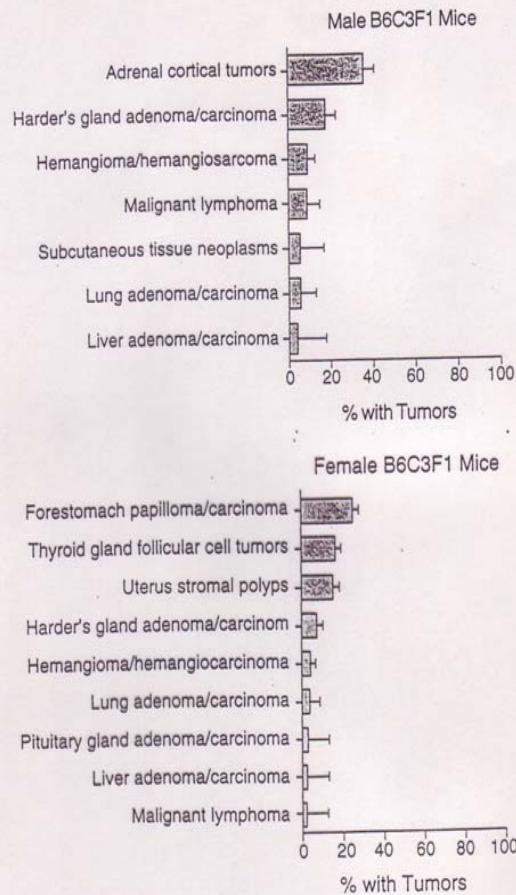


Figure 2-11. Most frequently occurring tumors in untreated control mice from recent NTP 2-year rodent carcinogenicity studies.

The values shown represent the mean \pm SD of the percentage of animals developing the specified tumor type at the end of the 2-year study. The values were obtained from 30 different studies involving a total of between 1447 and 1474 animals per tumor type.

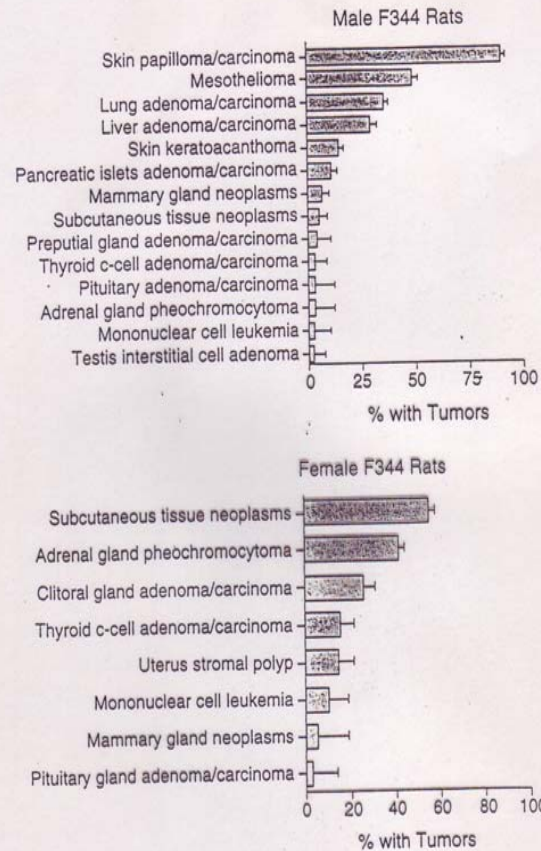


Figure 2-10. Most frequently occurring tumors in untreated control rats from recent NTP 2-year rodent carcinogenicity studies.

The values shown represent the mean \pm SD of the percentage of animals developing the specified tumor type at the end of the 2-year study. The values were obtained from 27 different studies involving a combined total of between 1319 and 1353 animals per tumor type.

Etudes expérimentales de cancérogenèse

Points-clés de l'interprétation

- 1 – nombre suffisant d'animaux par groupe
- 2 – schéma d'administration : dose suffisante (concentration, durée)
- 3 – exposition suffisante du tissu cible par la technique employée
- 4 – tumeurs histologiquement comparables à l'homme
- 5 – relation dose-réponse
- 6 – anomalies pulmonaires associées (fibrose ?...)