



Cytotoxicité, génotoxicité : approche comparative entre rayonnements ionisants et autres agents génotoxiques

→ Doses seuil

Dr Fabrice Nessler

**Institut Pasteur de Lille
Toxicologie Génétique**

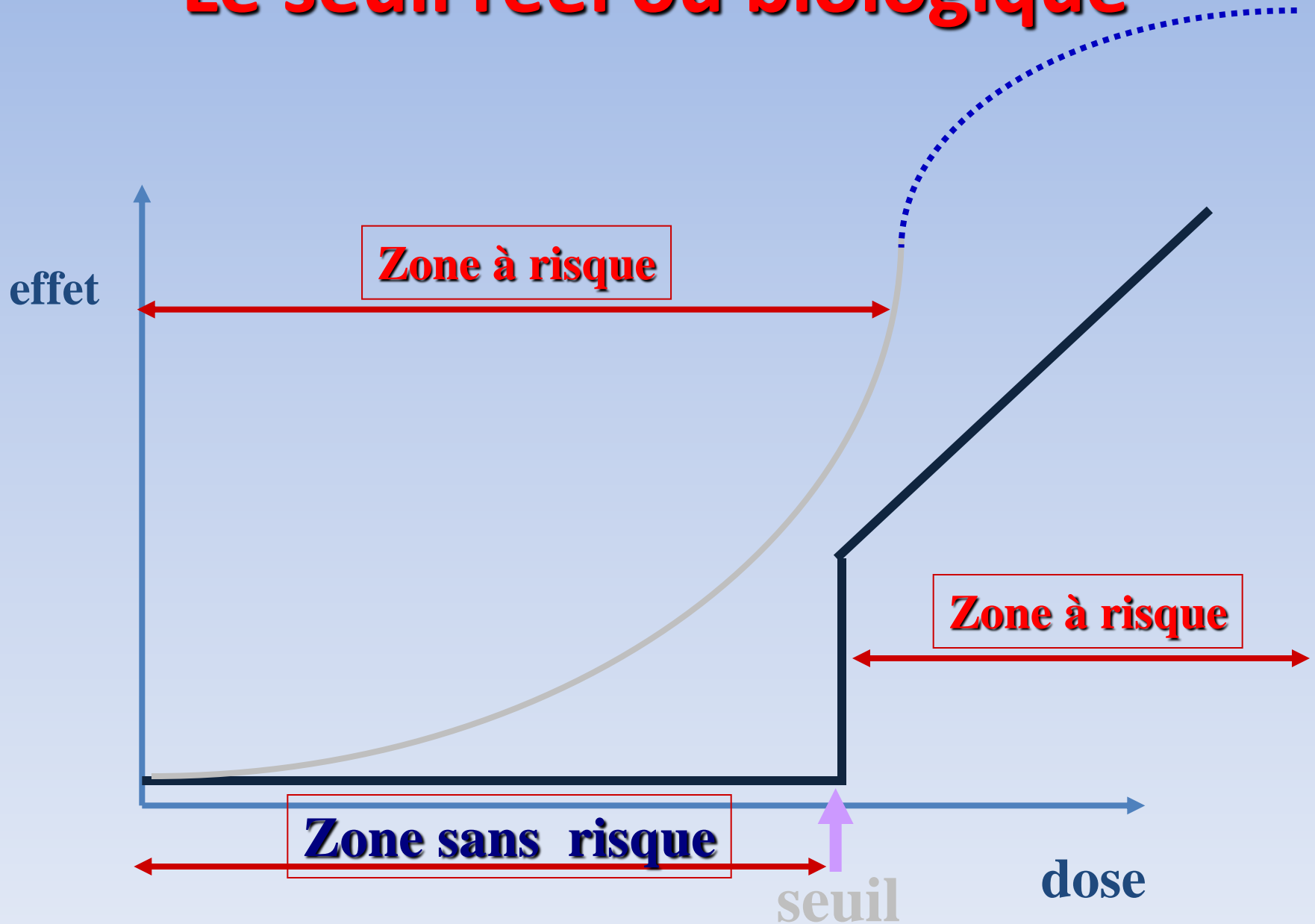
Intuition du seuil en mutagenèse

- Ernst Fress 1973

Un seuil pour des mutations **devrait se produire** car:

- **Distribution** dans les tissus affectée par ADME et génétique
 - *Ex: des peroxydes peuvent être détruits avant d'atteindre le noyau par la peroxydase ou la catalase*
- Pourrait **se fixer sur des cellules** proches du point d'administration et ne pas atteindre les cellules cibles
- « **L'activation ou la destruction** du produit peut nécessiter des *enzymes induits par lui-même* »

Le seuil réel ou biologique



Mécanismes de génotoxicité à seuil

1995 : Elhajouji *et al.* démontrent un seuil pour la perte de chromosomes

1997 : Elhajouji *et al.*

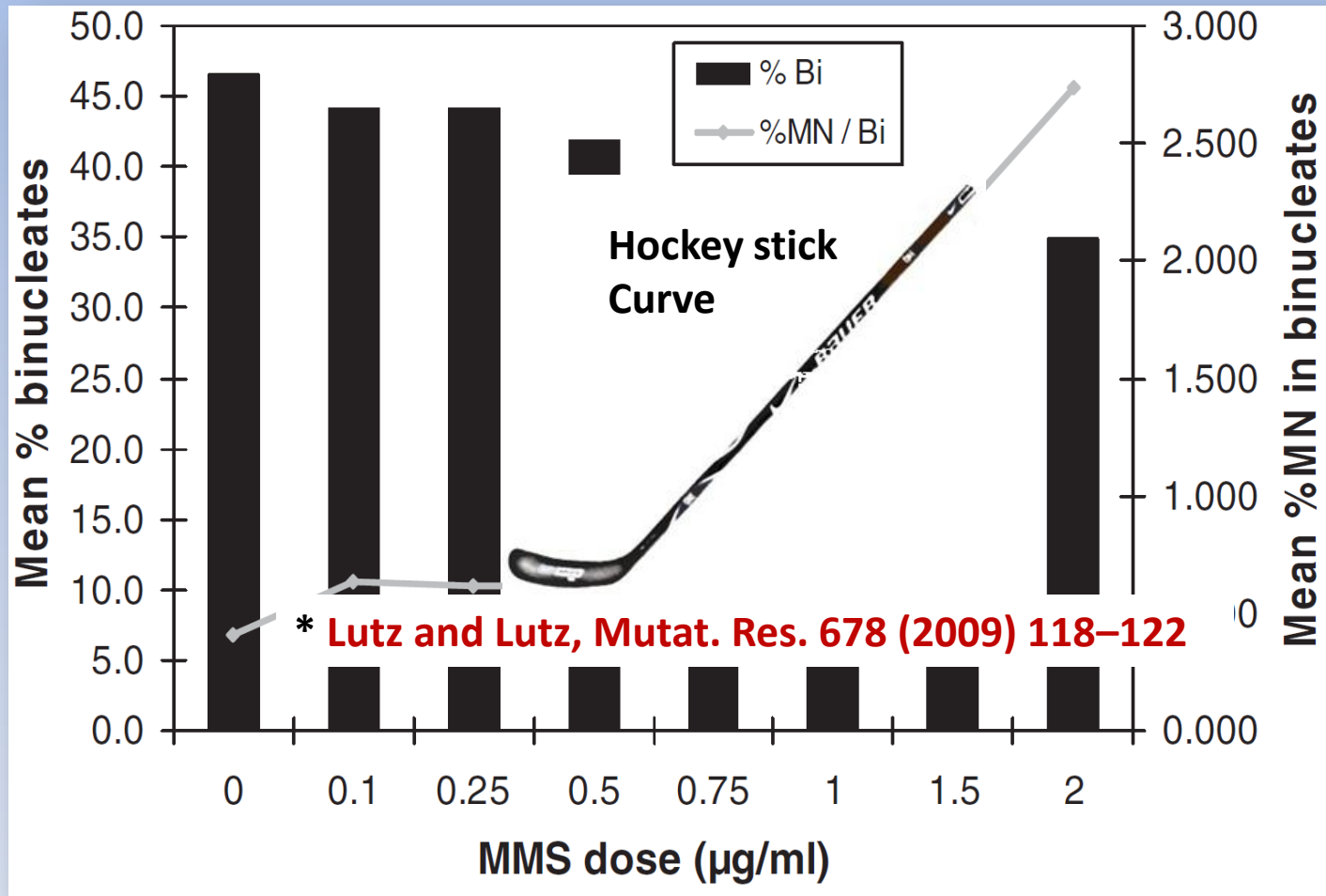
Seuil pour la non-disjonction à doses + faibles que pour la perte de chromosome

Produit	Perte de chromosome	Non-disjonction
	µM	µM
Colchicine	0,033	0,02
Mebendazole	0,29	0,23
Carbendazime	2,47	2,85
Nocodazole	0,053	0,032

Seuil pour les agents alkylants ?

