



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

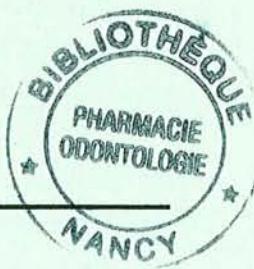
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I

2005

FACULTE DE PHARMACIE



LE TEST DES COMETES :

VALIDATION ET ETUDE DE SA SENSIBILITE ET SPECIFICITE
IN VITRO ET IN VIVO

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 13 mai 2005

Pour obtenir

Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par Nadia ZENNOUCHE

Née le 9 juillet 1979

Membres du Jury

Président : Mlle Anne-Marie BATT, Professeur

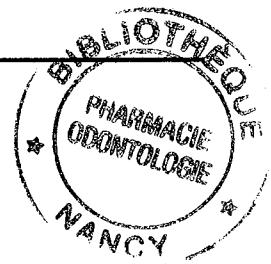
Directeur : M. Daniel MARZIN, Professeur

Juges : Mme Brigitte MOLINIER, Docteur
M. Fabrice NESSLANY, Directeur d'études

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I

2005

FACULTE DE PHARMACIE



LE TEST DES COMETES :

VALIDATION ET ETUDE DE SA SENSIBILITE ET SPECIFICITE
IN VITRO ET IN VIVO

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 13 mai 2005

Pour obtenir

Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par Nadia ZENNOUCHE
Née le 9 juillet 1979

Membres du Jury

Président : Mlle Anne-Marie BATT, Professeur

Directeur : M. Daniel MARZIN, Professeur

Juges : Mme Brigitte MOLINIER, Docteur
M. Fabrice NESSLANY, Directeur d'études



Membres du personnel enseignant 2004/2005

Doyen

Chantal FINANCE

Vice Doyen

Francine PAULUS

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Responsable de la Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Directeur des Etudes

Gérald CATAU

Responsable de la Filière officine

Gérald CATAU

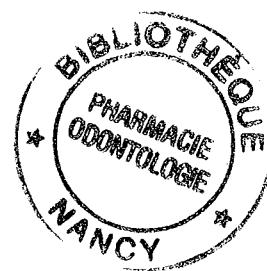
Responsables de la Filière industrie

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Isabelle LARTAUD

Responsable de la Filière hôpital

Jean-Michel SIMON

**DOYEN HONORAIRE**

M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

Mme BESSON Suzanne

M. MARTIN Jean-Armand

Mme GIRARD Thérèse

M. MORTIER François

M. JACQUE Michel

M. MIRJOLET Marcel

M. LECTARD Pierre

M. PIERFITTE Maurice

M. LOPPINET Vincent

PROFESSEURS EMERITES

M. BONALY Roger

M. HOFFMAN Maurice

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Mme FUZELLIER Marie-Claude

Mme POCHON Marie-France

Mme IMBS Marie-Andrée

PROFESSEURS

M. ASTIER Alain

Pharmacie clinique

M. ATKINSON Jeffrey

Pharmacologie cardiovasculaire

M. AULAGNER Gilles

Pharmacie clinique

M. BAGREL Alain

Biochimie

Mme BATT Anne-Marie

Toxicologie

M. BLOCK Jean-Claude

Santé publique

Mme CAPDEVILLE-ATKINSON Christine

Pharmacologie cardiovasculaire

Mme FINANCE Chantal

Virologie, immunologie

Mme FRIANT-MICHEL Pascale

Mathématiques, physique, audioprothèse

Mme GALTEAU Marie-Madeleine

Biochimie clinique

M. HENRY Max

Botanique, mycologie

M. JOUZEAU Jean-Yves

Bioanalyse du médicament

M. LABRUDE Pierre

Physiologie, orthopédie, maintien à domicile

Mme LAURAIN-MATTAR Dominique

Pharmacognosie

M. LALLOZ Lucien

Chimie organique

M. LEROY Pierre

Chimie physique générale

M. MAINCENT Philippe

Pharmacie galénique

M. MARSURA Alain

Chimie thérapeutique

M. MERLIN Jean-Louis

Biologie cellulaire oncologique

M. NICOLAS Alain

Chimie analytique

M. REGNOUF de VAINS Jean-Bernard

Chimie Thérapeutique

M. RIHN Bertrand (Professeur associé)

Biochimie

Mme SCHWARTZBROD Janine

Bactériologie, parasitologie

M. SIEST Gérard

Biochimie

M. SIMON Jean-Michel

Droit officinal, législation pharmaceutique

M. VIGNERON Claude

Hématologie, physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - virologie
Mme	BANAS Sandrine	Parasitologie
M.	BOISBRUN Michel	Chimie Thérapeutique
Mme	BOITEUX Catherine	Biophysique, Audioprothèse
M.	BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
M.	CATAU Gérald	Pharmacologie
M.	CHEVIN Jean-Claude	Chimie générale et minérale
M.	CHILLON Jean-Marc	Pharmacologie
M	CLAROT Igor	Chimie analytique
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie, conseils vétérinaires
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Mycologie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, audioprothèse, acoustique
M.	DUVAL Raphaël	Microbiologie clinique
Mme	FAIVRE Béatrice	Hématologie
M.	FERRARI Luc	Toxicologie
Mle	FONS Françoise	Biologie végétale, mycologie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie clinique
Mle	HINZELIN Françoise	Mycologie, botanique
M.	HUMBERT Thierry	Chimie organique
M.	JORAND Frédéric	Santé, environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie galénique
Mle	LAMBERT Alexandrine	Biophysique, biomathématiques
M.	LAMPRECHT Alf	Pharmacie galénique
Mme	LARTAUD Isabelle	Pharmacologie
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
Mme	LIVERTOUX Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAL-HEUSSLER Emmanuelle	Communication et santé
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MONAL Jean-Louis	Chimie thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PERRIN-SARRADO Caroline	Pharmacologie
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	SAUDER Marie-Paule	Mycologie, botanique
Mle	THILLY Nathalie	Santé publique
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacologie
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme	GRISON Geneviève	Pratique officinale
-----	------------------	---------------------

PROFESSEUR AGREGÉ

M.	COCHAUD Christophe	Anglais
----	--------------------	---------

ASSISTANTS

Mme	BEAUD Mariette	Biologie cellulaire
Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie, phytothérapie
Mme	PAVIS Annie	Bactériologie

SERMENT DES APOTHICAires



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorier ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



*Mlle Anne-Marie Batt,
Professeur de toxicologie, Faculté de Pharmacie-Nancy,*

*Vous m'avez fait l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse.
Vous m'avez guidée, accompagnée et soutenue dans chacune de mes expériences
dans le monde de la Toxicologie.
Pour votre disponibilité, pour l'attention portée à l'ensemble de mon travail,
recevez dans cet ouvrage l'expression de toute ma reconnaissance, de mon plus
profond respect.*

*M. Daniel Marzin,
Professeur de toxicologie, Faculté de Pharmacie-Lille,
Directeur du Laboratoire de Toxicologie de l'Institut Pasteur de Lille,*

*En acceptant d'être mon directeur de thèse, vous n'avez jamais ménagé ni votre
temps ni votre énergie.
Pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire, pour votre confiance et vos
conseils, je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude.*

*Mme Brigitte Molinier,
Responsable du Laboratoire de Toxicologie Génétique de Sanofi-Aventis-
Montpellier,*

*Je vous remercie pour vos conseils, votre contribution à l'élaboration de cette thèse
et votre participation à ce jury en dépit de vos nombreux impératifs
professionnels.*

*Mes remerciements vont également à toute l'équipe du Laboratoire de Toxicologie
de Sanofi-Aventis-Montpellier, ainsi qu'à M. Luc Esserméant, Statisticien, pour
sa contribution à ce travail.*

*M. Fabrice Nesslany,
Directeur d'étude - Laboratoire de Toxicologie de l'Institut Pasteur de Lille,*

*Je tiens à vous adresser mes plus vifs remerciements pour votre soutien
inconditionnel, votre générosité et votre disponibilité à tout moment et à toute
épreuve.*

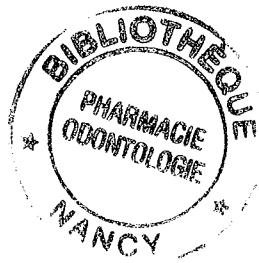
*En souvenir des bons moments passés, je remercie également toute l'équipe du
laboratoire de Toxicologie de l'Institut Pasteur de Lille.*

*Maman, Papa, je tiens à vous exprimer toute mon affection pour votre patience,
vos sacrifices et vos encouragements.
Avec toute ma reconnaissance et mon amour...*

*A ma petite sœur Karine et à mon petit frère Yacine,
À tous les moments de complicité partagés ensemble, avec toute mon affection et
toute ma tendresse...*

*A mon Nicolas,
Pour ton soutien, ton aide et surtout ta patience.
Avec tout mon amour.*

*A mes amis, en souvenir des moments de joie comme de stress...durant ces années
fac !!!*



INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : GENERALITES

I. LE TEST DES COMETES	3
A. <i>Définition et historique du test</i>	3
a) Définition.....	3
b) Historique	3
B. <i>Les lésions de l'ADN mises en évidence par le test des Comètes</i>	5
a) Les cassures simple et double-brin	8
b) Les sites alcali-labiles	10
c) Les lésions mises en évidence par les systèmes de réparation.....	12
C. <i>Principe général du test des Comètes</i>	20
D. <i>Les applications</i>	31
a) Toxicologie génétique	31
b) Epidémiologie / Biomonitoring environnemental	32
c) Ecotoxicologie.....	32
d) Les applications indirectes du test des Comètes : les études mécanistiques.....	33
II. LES ETUDES <i>IN VITRO</i>	34
III. LES ORGANES ETUDES <i>IN VIVO</i>	36
A. <i>Le rein</i>	36
a) Rappel sur l'anatomie du rein	36
b) Rappel sur les fonctions rénales.....	39
B. <i>Le foie</i>	40
a) Rappel sur l'anatomie du foie	40
b) Rappel sur les fonctions hépatiques	42

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES

I. MATERIEL.....	44
A. <i>Les cellules</i>	44
B. <i>Les animaux</i>	44
C. <i>Les toxiques étudiés</i>	45
a) Benzo(a)pyrène	45
b) 2-Acétyl-aminofluorène.....	47
c) Cyclophosphamide	48
d) Ethyl-méthane sulfonate et Méthyl-méthane sulfonate.....	50
e) Streptozotocine.....	51
f) Acides aristolochiques.....	52
g) Ortho-Nitroanisole.....	54
h) Acide Nitrilotriacétique.....	55
i) Indométacine.....	56

II. METHODES	61
A. Traitement et obtention de la suspension cellulaire	61
a) <i>In vitro</i>	61
b) <i>In vivo</i>	63
B. Comptage et viabilité.....	67
C. Le test des Comètes.....	69
a) Préparation des agaroses.....	69
b) Préparation des lames	70
c) Lyse cellulaire	71
d) Dénaturation de l'ADN	71
e) Electrophorèse	72
f) Neutralisation.....	72
g) Conservation des lames.....	72
h) Coloration des lames	72
i) Lecture	73
D. Analyse statistique.....	74
E. Evaluation et interprétation des résultats.....	76

TROISIEME PARTIE : RESULTATS

I. ESSAIS DE MISES AU POINT	77
A. Isolement par broyage / cas des cellules hépatiques.....	77
B. Isolement par méthode enzymatique spécifique / cas des cellules rénales	79
II. RESULTATS DES DIFFERENTES ETUDES	83
A. Etude de composés génotoxiques <i>in vitro</i>.....	83
a) Le Benzo(a)pyrène	83
b) Le Cyclophosphamide	84
c) L'Ethyl-méthane sulfonate	85
d) Le Méthyl-méthane sulfonate.....	86
B. Etude de composés génotoxiques <i>in vivo</i> sur un organe cible : le foie	87
a) Le Benzo(a)pyrène	87
b) Le 2-Acétylaminofluorène.....	90
c) Le Cyclophosphamide	93
d) Le Méthyl-méthane sulfonate.....	96
C. Etudes <i>in vivo</i> sur un organe cible : le rein	99
a) Etude de composés génotoxiques	99
b) Etude d'un composé épigénétique	109
c) Etude d'un composé cytotoxique	112

QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION

I.	LE TEST DES COMETES	116
<i>A.</i>	<i>L'isolement cellulaire in vivo.....</i>	116
<i>B.</i>	<i>Evaluation et interprétation des résultats.....</i>	118
a)	Le paramètre choisi, l'OTM	118
b)	Choix de la représentation graphique : La variabilité liée au test.....	118
c)	L'analyse statistique	119
d)	L'importance des études de cytotoxicité pour l'interprétation des résultats	121
<i>C.</i>	<i>Le test des Comètes / avantages-inconvénients.....</i>	122
a)	Avantages	122
b)	Inconvénients	123
II.	APPLICATION ET VALIDATION DU TEST	124
<i>A.</i>	<i>Les études in vitro.....</i>	124
<i>B.</i>	<i>Validation du test in vivo.....</i>	127
a)	Etudes sur cellules hépatiques.....	127
b)	Etudes sur cellules rénales	128

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

INTRODUCTION



Le développement de la toxicologie génétique est lié au constat que certains produits chimiques ou certains agents physiques seraient capables d'augmenter la fréquence des maladies héréditaires chez l'homme ou seraient à l'origine de l'apparition de cancers. Ainsi, dans un but de santé publique, il est nécessaire de déterminer si les produits chimiques utilisés dans l'industrie (produits phytosanitaires, additifs alimentaires,..) ou si les nouvelles molécules issues de la recherche (les candidats médicaments) ont la capacité d'endommager l'acide désoxyribonucléique, l'ADN, en altérant sa structure et/ou ses fonctions.

De tels produits sont dits génotoxiques et sont capables de produire d'une part des lésions primaires de l'ADN, d'autre part d'engendrer des mutations (géniques, chromosomiques, génomiques). Afin de mettre en évidence ces phénomènes, aucun test n'étant capable de détecter tous les mécanismes génotoxiques, une batterie de tests en toxicologie génétique, *in vivo* et *in vitro*, s'avère donc nécessaire.

Parmi les différents tests décrits dans la littérature, seul un petit nombre d'entre eux est recommandé et accepté par les autorités d'enregistrement. La Commission Internationale d'Harmonisation (ICH), chargée d'harmoniser les procédures d'enregistrement des médicaments entre les trois grandes régions du monde (Etats-Unis, Europe et Japon) préconise une batterie de trois tests : le test d'Ames, le test du Lymphome (« Mouse Lymphoma Assay » ou MLA) et le test du Micronoyau *in vivo*. Cette batterie doit permettre d'évaluer le risque génotoxique ; il est admis que si un résultat négatif est obtenu sur chacun d'entre eux le maximum de précautions aura été pris, le produit sera alors considéré comme non génotoxique.

En revanche, dans le cas d'un résultat positif dans un ou plusieurs de ces tests réglementaires, des études complémentaires peuvent être exigées.

De nouveaux développements sont apparus ces dernières années, le test des Comètes en fait partie. Actuellement en cours d'évaluation et de validation, celui-ci permet de mettre en évidence des lésions primaires de l'ADN telles que des cassures simple et double-brin, des adduits aux bases de l'ADN, des intercalations, des pontages inter et intra-brin, et des pontages ADN-protéines, ... (Tice *et al.*, 2000). Le test des Comètes peut être utilisé en seconde intention pour confirmer ou non le(s) résultat(s) positif(s) observé(s) dans la batterie de base ; il peut également permettre la mise en évidence d'une possible spécificité d'action, la vérification du caractère génotoxique ou épigénétique d'un composé et/ou l'organospécificité du produit étudié.

Pour être reconnu, un nouveau test en développement doit être validé sur un grand nombre de produits cancérogènes connus, de même que sur des produits non cancérogènes de

façon à évaluer respectivement la sensibilité et la spécificité du test. Il doit être reproductible, rapide, peu coûteux et capable de mesurer un effet génotoxique avec une quantité minimum de substance à tester.

L'objet de notre étude s'inscrit dans ce contexte : il s'agit de la mise en place, l'application et la validation du test des Comètes.

Notre travail a consisté, d'une part, à la mise en place et la validation du test *in vitro* sur des cellules en culture : les cellules L5178Y, l'objectif étant d'utiliser par la suite le test des Comètes pour des études de Screening.

D'autre part, le test *in vivo* a été mis au point et validé sur un organe cible : le foie.

De plus afin de déterminer dans quelle mesure le test est spécifique et sensible, notamment en terme d'organospécificité, une validation a été réalisée sur un autre organe cible : le rein.

PREMIERE PARTIE :

GENERALITES



I. LE TEST DES COMETES

A. DEFINITION ET HISTORIQUE DU TEST

a) Définition

Le test des Comètes ou « Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) Assay » en conditions alcalines, est défini comme une technique microélectrophorétique rapide, simple et sensible, qui permet d'évaluer *in vitro* et *in vivo* les cassures d'ADN simple et double-brin et les sites alcali-labiles sur des cellules eucaryotes individualisées (McKelvey-Martin *et al*, 1993).

Il permet de mettre en évidence les propriétés clastogènes de certains produits mais ne peut en aucun cas détecter des mutations. Il peut permettre, dans des conditions particulières, d'évaluer les capacités de réparation cellulaire et de détecter des produits apoptogènes (Tice *et al*, 2000).

b) Historique

En 1978, Rydberg & Johanson sont les premiers à avoir quantifié les dommages de l'ADN par une nouvelle approche utilisant la dénaturation de cellules incluses dans un gel d'agarose. Des cellules individualisées (cellules de Hamster chinois, CHO), irradiées par du ^{60}Co , sont incluses dans une couche de gel d'agarose déposée sur une lame de microscopie. La lyse des cellules et la dénaturation sont réalisées dans une solution alcaline. L'ADN est coloré par l'acridine orange, et la quantification des dommages se fait par mesure de l'émission de fluorescence. Plus précisément leur importance est déterminée par le rapport fluorescence verte sur fluorescence rouge. Sachant que les molécules d'acridine orange s'intercalent dans l'ADN double-brin en émettant une fluorescence verte et forment un polymère le long de l'ADN simple-brin émettant alors une fluorescence rouge, l'ADN peu endommagé montre alors un rapport fluorescence verte sur rouge élevé et inversement (Rydberg and Johanson, 1978).

En 1984, Ostling & Johanson améliorent la sensibilité de cette technique et introduisent une étape supplémentaire après la lyse : une électrophorèse en milieu neutre. Cette nouvelle version s'est révélée capable d'analyser les dommages causés à l'ADN par les rayons gamma sur des cellules de lymphome murin de la lignée L5178Y. Comme dans la version originale, les cellules ont été incluses dans une couche de gel d'agarose déposée sur une lame de microscopie et lysées. Ainsi sous l'influence du champ électrique (5 minutes à 5V/min) l'ADN va migrer. Après coloration à l'acridine orange, les fragments d'ADN sont observés au microscope à fluorescence. Cette technique a permis de détecter des lésions de l'ADN dose-dépendantes sous l'effet des radiations ionisantes.

Les cellules dont l'ADN est intact se présentent alors sous la forme d'une sphère avec des contours bien marqués (figure 1). Inversement, si l'ADN est endommagé, les fragments vont migrer à côté du noyau et former une traînée, assimilable à la queue d'une comète. Ainsi naît **LE TEST DES COMETES** (Ostling and Johanson, 1984).

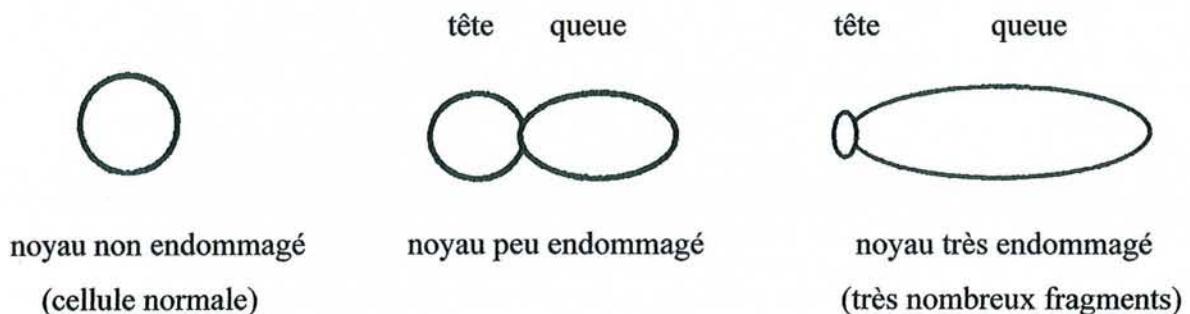


Figure 1 : Représentation schématique des comètes

En 1988, Singh modifie la technique en pratiquant l'électrophorèse en milieu alcalin, à pH > 13. Dans de telles conditions, le test permet de détecter les cassures simple-brin et les sites alcali-labiles. Il donne à cette variante du test des comètes le nom de « *Single cell gel electrophoresis* » (SCGE) (Singh *et al*, 1988).

En 1991, Olive et son équipe développent des versions en conditions neutres, pour détecter les cassures double-brin, et/ou alcalines (pH=12,3) afin de mettre en évidence les cassures simple et double-brin (Olive *et al*, 1991).

En 1994, Tice apporte de nouvelles modifications améliorant encore la sensibilité de la technique, c'est celle qui est généralement appliquée (Tice *et al*, 2000).

Depuis, avec de nombreuses applications et quelques variantes, ce test est largement utilisé.

Enfin, lors de l'«International Workshop on Genotoxicity Test Procedures» tenu à Washington en mars 1999, un panel d'experts a établi une proposition de ligne directrice du test des Comètes *in vitro* et *in vivo* (Tice *et al*, 2000).

B. LES LESIONS DE L'ADN MISES EN EVIDENCE PAR LE TEST DES COMETES

Une cellule subit, à tout moment, des agressions physiques et chimiques d'origine exogène. L'ADN en est la cible privilégiée. La fixation covalente d'un produit au niveau de l'ADN peut provoquer des lésions ou des mésappariements à l'origine de modifications variées de sa structure. Les altérations possibles de l'ADN provoquées par les facteurs exogènes sont multiples et diverses, comme le montre la figure 2 :

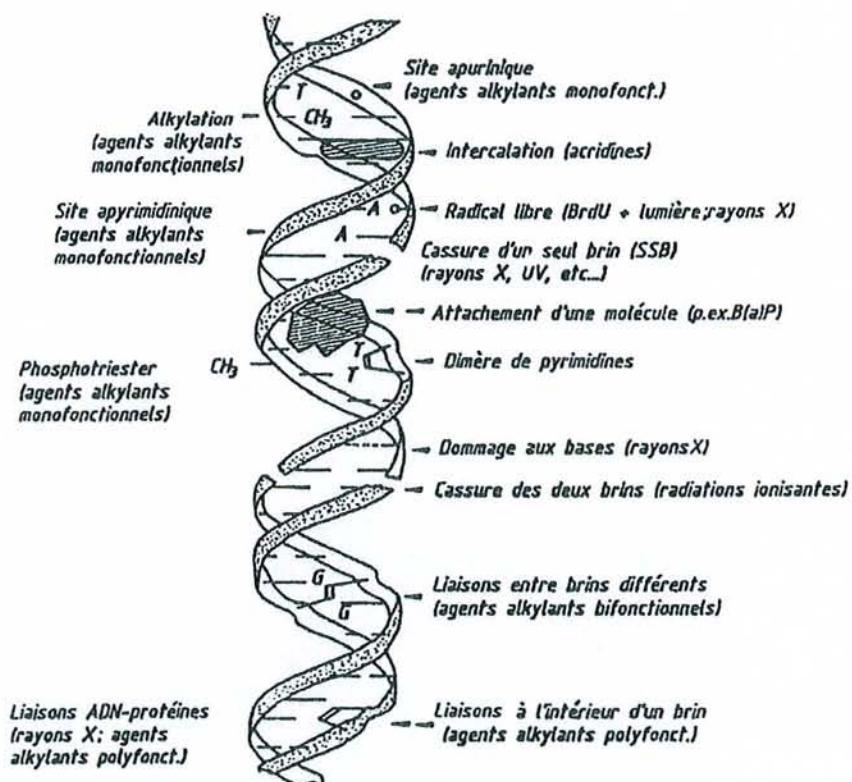


Figure 2 : Principales lésions produites par les agents génotoxiques (Léonard, 1990)

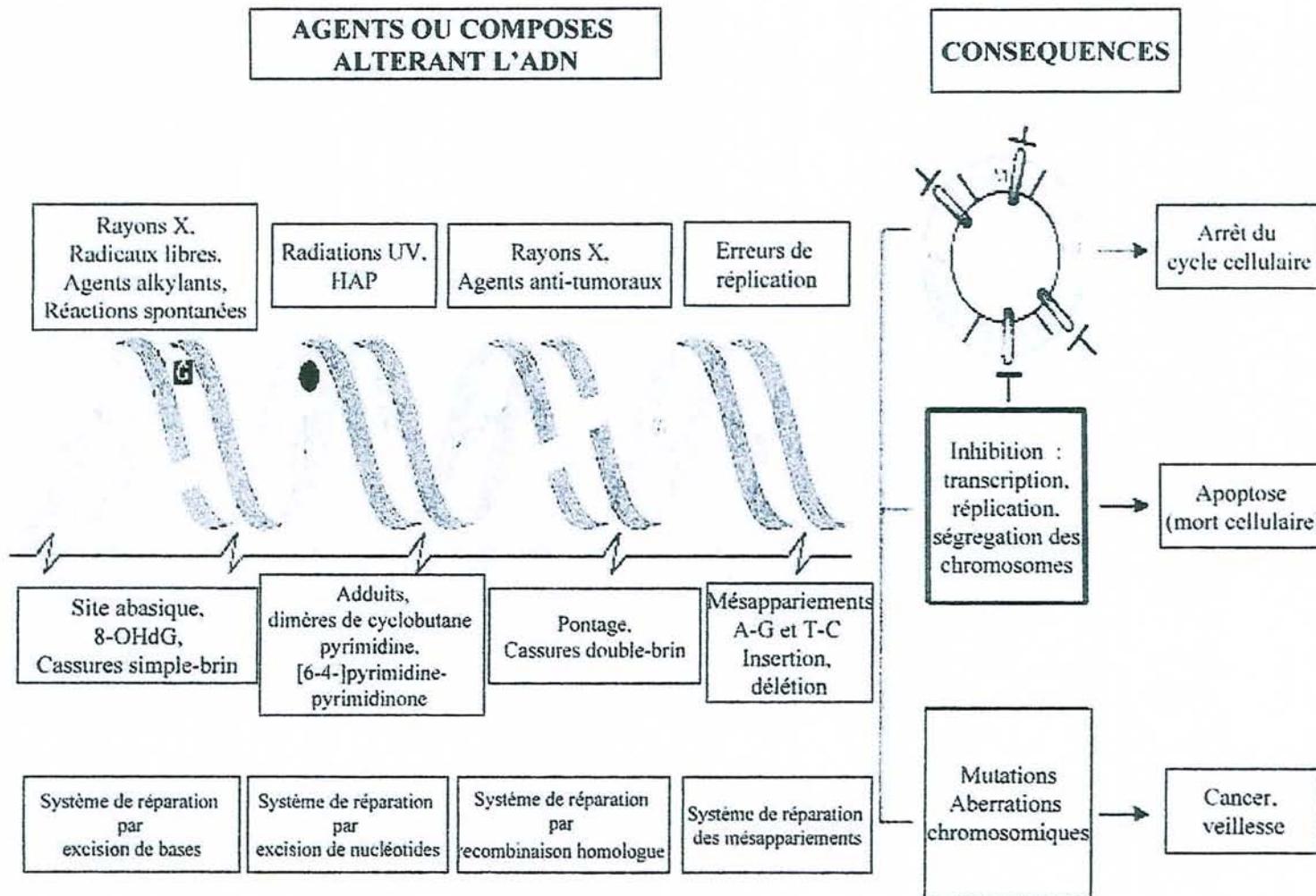
En effet, plusieurs cas sont possibles :

- ❖ Des réactions d'additions sur les centres nucléophiles des bases nucléiques (en position N7 de la guanine, N3 de l'adénine, O6 de la guanine,...), par des groupements méthyl ou éthyl (agents alkylants), par des métabolites électrophiles. La liaison entre « site électrophile-région nucléophile », autrement dit entre cancérogène et macromolécule (ici l'ADN) représente un composé appelé « adduit ». Durant la réPLICATION de la cellule, les adduits peuvent provoquer des mutations, ils peuvent également être à l'origine de cassures de l'ADN.
- ❖ Des pontages, c'est-à-dire des liaisons covalentes au sein de la molécule d'ADN (pontage interbrin) ou dans un seul brin (pontage intrabrin).
- ❖ Des ruptures de brins : cassures simple-brin ou double-brin, sous l'effet des UV par exemple.
- ❖ Des modifications de bases comme une oxydation par des composés très oxydants (oxygène singulet, anion superoxyde, radical hydroxyle, peroxyde d'hydrogène, etc...) formés par réaction photochimique sur l'oxygène ou par le métabolisme oxydatif.
- ❖ Une dimérisation de pyrimidines.
- ❖ L'ouverture du cycle pyrimidique ou cycle imidazole des purines, destruction du désoxyribose.
- ❖ La formation de sites AP : sites apuriniques ou sites apyrimidiques, sous l'effet des agents alkylants par exemple.
- ❖ L'intercalation de grosses molécules dans la double hélice de l'ADN par des agents « intercalants ». Ceci provoque des distorsions majeures, avec comme conséquences le blocage de la réPLICATION ou un décalage du cadre de lecture du code génétique lors de la transcription.

Généralement, un agent génotoxique provoque plusieurs types de lésions dont quelques unes sont prédominantes. La figure 3 résume les différents types de composés pouvant altérer l'ADN, les différentes modifications de sa structure, les différents mécanismes de réparation mis en jeu ainsi que les conséquences pour la cellule.

(Garry, 2004)

Figure 3 : Dommages à l'ADN, mécanismes de réparation (a) et conséquences (b)



Parmi ces différentes atteintes, le test des Comètes permet de détecter :

a) Les cassures simple et double-brin

De nombreux agents, physiques ou chimiques, sont capables de provoquer des cassures d'un ou des deux brins d'ADN. Ces cassures sont le résultat de différents processus mis en jeu par la cellule en réponse aux atteintes endogènes et exogènes comme le montre la figure 4 :

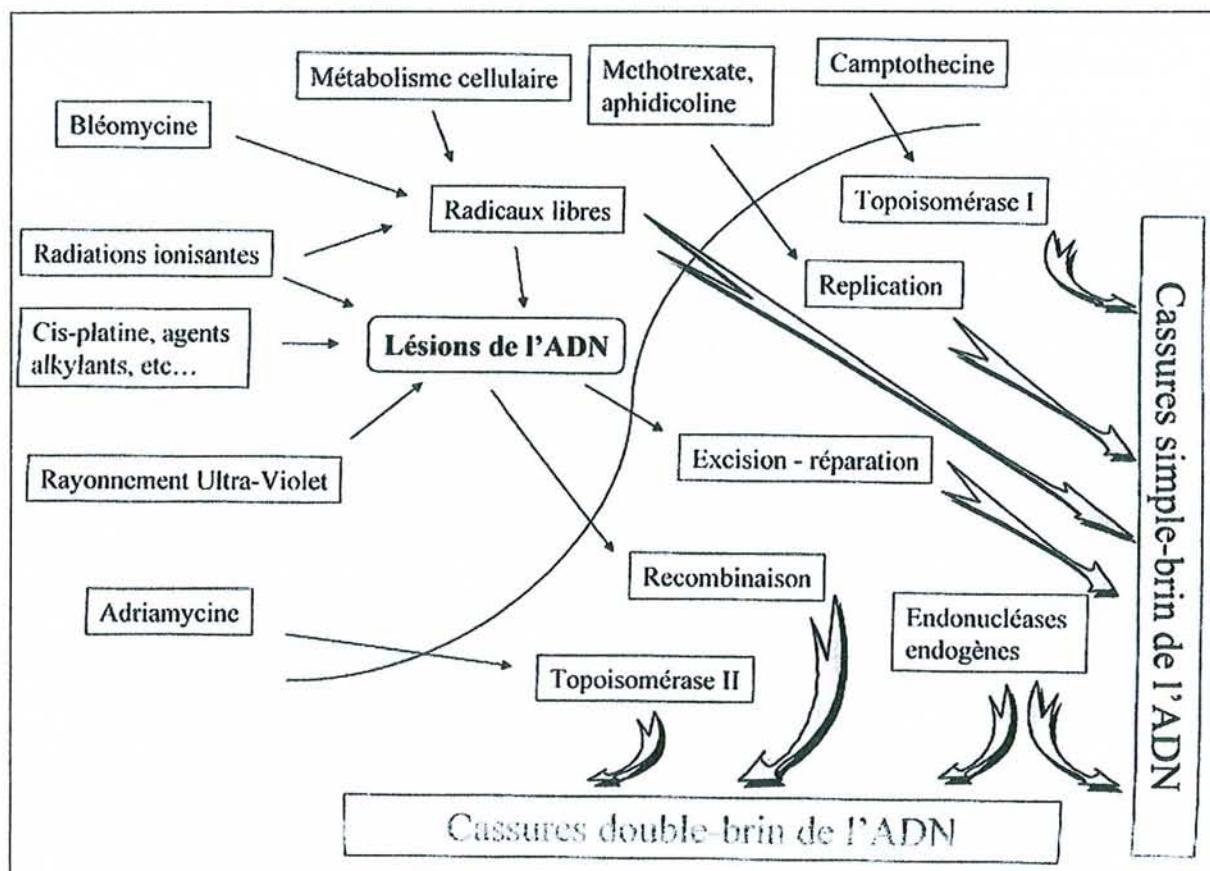


Figure 4 : Origine des cassures de l'ADN (Eastmann and Barry, 1992)



Les cassures simple-brin

Il s'agit d'une cassure sur un des deux brins du squelette phosphodiester de l'ADN.

Il existe un grand nombre d'agents (exogènes) capables de rompre les liaisons phosphodiesters. Parmi eux on trouve des agents chimiques comme les peroxydes ou encore certains ions métalliques (Fe^{2+} , Cu^{2+}). Les radiations ionisantes produisent également des cassures, par l'action d'électrons secondaires, par l'ionisation de l'eau et la production de radicaux libres oxygénés qui sont capables d'attaquer ces liaisons (Freifelder, 1990).

Les cassures simple-brin surviennent également et même fréquemment au cours de processus endogènes. Elles sont le résultat de nombreuses réactions différentes, telles que par exemple :

- la réparation par l'excision de bases ou de nucléotides,
- l'action d'endonucléases ou de la topoisomérase I.

Les cassures simple-brin sont considérées comme des lésions réparables étant donné que le brin opposé de la double hélice maintient les deux extrémités du brin cassé proches. Les cassures simple-brin sont le plus souvent réparées par l'action de l'ADN ligase. Certaines de ces cassures peuvent être réparées rapidement parce qu'elles représentent de simples discontinuités (entre un 5'-phosphate et un 3'-hydroxyl) dans le squelette phosphodiester de l'ADN ; en revanche, d'autres cassures sur un 3'-phosphate nécessitent comme première étape de réparation une déphosphorylation (Eastman et Barry, 1992).



Les cassures double-brin

Elles sont définies comme la présence de deux cassures, chacune sur un brin opposé de la double hélice, localisées soit en opposition soit proche l'une de l'autre, entraînant la rupture de la double hélice.

Si une molécule d'ADN comporte un nombre important de cassures simple-brin, elles peuvent se situer de façon suffisamment proche pour former une cassure double-brin.

Des cassures double-brin peuvent être produites lors de divers processus endogènes physiologiques, tels que la transcription, la recombinaison, la réplication, certains types de

réparation de l'ADN, ou l'apoptose. Les facteurs exogènes responsables les plus courants sont les radiations ionisantes, les inhibiteurs de la topoisomérase II, les xénobiotiques générant des radicaux libres ou oxygénés.

Une cassure double-brin de l'ADN est une lésion qui peut conduire à une perte importante d'informations pour la cellule, à cause de la discontinuité physique du chromosome qui en résulte. Une non-réparation ou une réparation fautive d'une cassure double-brin conduira à une aberration chromosomique, à une mortalité cellulaire ou à une transformation oncogénique (Eastman et Barry, 1992).

b) Les sites alcali-labiles

Les cassures ne sont pas toutes induites directement, certains sites fragilisés peuvent être transformés en cassure de brin lors du traitement de l'ADN avec des solutions très alcalines (pH>13).

Ces sites peuvent être formés par les agents alkylants. En effet ces derniers forment des liaisons sur les sites nucléophiles de l'ADN, illustrés figure 5.

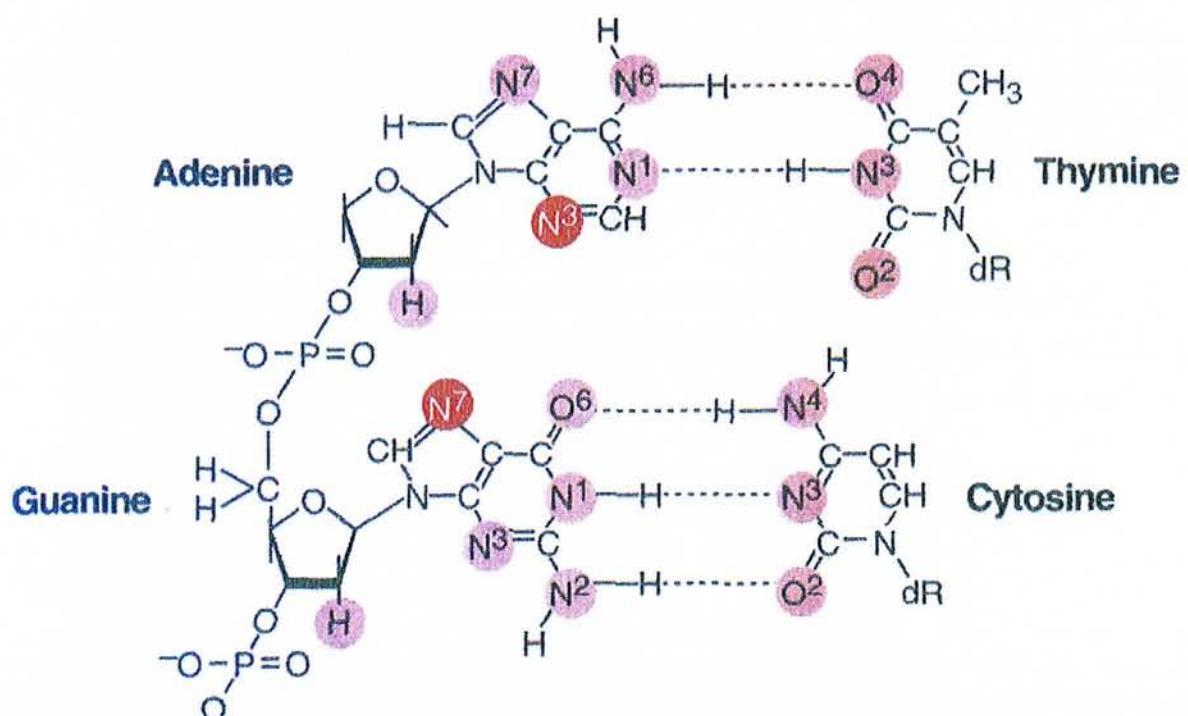


Figure 5 : Sites d'alkylation des bases de l'ADN (Friedberg, 2005)

Les agents alkylants vont ainsi affaiblir la liaison N-glycosidique, ce qui va conduire à la dépurination ou à la dépyrimidination spontanée, formant des sites apuriques ou apyrimidiniques encore appelés sites AP (Cf figure 6)

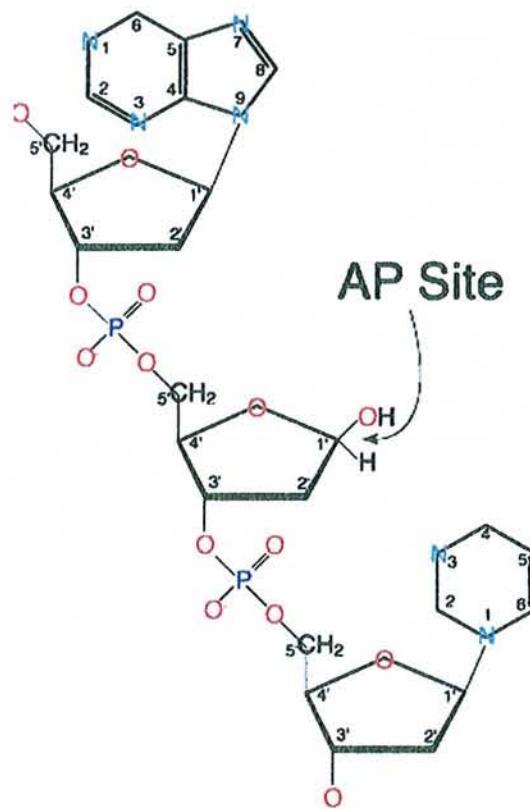


Figure 6 : Exemple d'un site AP (Friedberg, 2005)

Ces sites AP peuvent également résulter de l'excision de certaines bases endommagées initiée par une ADN-glycosylase spécifique (Friedberg *et al*, 1995).

Notons que ces sites alcali-labiles sont stables jusqu'à des pH de 12,5 (Eastman et Barry, 1992). Au-delà, les sites AP sont hydroxylés par une réaction de β -élimination produisant un clivage de la liaison phosphodiester et donc une cassure de brin.

c) Les lésions mises en évidence par les systèmes de réparation

Les cellules possèdent des systèmes de protection contre les agressions susceptibles d'altérer leur ADN. En effet, elles mettent en œuvre un ensemble de systèmes enzymatiques de réparation pour restaurer la séquence et la structure de base de l'ADN endommagé. Ces systèmes sont essentiels car ils sont capables de maintenir l'intégrité de l'information génétique contenue dans l'ADN cellulaire.

Les mécanismes sont de trois types

- ◆ La restauration de la zone endommagée : c'est le plus simple. Une action enzymatique restaure la structure sans modifier le squelette.
- ◆ La suppression de la zone endommagée : les bases ou le groupe de nucléotides incorrects sont remplacés.
- ◆ La tolérance de la zone endommagée : il n'y a pas de réparation, la lésion est acceptée.

Cette synthèse constitue une liste qui n'est pas exhaustive, mais met en évidence les principaux mécanismes des systèmes de réparation des lésions de l'ADN, elles mêmes détectées par le Test des Comètes. Ces mêmes cassures sont soit transitoires et apparaissent au cours même du mécanisme de réparation, ou bien elles peuvent être dues à une réparation incomplète (Speit and Hartmann, 1995).

La restauration de la zone endommagée ou réparation par réversion

Ce système de réparation est le plus simple et le plus direct.

Parmi les mécanismes les plus significatifs, citons :

La photoréactivation (Friedberg et al, 1995)

Il est le plus simple et le plus ancien des systèmes de réparation. Il agit sur les lésions de l'ADN causées par les rayonnements UV. La photoréactivation correspond à un clivage enzymatique des dimères de pyrimidines activés par l'exposition aux UV (Cf figure 7).

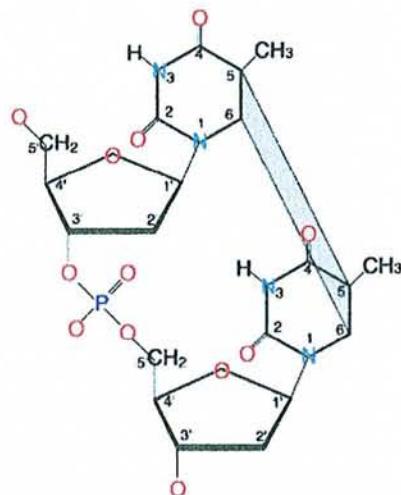


Figure 7 : Dimère de Thymine formé par les UV (Friedberg, 2005)

Une enzyme de « photoréactivation », ou enzyme PR, ou photolyase, va former un complexe ADN-enzyme. Ce dernier absorbe la lumière et utilise cette énergie pour cliver les liaisons C-C du dimère, régénérant ainsi les 2 pyrimidines adjacentes (Cf figure 8).

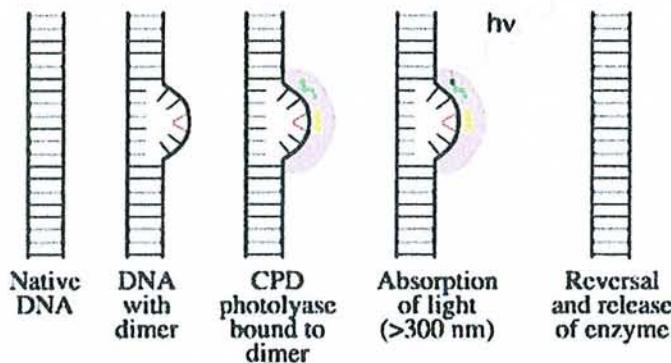


Figure 8 : La photoréactivation (Friedberg, 2003)

La réparation des cassures double-brin (Papadopoulo, 2005)

Deux voies majeures sont impliquées dans la réparation des cassures double-brin (CDB) : la Recombinaison homologue et le processus dit " End-joining " (Cf figure 9)

La recombinaison homologue se produit à partir d'une extrémité 3'-OH libre. Ce mécanisme induit une recombinaison pour résoudre une interruption sur l'une des molécules filles (liaison inter-brin) ou traiter une lésion non codante sur l'ADN. Il nécessite une homologie de plusieurs centaines de bases entre la séquence-porteur de la CDB et la séquence utilisée pour sa réparation. Ce mode de réparation est en général précis et requiert une chromatide sœur ou homologue.

Le processus "End-Joining" (EJ) constitue la voie prédominante de la réparation des CDB dans les cellules somatiques des mammifères. Lors de ce processus les extrémités cassées de l'ADN sont alignées et ressoudées.

Les principaux acteurs du processus "End-Joining" sont :

- l'hétérodimère Ku70/Ku80 qui s'attache aux extrémités et les protège ;
- une protéine kinase DNA dépendante, DNA-PKcs, qui se joint au complexe et recrute les autres composantes de la machinerie EJ.

Le complexe ainsi formé rapproche, aligne et maintient les extrémités à proximité. L'ADN Ligase IV avec son co-facteur XRCC4 participe dans l'étape finale - la religation.