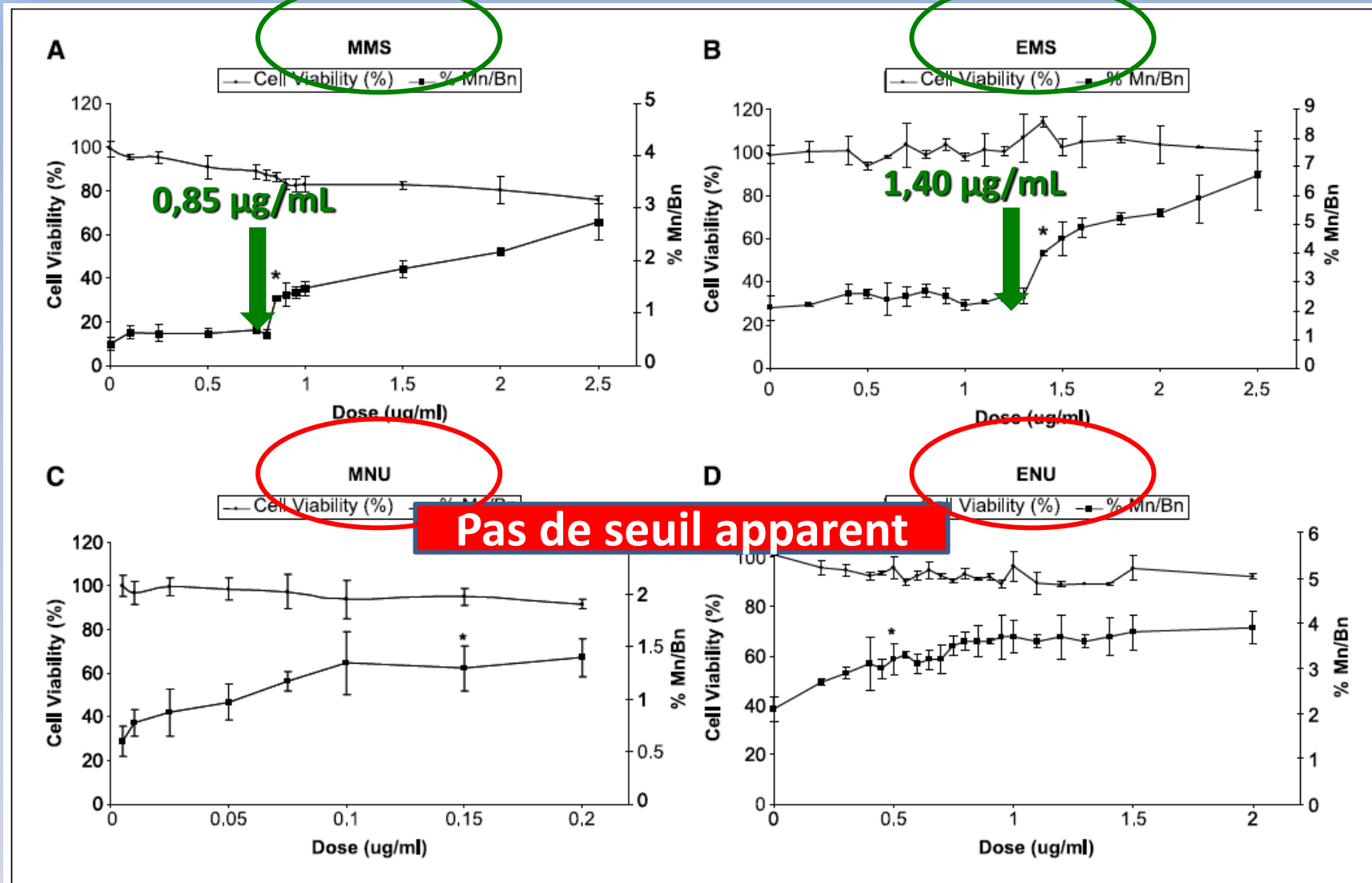
Premiers éléments

MMS : micronoyaux *in vitro* sur cellules MCL-5

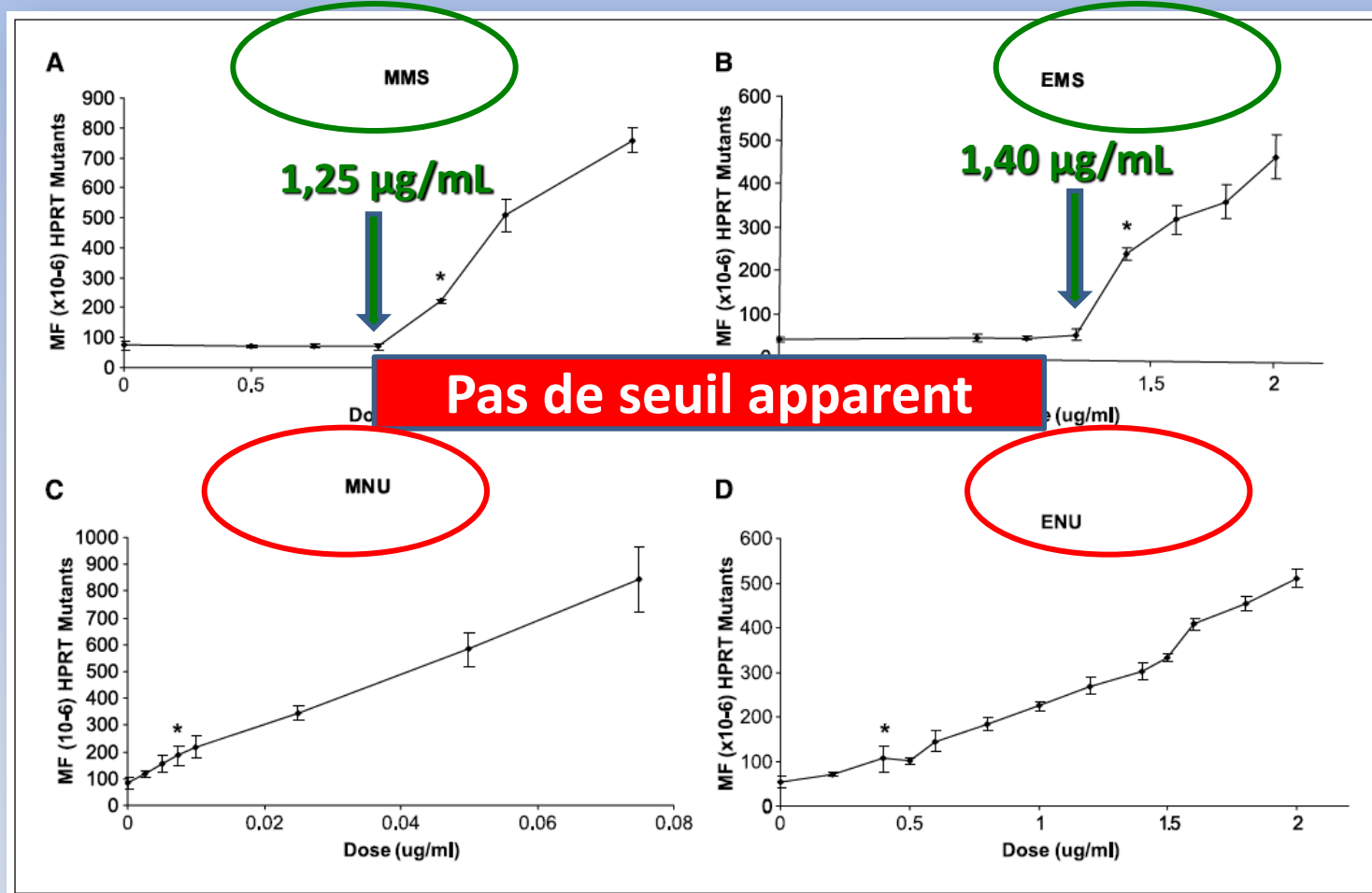


Cytokinesis-blocked micronucleus data from MMS exposed MCL-5 cells
Jenkins et al., 20 Mutagenesis (2005) 389–398

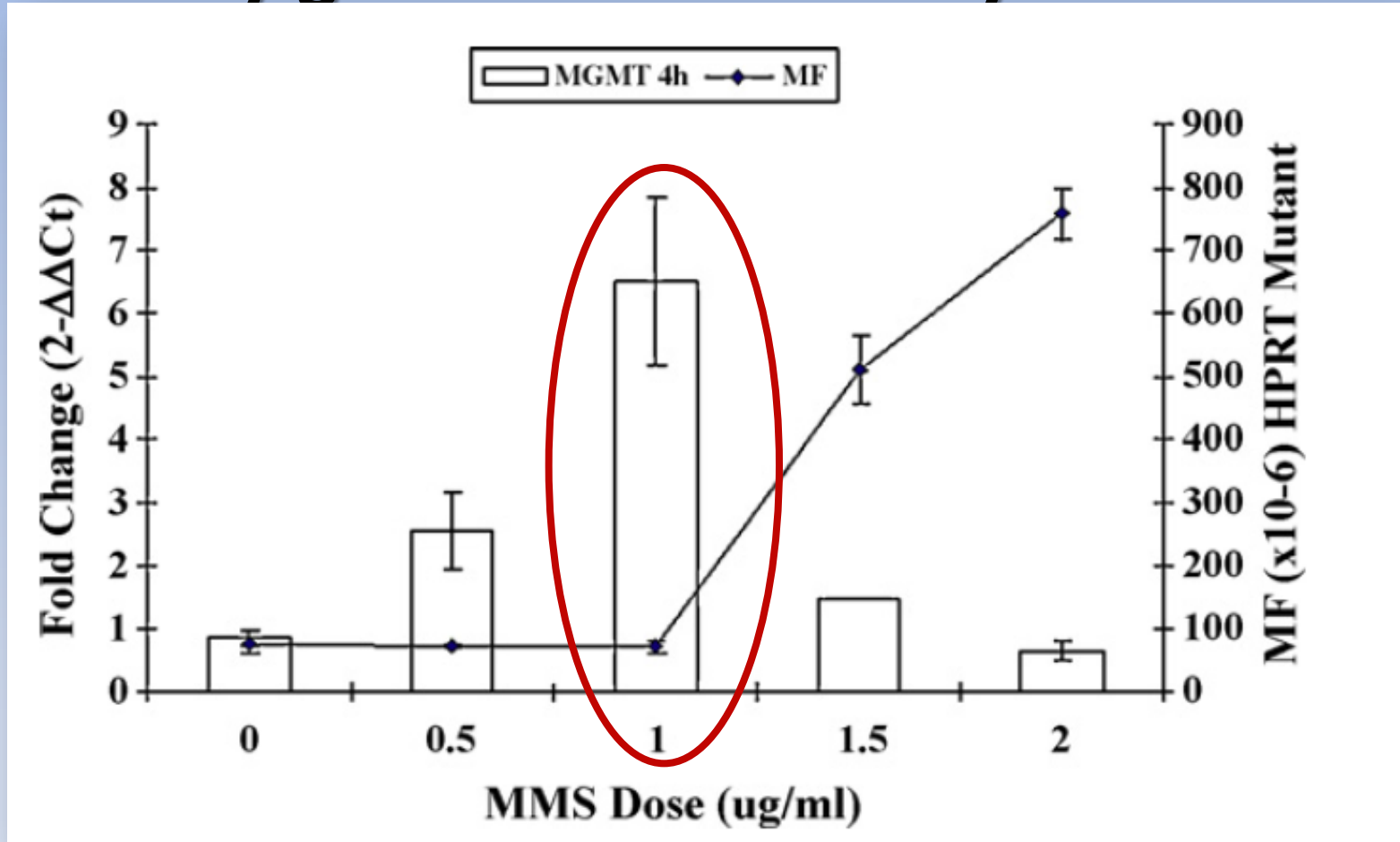
Premiers éléments micronoyaux *in vitro* sur cellules AHH-1



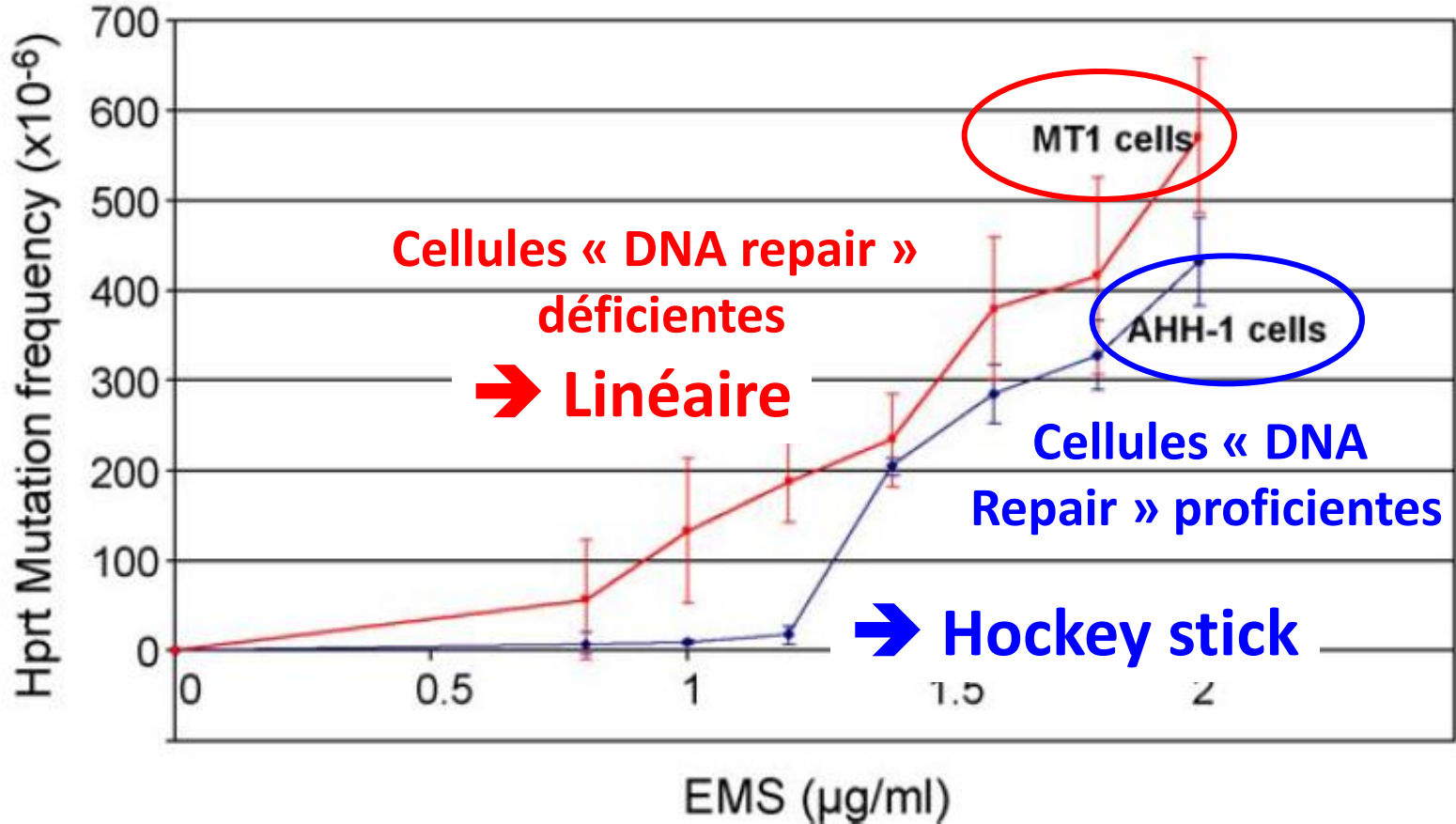
Mutations HPRT *in vitro*



MMS induit O⁶-methylguanine DNA méthyltransférase



Effets de la réparation de l'ADN



Jenkins et al. Toxicology 278 (2010) 305–310

Implication de la MGMT (réparation adduits O⁶-méthylguanine) aux doses ≤ NOGEL (Thomas *et al.*, Mars 2013)

L'«Affaire Viracept»

- Nelfinavire, médicament antisida (Roche)
- Mars 2007 – Mai 2007
- Lots de contaminés par EMS (Ethinylestradiol, Norethisterone, sulfonate)
- 29 pays touchés (Australie, Belgique, Canada, Danemark, Espagne, France, Irlande, Italie, Japon, Pays-Bas, Royaume-Uni, Suède, Suisse, etc., R, E, GB)
- ~ 45 000 patients traités pendant 3 mois
- Ni EMS, ni sulfonate dans le Viracept

→ Existe-t-il un risque pour ces patients?

• Dose maximale calculée d'EMS :
3000 mg (3000 mg x 0.00092)
soit 0,055 mg/kg (50 kg patient)

Stratégie Roche

- **2 Produits étudiés : EMS et ENU**
 - **Mutagenèse**
 - **Micronoyaux moelle osseuse** 7 jours de traitement (+ adduits Hb)
 - **Souris transgéniques** (+ adduits Hb)
 - 1 traitement
 - 28 jours de traitement
 - **Exposition : adduits éthylvaline sur l'hémoglobine**
 - ***In vitro* EMS** sang souris – singe – homme
 - ***In vivo* EMS** souris – singe – rat
 - ***In vivo* comprimés** Viracept contaminés singe
 - **Modèle cinétique** de l'EMS et adduits EMS-Hb
- ➔ Extrapolation exposition homme**

Micronoyaux dans la moelle osseuse chez la souris

Schéma d'étude

Jour 8: prélèvement

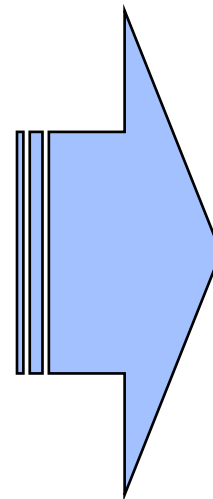
Jour 1



7 traitements quotidiens

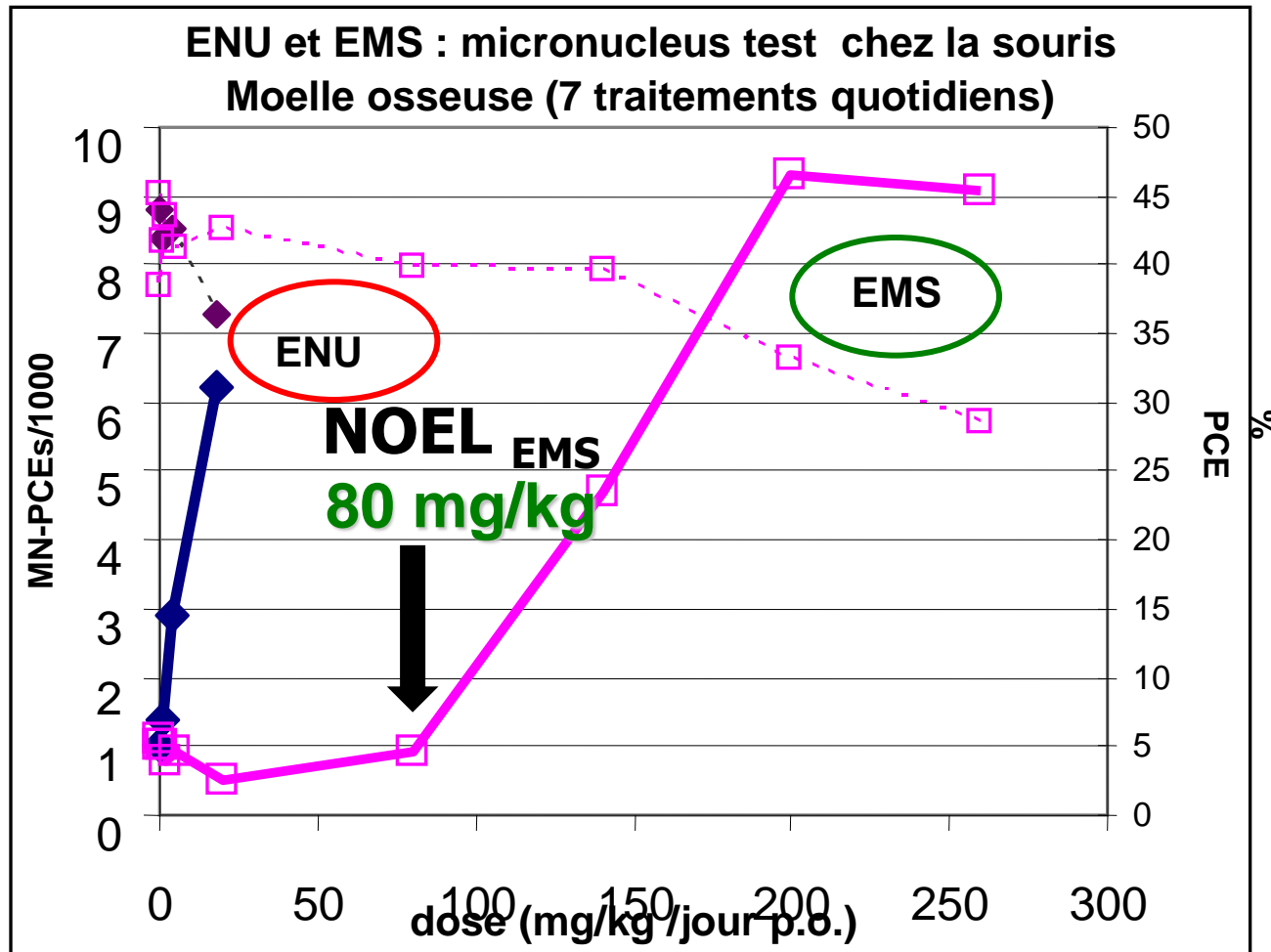
EMS: 0 – 1,25 – 2,5 – 5 – 20 – 80 – 140
– 200 - 260 mg/kg/j

ENU: 0 – 1,11 – 4,45 – 17,8 mg/kg/j



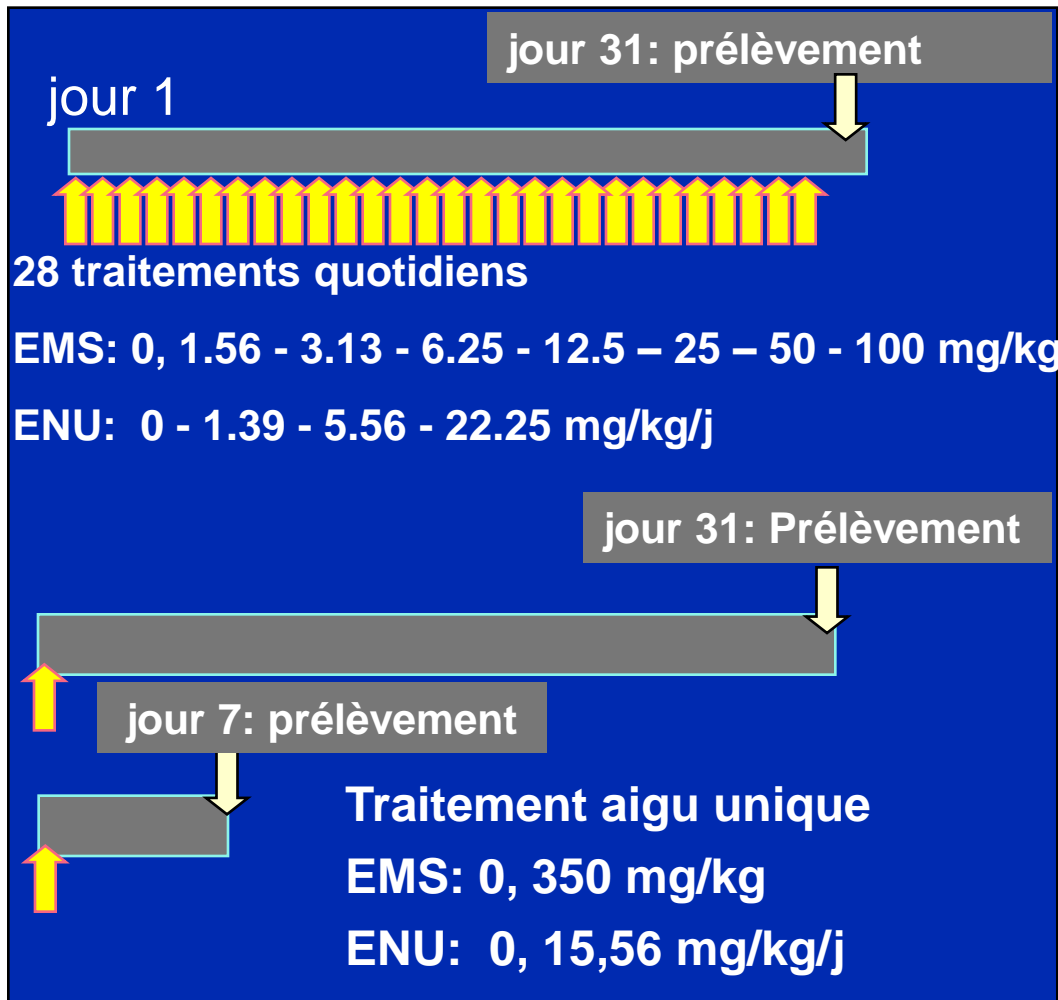
- MN / PCNE
- Adduits Hb

Induction de MN en fonction de la dose



ENU : Aucune NOEL déterminée

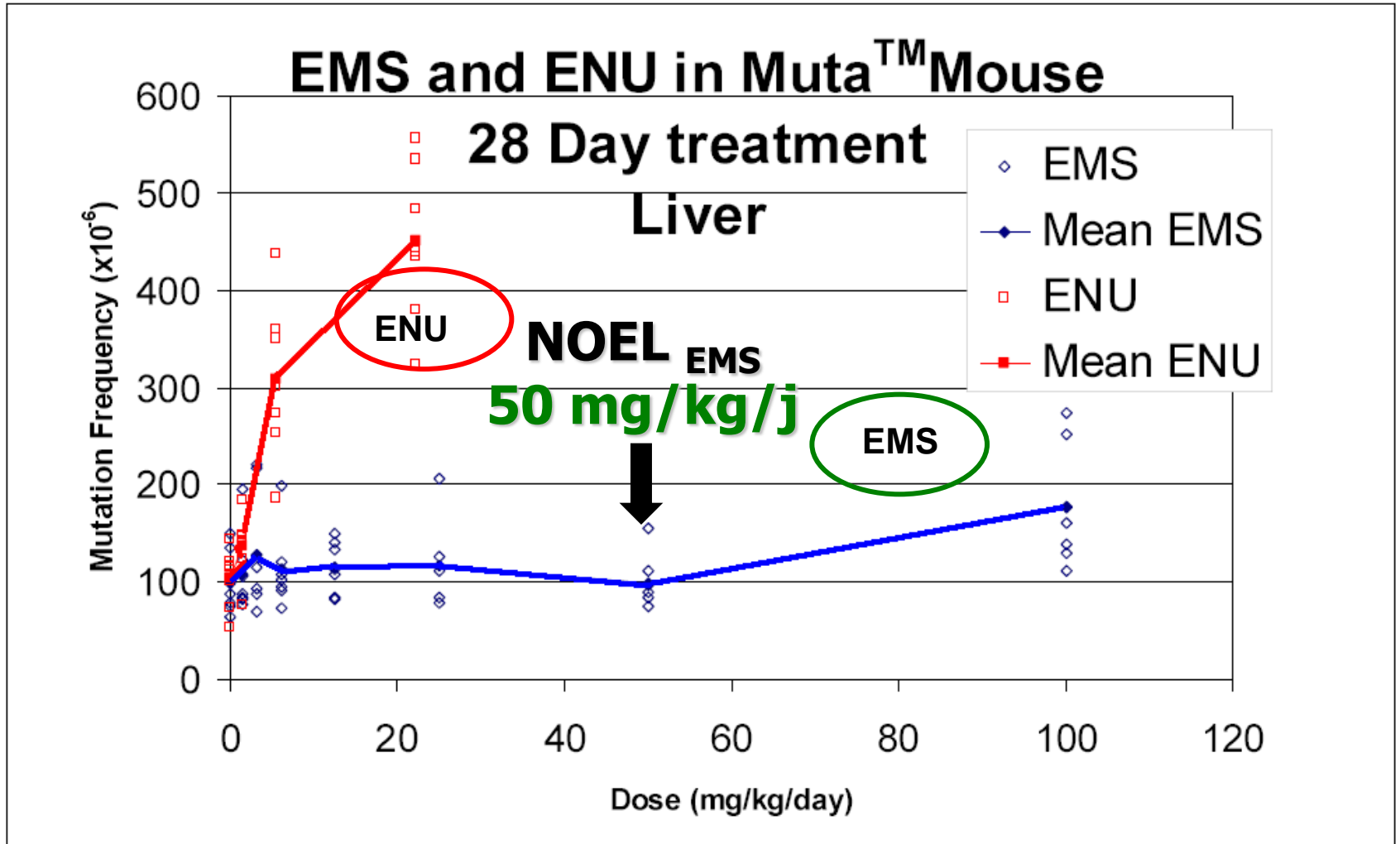
Induction de **mutations** LacZ gene dans le modèle Muta™ Mouse (transgénique)