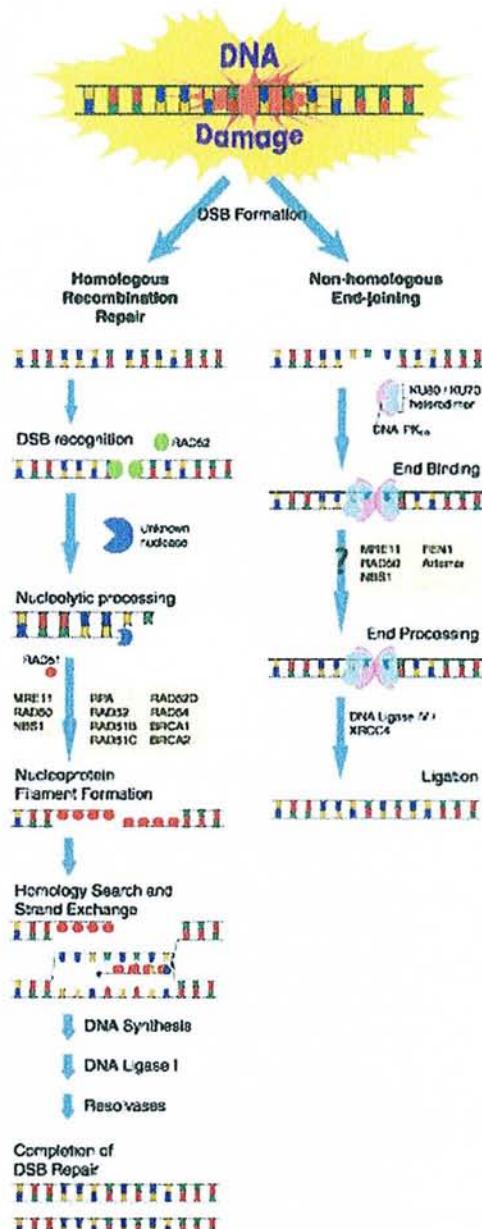


Figure 9 : La réparation par recombinaison homologue et le processus « End-Joining »

(Papadopoulo, 2005)

La déalkylation *in situ* de bases alkylées (Friedberg et al, 1995)

Certains composés comme la N-méthyl-N'-nitro-N-nitroguanidine (MNNG), la N-méthyl-N-nitrosourée (MNU) et dans une moindre mesure le méthyl-méthane sulfonate (MMS) réagissent avec l'ADN pour produire des dérivés O-alkylés et N-alkylés. Parmi les O-alkylés, la O⁶-alkylguanine et la O⁴-alkylthymine sont des lésions potentiellement mutagènes car à l'origine de mésappariements pendant la réPLICATION.

Ainsi la O⁶-méthylguanine-ADN-méthyltransférase (O⁶-MGT) catalyse le départ d'un groupement méthyl en position O⁶ d'une guanine.



La suppression des lésions ou réparation par excision

Ce système de réparation consiste en l'excision d'un nucléotide ou d'une base, ce qui permet d'enlever la partie de l'ADN endommagée et de la remplacer par le nucléotide original, reconstituant ainsi de façon intacte l'ADN.

La réparation par excision de base (Friedberg et al, 1995)

Le système de réparation par excision de base est l'un des mécanismes les plus actifs pour corriger les lésions de l'ADN. C'est le mécanisme principal pour enlever spontanément les dommages causés par hydrolyse ou oxydation ; les principaux agents responsables sont les espèces réactives de l'oxygène (superoxyde, radical hydroxyle, peroxyde d'hydrogène), et les radicaux libres. La réparation par excision de base est aussi souvent responsable des corrections de lésions qui surviennent spontanément dues à l'instabilité de l'ADN ou suite à des alkylations. Dans tous les cas ce système chaperonne :

- ◆ Des bases inappropriées (mal appariées ou lésées) provenant d'erreurs de réPLICATION ou via des modifications chimiques par oxydation ou alkylation,
- ◆ Des sites ou bases perdus, formés par une réACTION enzymATIQUE,
- ◆ Des cassures de brins d'ADN dues à une attaque par des radicaux libres.

Le système de réparation par excision de bases implique des protéines, l'action séquentielle d'une série d'enzymes, qui reconnaissent et excisent spécifiquement les lésions de l'ADN, éventuellement en remplaçant le motif lésé par le nucléotide normal en restaurant l'ADN dans son état d'origine.

Les différentes étapes du processus sont :

- ◆ La suppression de la base inappropriée, celle-ci est incisée par une ADN-glycosylase. Ces enzymes se lient spécifiquement à la base altérée et clivent la liaison N-glycosidique en laissant le désoxyribose dans le squelette, créant ainsi un site AP.
- ◆ Une AP-endonucléase (APE), qui reconnaît ces sites sur l'ADN duplex, produit une seule coupure par hydrolyse de la liaison phosphodiester immédiatement en 5' (plus rarement en 3') du site AP générant ainsi un résidu désoxyribose-phosphate.
- ◆ Il s'ensuit l'excision du désoxyribose par l'action d'une exonucléase ou ADN-désoxyribophosphodiesterase. L'action séquentielle de ces enzymes génère une brèche d'un nucléotide dans l'ADN duplex.
- ◆ La réparation de l'ADN est complétée par l'ADN-polymérase qui comble la brèche en incorporant le nucléotide manquant et l'ADN-ligase qui relie les deux brins.

Ces différentes étapes sont illustrées figure 10.

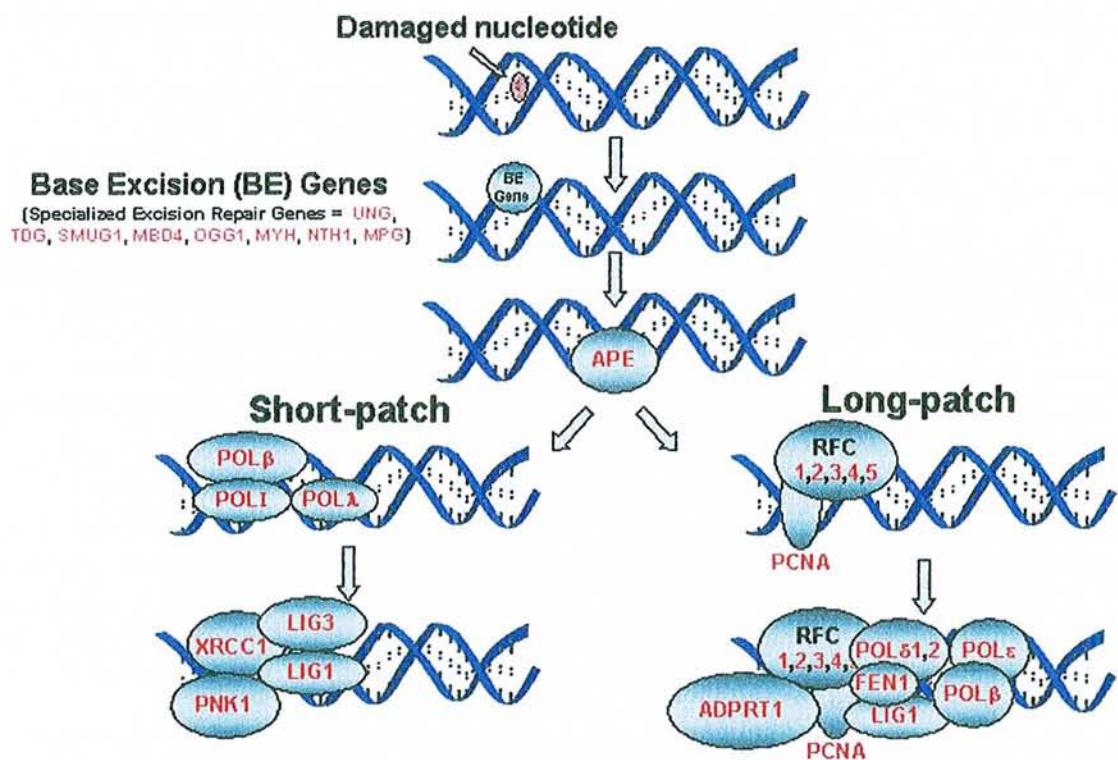


Figure 10 : Le système de réparation par excision de bases (Matsumoto, 2003)

La réparation par excision de nucléotides (Friedberg et al, 1995)

Les lésions de l'ADN causées par l'interaction entre l'environnement et l'ADN ne sont pas toutes reconnues par des ADN-glycosylases spécifiques. Le système de réparation par excision de nucléotides fait intervenir une autre classe d'enzymes de réparation qui excise la base endommagée à l'état de nucléotides et non de bases libres.

La base endommagée est reconnue par une endonucléase dommage-spécifique qui incise l'ADN de chaque côté de la lésion, produisant un fragment d'oligonucléotides qui inclut la base endommagée. Une exonucléase enlève ce fragment et crée une brèche. Alors, l'ADN-polymérase reconstitue la séquence en prenant pour matrice le brin complémentaire intact. La fermeture de la chaîne réparée se fait grâce à l'intervention de l'ADN-ligase (Cf figure 11).

Ce type de réparation induit donc aussi des brèches sur l'ADN.

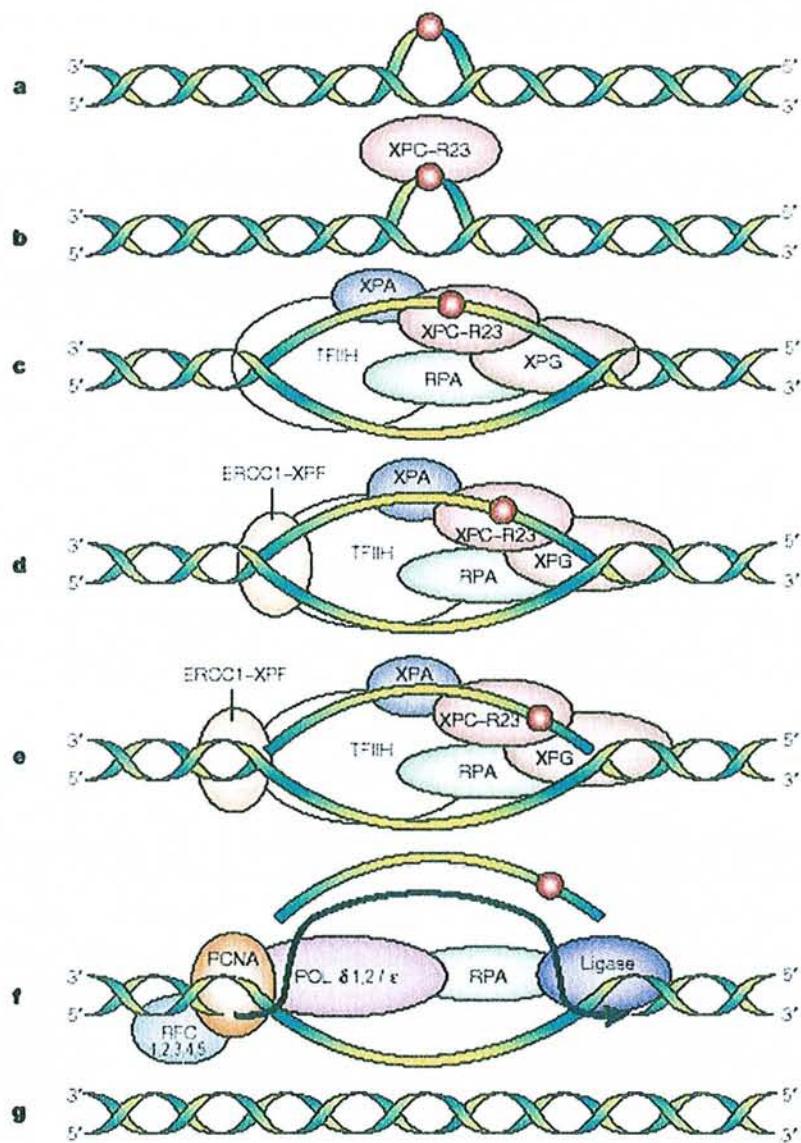


Figure 11 : Le système de réparation par excision de nucléotide (Friedberg, 2003)

La réparation des mésappariements (Friedberg et al, 1995)

L'altération de l'ADN provient fréquemment des mésappariements de bases lors de la réplication de l'ADN. Aussi, les cellules eucaryotes sont capables de réparer les bases non appariées dans leur ADN. Le mécanisme est le suivant :

- ◆ Reconnaissance du mauvais appariement,
- ◆ Excision de la base mal incorporée et de l'ADN entourant celle-ci,
- ◆ Réparation par resynthèse afin de remplacer la bonne base.

Ce système de réparation doit être capable de distinguer la base correcte de l'incorrecte. Cette reconnaissance est basée sur le degré de méthylation de chaque brin, l'excision se faisant préférentiellement sur les nucléotides du brin le moins méthylé c'est-à-dire le brin nouvellement synthétisé.



La tolérance de la zone endommagée.

Toutes les lésions de l'ADN ne peuvent être réparées immédiatement. Certaines persistent. Si une fourche de réplication contient des altérations (par exemple un dimère de pyrimidine), il y a normalement un blocage de la réplication ou lacune post-réplicative (brèche sur le brin fils).

Deux autres types de réparation, mais exclusivement procaryotes peuvent être mis en évidence : le système SOS et la réplication fautive.

En conclusion, lors de la réparation, le plus souvent, se crée une cassure simple-brin dans l'ADN. Cette cassure transitoire ou persistante, lorsque les systèmes de réparation sont incomplets, sera détectée lors du Test des Comètes réalisé en condition alcaline. Le test pourra donc mettre en évidence indirectement, par l'intermédiaire des mécanismes de réparation, de nombreuses lésions autres que des cassures directes (Collins A, 2004).

C. PRINCIPE GENERAL DU TEST DES COMETES

A l'état normal, une molécule d'ADN située dans le noyau se présente sous une forme superenroulée. Une cassure provoque la rupture du brin d'ADN ; cela entraîne un relâchement de cette structure en double hélice. Sous l'effet d'un champ électrique faible, les fragments d'ADN, plus légers et surtout chargés négativement, vont migrer vers l'anode (Tice *et al*, 2000).

Le protocole suit les étapes décrites figure 12:

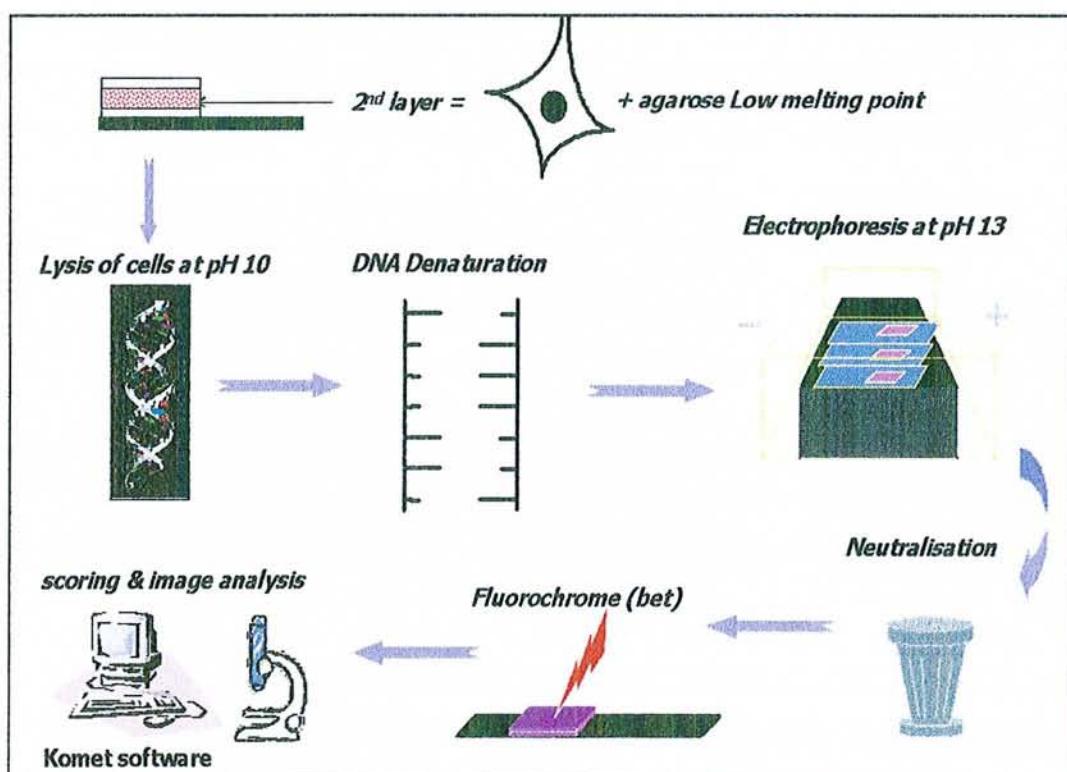


Figure 12 : Principales étapes du Test des Comètes

◆ Les cellules :

L'un des avantages principaux du test des Comètes est qu'il est applicable sur n'importe quel type cellulaire, à toute lignée ou tissu isolé, humain, animal (y compris invertébrés) ou même végétal. Toute cellule eucaryote peut être employée pour la réalisation du Test des Comètes à condition d'obtenir une suspension homogène de cellules bien individualisées avec une viabilité acceptable, i.e. >60% (Fairbairn, 1994).

La préparation de la suspension cellulaire, à partir d'une culture (*in vitro*) ou d'un organisme (*in vivo*), constitue la première étape du test ; elle peut se révéler très délicate, car elle constitue la base du test et conditionne son bon déroulement. Ainsi, il est indispensable de manipuler les cellules avec d'extrêmes précautions, afin de ne pas engendrer de lésions supplémentaires non spécifiques de l'ADN. C'est pour cette raison en particulier que certaines étapes du test se déroulent à l'obscurité, la lumière naturelle (les rayons UV en particulier) pouvant induire des lésions alcali-labiles supplémentaires (Hartmann *et al*, 2003, Tice *et al*, 2000).

En ce qui concerne le traitement ou l'exposition par les substances à étudier, le principe consiste à :

- pour le protocole *in vitro*, traiter des cellules en culture avec le produit à tester et récupérer ces dernières après un temps de traitement pré-déterminé,
- pour le protocole *in vivo*, exposer l'organisme vivant à la substance à tester, récupérer les tissus et/ou les échantillons biologiques d'intérêt et d'en isoler les cellules. La technique d'isolement cellulaire doit permettre de récupérer un nombre suffisant de cellules ($>1.10^5$) viables (Anderson *et al*, 1998).

Dans ce document consacré à des études de toxicologie génétique, deux techniques différentes d'isolement de cellules d'organes, obtenues à partir d'animaux traités, ont été expérimentées. (*Cf Matériel et méthodes*).

❖ La préparation des lames

Le principe du test des Comètes consiste à inclure la suspension de cellules individualisées ainsi obtenue dans un gel d'agarose à bas point de fusion (37 °C), l'ensemble étant déposé sur des lames de microscopie. En réalité, il ne s'agit pas d'un simple dépôt sur lame de microscope, ce mélange cellules-agarose est inclus « en sandwich » entre deux autres couches de gel d'agarose comme le montre la [figure 13](#).



Figure 13: « Un sandwich » de trois couches d'agarose

- la première couche d'agarose (à point de fusion normal) doit permettre d'assurer l'adhérence de la totalité du « sandwich » à la lame,
- la seconde couche est constituée du mélange entre la suspension de cellules individualisées et l'agarose à bas point de fusion, ce dernier ayant l'avantage d'être liquide à 37°C (température optimale pour la viabilité des cellules) et permet de réaliser un mélange homogène.
- La dernière couche est facultative ; elle permettrait de « protéger » davantage le tout, évitant une perte de cellules voire de fragments d'ADN.

La qualité de l'image d'une comète affecte largement le pouvoir d'obtention de l'information optimale concernant le niveau de lésions de l'ADN. C'est pourquoi le choix de la lame et de l'agarose est important afin de produire une image finale de bonne qualité.

La préparation des lames et surtout celle des agaroses (à bonne concentration) constitue également une étape importante et délicate du test.



La lyse

Lorsqu'une cellule est soumise à une solution de lyse contenant un détergent, non ionique ou ionique, et contenant des sels en concentration élevée, le détergent rendra la cellule perméable en dissociant la double couche de phospholipides membranaires, tandis que la solution saline dissociera les histones de l'ADN soit plus de 95 % des protéines nucléaires (Fairbairn *et al*, 1995). En effet la chromatine se dissocie en présence de solutions salines à concentrations élevées. Notons que la solution de lyse ne doit en aucun cas endommager le gel d'agarose.

Un antioxydant, le diméthylsulfoxyde (DMSO) sera ajouté à 10 % pour prévenir la formation des radicaux oxygénés pouvant provenir de l'hémoglobine libérée par les erythrocytes éventuellement présents dans le(s) tissu(s) (Tice *et al*, 2000). De cette façon, bien que la plupart des auteurs préconisent une durée d'une heure, temps minimum pour lyser la membrane cytoplasmique, la lyse pourrait être prolongée pendant des mois sans provoquer de lésions supplémentaires.

Ainsi, lors de cette étape, les membranes cellulaires, nucléaires, et les protéines liées à l'ADN sont éliminées. En revanche, à ce stade du protocole la structure de l'ADN persiste sous forme superenroulée, malgré l'absence de la membrane du noyau et l'élimination des histones, et ce du fait de la présence de la matrice nucléaire.



La dénaturation

Rappel : afin de comprendre le comportement de l'ADN, notamment au cours de cette étape du test, rappelons préalablement et succinctement l'organisation d'une molécule d'ADN. (Freifelder, 1990)

Dans les cellules eucaryotes, l'ADN est organisé en unités distinctes appelées chromosomes. Chaque chromosome contient une unique et énorme molécule d'ADN. Une cellule typique de mammifère contient à peu près 50 cm d'ADN génomique. Il est donc impératif, pour que l'ADN puisse s'insérer dans un noyau de 5 à 10 μm de diamètre, qu'il se replie sur lui-même. Ainsi à l'état natif dans un noyau, la molécule d'ADN se présente sous une forme superenroulée, fortement compactée. La molécule d'ADN, dans un chromosome d'eucaryote, est liée à des protéines basiques appelées histones. Le complexe comprenant l'ADN et les histones est appelé la chromatine.

L'unité structurale la plus élémentaire observée en microscopie électronique correspond à une fibre de 10 nm d'épaisseur semblable à un chapelet de perles. Chaque perle ou nucléosome correspond à un complexe ordonné d'ADN et d'histones. L'assemblage de l'ADN et des histones est la première étape du raccourcissement du brin d'ADN dans un chromosome. La molécule d'ADN est ensuite repliée de telle sorte que les nucléosomes sont empilés les uns sur les autres pour créer des rangées régulières dans lesquelles l'ADN est fortement condensé. Enfin dans un chromosome, l'ADN n'est pas seulement empaqueté avec les histones en nucléosomes mais il est aussi replié et organisé par d'autres protéines de façon à former des boucles.

Cf figure 14

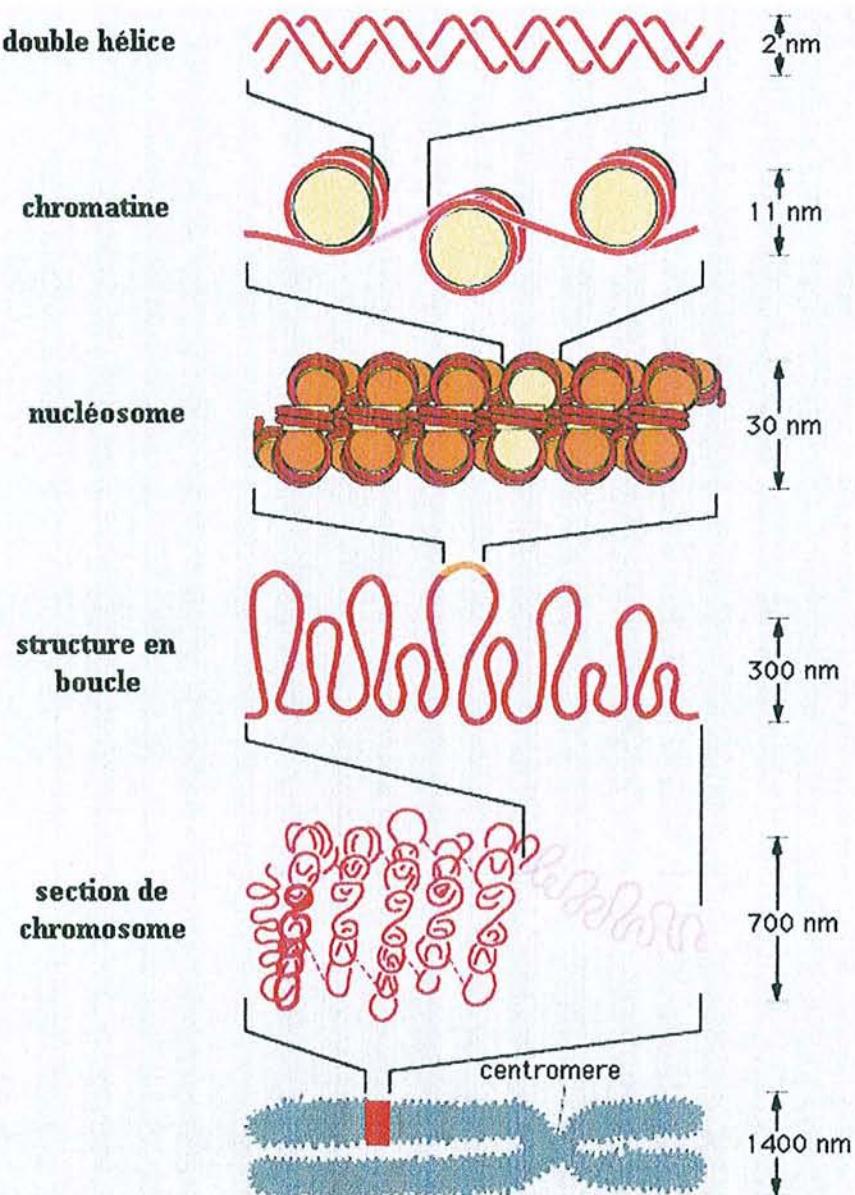


Figure 14 : Organisation de l'ADN : « de la double hélice au chromosome »
 (Mohler, 2005)

Réalisée sous conditions alcalines fortes, l'étape de dénaturation permet alors le relâchement de la molécule d'ADN suivi par son déroulement et par la dénaturation de l'ADN double-brin, c'est-à-dire la séparation des deux brins ; l'ADN devient alors simple-brin ou monocaténaire. L'augmentation de pH est un agent dénaturant car il modifie les charges portées par les groupements chimiques engagés dans les liaisons hydrogènes qui maintiennent la structure en double hélice. Le déroulement se produit au niveau des extrémités de la

molécule d'ADN mais aussi au niveau des cassures simple-brin. Notons à ce sujet que si l'ADN superenroulé présente une cassure simple-brin, il en résulte un relâchement de la double hélice superenroulée. Ainsi une molécule d'ADN portant une cassure est beaucoup moins compacte.

De plus, il se forme à pH très alcalin (>13) des cassures au niveau des sites alcali-labiles.

En conclusion, la réalisation de cette étape permettra la mise en évidence des cassures simple et double-brin et des sites alcali-labiles (Miyamae *et al*, 1997).

Dans la mesure où la solution de déroulement est la même que la solution d'électrophorèse, cette étape permet aussi qu'un équilibre s'établisse entre la solution et le gel d'agarose avant la réalisation de l'électrophorèse.

◆ L'électrophorèse

Principe : L'ADN chargé négativement, soumis à un champ électrique, va migrer vers l'anode. Les fragments d'ADN beaucoup plus légers seront entraînés plus loin, formant ainsi une traînée, la queue de la comète.

La solution tampon utilisée est identique à celle de la phase de dénaturation. Par rapport aux techniques conventionnelles, l'exécution de l'électrophorèse en comète ne requiert qu'un temps court, une faible tension et une faible intensité. Ainsi l'électrophorèse est, comme la dénaturation, réalisée à pH alcalin ($\text{pH} > 13$), pendant 20 minutes, à 25 V et 300 mA. Ainsi les fragments d'ADN vont migrer dans le gel selon leur taille.

Selon Singh (Singh *et al*, 1991), la tension utilisée doit être la plus faible possible permettant de faire migrer des molécules d'ADN de poids moléculaire élevé.

Tice (Tice *et al*, 2000) recommande une réalisation à $+ 4$ °C pour garantir une bonne reproductibilité. Speit (Speit *et al*, 1998) montre que la température de l'électrophorèse est un paramètre majeur et peut engendrer d'importantes variabilités dans les résultats.

Le test peut également être effectué à pH neutre. En effet, si l'objectif de l'étude à pH alcalin est de détecter les cassures simple et double-brin, lorsque le test est effectué à pH

neutre, seules les cassures double-brin sont détectées. Cette variante est en conséquence beaucoup moins utilisée.

Notons qu'à pH neutre, le test ne permet pas de dénaturation de l'ADN double-brin. De ce fait au cours de l'électrophorèse, la présence de protéines liées à la molécule d'ADN ralentit la migration à travers le gel. Une faible tension de courant d'électrophorèse ne permet pas aux nucléoides de se relâcher et aux extrémités endommagées de l'ADN chargées négativement de s'étirer vers l'anode.

Enfin en condition neutre, la forme de la comète est également différente. La queue de la comète n'est pas constituée de fragments d'ADN comme c'est le cas en condition alcaline, mais correspond aux boucles d'ADN relâchées encore liées à la matrice nucléaire.

C'est pourquoi la méthode en condition alcaline est celle recommandée dans les propositions de lignes directrices de Tice et son équipe (Tice *et al*, 2000).



La neutralisation

Après l'électrophorèse, il est recommandé de rincer les lames dans un tampon à pH=7,4. Cette étape a pour but de neutraliser la solution alcaline présente dans le gel et d'éliminer sels et détergents qui entraîneraient lors de la lecture un bruit de fond important (Singh, 1996).



La coloration

Les lames peuvent être lues en l'état immédiatement, une fixation à l'alcool permet de les conserver à température ambiante et à l'abri de la lumière (Klaude *et al*, 1996, Woods *et al*, 1999). La fixation a pour but de déshydrater les lames, afin de permettre une conservation plus longue, évitant ainsi la diffusion de l'ADN à travers la matrice du gel d'agarose au fil du temps.

La coloration est réalisée par un fluorochrome. Les agents les plus utilisés et décrits dans la littérature sont le Bromure d'Ethydium (BET) (Ostling et Johanson, 1984, Singh *et al*, 1988), l'Iodure de Propidium (IP) (Olive *et al*, 1991). Ce sont des agents intercalants qui ont la propriété de se fixer entre les brins d'ADN entraînant ainsi un phénomène de fluorescence.

Ces fluorochromes permettent d'obtenir des images de très bonne qualité avec un contraste élevé entre l'ADN et l'agarose ainsi qu'un faible bruit de fond. Ils présentent une

stabilité relativement bonne. Il est recommandé également d'utiliser un anti-fad (Longin *et al*, 1993). En effet ce dernier permet de stabiliser davantage la coloration et d'éviter les variabilités liées notamment aux extinctions de fluorescence.



L'analyse des lésions

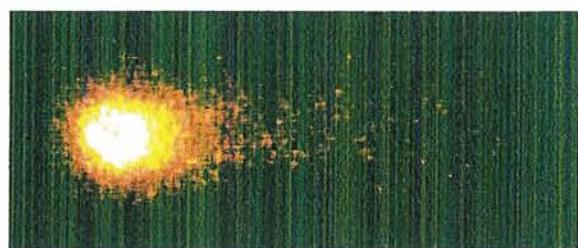
La lecture des lames se fait immédiatement après la coloration et toujours à l'obscurité.

L'analyse des lésions de l'ADN se fait alors sous un microscope à fluorescence, reliée à un système informatique d'analyse d'image.

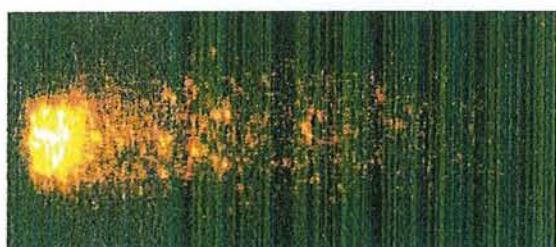
En l'absence de logiciel, les dommages sont analysés qualitativement, en classant visuellement les comètes obtenues en fonction de leur aspect comme le montre la figure 15 (Avishai *et al*, 2003).



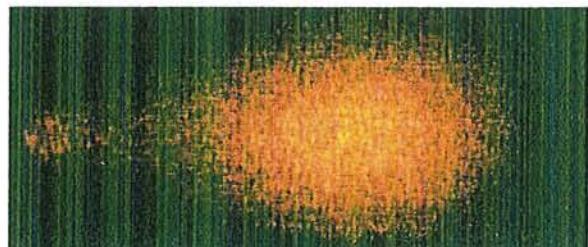
Cellule intacte :
observée pour les témoins négatifs



Noyau peu endommagé :
ébauche de queue



Noyau fortement endommagé :
queue franche



Cellule fantôme :
tête à peine visible

Figure 15 : Les différents types de comètes

Mais dans la majorité des études aujourd’hui, le microscope à fluorescence est relié à une caméra, couplée à un logiciel d’analyse d’image (Cf figure 16).

(Frieauff *et al*, 2001, Konca *et al*, 2003, Bocker *et al*, 1999)

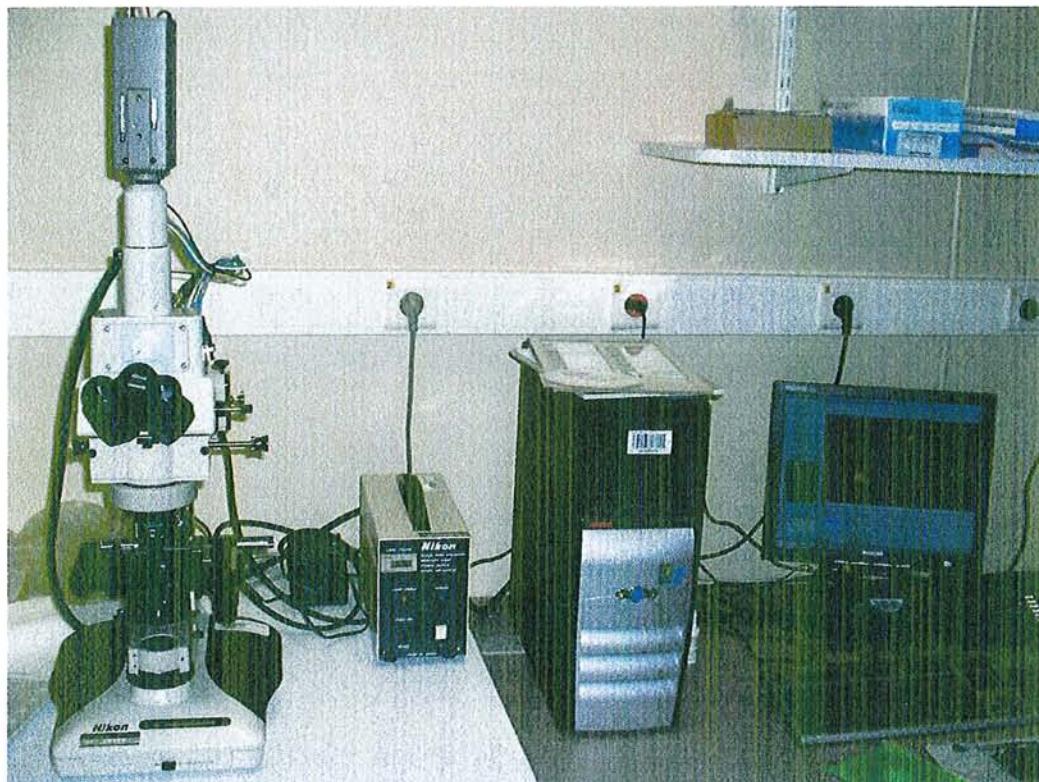


Figure 16 : Photo du microscope équipé d'une caméra et relié à l'ordinateur (salle d'analyse d'image Sanofi-Aventis-Montpellier)

Les fragments sont alors mesurés quantitativement. Cette analyse est semi-automatique : les cellules sont sélectionnées une à une en balayant la lame sous le microscope.

L'image ci-dessous (figure 17) correspond à l'écran de travail du logiciel :

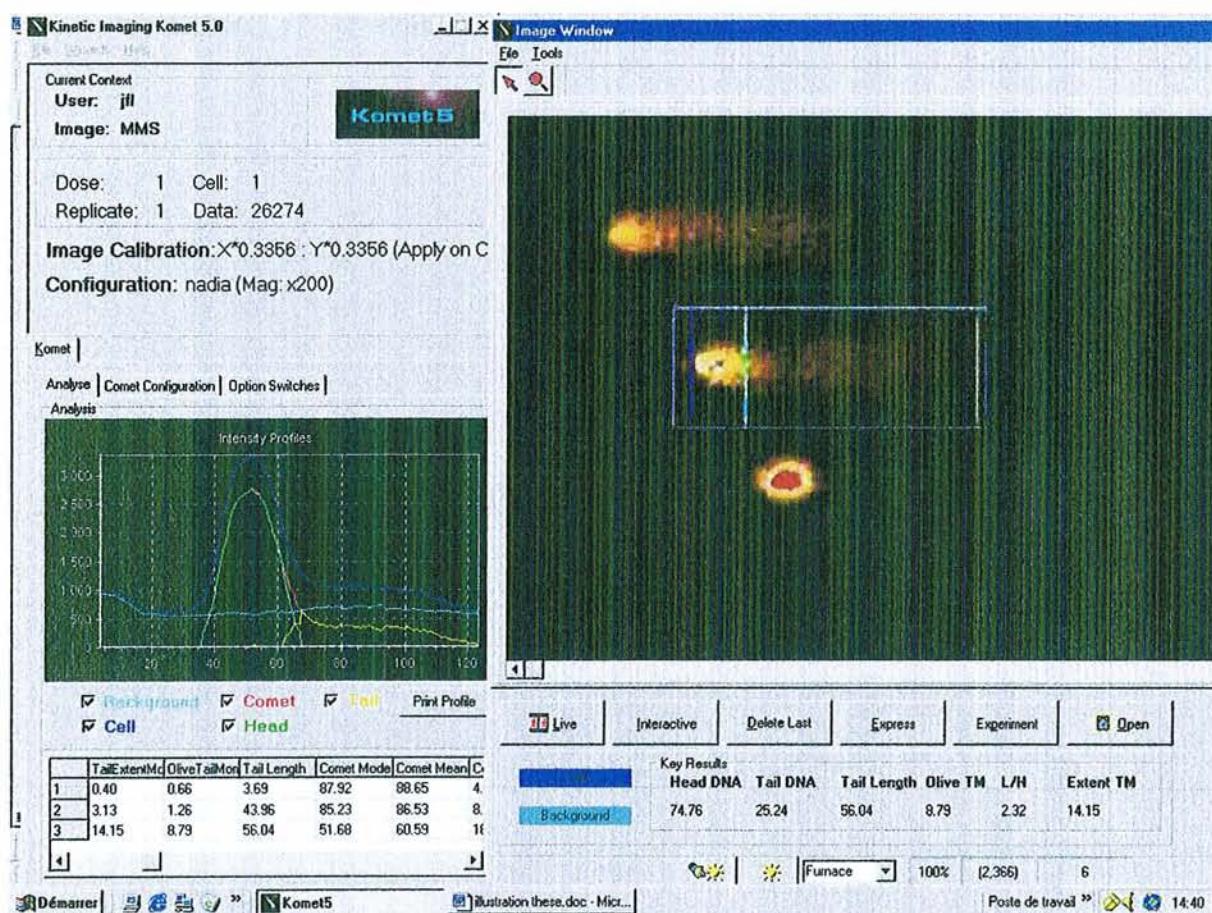


Figure 17 : Ecran de travail du logiciel Komet 5-Kinetic Imaging

La partie droite de l'écran de l'ordinateur correspond à l'image telle qu'elle apparaît sous l'oculaire du microscope, elle est ainsi retranscrite grâce à la camera. Pour chaque cellule sélectionnée, un cadre de mesure est créé permettant de délimiter la tête et la queue de la comète, de mesurer l'intensité de fluorescence et le bruit de fond (Cf agrandissement figure 18)

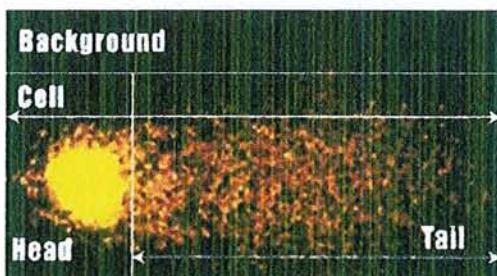


Figure 18 : Une comète sélectionnée et mesurée par le logiciel Komet 5-Kinetic Imaging

Ensuite pour chaque cellule sélectionnée, le logiciel est capable d'enregistrer et de calculer un grand nombre de paramètres, ce qui permet d'évaluer quantitativement les dommages. Le tableau d'enregistrement et le graphique correspondant sont représentés partie gauche de l'écran [figure 18](#). Ainsi ce sont ces valeurs qui permettront d'analyser sous forme de résultats chiffrés l'étendue des lésions.

Parmi les paramètres enregistrés, les plus intéressants et représentatifs pour l'évaluation des dommages de l'ADN d'une cellule sont (Schnurstein et Braunbeck, 2001, Bowden *et al*, 2003) :

- ❖ **L'intensité de fluorescence présente dans la queue de la comète**, « ADN queue » ou « Tail DNA », qui peut aussi être exprimée en pourcentage par rapport à l'intensité totale de la comète dans son intégralité, « % ADN queue ».
- ❖ **La longueur de la queue de la comète**, « Tail Lengh ». Selon les auteurs, il représente soit la longueur totale de la comète (Miyamae *et al*, 1997), soit la distance à partir du centre de la tête jusqu'à la fin de la queue (Olive *et al*, 1991) ou bien strictement la longueur de la queue de la comète.
- ❖ **Le moment de la queue de la comète**, « Tail Moment » dont la formule est :

$$\text{% ADN queue} \times \text{longueur de la queue de la comète}$$

Olive ([Olive *et al*, 1991](#)) a défini le « Tail Moment » comme étant :

$$\text{% ADN queue} \times \text{distance entre les centres de gravité de la queue et de la tête}$$

- ❖ **Le rapport queue sur tête**, « Length/Head » défini également par Olive :

$$\text{longueur de la queue}/\text{diamètre de la tête}$$

Ainsi de nombreux paramètres sont décrits dans la littérature. Il est nécessaire de choisir un bon représentant de la comète. Ce dernier permettra ensuite l'interprétation des résultats suite à un traitement statistique choisi et adapté.

D. LES APPLICATIONS

Le Test des Comètes s'est largement développé ces dernières années. Permettant une détection au niveau des cellules individualisées, il est reconnu comme un test sensible pour mesurer de faibles dommages d'ADN, nécessitant peu de cellules, de faible coût, flexible et rapide.

Il est alors utilisé pour de nombreuses applications (Anderson *et al*, 1998).

a) Toxicologie génétique (Fairbairn *et al*, 1995)

Durant ces dernières années, le test des comètes a été utilisé comme test de mutagenèse pour évaluer les dommages à l'ADN induits par des agents génotoxiques. Les altérations primaires de l'ADN constituent des lésions qui, si elles ne sont pas réparées, donneront naissance à des mutations.

D'un point de vue réglementaire, une batterie de trois tests est préconisée pour évaluer le potentiel mutagène des produits à usage pharmaceutique (ICH S2B) :

- ◆ Un test de mise en évidence de l'induction de mutation dans un système bactérien : le test d'Ames.
- ◆ Un test *in vitro* d'évaluation de dommages chromosomiques : MLA ou « Mouse Lymphoma Assay » sur cellules L5178Y au locus TK ou un test d'aberrations chromosomiques *in vitro* sur culture de cellules.
- ◆ Un test de mise en évidence de l'induction de lésions chromosomiques *in vivo* sur cellules hématopoïétiques de rongeur.

En cas de résultat positif dans un ou plusieurs tests de cette batterie, des études complémentaires peuvent être exigées, comme le test de la synthèse non programmée de l'ADN (encore appelé test UDS pour Unscheduled DNA Synthesis).

Dans ce cas le Test des Comètes pourra être utilisé, afin de confirmer un résultat douteux. De plus il permettra « d'affiner » l'étude *in vivo* : des études complémentaires pourront être effectuées sur les organes cibles grâce à ce test.

Enfin, le test peut être appliqué *in vitro* en microculture sur une grande variété de cellules, comme par exemple les lymphocytes humains, les cellules de lymphomes de souris, les cellules CHO, des cultures primaires d'hépatocytes de rongeur,...

Cette dernière application du test peut être utilisée comme un screening primaire permettant l'évaluation précoce (nécessitant une faible quantité de produit) et rapide du potentiel génotoxique des composés (Hartmann *et al*, 2001, Kiskinis *et al*, 2002).

b) Epidémiologie/ Biomonitoring environnemental

Une autre application possible du test se trouve dans le domaine de l'épidémiologie. L'évaluation des lésions de l'ADN peut être effectuée sur des cellules isolées d'individus exposés professionnellement, cliniquement ou environnementalement (Collins *et al*, 1997). Le principal avantage est qu'une analyse peut être conduite sur quelques microlitres de sang (étude réalisée sur lymphocytes), ou plus rarement sur un échantillon de tissu obtenu par biopsie à l'aide d'une fine aiguille.

Ce type d'étude utilise le test des Comètes comme outil de détection, en tant que biomarqueur d'exposition. Ces études concernent par exemple l'exposition de travailleurs agricoles à des pesticides (Piperakis *et al*, 2003, Grover *et al*, 2003), l'exposition aux radiations ionisantes (Paz-y-ino *et al*, 2002, Garaj-Vrhovac et Kopjar, 2003), également l'effet du rayonnement solaire (Tsimiligaki *et al*, 2003), l'évaluation des lésions de l'ADN chez des fumeurs versus des individus non-fumeurs (Hininger *et al*, 2004).

c) Ecotoxicologie

Le Test des Comètes est utilisé comme approche pour évaluer les conséquences possibles de polluants sur l'environnement. Les études menées montrent que les applications potentielles de ce test sont quasiment illimitées, tout organisme pouvant être utilisé : des rongeurs, des vers de terre, des poissons (Rajaguru *et al*, 2003, Avishai *et al*, 2003, Akcha *et al*, 2003),... De même, l'impact de la pollution sur les végétaux pourrait être apprécié.

d) Les applications indirectes du test des Comètes : les études mécanistiques.



Détection des dommages oxydatifs spécifiques

(Speit *et al*, 2004, Cavallo *et al*, 2003, Liu *et al*, 2003)

De façon générale, toute lésion pour laquelle il existe une enzyme de réparation possédant une activité endonucléase, peut être détectée par le Test des Comètes. Il suffit pour cela d'inclure cette enzyme après l'étape de lyse de la cellule.

Le principe consiste à utiliser une enzyme ayant une activité endonucléase qui détecte spécifiquement les bases oxydées de l'ADN et catalyse l'incision du squelette à leur niveau. C'est le cas par exemple de la protéine fpg : formamidopyrimidine-DNA glycosylase. Cette dernière agit sur le dérivé formamidopyrimidine résultant de l'ouverture du cycle imidazole des bases puriques. Elle peut également reconnaître un produit majeur d'oxydation, la 8-hydroxyguanine, et les sites apuriques/apirimidiques (AP). Ainsi, la protéine fpg va créer une cassure de brin.