Mutations du gène LacZ

- moelle osseuse
- foie
- intestin
- + Adduits Hb

Mutations LacZ à 28 jours : Foie

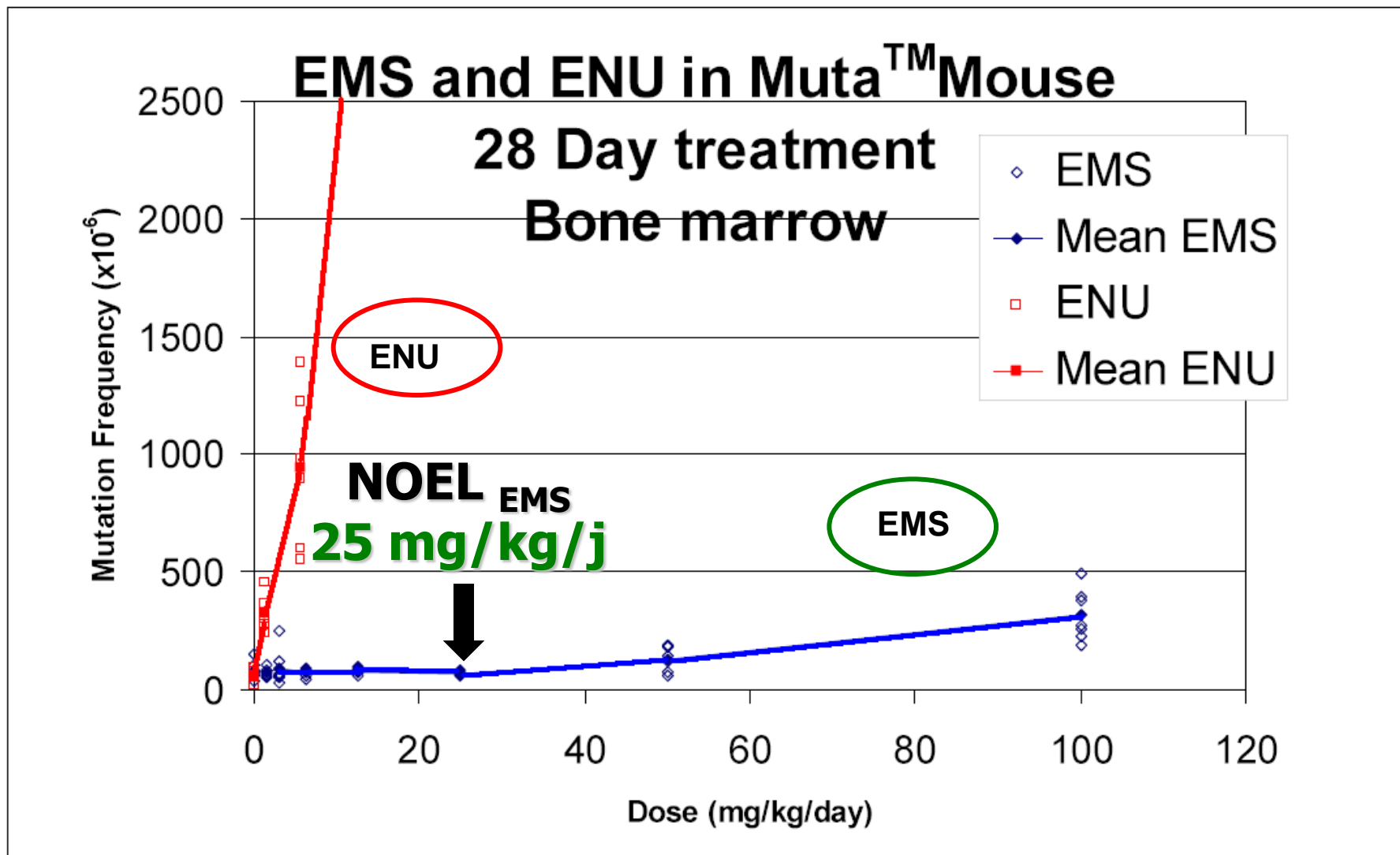


ENU : Aucune NOEL déterminée

Gocke et al. Toxicol Lett. 190 (2009) 286-297

Gocke and Müller Mutat Res. 678(2009) 101-117.

Mutations LacZ à 28 jours : moelle osseuse

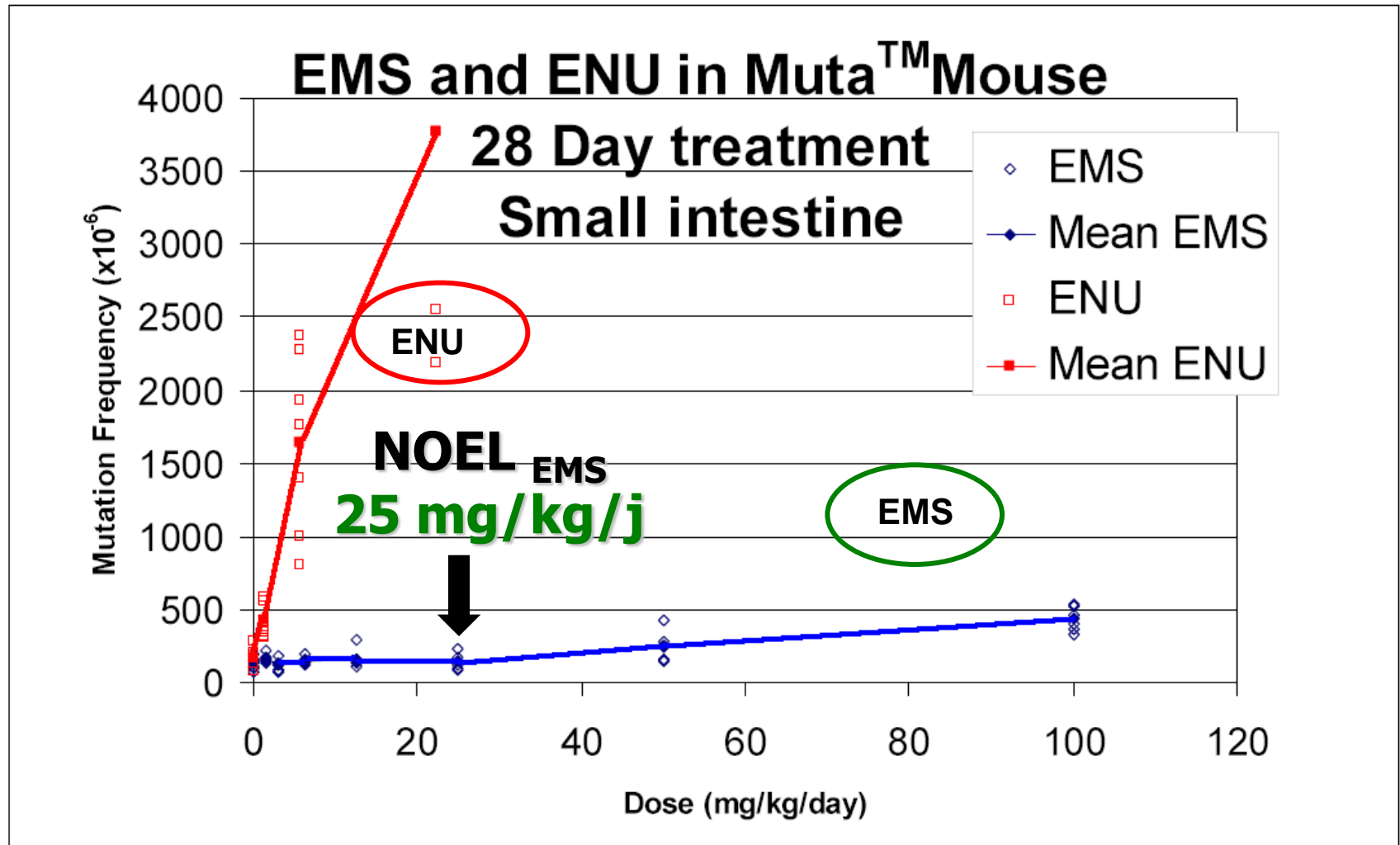


ENU : Aucune NOEL déterminée

Gocke et al. Toxicol Lett. 190 (2009) 286-297

Gocke and Müller Mutat Res. 678(2009) 101-117.

Mutations LacZ à 28 jours : intestin grêle



ENU : Aucune NOEL déterminée

Gocke et al. Toxicol Lett. 190 (2009) 286-297

Gocke and Müller Mutat Res. 678(2009) 101-117.

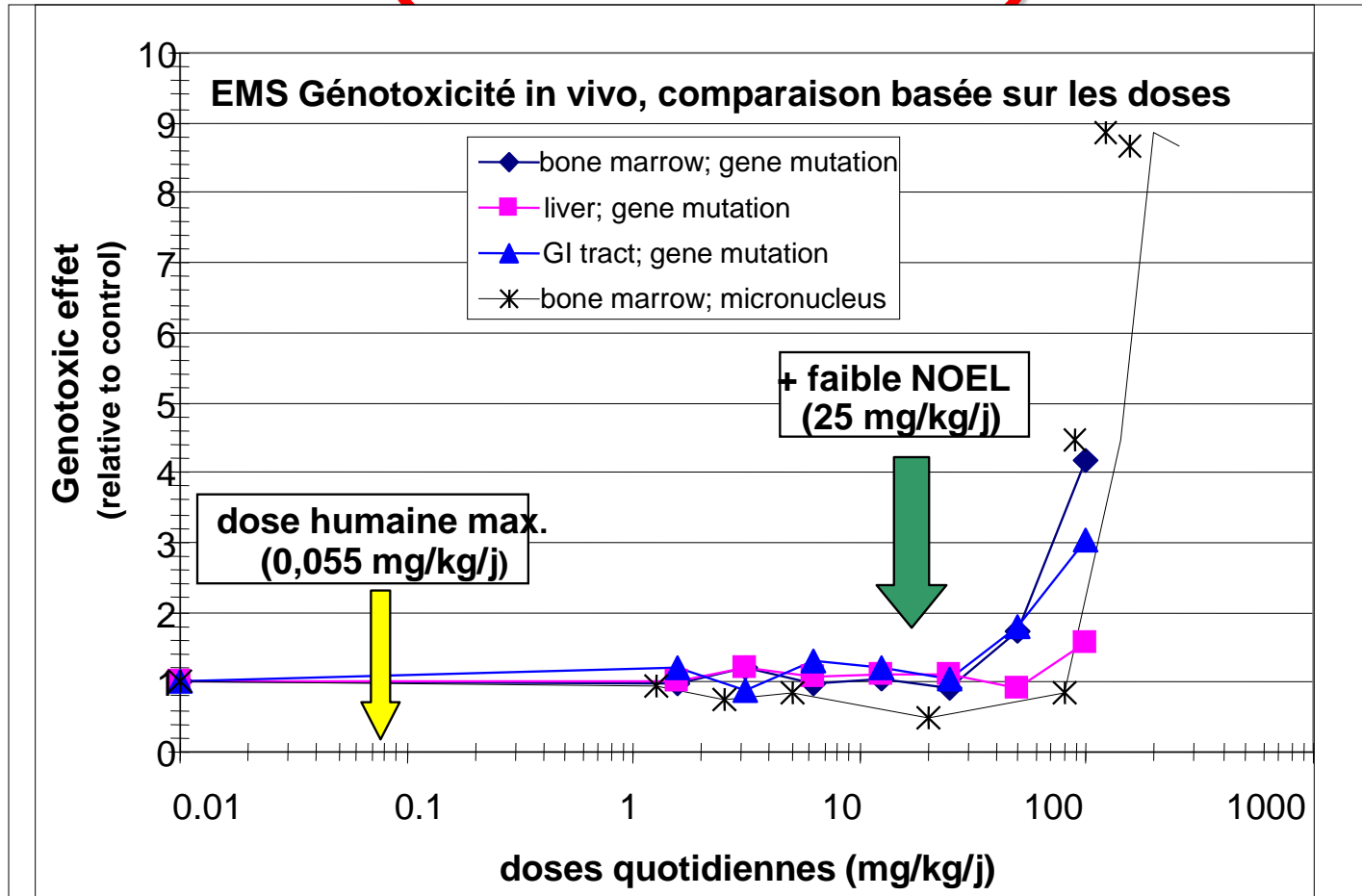
Conclusions de l'étude Muta™ Mouse

- **EMS** : relation dose/effet **non linéaire** (à seuil)
NOEL pour l'induction de mutations géniques
 - **25 mg/kg/jour**
 - moelle osseuse et intestin grêle
 - **50 mg/kg/jour** pour le foie
 - L'induction de mutations non additive sur 28 j
- **ENU** : relation dose/effet **linéaire** (sans seuil apparent) dans tous les tissus
 - Induction de mutations ENU additive sur 28 j

Évaluation du risque

Effet vs comparaison des doses

(mutations & MN)



Plus faible $NOEL_{mut}$ / dose humaine max \approx **450** (“facteur de sécurité”)

Gocke et al. Toxicol Lett. 190 (2009) 286-297

Gocke and Müller Mutat Res. 678(2009) 101-117.