La comparaison des résultats obtenus en absence et en présence de la protéine fpg permet d'évaluer la composante liée à des phénomènes purement oxydatifs, ce qui représente une application spécifique du test des Comètes.



Détection des pontages

(Merck et Speit, 1999)

Les agents pontants forment des ponts entre les brins d'ADN ou entre l'ADN et ses protéines constitutives. Ainsi, les ponts stabilisent la double hélice et diminuent les lésions visibles du fait de l'encombrement lié à l'importante taille des fragments générés qui migrent beaucoup moins loin. C'est le cas par exemple de la Mitomycine C ou du Cisplatine qui donnent un résultat négatif par le test des Comètes. L'activité génotoxique de telles molécules peut toutefois être mise en évidence par ce dernier de manière indirecte. L'incubation simultanée de la Mitomycine C et d'un inducteur direct de cassure (un agent alkylant tel que le Méthylméthane Sulfonate par exemple), montre une diminution significative de la réponse obtenue par le test des Comètes avec l'agent alkylant seul.

II. LES ETUDES *IN VITRO*

D'une manière générale, les études *in vitro* sont très largement utilisées en toxicologie. Elles permettent avant tout de réduire le nombre d'expérimentations sur animaux.

Aussi, afin de détecter un produit, mutagène par lui-même ou par la présence d'impuretés, il est nécessaire d'adapter les tests de mutagenèse en utilisant des microméthodes. De cette façon, les études pourront être réalisées sur une faible quantité de produit.

Les études *in vitro* sont souvent employées afin de réaliser un premier screening.

Cependant la simplification des modèles *in vitro* les éloigne bien souvent de la complexité d'un système *in vivo*. De ce fait, il est impératif, pour nos études de génotoxicité, de mimer ce qui se passe dans l'organisme relativement aux réactions de biotransformation.

La plupart des produits cancérogènes sont activés suite à des processus de métabolisation. Une telle activation met en jeu des systèmes enzymatiques de phase I (réactions d'oxydation, de réduction, d'hydrolyse) et/ou de phase II (réactions de conjugaison).

Ainsi dans les tests *in vitro* de mutagenèse, il faut pouvoir générer ces métabolites réactifs. Une fraction métabolique hépatique exogène pourra être utilisée et mise au contact des cellules cibles : il s'agit de la fraction de S9.

Cette fraction est obtenue à partir d'un homogénat brut obtenu à partir d'un foie, le plus souvent de rat, traité par l'Aroclor, qui est un puissant inducteur d'isoformes de cytochrome P 450. Les hépatocytes sont dissociés et broyés. Une centrifugation à 9000 g permet de récupérer le surnageant dit S9 (Supernatant 9000 g), comprenant à la fois les microsomes, fragments des membranes du réticulum endoplasmique lisse portant les CYP 450, et le cytosol où sont localisées d'autres enzymes de biotransformation. Cette fraction peut être conservée à - 80 °C.

Cependant la fraction S9 présente quelques inconvénients et nécessite des précautions d'emploi. Notamment, elle est cytotoxique en cas d'exposition prolongée, ce qui limite le temps de contact avec la cellule cible, et l'activité enzymatique de cette fraction diminue très rapidement.

L'utilisation du S9 de foie de rat a été choisie pour nos études, mais il existe d'autres systèmes pour générer les métabolites réactifs *in vitro* : l'usage de cellules métaboliquement

compétentes. Ces cellules jouent à la fois le rôle de cellules cibles et de système d'activation endogène :

(Yusuf *et al*, 2000)

- ❖ Des hépatocytes en culture primaire de rat peuvent être employés, le recours ponctuellement à des hépatocytes humains est également possible.
- ❖ Des lignées cellulaires obtenues à partir d'hépatomes de rongeurs et même humains : la lignée Hep G2, dérivée d'un hépatoblastome primaire isolé d'un argentin de 11 ans se rencontre dans les études de génotoxicité.
- ❖ Les LiverBeads®, développés par la société BIOPREDIC®, sont des billes d'alginate de 1 mm de diamètre renfermant des hépatocytes isolés de foie de diverses espèces. Immobilisés dans ces billes les hépatocytes sont manipulés comme une suspension cellulaire. Ce système permet une meilleure conservation et permet d'améliorer la récupération des capacités métaboliques.
- ❖ Il existe enfin des lignées cellulaires génétiquement modifiées, pour surexprimer les isoformes de cytochrome P 450.

III. LES ORGANES ETUDES *IN VIVO*

Un des avantages du test des Comètes est son applicabilité sur n'importe quel type cellulaire, et donc n'importe quel organe. Il présente donc un intérêt tout particulier pour la recherche de l'organospécificité génotoxique. Lors des études *in vivo*, plusieurs organes à la fois peuvent être prélevés et étudiés au cours d'une même étude.

Deux organes font l'objet de notre étude : le foie et le rein. Ces organes présentent un intérêt tout particulier, tous deux carrefour métabolique et lieu de passage important des molécules, ils constituent une cible privilégiée pour les toxiques.

Rappelons ici quelques notions anatomiques et fonctionnelles de ces deux organes.

A. LE REIN

a) Rappel sur l'anatomie du rein

L'appareil urinaire comporte deux reins, deux uretères, une vessie et un urètre. L'urine est produite dans les reins et conduite par les uretères à la vessie où elle est mise en réserve jusqu'à ce qu'elle soit vidée par l'urètre.

Les reins sont des organes en forme de haricot d'environ 11 à 12 cm de longueur chez l'homme. Ils filtrent environ 1600 litres de sang par jour. En moyenne, la quantité d'urine émise par jour est de 1 à 1,8 litres.

Le sang arrive dans chaque rein par les artères rénales nées de l'aorte. Pour ordre d'idée, chez l'homme, le volume total du sang de l'organisme traverse les reins environ 300 fois par jour.

La structure macroscopique du rein reflète l'arrangement des néphrons. Le parenchyme rénal peut être divisé en un cortex externe et une médullaire interne. La plus grande partie des néphrons est localisée dans le cortex (NB : lors de nos manipulations, la medulla sera retirée). Le rein est enveloppé dans une capsule de tissu fibreux résistant. L'artère et la veine rénale pénètrent et quittent le rein au-dessus de l'uretère au niveau du hile (Cf [figure 19](#)).

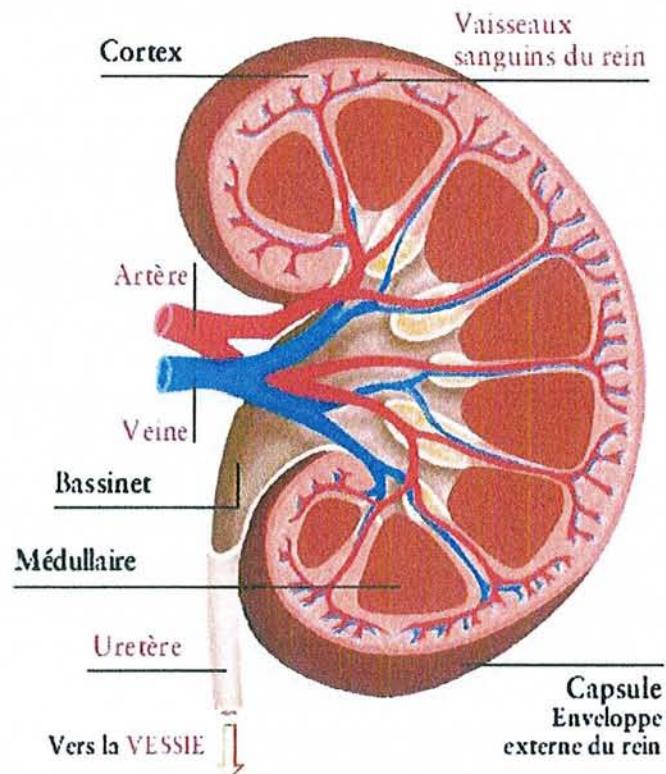


Figure 19 : Schéma de la structure macroscopique du rein.

Le néphron est l'unité fonctionnelle du rein. Il comporte deux constituants principaux, le corpuscule rénal (ou glomérule rénal) et le tube rénal.

◆ Le glomérule est la partie du néphron responsable de la filtration du plasma et résulte de l'association de deux structures : la capsule de Bowman et le réseau capillaire.

◆ Le tubule rénal : s'étend de la capsule de Bowman jusqu'à sa jonction avec un tube collecteur. Le tubule rénal est contourné et comporte quatre zones histophysiologiques distinctes, chacune d'elles jouant un rôle différent dans la fonction tubulaire. Il s'agit du Tube Contourné Proximal, de l'Hanse de Henlé, du Tube Contourné Distal et du Tube Collecteur de Bellini. (Cf figure 20).

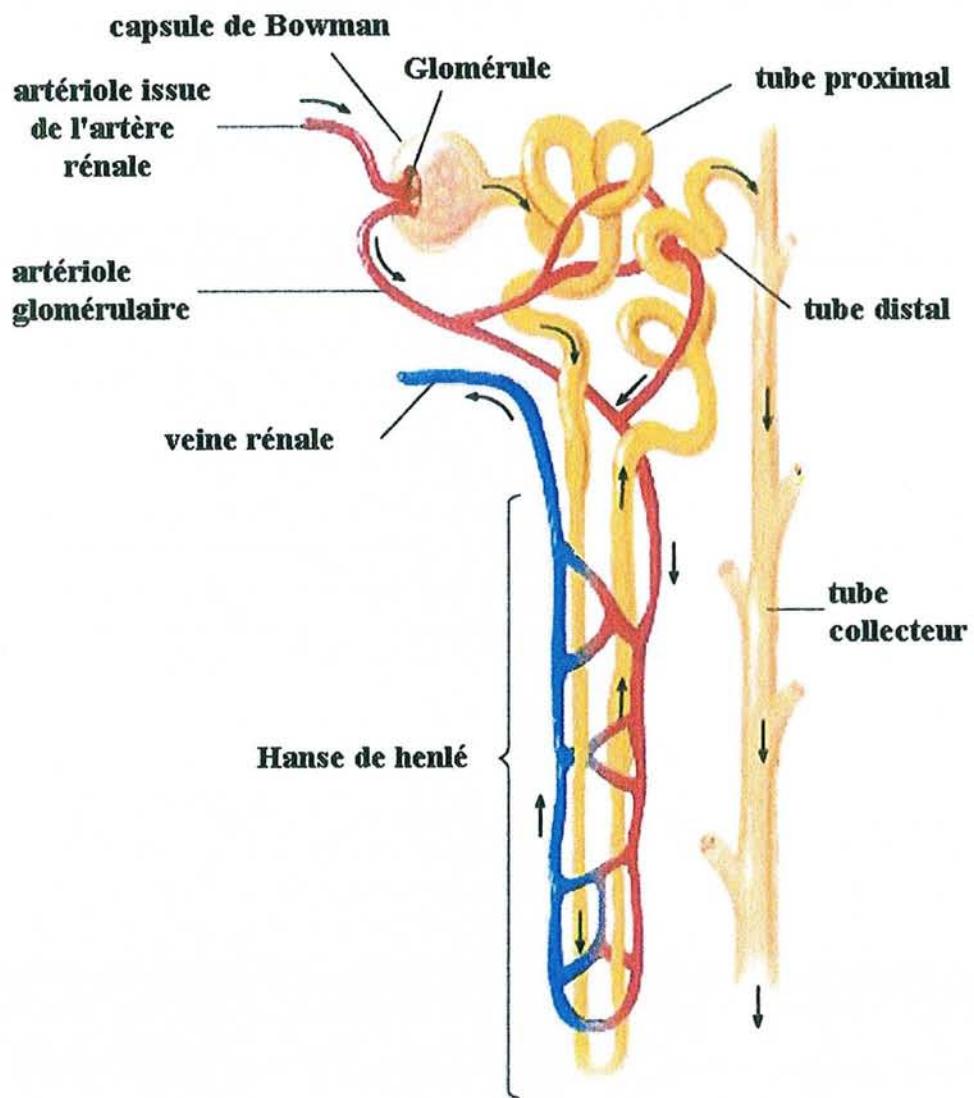


Figure 20 : Schéma du néphron

b) Rappel sur les fonctions rénales

- ❖ Les reins, et avec eux tout l'appareil urinaire, sont les principaux responsables de l'homéostasie de l'eau et des électrolytes. Leur fonction essentielle est d'éliminer de l'organisme les excès d'eau et d'électrolytes.
- ❖ Un deuxième rôle important est l'excrétion de nombreux et divers produits toxiques du métabolisme, en particulier les composés azotés, surtout l'urée et la créatinine.
- ❖ Il appartient également à l'appareil urinaire de réguler la concentration osmotique du plasma. Le produit final de ces processus est l'urine.

Les unités fonctionnelles de l'appareil urinaire sont les néphrons. Il y en a environ un million dans chaque rein. Les néphrons assurent les fonctions d'osmorégulation et d'excrétion selon les processus suivants :

- filtration de la plupart des molécules du plasma sanguin pour former un ultrafiltrat,
- réabsorption sélective de presque toute l'eau et d'autres molécules de l'ultrafiltrat.
- sécrétion de quelques produits excrétés passant du sang dans l'ultrafiltrat.

❖ Le rein est également impliqué dans deux autres mécanismes homéostatiques qui sont sous la dépendance d'hormones. Le mécanisme rénine-Angiotensine-Aldostérone participe au maintien de la pression sanguine. L'hormone érythropoïétine stimule, quant à elle, la production d'érythrocytes dans la moelle osseuse et contribue ainsi au maintien de la capacité de transport de l'oxygène du sang.

Le rein est un organe important dans l'organisme, un passage quasi obligé des xénobiotiques et/ou de leurs métabolites. S'il est un lieu important de concentration et donc d'accumulation des toxiques, il joue également un rôle important dans la métabolisation. En ce sens, le métabolisme rénal est particulier, certains cytochromes sont présents uniquement dans cet organe, d'autres le sont en quantité plus importante. Toutes ces propriétés font du rein une cible importante et intéressante pour les constituants génotoxiques.

De plus, il est intéressant de constater que certains produits présentent une toxicité rénale spécifique. Nous pouvons citer à titre d'exemple l'Ochratoxine A, les dérivées du Cadmium, du Mercure, le Cisplatine, les aminoglycosides,...qui sont des génotoxiques connus et spécifiques (Casarett and Doulls, 2001).

B. LE FOIE

a) Rappel sur l'anatomie du foie

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme chez l'homme. Il mesure en moyenne 28 centimètres dans le sens transversal, 16 de haut et 8 d'épaisseur, dans la région la plus volumineuse du lobe droit.

Le foie est rouge brun. Il a une consistance assez ferme mais cependant il est friable, fragile et se laisse déprimer par les organes voisins.

Le foie est situé dans l'abdomen, sous la coupole diaphragmatique droite. Sa forme générale est triangulaire; sa face supérieure, convexe, suit les contours du diaphragme; sa face inférieure est parcourue par trois sillons, l'un d'eux est le hile du foie, où convergent les organes qui arrivent au foie ou en partent. Organe entouré d'une capsule fibreuse, la capsule de Glisson, le foie est formé de deux lobes principaux, le droit et le gauche, séparés par un ligament rond et falciforme, et de deux petits lobes, le lobe caudé, situé à la face postérieure, et le lobe carré, situé à la face inférieure (figure 21)

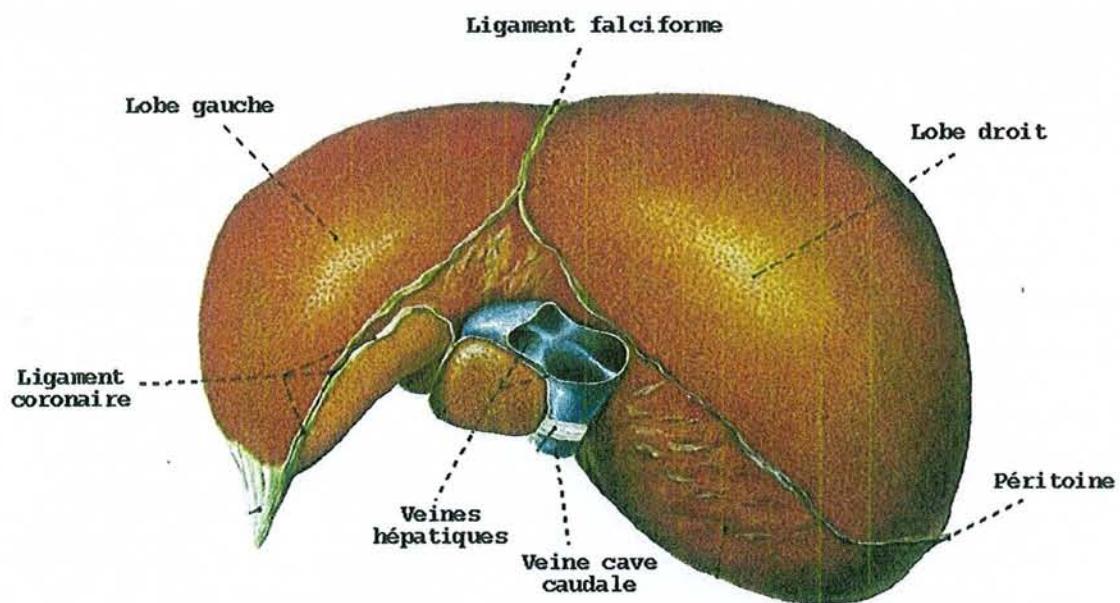


Figure 21 : Anatomie macroscopique du foie (humain)

Sa situation lui permet d'accomplir des fonctions indispensables à la vie : il est placé sur le trajet du courant sanguin qui provient de l'intestin, de telle sorte qu'il peut contrôler tout l'apport alimentaire. Le foie est très richement vascularisé. Pas moins d'un litre et demi de sang traverse cet organe chaque minute.

Le foie est alimenté en sang artériel oxygéné par l'artère hépatique, il reçoit en outre par la veine porte le sang provenant de l'ensemble du tube digestif; aux côtés de ces deux vaisseaux circule le canal hépatique, qui draine hors du foie la bile que celui-ci a sécrétée. Le sang qui est passé à travers le filtre hépatique est conduit vers le cœur par la veine sus-hépatique.

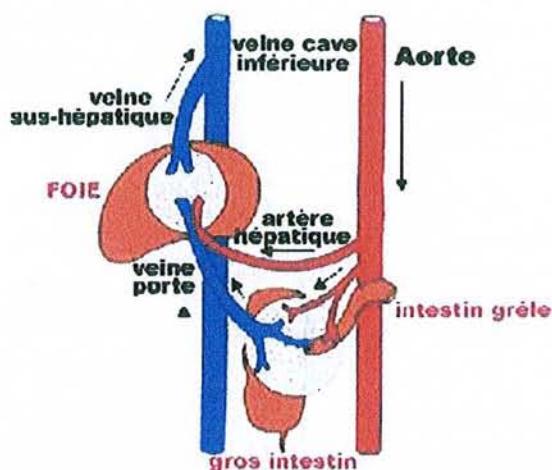


Figure 22 : Vascularisation du foie

La structure élémentaire du tissu hépatique est le lobule hépatique, qui est fait d'un groupement de cellules hépatiques (hépatocytes) centré sur une veinule qui est une branche initiale de la veine sus-hépatique; le lobule hépatique est entouré d'espaces portes, où sont groupées les branches de l'artère hépatique, de la veine porte et des canaux biliaires. Le sang circule à travers les hépatocytes des espaces portes vers les veines centrolobulaires. A l'inverse, les canalicules biliaires sont constitués de sillons ménagés entre les faces accolées d'hépatocytes adjacents. La bile est sécrétée dans ces canalicules et se déverse progressivement dans les conduits biliaires interlobulaires et enfin les canaux hépatiques plus gros.

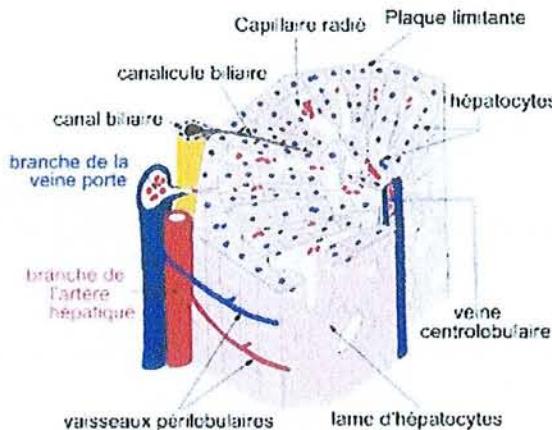


Figure 23 : Schéma du lobule hépatique

b) Rappel sur les fonctions hépatiques

Le foie est un organe très important, aussi bien par sa taille que par le rôle qu'il assure au niveau physiologique.

Les fonctions du foie sont diverses, multiples et vitales. Elles peuvent se résumer à deux grandes fonctions, la première endocrine ou métabolique, l'autre exocrine ou biliaire.

◆ **La fonction glycogénique** : le foie joue un rôle essentiel dans le métabolisme des glucides, des protéines et des lipides. Il stabilise les taux de glucose dans le sang en captant et en entreposant le glucose sous forme de glycogène (neoglycogenèse), en dégradant le glycogène en glucose (glycogénolyse) ainsi qu'en formant du glucose à partir de substances non glucidiques telles que les acides aminés (glyconéogenèse).

◆ **La synthèse de protéines** : le foie synthétise la majeure partie des protéines qui circulent dans le plasma, y compris l'albumine et la plupart des globulines autres que les gammaglobulines. L'albumine assure en grande partie la pression oncotique du plasma et sert au transport des médicaments et des composés hydrophobes endogènes comme la bilirubine non conjuguée. Les globulines comprennent les facteurs de coagulation suivants : le fibrinogène, la prothrombine (facteur II) et les facteurs V, VII, IX et X, dont l'activité dépend de la vitamine K.

◆ **La fonction uréogénétique** : le foie est aussi le siège de la plus grande partie du catabolisme et des interconversions des acides aminés. Ces derniers sont catabolisés en urée. Pendant ce processus, l'ammoniaque, un produit du métabolisme de l'azote et une neurotoxine, est utilisée et par conséquent détoxifiée.

◆ **Rôle dans la synthèse et la dégradation des graisses** : le foie capte les acides gras et les estérifie en triglycérides. Il lie les triglycérides avec le cholestérol, les phospholipides et les apoprotéines, pour former les lipoprotéines. Celles-ci passent dans le sang où elles sont utilisées ou mises en réserve dans les adipocytes. La synthèse du cholestérol se fait en majeure partie dans le foie. Les sels biliaires sont le principal produit du catabolisme hépatique.

◆ **La fonction de détoxification** : le foie est doté d'un système enzymatique très riche qui assure le métabolisme de nombreuses drogues, y compris l'alcool. Il détoxifie les substances nocives qui arrivent de la circulation splanchnique et les empêche de passer dans la circulation générale. Cela rend le foie particulièrement vulnérable aux lésions d'origine médicamenteuse.

◆ **La fonction biliaire** : la bile fournit la principale voie d'excrétion des métabolites toxiques, du cholestérol et des déchets lipidiques. Elle est aussi nécessaire à la digestion et à l'absorption efficace des graisses alimentaires. Les sels biliaires, synthétisés en exclusivité par le foie à partir du cholestérol, sont responsables de la formation de la bile.