Conséquences pour les patients



European Medicines Agency

London, 24 July 2008

Doc. Ref. EMEA/CHMP/375807/2008

Questions and answers on the follow-up to the contamination of Viracept (*nelfinavir*) with ethyl mesilate

- « Les patients exposés au maximum pendant 3 mois à 0,05 mg/kg/j peuvent être assurés qu'ils ne courent pas un risque de cancer supérieur aux autres patients atteints par le HIV »
- « Aucune augmentation de risque n'est attendu pour les enfants exposés ou pour les enfants nés de mères ayant reçu du Viracept pendant la grossesse »

Seuil(s) pour les agents oxydants

Seuil(s) pour les agents oxydants : Matériel et méthode

Produits oxydants « stricts »

- Induisant **exclusivement** des lésions oxydatives
- Mécanismes d'action différents

Bromate de potassium (KBrO ₃)
Bléomycine (BLM)
Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)

Modèle cellulaire

- Lignée lymphoblastoïde humaine TK6



Glucose oxydase (GOx)

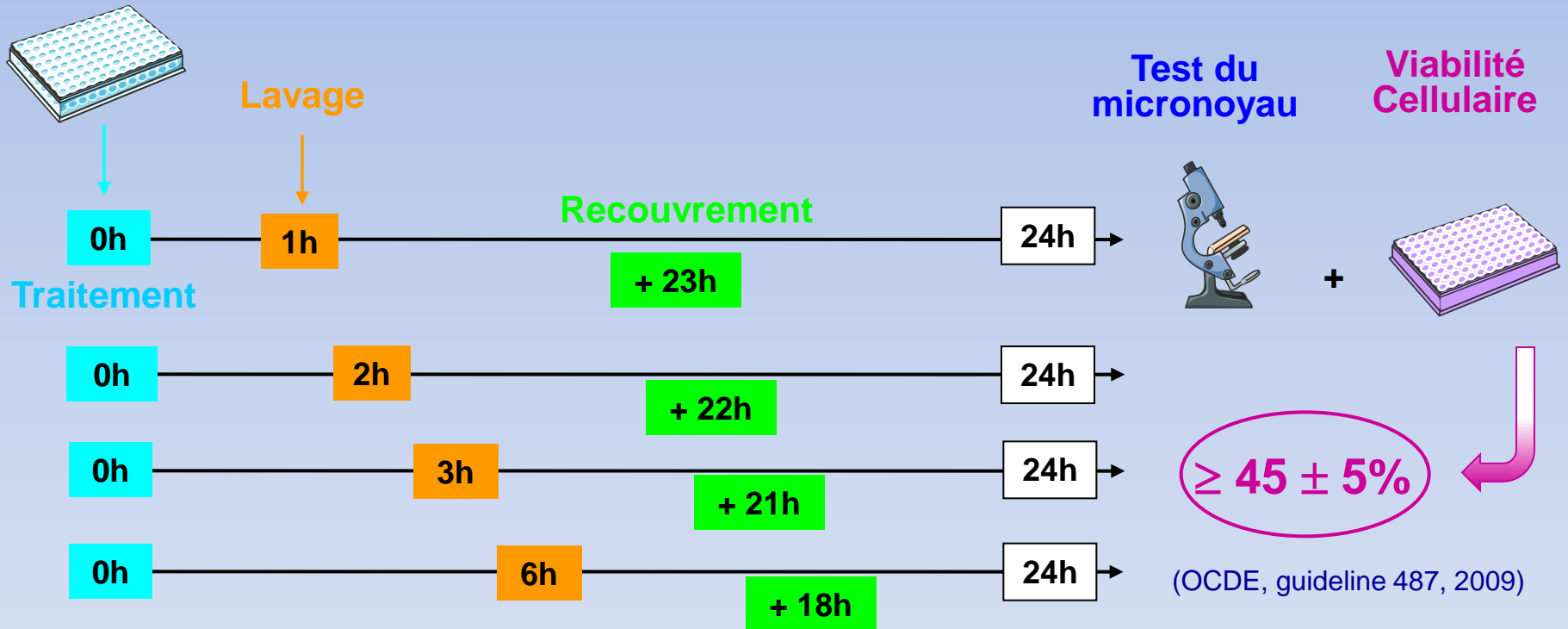
Système d'essai

- Test du micronucleus *in vitro*

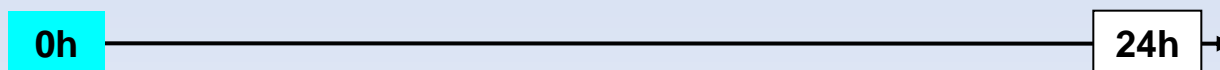
MICRONOYAU *in vitro*

Schémas de traitement

• TEMPS COURTS (1+23h, 2+22h, 3+21h, 6+18h)



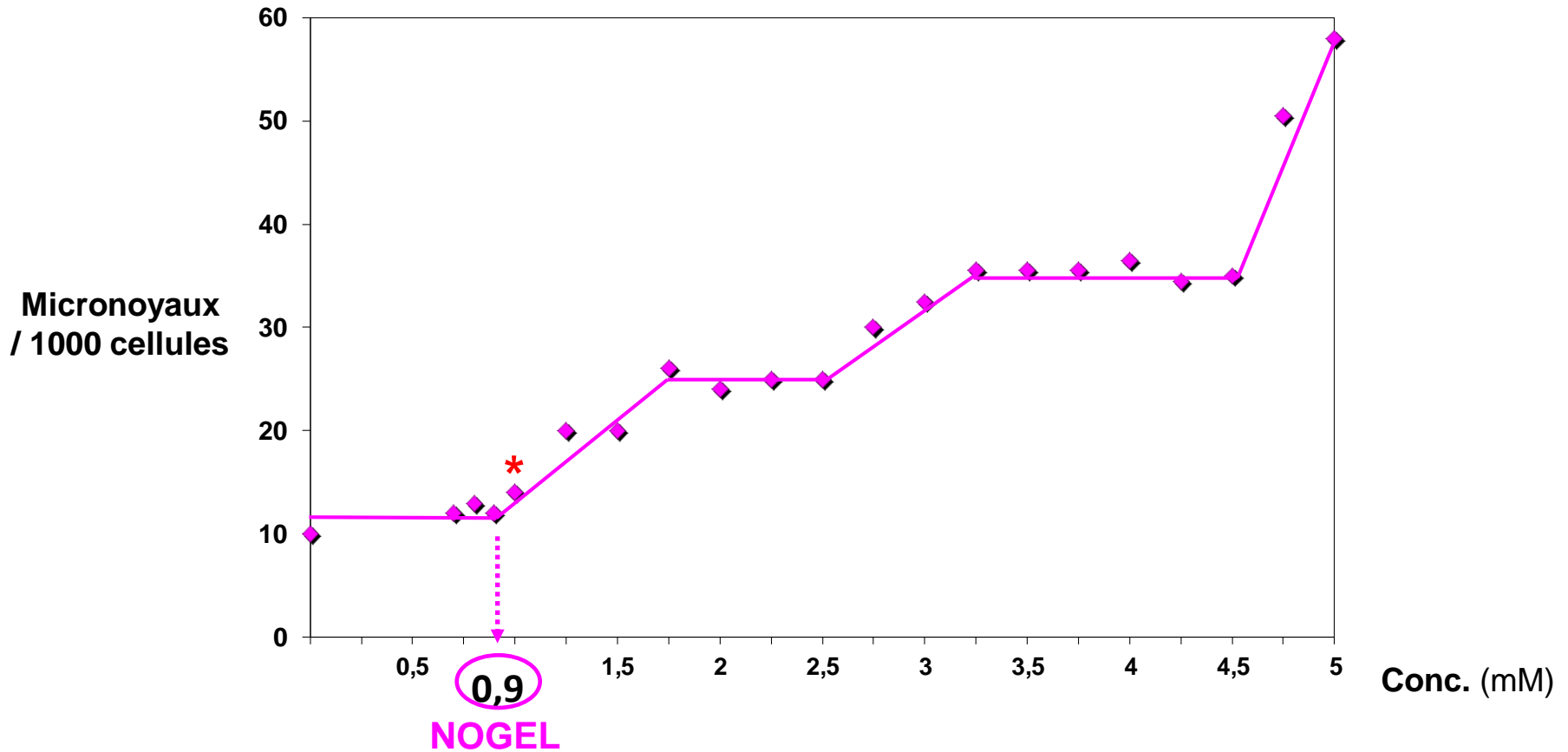
• TEMPS LONG (24+0h)



MICRONOYAU *in vitro*

KBrO₃

1h+23h



- Relation dose-effet non linéaire
- 3 plateaux
- **NOGEL = 0,9 mM**

Test de X²

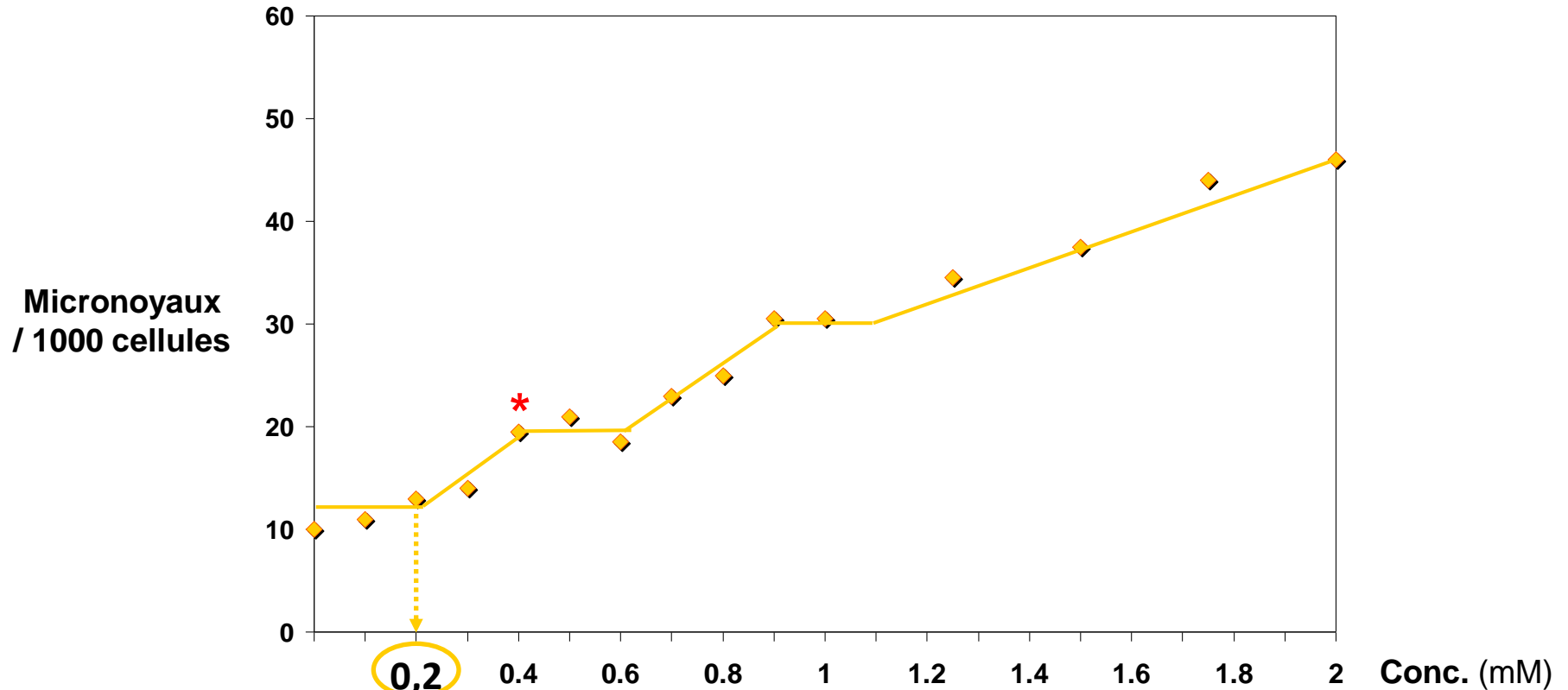
1^{ère} dose stat. signif.

* p < 0,05

MICRONOYAU *in vitro*

KBrO₃

2h+22h



NOGEL

- Relation dose-effet non linéaire
- 3 plateaux
- **NOGEL = 0,2 mM**

Test de X²

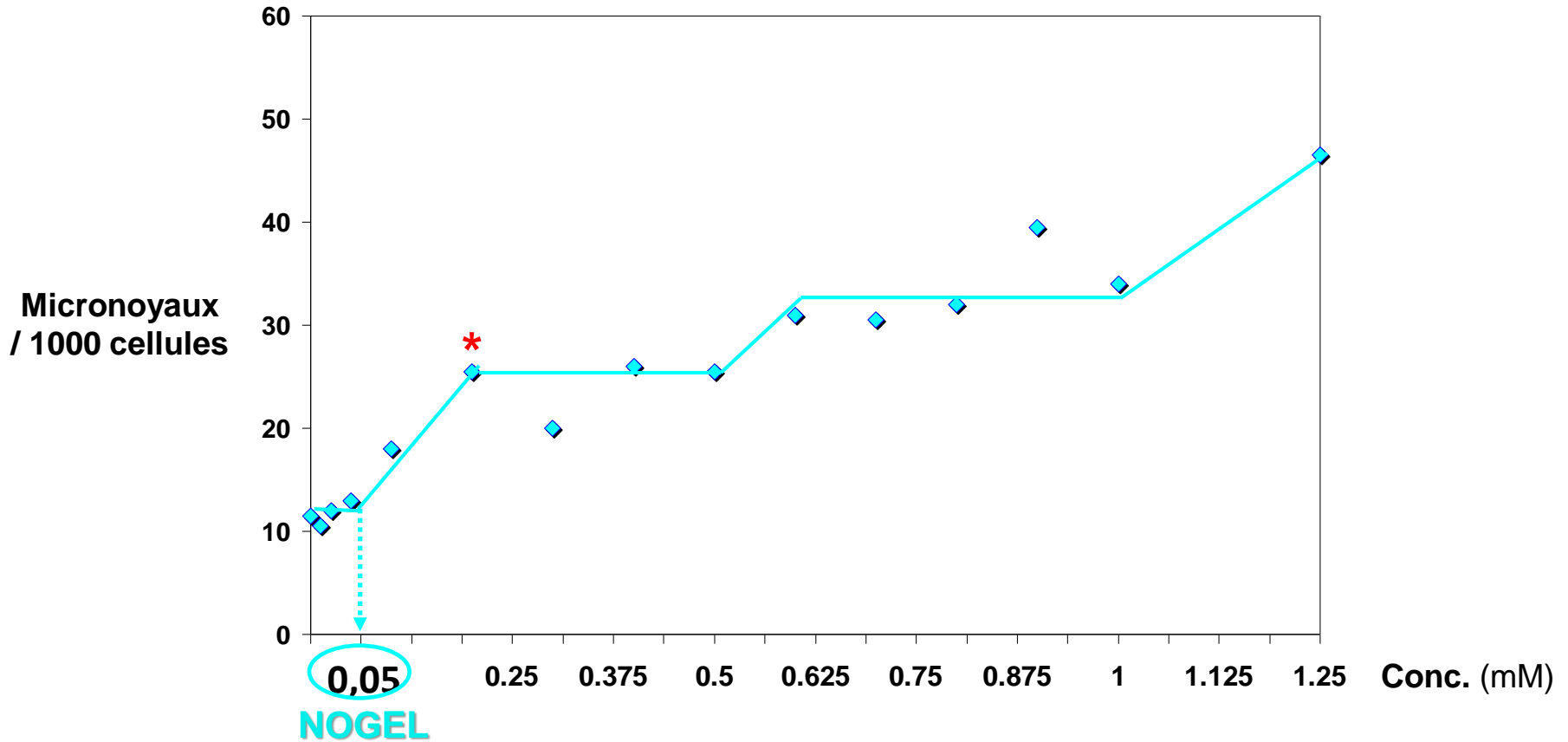
1^{ère} dose stat. signif.

* p < 0,05

MICRONOYAU *in vitro*

KBrO₃

3h+21h



- Relation dose-effet non linéaire
- 3 plateaux
- **NOGEL = 0,05 mM**

Test de X²

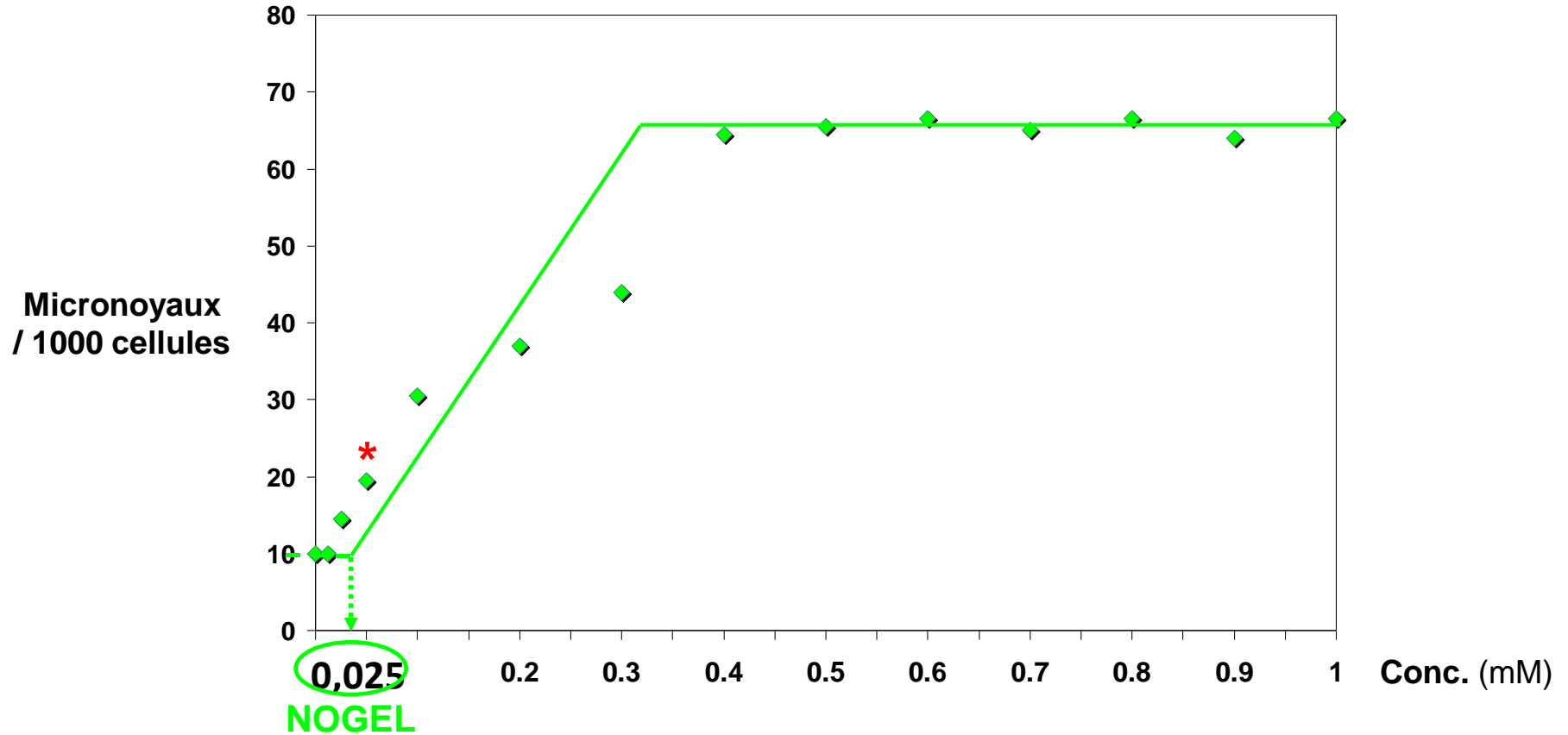
1^{ère} dose stat. signif.

* p < 0,01

MICRONOYAU *in vitro*

KBrO₃

24h+0h



- Relation dose-effet non linéaire
- 1 - 2 plateaux
- **NOGEL = 0,025 mM**

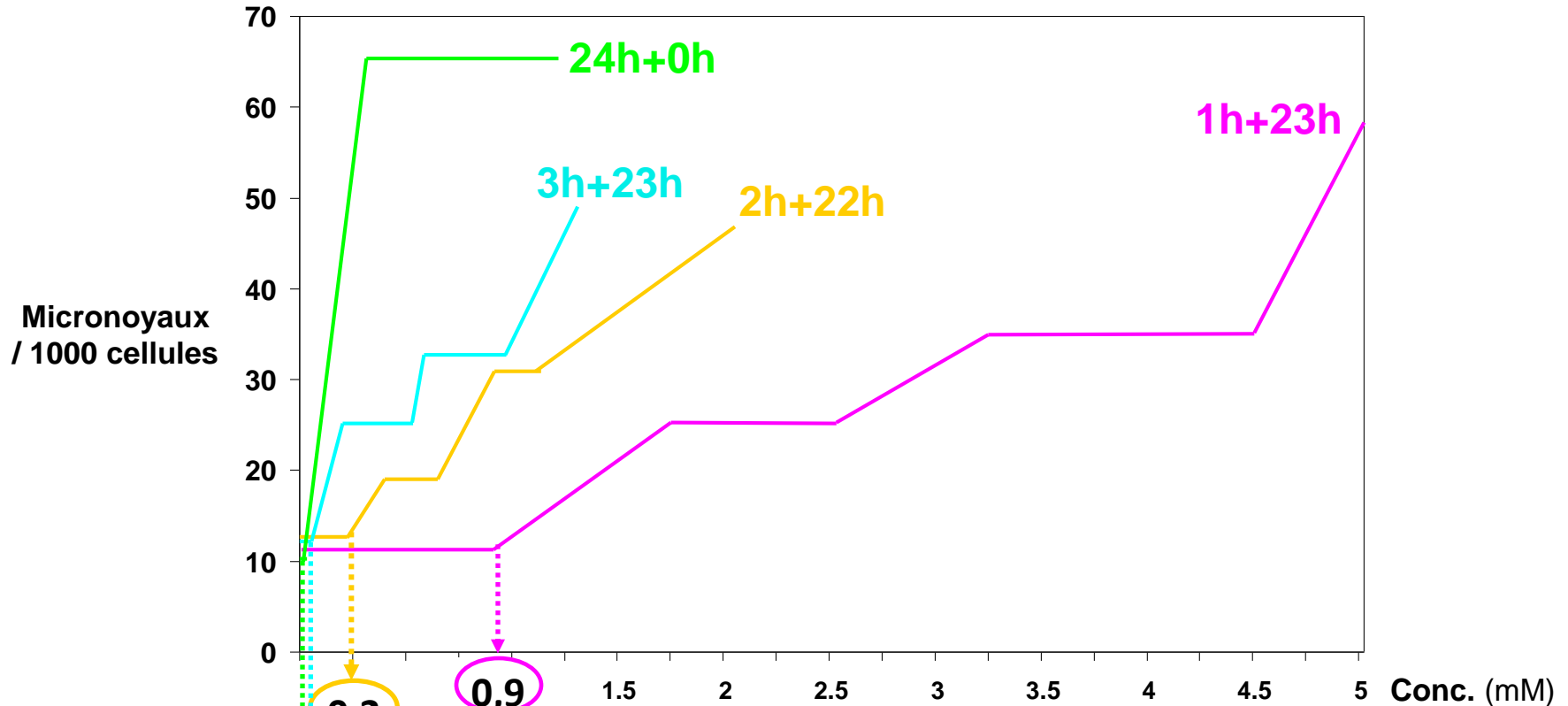
Test de X2

1^{ère} dose stat. signif.