La vésicule biliaire sert à concentrer et à stocker la bile, qui est produite sous une forme diluée par le foie, et à sécréter cette bile dans les canaux cystiques pour la déverser dans le duodénum. La bile est composée de cholestérol, de sels biliaires et de pigments biliaires. Quand la bile atteint le duodénum, elle contribue à l'absorption des graisses en agissant comme détergent biologique. Les sels biliaires sont réabsorbés surtout dans l'iléon et ils retournent au foie par la veine porte pour être de nouveau captés et sécrétés. C'est la circulation entéro-hépatique (de l'intestin au foie).

Après son excrétion par le foie, la bile est emmagasinée dans la vésicule biliaire durant les périodes de jeûne.

DEUXIEME PARTIE :

MATERIEL ET METHODE

Les études *in vitro* et celles menées sur le foie ont été réalisées au sein du Laboratoire de Toxicologie Génétique de Sanofi-Aventis Montpellier. Les méthodes utilisées et les résultats obtenus sont ceux correspondant à la mise en place et la validation du test dans ce laboratoire. Cette validation a consisté à tester un grand nombre de génotoxiques connus, plusieurs fois chacun de manière à démontrer la sensibilité du test et sa reproductibilité. Les agents testés sont : le benzo(a)pyrène, le 2-acétyl-aminofluorène, le cyclophosphamide, l'éthyl-méthane sulfonate et le méthyl-méthane sulfonate.

Les études menées sur le rein ont été, elles, réalisées au Laboratoire de Toxicologie Génétique de l'Institut Pasteur de Lille. Il s'agit dans ce cadre non pas d'une mise au point du test, mais d'une validation de celui-ci comme étant spécifique et sensible à la recherche de l'organospécificité génotoxique. L'objet de cette recherche étant de déterminer les limites du « Test des comètes *in vivo* », au travers l'étude de ces spécificités, en appliquant ce test à la recherche de l'organospécificité de cancérogènes génotoxiques : la streptozotocine, les acides aristolochiques et l'ortho-nitroanisole ; en évaluant l'impact de l'interférence de phénomènes cytotoxiques (étude de l'indométacine) ; et en testant des composés agissant par d'autres mécanismes d'action tels que des cancérogènes épigénétiques (étude de l'acide nitrilotriacétique) ; et ce sur un organe cible : le rein.

I. MATERIEL

A. LES CELLULES

Les cellules L5178Y ont été sélectionnées comme cellules cibles pour le Test des Comètes *in vitro*. Il s'agit d'une lignée cellulaire provenant de lymphomes de souris, elles sont très largement utilisées en mutagenèse. Elles présentent un fort taux de division cellulaire. Ces cellules sont aliquotées en ampoule et sont congelées jusqu'à utilisation pour le test.

B. LES ANIMAUX

Le rat de souche Sprague-Dawley mâle, de 200 g environ, est une espèce couramment utilisée dans le cadre des études de toxicologie. De préférence âgés de 5 à 6 semaines, les animaux subissent un examen clinique afin de ne sélectionner que les rats sains.

Une période d'acclimatation d'au moins 5 jours doit être respectée. Les animaux sont placés dans des cages en armoire ventilée. La température de leur pièce doit être de 22° C +/- 3°C, le taux d'humidité doit être voisin de 50-60 %, la lumière peut y être artificielle mais doit respecter les 12 h de jour et 12 h de nuit.

Leur nourriture est constituée d'aliments stérilisés, l'eau de boisson est fournie *ad libidum*. Les animaux sont seuls ou en petit groupe de même genre par cage.

Ces animaux présentent l'avantage d'être dociles, faciles à élever et peu agressifs, mais ils sont choisis avant tout pour leur métabolisme qui est proche de celui de l'homme.

C. LES TOXIQUES ETUDES

a) Benzo(a)pyrène

(INRS, Monteith *et al*, 1995, Speit et Hartmann, 1995, Yusuf *et al*, 2000)

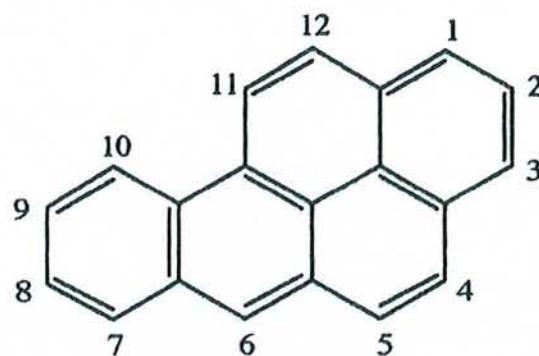
★ Généralités

Le B(a)P se présente sous forme de cristaux jaunes inodores, peu solubles dans l'eau mais solubles dans les solvants (aromatiques, chlorés,...). C'est une substance stable jusqu'à des températures très élevées (température de fusion = 175 °C).

En solution, il s'oxyde sous l'influence de la lumière de l'air et de la chaleur.

Le B(a)P est un composé apolaire lipophile.

n° CAS : 50-32-8





Exposition

Le B(a)P fait partie de la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) qui sont des contaminants ubiquitaires de l'environnement, formés par la combustion incomplète des matières organiques (bois, charbon, huile minérale,...). On retrouve ces composants dans la fumée de cigarette, dans les gaz d'échappement de voitures, dans les goudrons, les suies, les pétroles... et dans les aliments frits, grillés ou fumés.



Propriétés toxiques et cancérogènes

Le B(a)P requiert une activation métabolique à plusieurs étapes afin de pouvoir réagir avec l'ADN ; une époxydation catalysée en particulier par le CYP450 1A1, aboutit à la formation de métabolites intermédiaires, notamment l'époxy 9,10-dihydroxy 7,8 benzo[a]pyrène. Ces derniers induisent des mutations par la formation d'adduits à l'ADN.

Chez l'homme, il existe peu de données concernant le B(a)P seul, il induit une augmentation de la fréquence de certains cancers (pulmonaire, de la vessie...). Il a été classé 2A (cancérogène probable chez l'homme) par le IARC ([CIRC, 2004](#)).

Lorsqu'il est administré par voie orale, le B(a)P entraîne chez le rat ou la souris, un retard de croissance. A long terme, il induit chez certaines souches de souris, une perte de poids, une anémie aplasique, une pancytopénie,...

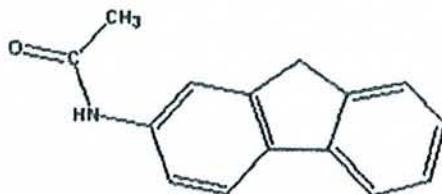
Selon les études de cancérogenèse, il est susceptible d'induire des tumeurs de l'œsophage, du pré-estomac et de l'estomac chez la souris, le rat et le hamster. Par instillation intra-trachéale, il induit des tumeurs pulmonaires et bronchiques. Une application cutanée induit des tumeurs locales.

Enfin, le B(a)P est utilisé comme témoin positif dans de nombreux tests de mutagenèse *in vitro* et *in vivo*.

b) 2-Acétyl-aminofluorène (INRS, Rundell *et al*, 2003)

Généralités

n° CAS : 53-96-3



Le 2-Acétylaminofluorène se présente sous forme d'aiguilles cristallines. Il est insoluble dans l'eau, mais soluble dans les alcools, les glycols, l'éther, l'acide acétique, et les solvants organiques. Lors de sa décomposition par chauffage il émet des vapeurs toxiques d'oxydes d'azote.

Exposition

L'exposition au 2-AAF peut se produire par inhalation ou par contact cutané. Les métiers au plus grand risque d'exposition sont les chimistes organiciens et les chercheurs biomédicaux. Ce produit a été un candidat pesticide, mais n'a jamais été commercialisé à cette issue du fait de son hépatotoxicité.

Propriétés toxiques et cancérogènes

Le 2-AAF appartient à la famille des amines aromatiques, avec lesquelles sont associées une incidence augmentée de cancer.

Ce composé génotoxique forme des adduits à l'ADN.

Il est fréquemment employé dans les études par les toxicologues et les biochimistes en tant que témoin positif dans les études des enzymes du foie, de la cancérogénèse et de la mutagénicité des amines aromatiques.

Aucune information n'est disponible concernant les effets du 2-AAF sur la santé humaine à court terme comme à long terme.

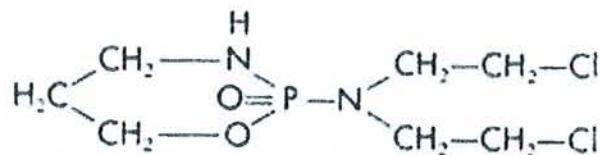
Chez l'animal, ce composé provoque des tumeurs du foie, de l'appareil rénal, du poumon, du pancréas et des testicules.

c) Cyclophosphamide

(Chabner et al, 1998)

Définition

n° CAS : 50-18-0



Le cyclophosphamide (CP) est un agent anticancéreux fréquemment utilisé en chimiothérapie. Il est le chef de file de la famille des moutardes azotées.

C'est un composant essentiel dans la thérapie des lymphomes non hodgkinien, du lymphome de Burkitt, du carcinome du sein. Des résultats ont été obtenus dans le myélome multiple, la leucémie lymphoïde chronique, le carcinome du poumon, du col de l'utérus et de l'ovaire.

Mécanisme d'action toxique

Le processus de métabolisation du CP est complexe et donne naissance à des métabolites intermédiaires très réactifs : la moutarde phosphoramide et l'acroléine (Cf figure 24). Ce sont des agents alkylants qui vont se fixer sur les N de la guanine et sur les groupements phosphates de l'ADN.

Les principales propriétés de ce composé alkylant sont celles qui perturbent les mécanismes fondamentaux de la prolifération cellulaire, en particulier la synthèse de l'ADN et la division cellulaire. Cette capacité est à la base de ces applications thérapeutiques et la plupart de ses propriétés toxiques. (classement IARC : groupe I, CIRC, 2004)

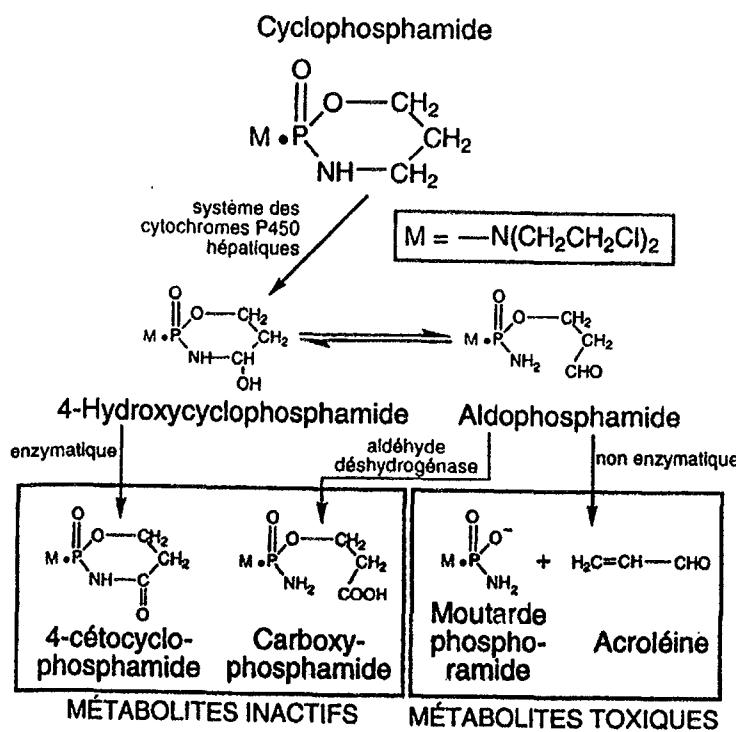


Figure 24 : Métabolisme du Cyclophosphamide

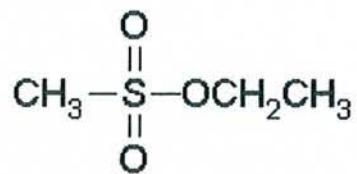
★ Effets indésirables et toxicité

La toxicité du CP lors de son utilisation en chimiothérapie se traduit notamment au niveau médullaire par une myélosuppression. Il est également très毒ique sur les muqueuses ce qui se traduit par des ulcérations buccales et une érosion intestinale. Outre cette toxicité médullaire et sur les muqueuses, le CP peut être responsable d'autres toxicités d'organe : de façon plus rare il peut être à l'origine de fibroses pulmonaires, d'occlusions veineuses, voire encore d'une insuffisance rénale, par la libération de l'acroléine, métabolite néphro et urotoxique. La toxicité sur le système nerveux central se manifeste par des nausées et des vomissements. Le CP est également toxique pour le système de reproduction (responsable d'aménorrhée et d'azoospermie). Enfin comme la plupart des agents alkylants, il cause une alopecie importante.

d) Ethyl-méthane sulfonate et Méthyl-méthane sulfonate

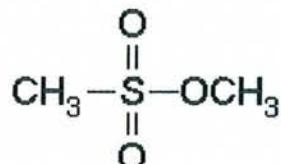
(Sigma)

L'éthyl-méthane sulfonate ou méthane sulfonate d'éthyle ou EMS, de n° CAS : 62-50-0, a pour formule :



Il s'agit d'un liquide incolore à odeur marquée, son poids moléculaire est de 124,2. Sa température d'ébullition est de 85 °C et sa densité de 1,167 g/ml. Il est miscible dans le chloroforme.

Le méthyl-méthane sulfonate ou méthane sulfonate de méthyle ou MMS, de n° CAS 66-27-3, a pour formule :



Le MMS se présente sous forme d'une poudre blanche. Son poids moléculaire est de 110.13, sa température de fusion de 202 °C et sa densité de 1,3g/25ml.

Ces deux produits ne sont destinés qu'à l'usage des laboratoires où une exposition accidentelle est possible par inhalation ou par voie cutanée.

Ce sont tous deux des produits chimiques connus pour leurs propriétés alkylantes et clastogènes vis-à-vis de l'ADN. Ils se fixent de façon covalente comme le montre la figure 25

Ces deux produits ne nécessitent aucune activation métabolique pour exercer leur pouvoir mutagène.

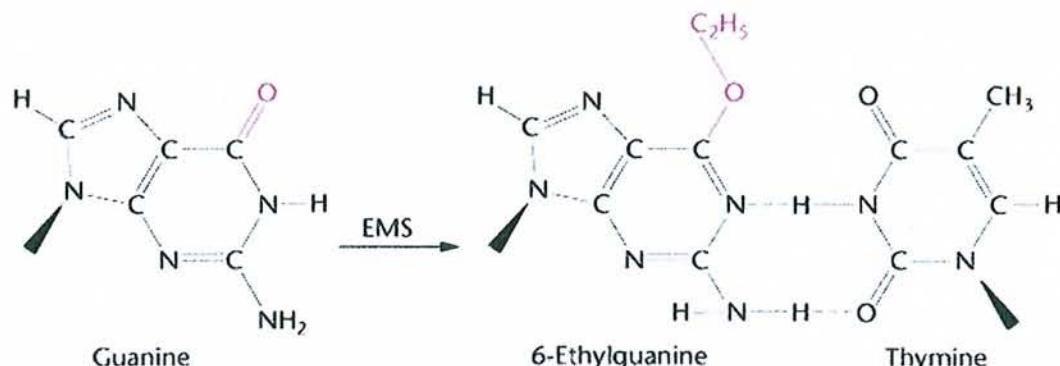


Figure 25 : Fixation de l'EMS à l'ADN.

Concernant les études de génotoxicité relatives au Test des Comètes, l'EMS et le MMS sont très largement utilisés dans la littérature et notamment comme témoins positifs de référence (Giannotti *et al*, 2002, Hartmann *et al*, 2003, Miyamae *et al*, 1997, Rundell *et al*, 2003, Sasaki *et al*, 1997, Valentin-Severin *et al*, 2003, Wagner *et al*, 1998, Wagner *et al*, 2003, Wang *et al*, 1997,...)

Ces deux agents sont probablement cancérogènes pour l'homme et sont classés 2B par l'IARC (CIRC, 2004).

e) **Streptozotocine** (Schmezer *et al*, 1994, Liegibel *et al*, 1992, Kraynak *et al*, 1995)

Définition/Utilisation

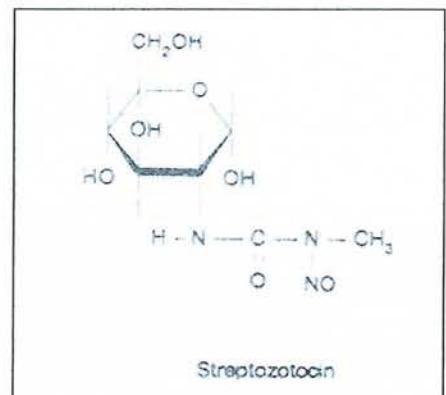
n°CAS : 18883-66-40

Il s'agit d'une molécule isolée de *Streptomyces achromogenes*.

Elle possède une activité antibiotique à large spectre.

Elle présente également des propriétés anti-néoplasiques.

Enfin, elle est utilisée en expérimentation animale pour induire un diabète car elle possède également une action sur les cellules du pancréas.

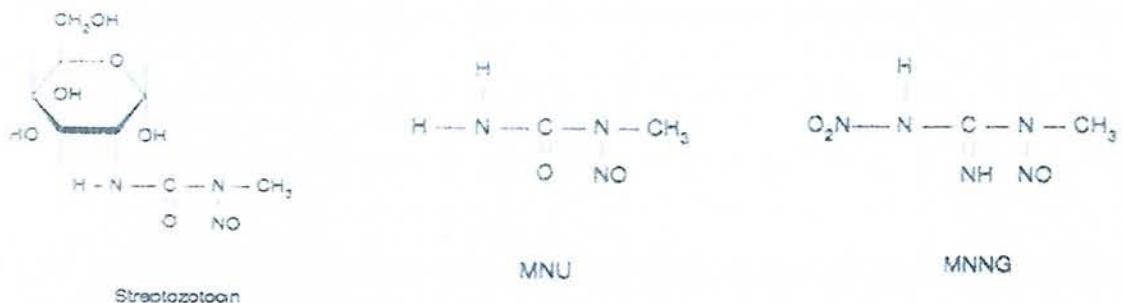


Toxicité

La Streptozotocine fait preuve d'une toxicité rénale. Si elle provoque spécifiquement des tumeurs du rein, elle est également responsable dans certains cas de tumeurs du foie et du pancréas chez le rat.

Mécanisme d'action toxique

Tout d'abord cette molécule présente une analogie de structure avec le MNU (N-methyl-N-nitrosourée) et le MNNG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanine), ces derniers étant des agents mutagènes bien connus.



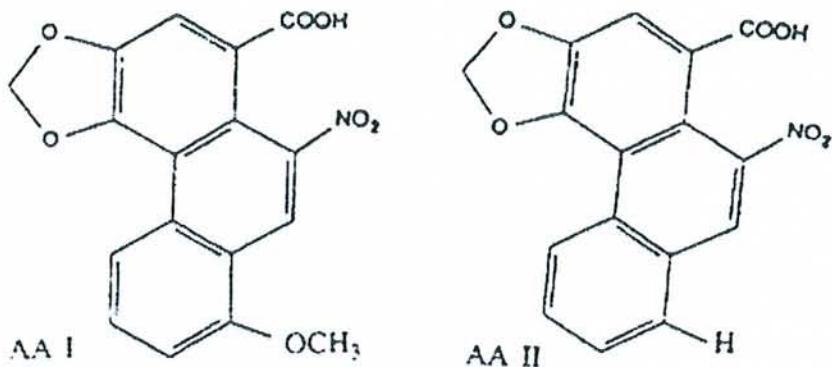
La génotoxicité de la Streptozotocine a été largement démontrée sur les modèles animaux : c'est un agent mutagène méthylant. Elle entraîne la rupture de brin d'ADN, et des mutations spécifiques au niveau du rein. Des aberrations chromosomiques et des échanges de chromatides sœurs ont également été mises en évidence. Elle est peut être cancérogène pour l'homme, classée 2 B par l'IARC (CIRC, 2004).

f) Acides aristolochiques

(Vanherweghem, 2002, Lord *et al*, 2004)

Définition/Utilisation

Les Acides Aristolochiques I et II sont retrouvés dans certaines herbes chinoises (de la famille des Aristolochia), qui ont été utilisées à l'état d'extraits pulvérisés dans des médicaments traditionnels et plus précisément dans certaines compositions à visée amaigrissante. L'une de ces plantes prescrites porte le nom *d'Aristolochia fangchi*. Les principaux constituants sont les acides 3,4-méthylènedioxy-8-méthoxy-10-nitrophénanthrène-1-carboxylique (Acide Aristolochique I) et son dérivé déméthoxy (Acide Aristolochique II).





Effets toxiques

Les Acides Aristolochiques sont néphrotoxiques, à tel point qu'ils ont donné leur nom à la pathologie : « néphropathie aux herbes chinoises ». Ils sont responsables d'insuffisance rénale, caractérisée par une fibrose interstitielle, une atrophie tubulaire, et compliquée par des tumeurs des voies urinaires (urothélium).

Les acides aristolochiques induisent également des cancers du pré-estomac chez le rongeur (Mengs, 1983).



Mécanisme d'action

Ces composés sont génotoxiques, leur mécanisme d'action est caractérisé après activation métabolique par la formation d'adduits de l'ADN comme le montre la figure 26 :

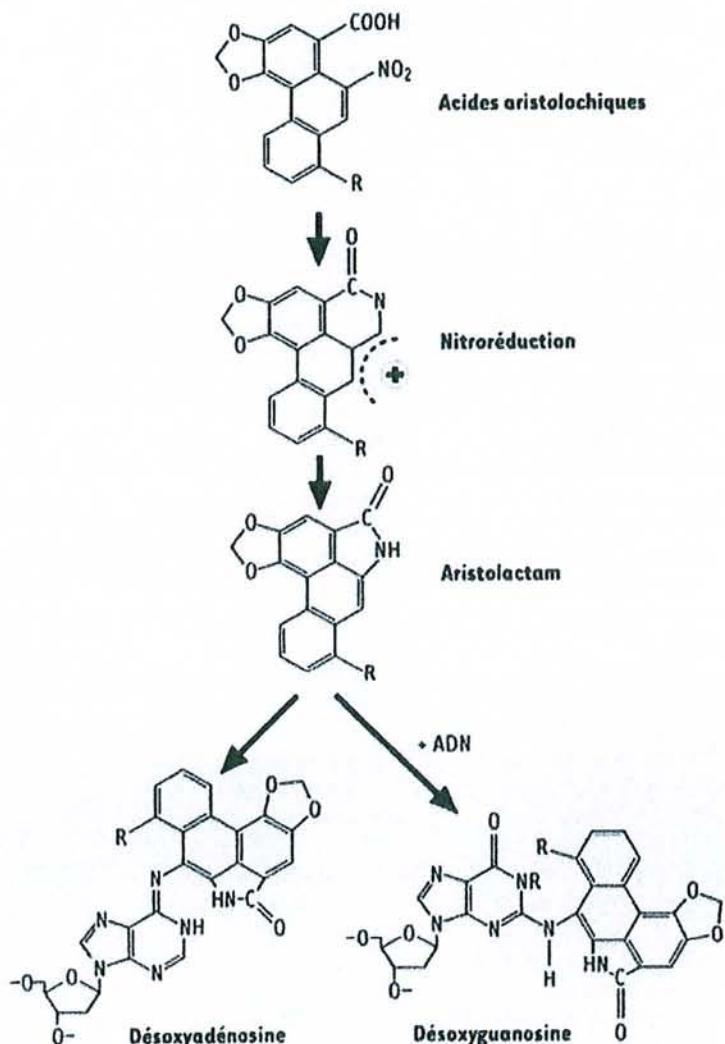


Figure 26 : Activation métabolique et fixation à l'ADN des acides aristolochiques.