* p < 0,05

MICRONOYAU *in vitro*

KBrO₃



0,05

➔ Décalage des **courbes** dose-effet → décalage des **NOGELS**

0,025

➔ La **NOGEL** dépend de la **durée** du stress oxydant

CONFIRMATIONS

- **Confirmé avec les autres agents oxydants ⁽¹⁾**
 - Bléomycine
 - H₂O₂ (générée par la glucose oxydase)
- **Confirmé pour les lésions primaires de l'ADN**
 - Test des comètes (avec et sans fpg et HOGG1) ⁽²⁾
- **Confirmé pour les mutations géniques**
 - Locus TK sur cellules TK6 ⁽²⁾

(1) Platel A. et al., Mutat. Res. 678 (2009) 30–37

(2) Platel A. et al., Mutat. Res. 726(2011) 151-1599

Effets génotoxiques à seuil (NOGEL)



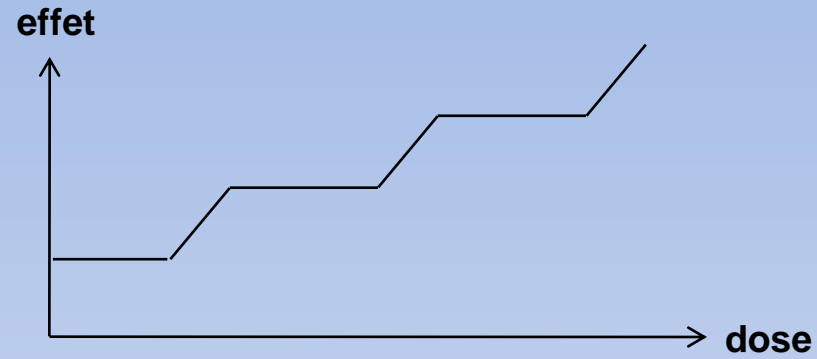
Mécanismes d'action

TRANSCRIPTOMIQUE

**Etude des profils d'expressions géniques
dans les cellules lymphoblastoïdes humaines TK6
exposées à des agents oxydants de l'ADN**

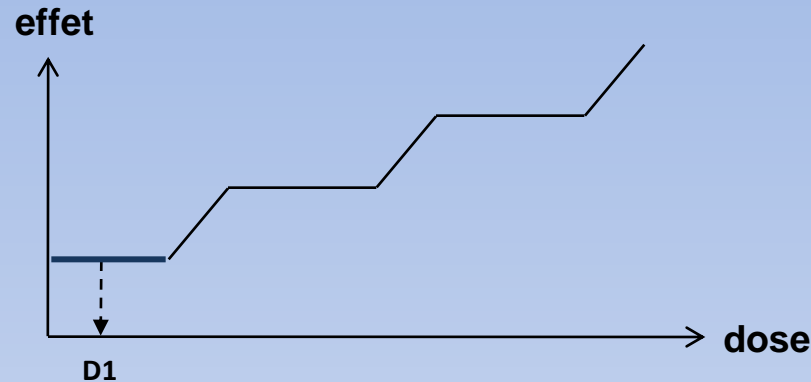
ANALYSE FONCTIONNELLE

Principales voies cellulaires et moléculaires modulées (1+23h)



ANALYSE FONCTIONNELLE

Principales voies cellulaires et moléculaires modulées (1+23h)



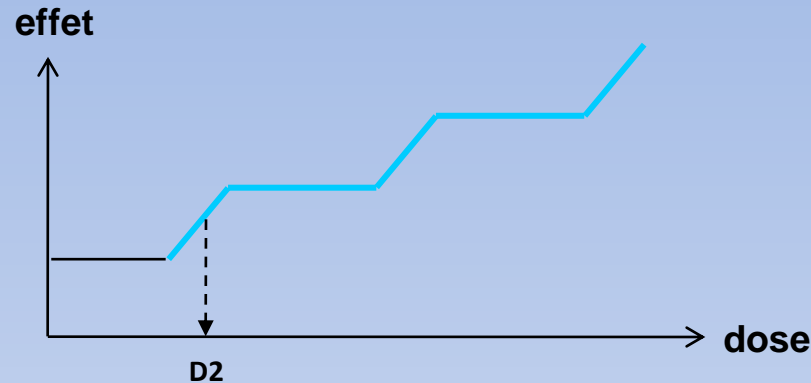
A très faibles doses

Aucune modification de l'expression génique

➡ ***Neutralisation des ERO par les molécules ANTI-OXYDANTES non enzymatiques***

ANALYSE FONCTIONNELLE

Principales voies cellulaires et moléculaires modulées (1+23h)



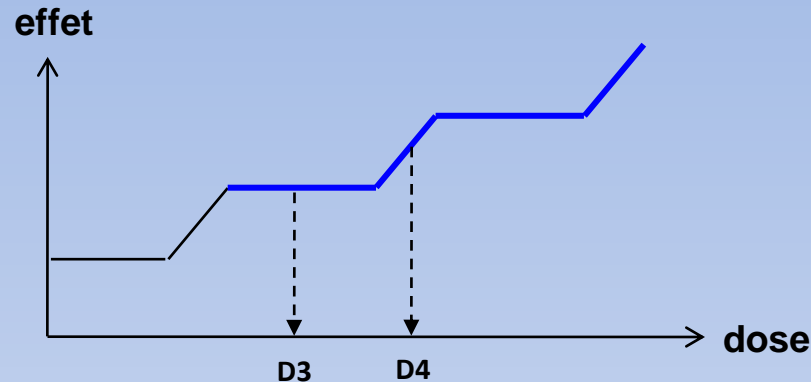
Dès les **faibles** doses

Réponse inflammatoire

- via les facteurs de transcription **AP-1** et **NF-kB**
- **↑** voie du **TNF α** (TNFAIP6, TNFSF4)
- **↑↓** **pro-inflammatoires** (IFN γ , GM-CSF, MIP-1A/1B, IL1Fs, CASP1/4, CCL5, MMPs)
- **↑↓** **anti-inflammatoires** (IL13, IFN β 1, AIF1, PTGR1, TNFAIP3, CYP4F3)

ANALYSE FONCTIONNELLE

Principales voies cellulaires et moléculaires modulées (1+23h)



Dès les moyennes doses

Défenses anti oxydantes

- via le facteur de transcription **Nrf2**
- **↑** **détoxification des ERO** (SOD2, HMOX1, GPX7, HSPA6, MTs)
- **↑** **métabolisme du GSH/Cys** (GGTs, CTH)

ANALYSE FONCTIONNELLE

Principales voies cellulaires et moléculaires modulées (1+23h)

Dès les moyennes doses

Survie et prolifération cellulaire

- ↑ proto-oncogènes (c-JUN, c-FOS, FOS-B, ATF3)
- ↑ facteurs de croissance (GDF1/15, FGF18, PGF)
- ↑ gènes anti-apoptotiques (BCL2, BIRC7)

	D1	D2	D3	D4	D5	D6
c-Jun			4,15	8,90	24,28	41,33
FosB				2,33	4,47	6,07
c-Fos						5,49
ATF3				3,08	4,07	6,07

Complexe AP-1

1+23h - GOx

ANALYSE FONCTIONNELLE

Dès les moyennes doses

Voie de signalisation de p53

Régulation du cycle cellulaire (« points de contrôle » G1/S et G2/M)

- **↑ inhibition** (p21, GADD45 α , SFN)
- **↓ progression** (TOP2 α , SKP2, Cyclines A1/B1/E2, Cdc25A, Cdk2)
- **↓ réplication** (MMCs)
- **↓ transcription** (TFIIA, ELL3, MED18)

ANALYSE FONCTIONNELLE

Dès les moyennes doses

Voie de signalisation de p53

Régulation du cycle cellulaire (« points de contrôle » G1/S et G2/M)

- **↑ inhibition** (p21, GADD45 α , SFN)
- **↓ progression** (TOP2 α , SKP2, Cyclines A1/B1/E2, Cdc25A, Cdk2)
- **↓ réplication** (MMCs)
- **↓ transcription** (TFIIA, ELL3, MED18)

Apoptose

- **↑ pro-apoptose** (NOXA, PUMA, FAS, GADD45, PIG3, TEAP)
- **↑ anti-apoptose** (BCL2, BIRC7, XIAP)
- **↑ voie du TNF α** (TNFAIP3, TRAF1, APO2L)
- **↑ dysfonction mitochondriale & stress du réticulum endoplasmique** (GADD153)

ANALYSE FONCTIONNELLE

Dès les moyennes doses

Voie de signalisation de p53

Régulation du cycle cellulaire (« points de contrôle » G1/S et G2/M)

- **↑ inhibition** (p21, GADD45 α , SFN)
- **↓ progression** (TOP2 α , SKP2, Cyclines A1/B1/E2, Cdc25A, Cdk2)
- **↓ réplication** (MMCs)
- **↓ transcription** (TFIIA, ELL3, MED18)

Apoptose

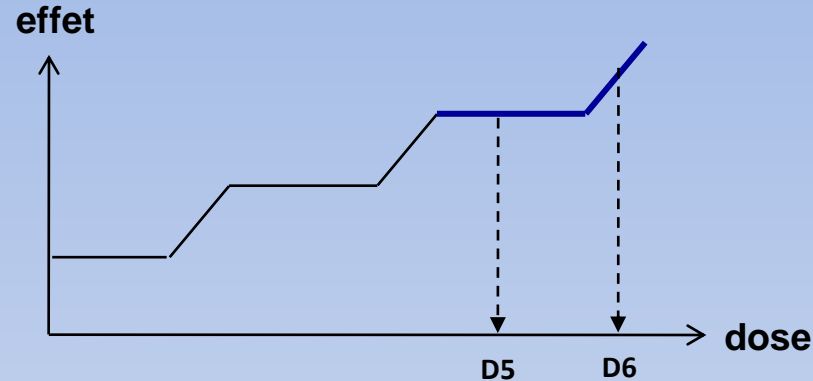
- **↑ pro-apoptose** (NOXA, PUMA, FAS, GADD45, PIG3, TEAP)
- **↑ anti-apoptose** (BCL2, BIRC7, XIAP)
- **↑ voie du TNF α** (TNFAIP3, TRAF1, APO2L)
- **↑ dysfonction mitochondriale & stress du réticulum endoplasmique** (GADD153)

Réparation de l'ADN

- **↑ RRM2B, DDB2, RPA4, GADD45A/B, XRCC3, LIG4, POLM, POLR2A, PARP15, PRMT8**
(2,04 \leq FC \leq 37,38)
- **↓ FEN1, PARPs, POLEs, XRCC2, XRCC5, MSHs, FANCB/D2, BRCA2** **(-3,55 \leq FC \leq -2,01)**

ANALYSE FONCTIONNELLE

Principales voies cellulaires et moléculaires modulées (1+23h)