On note également des mutations du gène p53 et du proto-oncogène Ha-ras.

Les acides aristolochiques ont des propriétés cancérogènes et mutagènes, ils figurent dans le groupe 2A de la classification IARC ([CIRC, 2004](#)).

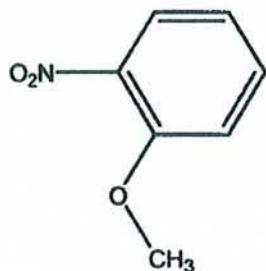
g) Ortho-Nitroanisole

(Casarret et Doulls, 2001)



Généralités

n° CAS : 91-23-6



Appelé également 2-Nitroanisole, ce produit se présente sous la forme d'un liquide légèrement jaunâtre, avec un point d'ébullition à 277 °C. Il est insoluble dans l'eau mais soluble dans les solvants organiques.



Exposition

Les principales voies d'exposition à l'Ortho-Nitroanisole sont cutanée, digestive mais surtout pulmonaire. En effet, il s'agit d'un important polluant industriel. Il est possible également de le retrouver dans l'eau de boisson.



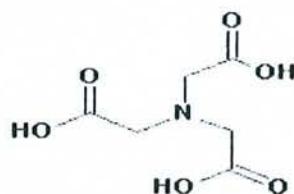
Propriétés toxiques et cancérogènes

L'O-Nitroanisole est responsable de la formation de tumeurs chez l'animal. Il est responsable de leucémies, peut engendrer des tumeurs au niveau des voies urinaires, du rein mais aussi de l'intestin. Aucune donnée n'est disponible aujourd'hui chez l'homme, il est classé 2B par l'IARC ([CIRC, 2004](#)).

Ce composé génotoxique forme des adduits par liaisons covalentes à l'ADN.

h) Acide Nitrilotriacétique (NTA)

(Anderson *et al*, 1985)



Utilisation

Le NTA peut séquestrer les ions métalliques pour former des complexes hydrosolubles ; il s'agit d'un agent chélateur important qui trouve de nombreuses applications industrielles. En raison de sa capacité à chélater les ions calcium et magnésium, le sel trisodique est utilisé dans les détergents à lessive comme adjuvant pour remplacer les phosphates. Le NTA est également utilisé abondamment dans le traitement de l'eau des chaudières pour prévenir l'entartrage. Il sert aussi, mais dans une moindre mesure, dans le domaine de la photographie, de la fabrication des textiles, de la production du papier et de la cellulose, dans les opérations de placage des métaux et de nettoyage. L'utilisation du NTA comme agent chélateur thérapeutique a été proposée pour le traitement de l'intoxication par le manganèse et pour le traitement de la surcharge en fer.

Exposition

C'est principalement par l'intermédiaire des eaux usées que le NTA se retrouve dans l'environnement. Il est facilement biodégradable. Il est présent dans l'eau potable principalement sous forme de complexes métalliques, plutôt que sous forme d'acides libres. Etant donné que l'analyse du NTA fait appel à des techniques spécifiques et non usuelles, cette substance ne fait pas l'objet d'une surveillance régulière dans les réseaux de distribution d'eau potable.

Propriétés physico-chimiques

L'acide Nitrilotriacétique de n° CAS : 139-13-9 est un acide aminocarboxylique dont la formule empirique est $C_6H_9NO_6$. Dans sa forme acide non dissociée, il est composé de

cristaux aciculaires ou prismatiques. Son point de fusion est de 241,5°C, sa solubilité dans l'eau à 22,5°C est de 1,28 mg/ml et le pH de la solution saturée de NTA est de 2,3.



Effet sur la santé

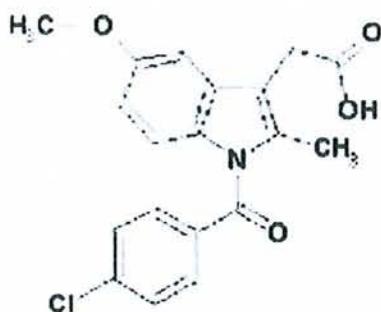
Le NTA peut être avantageux pour le développement néonatal parce qu'il accroît la biodisponibilité d'éléments essentiels. Cependant les résultats d'études menées chez l'animal montrent que le rein est l'organe cible des effets toxiques, que les lésions se produisent rapidement et qu'elles sont fonction de la dose. On peut noter chez l'animal une néphrose qui consiste en une dégénérescence hydropique des cellules tubulaires. Une hypertrophie ou une solidification par calcification des reins ont également été constatées, ainsi que des tumeurs (adénomes et adénocarcinomes des cellules tubulaires).

Outre ces données chez l'animal, le NTA, selon la classification du IARC appartient au groupe 2B, cancérogène possible chez l'homme (CIRC, 2004).

Le NTA est un inducteur de tumeurs selon un mécanisme de vacuolisation du cytoplasme des cellules rénales, aboutissant à la néoplasie. Il est donc considéré comme cancérogène épigénétique, la batterie de tests réalisée en mutagenèse ne mettant en évidence aucune activité génotoxique. Cependant de récentes études expliquent la survenue de néphropathies et cancers par la formation de radicaux libres et la production d'un stress oxydatif (Leibold *et al*, 2002).

i) Indométacine (Mendoza, 1988, Casarret et doull's, 2001)

N° CAS : 53-86-1





Définition/Utilisation

L'Indométacine est un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) possédant un noyau indole. Il a une action antalgique, antipyrrétique et anti-inflammatoire. Il est employé dans le traitement de courte durée des rhumatismes inflammatoires et des arthroses, et pour les traitements au long cours des rhumatismes inflammatoires chroniques. Il est connu sous le nom de la spécialité INDOCID® par exemple.

De façon générale, les AINS sont des médicaments largement utilisés, cependant leur bénéfice thérapeutique est limité par la survenue d'effets indésirables potentiellement graves, en particulier au niveau de l'estomac et du rein.



Mécanisme d'action

L'indométacine a pour principal mode d'action l'inhibition des prostaglandines par l'inhibition d'une enzyme : la cyclo-oxygénase.



Effets indésirables et toxiques

Parmi les effets indésirables il faut noter outre les manifestations digestives, les lésions des muqueuses cutanées, des lésions hépatiques et des complications rénales. Les AINS peuvent aussi être responsables d'œdèmes et d'hypertension artérielle par rétention hydro-sodée. Parmi les complications graves, on note l'insuffisance rénale aigue d'origine hémodynamique, des néphrites interstitielles, des troubles hydroélectrolytiques.

En effet, l'inhibition des prostaglandines est responsable d'une vasoconstriction rénale d'où peut résulter l'apparition d'ischémie, d'une hypoxie, voire même de nécrose. La possibilité de la formation d'intermédiaires réactifs initiant un stress oxydatif est également évoquée (Casarret et Doull's, 2001).

Caractéristiques des produits

Les produits chimiques testés ont été fournis par Sigma-Aldrich Chimie.

Produits chimiques	Numéro CAS	Pureté
Benzo(a)pyrène	50-32-8	98 %
2-Acétyl-aminofluorène	53-96-3	97 %
Cyclophosphamide	50-18-0	75 %
Méthyl-méthanesulfonate	66-27-3	99 %
Ethyl-méthanesulfonate	62-50-0	98 %
Ortho-nitroanisole	91-23-6	99 %
Acide Nitrilotriacétique	139-13-9	99 %
Indométacine	53-86-1	98 %

Traitements appliqués *in vitro*

Chaque étude *in vitro* a été répétée 2 ou 3 fois.

Les gammes de produits testés sont les suivantes :

◆ Benzo(a)pyrène

(Monteith *et al*, 1995, Yusuf *et al*, 2000, Valentin-Severin *et al*, 2003, Wang *et al*, 1997)

2 gammes différentes ont été testées :

0-1,5625-3,125-6,25-12,5-25 µg/ml

0-2-4-8-10-15-20-30-50 µg/ml

◆ 2-Acétyl-aminofluorène

(Hartmann *et al*, 1995, Rundell *et al*, 2003, Yusuf, *et al*, 2000, Valentin-severin *et al*, 2003, Wagner *et al*, 1998)

0-7,5-15-30-60-120 µg/ml

◆ **Cyclophosphamide**

(Giannotti *et al*, 2002, Hartmann *et al*, 1995, Monteith *et al*, 1995, Tice *et al*, 1990, Yusuf *et al*, 2000, Wang *et al*, 1997)

0-1-3-5-7-10- μ g/ml

◆ **Ethyl-méthane sulfonate**

(Hartmann *et al*, 2003, Miyamae *et al*, 1997, Rundell *et al*, 2003, Wagner *et al*, 1998)

0-0,25-0,5-0,75-1-2-2,5 mg/ml

◆ **Méthyl-méthane sulfonate**

(Giannotti *et al*, 2002, Miyamae *et al*, 1997, Valentin-Severin *et al*, 2003)

0-15-30-60-90-120 μ g/ml

Caractéristiques de traitement des études *in vivo*

◆ **Le Benzo(a)pyrène** a été administré par gavage (à l'aide d'une sonde gastrique) sous un volume de 10 ml/kg, après avoir été mis en suspension dans l'huile d'olive, celui-ci étant insoluble dans l'EPPI. Le toxique a été administré à raison de 250 mg/kg.

◆ **Le 2-Acétyl-aminofluorène** a été administré par gavage (à l'aide d'une sonde gastrique) sous un volume de 10 ml/kg, après avoir été mis en suspension dans le Tween 80. Le traitement a été effectué à la dose de 400 mg/kg.

◆ **Le Cyclophosphamide** a été administré par gavage. L'administration se fait sous un volume de 10 ml/kg à raison de 30 mg/kg de CP, celui-ci mis en suspension dans une solution saline.

◆ **L'Ethyl-méthane sulfonate** a de même été administré par gavage, sous 10 ml/kg à raison de 300mg/kg, en suspension dans une solution saline.

- ◆ Le Méthyl-méthane sulfonate a été administré par gavage (à l'aide d'une sonde gastrique) sous un volume de 10 ml/kg, après avoir été mis en suspension dans une solution saline. La dose de traitement est 80 mg/kg.

NB : En ce qui concerne les études de ces 5 produits, menées dans le cadre de la mise au point et la validation du test, les lots de témoins positifs n'ont pas été constitués. Une dose de produit a été testée au lieu de 2 comme recommandé.

- ◆ La Streptozotocine a été administrée par voie intraveineuse sous un volume de 10 ml/kg. Le solvant employé est le soluté de NaCl à 0,9%. Un essai préalable de recherche de doses a été réalisé: 60, 30 et 10 mg/kg ont été testés (*cf partie résultats*).
- ◆ L'Orthonitroanisole a été administré par gavage (à l'aide d'une sonde gastrique) sous un volume de 10 ml/kg, après avoir été mis en suspension dans la CMC dans l'eau à 0,5%, celui-ci étant insoluble dans l'EPPI. Les doses sont : 250 et 500 mg/kg.
- ◆ L'Acide Nitrilotriacétique a été administré par gavage sous un volume de 10 ml/kg. Le solvant utilisé est la CMC dans l'eau à 0,5%. Les doses testées sont 1000 et 2000 mg/kg.
- ◆ Les Acides Aristolochiques : les mêmes conditions d'administration par voie orale ont été utilisées, ainsi que le même solvant, la CMC dans l'eau à 0,5%. Les doses testées sont 10 et 30 mg/kg.
- ◆ L'Indométacine a été administrée à l'animal par gavage avec pour solvant la CMC 0,5% aux doses de 50 et 100 mg/kg, le tout sous un volume de 10 ml/kg.

II. METHODES

A. TRAITEMENT ET OBTENTION DE LA SUSPENSION CELLULAIRE

a) In vitro

Traitement des cellules

La décongélation

4 à 5 jours avant le début du traitement, une ampoule de cellules L5178Y sélectionnée est rapidement décongelée.

Les cellules remises en suspension dans 10 ml de R20P (milieu de culture contenant RPMI 1640, HEPES, fungizone, L-Glutamine, sodium piruvate, sérum de cheval inactivé, et pluronic F 68), sont centrifugées à 200 g pendant 5 minutes. Le culot est remis en suspension dans 2 à 3 ml de R20P suivant le taux d'ensemencement :

- Si la décongélation est faite 4 jours avant le traitement, il faut ensemencer 2 flasks de 175 cm³ à 5×10^4 cellules /ml dans 50 ml/flask (1 ml de culture par flask).
- Si la décongélation est faite 5 jours avant le traitement, il faut ensemencer 3 flasks de 175 cm³ à $3,3 \times 10^4$ cellules /ml.

Les flasks sont ensuite placées dans un incubateur à CO₂ à environ 37°C, 5% CO₂ et 95-100 % d'humidité (conditions à appliquer durant tout le test).

Préculture

La veille du traitement, les cellules sont repiquées en milieu R10P (ce milieu correspond au mélange d'un volume de R20P et d'un volume de ROP, ce dernier étant constitué de RPMI 1640, HEPES, Streptomycine, pénicilline et pluronic F68) pour qu'elles soient en phase exponentielle de leur croissance.

Au minimum, la moitié des cellules nécessaires pour le lendemain est ensemencée.

Un volume de suspension cellulaire nécessaire à la concentration de $2,5 \cdot 10^5$ cellules/ml dans des flasks de 175 cm³ (maximum 140 ml/flask) est alors réparti.

Préparation de la suspension cellulaire

Après avoir vérifié au microscope leur morphologie, les cellules mises en culture la veille sont centrifugées à 200 g pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot repris par 10 ml de R10P. Un comptage des cellules est réalisé au compteur Coulter.

Enfin, une dilution dans du R10P est effectuée de manière à obtenir une concentration de 2.10^6 cellules/ml.

Le traitement des cellules sera réalisé dans des microplaques de 96 puits (Cf [figure 27](#))

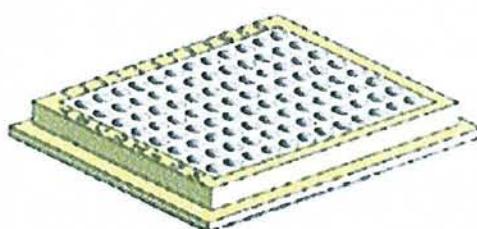


Figure 27 : microplaques de 96 puits

Une activation métabolique des cellules est nécessaire. Un mélange S9 mix est alors préparé, contenant la fraction de S9 à laquelle sont ajoutés des cofacteurs : NADP et G6P (cette préparation est réalisée sur lit de glace et utilisée immédiatement). Le mélange S9 mix doit avoir une concentration finale de 1,5% lorsqu'il est ajouté à la suspension cellulaire.

Ce mélange cellules + S9 est réparti dans les puits à la concentration finale de 2.10^5 cellules/puit sous un volume de 100 μ l.

Traitement proprement dit

Une gamme de concentrations du produit à tester est réalisée, celle-ci contient 3 à 5 doses. Elle est réalisée dans un solvant qui permet une bonne solubilité du produit et qui ne présente aucune toxicité pour les cellules. Il s'agit pour nos études dans tous les cas du DMSO.

Le traitement consiste donc à ajouter par puit **100 μ l** de solvant pour le témoin négatif ou **100 μ l** de produit à tester.

Les microplaques sont ensuite incubées pour un temps de traitement de 3 h à l'étuve à 37 °C.



Récupération des cellules

A la fin des 3 heures d'incubation, les microplaques sont centrifugées 5 min à 200g. Le surnageant est éliminé et un rinçage est effectué avec du R10P.

Enfin le culot est repris par 200 µl de R10P.

b) In vivo

(Hartmann et al, 2003)



Traitement des animaux

Préalablement au traitement, chaque animal est pesé et identifié par une bague d'oreille. Le nombre d'animaux requis pour chaque étude est de 20. En effet, 4 lots de 5 animaux sont constitués :

- Un lot témoin positif,
- Un lot témoin négatif,
- Un lot dose forte du produit testé,
- Un lot dose faible (généralement 50% de la dose forte).

Ensuite, 4 animaux traités sur les cinq dans chaque lot seront sacrifiés pour la récupération d'organe et entreront ainsi dans l'étude.

La substance à tester ainsi que le témoin positif sont mis en solution (ou suspension) dans un solvant approprié, qui ne doit faire preuve d'aucune toxicité, d'interaction ou réaction chimique avec le produit. Ce même solvant sera utilisé comme témoin négatif.

La voie d'administration la plus couramment utilisée est la voie orale (par gavage). Cependant, celle-ci peut être modifiée dans le cas d'une voie thérapeutique particulière ou en fonction des données observées dans la littérature. Dans tous les cas, la voie péritonéale doit être proscrite afin d'éviter le contact direct entre le produit et la cavité abdominale donc l'organe. Il est possible que la voie d'administration du témoin positif et celle du produit testé soient différentes.

La méthode consiste à étudier 2 temps de traitement : (Tice et al, 2000)

- un temps court d'exposition compris entre 3 et 6 heures
- un temps long de traitement compris entre 22 et 26 heures



Techniques d'isolement cellulaire

(Harman *et al*, 1987, Hartmann *et al*, 2004, Fontaine *et al*, 2003,...)

De nombreuses techniques de récupération des cellules de l'organe étudié sont décrites dans la littérature. Deux d'entre elles sont les plus importantes et les plus largement utilisées : il s'agit d'une part de la technique d'homogénéisation de l'organe émincé au potter, cette dernière sera utilisée pour la récupération des cellules du foie et d'autre part de la technique de perfusion de l'organe émincé *in situ* que nous avons utilisé dans le cadre de l'étude sur le rein.

Dans les deux cas l'isolement cellulaire se fait sur animaux anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (60 mg/kg). Ensuite, le rat est placé en décubitus dorsal et incisé au niveau de la cavité abdominale (Cf [figure 28](#)).



Figure 28: photographie de l'incision du rat au niveau de la cavité abdominale



Technique d'isolement de cellules rénales

(Bruggeman *et al*, 1989)

Pour cette technique, la récupération des cellules se fait par le lavage et la perfusion de l'organe.

Le rein et surtout le système circulatoire sont bien mis en évidence. La technique de perfusion du rein *in situ* consiste tout d'abord à poser un fil de ligature en aval du site de perfusion qui englobe le système veineux et artériel, obligeant les liquides de perfusion à pénétrer dans les reins et empêchant la diffusion du liquide dans tout l'organisme. Enfin, l'aorte abdominale rostrale est cathétérisée. De cette façon le liquide va bien pénétrer à l'intérieur des 2 reins (Cf figure 29).

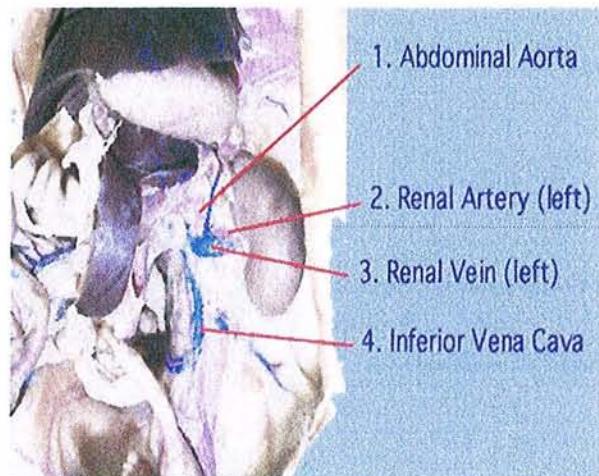


Figure 29 : photographies du système veineux et artériel rénal et de la perfusion par cathétérisation de l'aorte abdominale.

La première étape consiste à faire passer dans l'organe une solution d'HEPES/EDTA à pH 7,5, qui a pour but de laver le rein de son sang, permettant ainsi d'éliminer toutes cellules extra-rénales qui pourrait interférer dans la réponse mais aussi de faciliter l'action de la collagénase dans un second temps. Dès le début du lavage, on peut observer un gonflement et un blanchiment des deux reins, à ce moment il faut sectionner le système veineux rénal supérieur afin de laisser s'échapper le liquide. L'étape de lavage dure alors 1 minute à raison de 7 ml/min.

Ensuite, vient l'étape de perfusion de l'organe (15 minutes à 7 ml/min); une solution de collagénase I (à 0,025%) permet de dissoudre les tissus et a pour but l'individualisation des cellules. Notons que le lavage et la perfusion se font à 37°C et à pH 7,6.

L'organe est ensuite récupéré et émincé en petits cubes de 2-3 mm d'épaisseur pour ensuite subir une seconde digestion enzymatique à la trypsine/EDTA 0,05%, à l'étuve à 37 °C pendant 30 minutes (Cf figure 30).

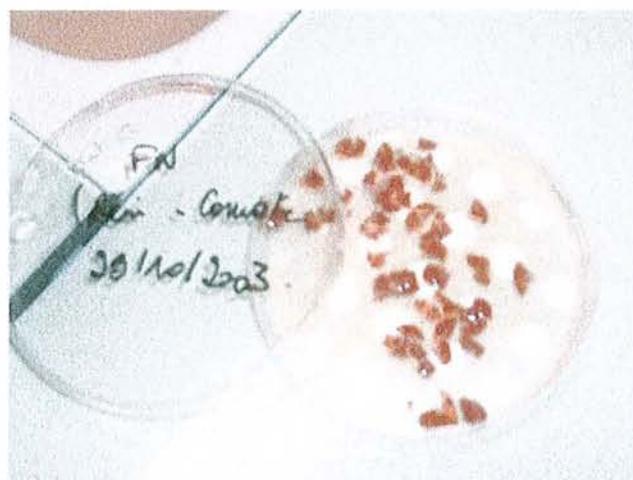


Figure 30: photographie du rein émincé, étape de digestion à la Trypsine.

Les morceaux de rein et la solution qui résultent de cette digestion sont ensuite filtrés (250 µm) et centrifugés (4 min à 150g) après avoir stoppé la réaction de la trypsine par un ajout de 10 % de Sérum de Veau fœtal (SVF). Le culot cellulaire est alors remis en suspension dans 10 ml d'HBSS.



Technique d'isolement de cellules hépatiques

(Miyamae *et al*, 1998, Sasaki *et al*, 1997)

Pour cette technique d'isolement cellulaire, le rat est exsanguiné par l'incision des principaux vaisseaux sanguins irriguant le foie. En l'occurrence, il s'agit de réaliser une incision au niveau de la veine porte, le but étant de vider le foie de son sang.

Ensuite un morceau de lobe est récupéré. Celui-ci est alors émincé en petits morceaux de 2-3 mm d'épaisseur de la même façon que pour le rein figure 30.

Les morceaux de foie sont alors placés dans le tube d'un potter, contenant une solution dite d'homogénéisation (constituée d'HBSS + EDTA 0,025 M). L'homogénéisation proprement dite est ensuite réalisée par écrasement de l'organe émincé à l'aide d'un piston

dans le potter type Dounce (Cf [figure 31](#)). Habituellement deux types de piston sont utilisés : le premier, le plus « gros » (piston A) permet un écrasement grossier de l'organe, le travail est affiné ensuite à l'aide d'un piston plus fin (piston B). Cette étape d'homogénéisation se déroule dans la glace.

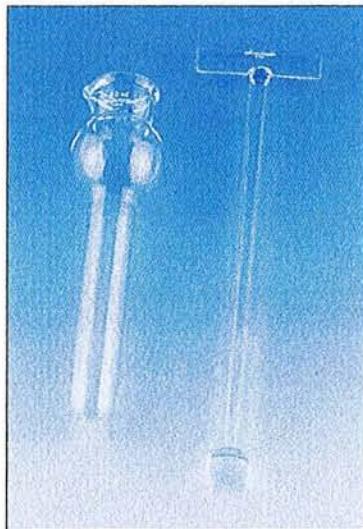


Figure 31 : Photographie du potter type Dounce.