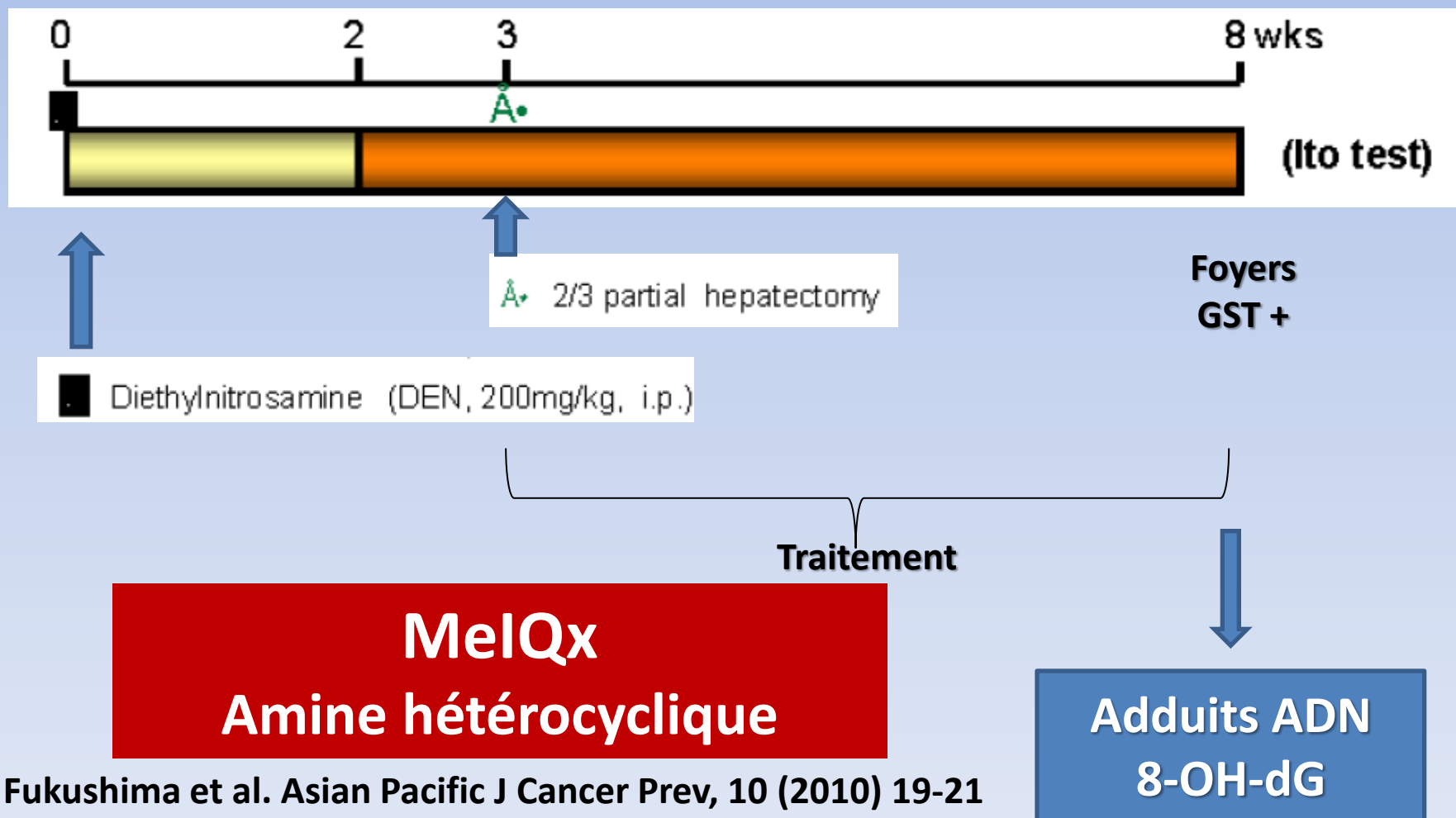
A fortes doses

Métabolisme lipidique

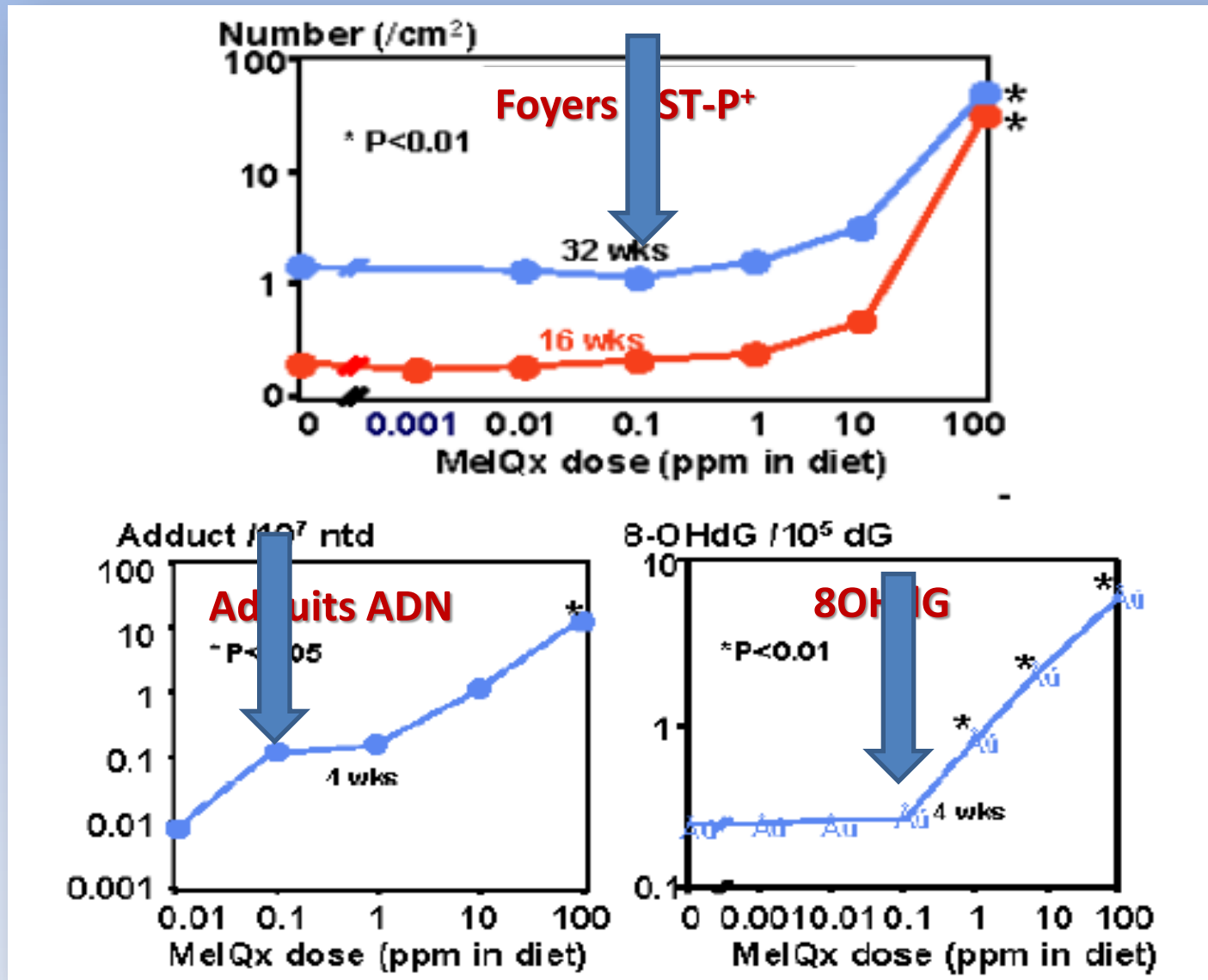
- ↑ **excision** des hydroperoxydes lipidiques (PLA2s, CPT1C)
- ↑ **détoxification** des aldéhydes (ALDHs, GPX7)

➡ *Signature transcriptionnelle d'une **péroxydation lipidique***

Seuil, adduits à l'ADN et Cancérogenèse



Seuil, adduits à l'ADN et Cancérogenèse



Seuil, adduits à l'ADN et Cancérogénèse

Confirmé avec d'autres cancérogènes

- **Diméthylnitrosamine → Foie**
- **Diéthylnitrosamine → Foie**
- **PhIP → colon**

Seuil, adduits à l'ADN et Cancérogenèse

Conclusions

« Il existe un seuil avec pratiquement tous les mutagènes

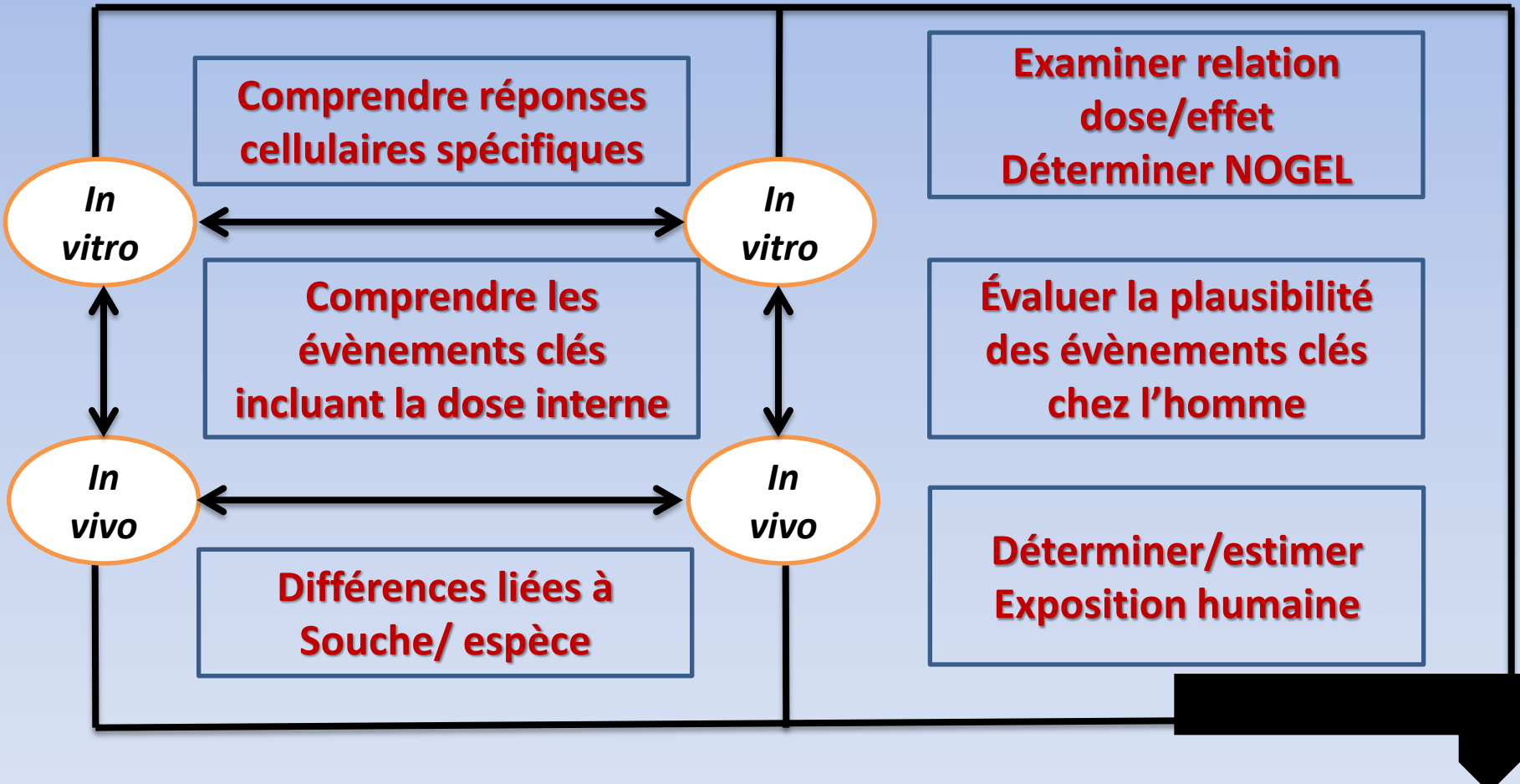
Existence d'un seuil pour l'effet cancérogène
Relation avec les adduits à l'ADN »

Fukushima et al. Asian Pacific J Cancer Prev, 10 (2010) 19-21

Conclusions

- Il existe un **seuil** avec de nombreux mutagènes
- Même avec les produits **réagissant avec l'ADN**
- Ces seuils peuvent être **démontrés et être utilisés dans l'évaluation du risque pour l'homme**

Démarche



D'après Pottenger and Gollapudi
Mutagenesis 2010

**Evaluation du risque
pour l'homme**

Conclusions

- Il existe un seuil avec de nombreux mutagènes
- Même avec les produits réagissant avec l'ADN
- Ces seuils peuvent être démontrés et être utilisés dans l'évaluation du risque pour l'homme

→ Extrapolation aux rayonnements ionisants?

Conclusions

- Quelle(s) **méthode(s)** pour démontrer la validité de la relation linéaire sans seuil pour estimer, par extrapolation, l'effet cancérogène des faibles doses?
 - Parallèle avec les **données épidémiologiques?**
 - Données biologiques sur les **mécanismes** de cancérogenèse
- ➔ Validité des évaluations actuelles du risque des faibles doses?



Remerciements

Institut Pasteur de Lille
Laboratoire de Toxicologie Génétique

Anne Platel

Daniel Marzin