L'homogénat ainsi récupéré est ensuite filtré (100 µm de diamètre).

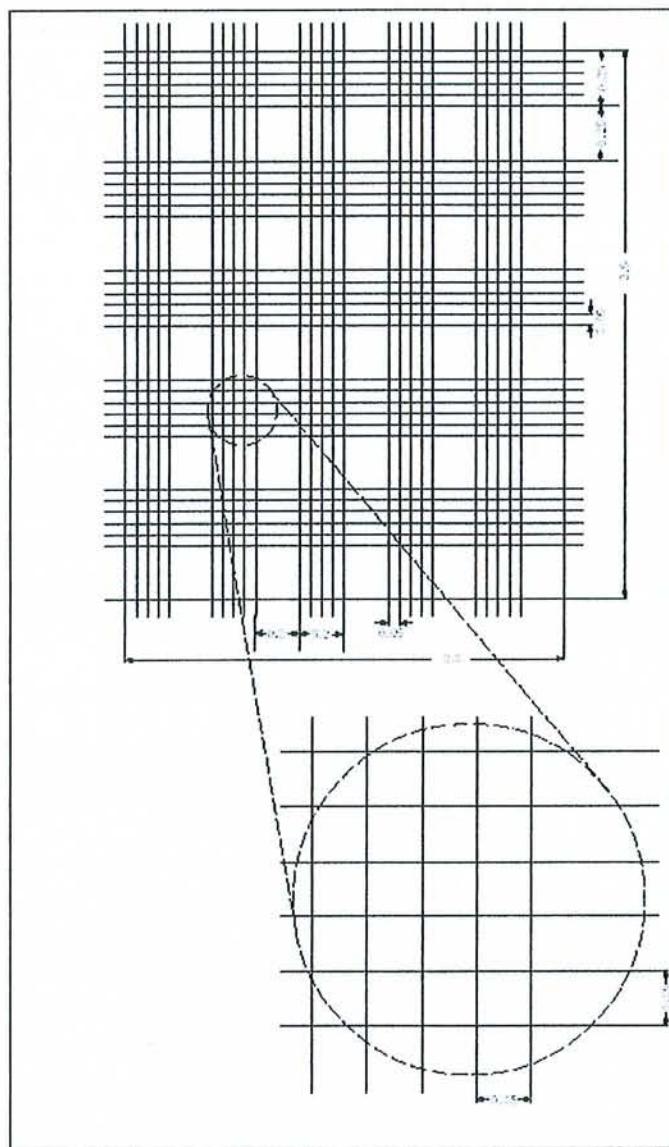
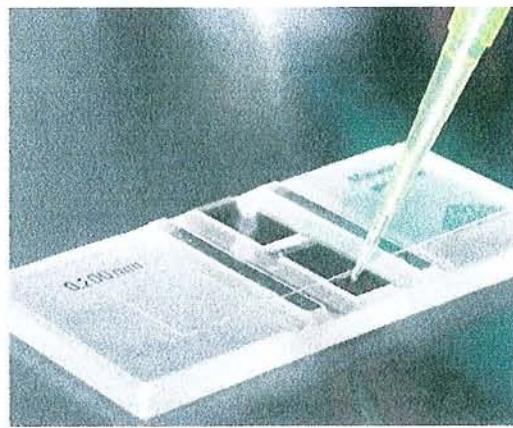
La suspension ainsi récupérée contient les noyaux des cellules. Elle est centrifugée pendant 10 minutes, à 700 g, à 0 °C.

Enfin, le culot cellulaire est remis en suspension dans 10 ml d'HBSS-EDTA.

B. COMPTAGE ET VIABILITE

Afin de déterminer le nombre de cellules récupérées et leur viabilité on utilise un colorant vital d'exclusion : le Bleu Trypan. Seules les cellules mortes apparaissent colorées en bleu, celles ayant conservé leur intégrité membranaire n'absorbent pas le colorant. Cette méthode sera utilisée pour sa simplicité de mise en œuvre.

Le comptage est réalisé à l'aide d'une cellule de Mallassez. Pour cela 500 µl de suspension cellulaire sont mélangés à 100 µl de Bleu Trypan (0,4%). Le nombre de cellules vivantes et mortes est déterminé par comptage au microscope (Cf [figure 32](#)).



Comptage : Nombre de cellules par ligne $\times 10^4 \times 6/5$ = nombre de cellules par ml
Viabilité : nombre de cellules vivantes / total cellules comptées $\times 100$

Figure 32: photographie de la cellule de Mallassez
Formules de comptage et viabilité

Le comptage doit nous permettre de vérifier qu'un nombre suffisant de cellules a été récupéré pour le test. Il s'agit ensuite de calculer le volume nécessaire de suspension cellulaire à prélever pour avoir suffisamment de cellules par lames (soit environ 30 000 par lames). Le pourcentage de viabilité cellulaire doit alors être supérieur à 70% (Tice *et al*, 2000).

Ce mode de comptage et cette mesure de la viabilité seront appliqués pour les études *in vitro* et celles *in vivo* concernant le rein (technique de perfusion).

En revanche, cette technique ne pourra pas être appliquée dans le cas où la suspension cellulaire est obtenue par homogénéisation au potter. En effet avec cette technique (décrise précédemment) une pression importante est exercée sur les membranes cellulaires et nucléaires et les fait ainsi « éclater ». Le comptage et la viabilité ne peuvent être envisagés par la méthode au Bleu Trypan car la suspension n'est en réalité constituée que des noyaux.

Le comptage sera effectué dans ce cas à l'aide d'un automate : le compteur Coulter.

Par contre aucun test de cytotoxicité n'a encore été déterminé. Ainsi par cette méthode d'isolement des noyaux cellulaires, si un comptage est possible, il faut encore rechercher le moyen de déterminer s'il n'y a pas d'effet cytotoxique, de phénomène de nécrose ou d'apoptose qui pourrait également engendrer des dommages à l'ADN.

C. LE TEST DES COMETES

(Tice *et al*, 2000)

a) Préparation des agaroses

Deux types de gel sont utilisés : un gel à point de fusion normal (NA = Normal Agarose) et un gel à bas point de fusion (LMPA = Low Melt Point Agarose). Ceux-ci sont préparés dans du PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} (afin d'inhiber l'activité endonucléasique Ca^{2+} - Mg^{2+} des cellules) ; les solutions sont fondues au micro-onde. Le Normal Agarose est préparé aux deux concentrations de 1,5 % (pour réaliser la couche primaire lors de la préparation des lames) et de 0,8 % (utilisé comme première sous-couche lors de la réalisation du test des comètes). Le Low Melt Point Agarose est préparé à la concentration de 0,5 % (dans laquelle les cellules seront incluses lors de la réalisation du test).

NB : le jour du test, le NA 0,8 % peut être maintenu dans un bain-Marie à 45°C et le LMPA à 0,5 % dans un bain-Marie à 37°C, jusqu'à leur utilisation.

b) Préparation des lames

Des lames de microscopie non lavées non dégraissées sont utilisées car elles permettent une bonne adhésion du gel à leur surface.

Pré-couche (au moins la veille du test)

Les lames sont trempées dans la solution d'agarose NA 1,5% la veille de l'essai de façon à les recouvrir au 3/4 d'un film de gel. Elles sont séchées à l'air libre. Cette pré-couche est la plus concentrée et a essentiellement pour but l'attachement et le maintien des couches suivantes sur la lame.

Première couche (le jour du test)

Sur la pré-couche bien sèche, 85 µl d'une solution d'agarose NA 0,8 % sont déposés, puis recouverts immédiatement d'une lamelle ; ceci permet l'étalement homogène de cette couche sous la surface de la lamelle. Les lames sont alors déposées pendant 5 minutes sur un lit de glace (ou au réfrigérateur), afin que le gel se solidifie. Ce laps de temps écoulé, la lamelle est retirée délicatement en la faisant glisser sur le gel pour en conserver l'intégrité.

Deuxième couche = couche cellulaire

Après l'étape de comptage, le volume nécessaire pour obtenir un nombre suffisant de cellules est déterminé. Une centrifugation est effectuée et le culot cellulaire est repris dans 300 µl de LMPA 0,5 %. Après un mélange par aspiration refoulement, 75 µl de cette suspension sont déposés sur la première couche. De la même façon que précédemment, une lamelle vient immédiatement recouvrir le dépôt. Les lames sont mises 5 à 10 minutes sur la glace (ou au réfrigérateur) pour permettre la solidification. Le temps écoulé, la lamelle est retirée délicatement.

Troisième couche

Enfin, 75 µl de la solution d'agarose à bas point de fusion sont déposés sur la deuxième couche, recouverte aussitôt d'une lamelle. La lame est maintenue à 4°C pendant 5 minutes, comme lors de la confection des couches précédentes.

Le modèle avec trois couches d'agarose est le plus souvent utilisé. Cependant, la dernière couche est facultative, certains auteurs ne la déposent pas.

c) Lyse cellulaire

L'étape d'inclusion des cellules terminée, les lamelles sont retirées délicatement puis les lames sont directement plongées dans un bac opaque contenant le tampon de lyse. La solution de lyse finale contient un détergent non ionique, le Triton X-100 et des sels à concentration élevée (NaCl).

La solution de lyse finale est préparée à partir de solutions stock de NaCl 2,5 M (Sigma), Trizmabase 10 mM (Sigma), EDTA 100 mM (Sigma), NaOH (Merck) et est complétée par 10 % de DMSO et 1 % de Triton X-100.

La lyse se déroule pendant au minimum 1 h à 4 °C. A partir de cette étape et ce jusqu'à la fin de l'électrophorèse, les manipulations auront lieu dans l'obscurité, afin d'empêcher des lésions supplémentaires de l'ADN.

d) Dénaturation de l'ADN

Certains auteurs préconisent un rinçage après la lyse pour enlever les restes de détergents et de sels qui pourraient retarder la migration (Fairbairn *et al*, 1995, Tice *et al*, 2000). Ce rinçage permet également d'obtenir une meilleure reproductibilité.

Cette étape de relâchement de la structure superenroulée et de séparation des deux brins d'ADN s'effectue dans la cuve électrophorétique. Le tampon d'électrophorèse est constitué de NaOH 10 N et d'EDTA 200mM, il est préparé extemporanément. La dénaturation a lieu sous condition alcaline forte, le pH du tampon est supérieur à 13.

Les lames restent alors immergées dans le tampon pendant 20 minutes, à 4 °C et toujours à l'obscurité.

e) Electrophorèse

La solution tampon utilisée est identique à celle de la phase de déroulement, le pH du tampon est toujours supérieur à 13. L'électrophorèse ne requiert qu'un temps court (20 min). Le générateur délivre une faible tension : 25 V, la formation d'une comète ne demandant en fait qu'un déplacement court de l'ADN. L'intensité est ajustée à 300mA en faisant varier le volume de tampon dans la cuve. Il est conseillé de réaliser cette étape à 4 °C pour garantir une bonne reproductibilité.

f) Neutralisation

L'électrophorèse s'étant déroulée en milieu alcalin, il faut neutraliser les gels pour permettre le réappariement des brins d'ADN. Les lames sont alors délicatement retirées de la cuve, égouttées et rincées dans une solution tampon Trizma 0,05 M à pH 7,5 pendant 5 à 10 minutes à température ambiante.

g) Conservation des lames

Les lames sont ensuite séchées et fixées par immersion dans l'éthanol absolu pendant 5 minutes. Avec l'utilisation des lames non lavées, non dégraissées, la conservation peut se faire indéfiniment avant la lecture, à température ambiante et à l'abri de la lumière ([Klaude et al, 1996](#)).

h) Coloration des lames

Elle se fait à l'aide d'un fluorochrome : l'Iodure de Propidium (IP) ou le Bromure d'Ethydium (BET).

Au moment de la lecture une solution d'IP à 20 µg/ml ou de BET à la même concentration est préparée. Un volume de 20 µl de cette solution est déposé sur le gel recouvert d'une lamelle. La lecture doit avoir lieu immédiatement après coloration, sans quoi une extinction de fluorescence et une diffusion du fluorochrome à travers le gel se produit et vient biaiser les résultats.

i) Lecture

Chaque lame est examinée à l'aide d'un microscope à fluorescence couplé à un système d'analyse d'image (*Cf Principe général du test des Comètes*). Ce dernier est constitué d'une caméra couplée au logiciel Komet 4.0 – Kinetic Imaging. L'analyse se fait de façon semi-automatique. En effet, la lecture d'une lame consiste à observer aléatoirement (au grossissement de 200 x ou de 400 x) et analyser 50 cellules, en balayant la lame dans un sens unidirectionnel, en évitant toujours les bords. Parmi les nombreux paramètres que le logiciel est capable d'enregistrer pour une seule et même cellule, nous avons choisi de retenir le moment caudal ou Olive Tail Moment (OTM), selon Olive ([Olive et al, 1991](#)). Ce dernier semble être bien représentatif d'une comète puisqu'il tient compte du centre de gravité de la tête, de la longueur de la queue et du pourcentage d'ADN contenu dans la queue (*Cf figure 33*), il est largement utilisé dans la littérature ([Tice et al, 2000](#), [Hartmann et al, 2003](#),...).

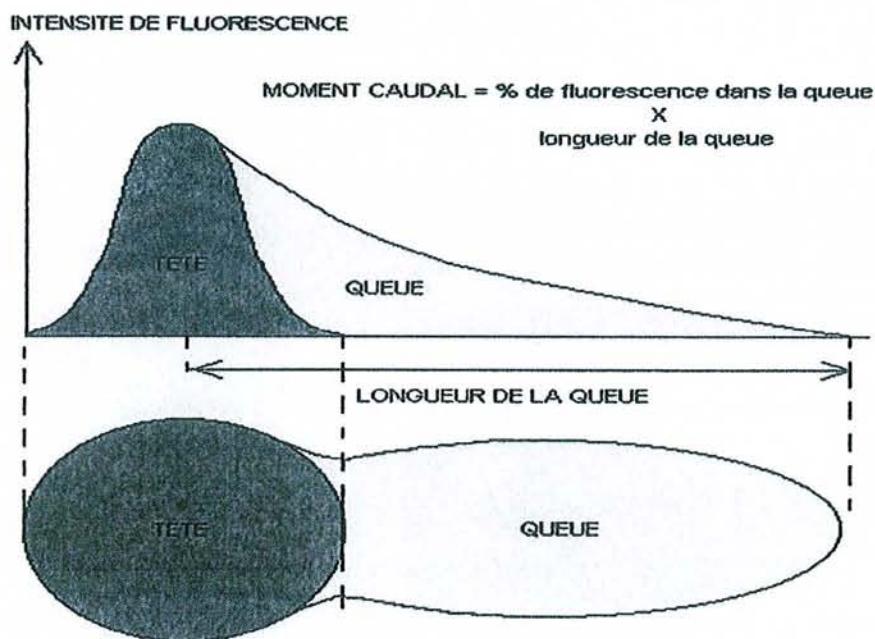


Figure 33 : calcul du moment caudal selon Olive.

Ainsi le nombre de cellules par lame enregistré est donc de 50.

In vitro : 3 lames sur les 4 réalisées par doses seront lues.

In vivo : 3 lames sur 4 réalisées par animal seront lues (chaque groupe d'animaux constitué de 4 rats ayant reçu une dose de produit à tester, le solvant ou le témoin positif).

Il faut noter qu'un système de codage des lames est mis en place, de manière à réaliser une lecture aléatoire et éviter la formation de biais.

D. ANALYSE STATISTIQUE

Une grande diversité règne en matière de tests statistiques appliqués au test des comètes. Les méthodes sont très variables concernant l'analyse des résultats, et à ce sujet les publications sont très nombreuses (Andreoli *et al*, 1985, Speit *et al*, 1998, Garry *et al*, 2003, Singh *et al*, 1988, Duez *et al*, 2003, Wiklund et Agurell, 2003, Ejchart *et al*, 2003, Bauer *et al*, 1998).

La méthode statistique choisie pour analyser nos résultats est basée sur les travaux de Wiklund et Agurell (Wiklund and Agurell, 2003).

Afin de bien comprendre la démarche et le choix de la méthode statistique, il faut tout d'abord noter que la distribution de l'OTM est inconnue et semble ne pas suivre une loi normale. De ce fait, il n'est pas possible d'envisager des tests paramétriques ; deux possibilités s'offrent alors à nous :

- la transformation des données pour tenter de normaliser
- le recours à des tests non paramétriques

Cependant, la distribution des OTM n'est pas la même pour chaque groupe : l'utilisation des tests non paramétriques n'est pas autorisée. Les valeurs étant beaucoup trop réparties pour une même lame, il n'est pas possible de choisir un représentant de l'OTM et de normaliser. En conclusion, aucun traitement statistique ne peut être appliqué si l'on considère la comète représentée par son OTM comme unité statistique.

Il faut donc choisir un représentant de la lame, le meilleur, dont la distribution sera la même pour tous les groupes. Gardant à l'esprit que les points sont beaucoup trop éloignés, moyenne ou médiane ne seront pas de bons représentants. La solution réside alors dans la transformation logarithmique, qui permet alors « de rapprocher » les points et de normaliser.

Enfin, des simulations à l'aide de modèles mathématiques ont été réalisées et démontrent que la moyenne des log donne les meilleurs résultats.

Ainsi pour chaque groupe (groupe témoin négatif, groupe témoin positif, groupe ayant été traité par une des doses testées), une boxplot de l'Olive Tail Moment (OTM) est réalisée. Celle-ci est représentée figure 34.

Cette représentation a l'avantage de regrouper un nombre important de renseignements statistiques superposés. Elle permet de rendre compte de la variabilité importante qui existe au sein d'une même lame et entre les lames d'un même groupe traité.

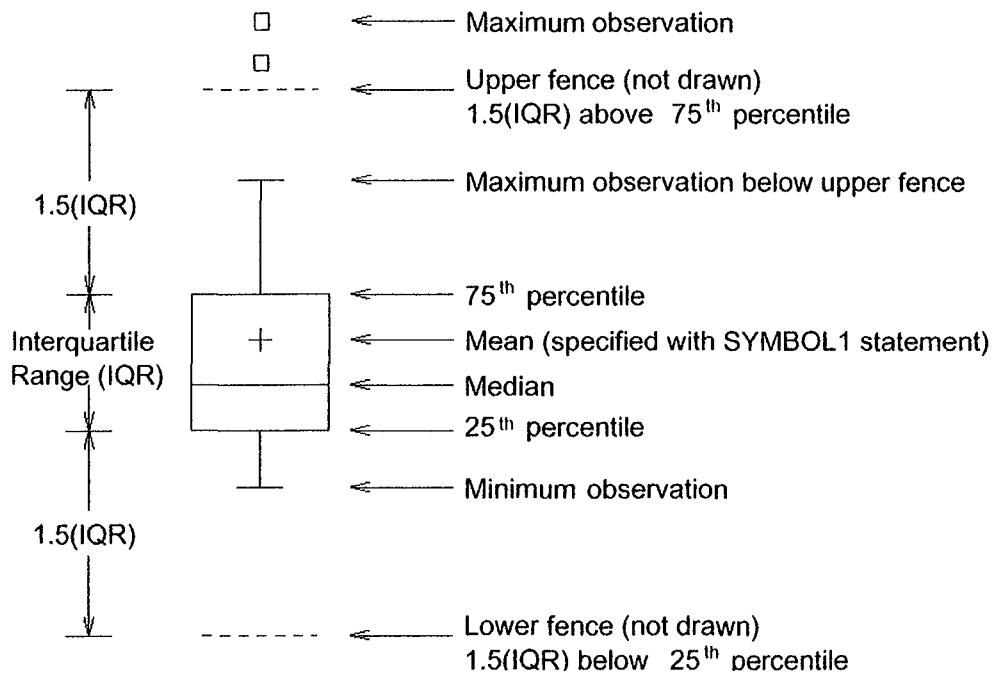


Figure 34 : Représentation graphique de la boxplot d'une lame

Une fois la moyenne des log calculée, la lame est utilisée comme unité statistique. Le traitement statistique est alors le suivant :

- **un test de tendance ou trend test** : il s'agit de réaliser dans un premier temps une analyse de variance, modèle deux voies, appelée encore MANOVA. Ce modèle présente l'intérêt de tenir compte de plusieurs facteurs, ici en l'occurrence l'effet dose d'une part, et l'effet animal d'autre part. Ceci étant valable pour le modèle *in vivo*, en ce qui concerne le modèle *in vitro*, il s'agit de réaliser la même analyse de variance mais cette fois à une seule voie, seule l'effet dose sera analysé.

Le test de tendance donne une idée générale du résultat statistique.

- **Un test de comparaison deux à deux ou pairwise** : ce second test permet d'affiner le résultat, la tendance obtenue avec le premier test. Il s'agit de tester chaque dose de produit testé versus le témoin négatif. Pour cela la calcul de

l'intervalle de confiance à 95 % permettra une estimation de la différence entre les groupes deux à deux.

L'ensemble des tests statistiques a été réalisé à l'aide des logiciels SAS program et Statview.

NB : cette méthode de traitement des résultats et cette analyse statistique ont été utilisées pour toutes les études *in vivo*. Par contre, les études *in vitro* présentées dans ce manuscrit n'ont fait l'objet d'aucune analyse statistique, l'interprétation sera basée sur une comparaison de nos résultats avec ceux obtenus dans la littérature, les produits testés pour la validation *in vitro* étant des positifs de référence largement décrits dans les publications relatives au Test des Comètes *in vitro*.

E. EVALUATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

Ainsi, nous venons de voir qu'il est nécessaire de tenir compte de plusieurs critères pour définir une réponse positive d'un produit, autrement dit pour mettre en évidence les propriétés génotoxiques du produit testé.

L'analyse statistique nous permet de voir un effet significatif par rapport au témoin négatif, il faut compléter le raisonnement en ajoutant une interprétation biologique du résultat, d'autant plus lors des études *in vivo*. Enfin, il est important de mettre en parallèle les résultats du Test des Comètes et ceux des études de cytotoxicité.

TROISIEME PARTIE :

RESULTATS

I. ESSAIS DE MISES AU POINT

Comme nous l'avons vu précédemment (Cf. *Matériel et Méthodes*), deux techniques d'isolement cellulaires ont été pratiquées dans cette étude : l'une correspondant à une récupération de noyaux cellulaires par broyage de l'organe, l'autre étant une méthode d'isolement enzymatique. Ces deux techniques ont nécessité de nombreux essais de mise au point préalables avant d'être appliquées. Ceux-ci représentent une étape délicate et très importante. En effet les cellules et donc la qualité de leur isolement constituent la base du test.

Les études de mises au point ont été réalisées sur un faible nombre d'animaux, non traités dans un premier temps, puis avec traitement par un positif de référence bien connu dans un second temps.

A. ISOLEMENT PAR BROYAGE / CAS DES CELLULES HEPATIQUES

Comme nous l'avons mentionné précédemment (*cf méthodes*), nous nous sommes inspirés des travaux de Sasaki et son équipe pour mettre au point cette technique d'isolement cellulaire (Sasaki *et al*, 1997).

💡 Au cours du premier essai, deux étapes du protocole ont été testées.

Il s'agit de déterminer d'une part la vitesse de centrifugation à appliquer. La première vitesse testée, 700 g est celle décrite et recommandée par Sasaki, celle-ci paraissant très élevée, il paraît judicieux de la comparer à une centrifugation de 50 g, plus fréquemment décrite et employée dans les protocoles *in vitro*.

D'après les résultats présentés figure 35, 700 g sera la vitesse retenue, en effet en appliquant cette technique de broyage ce sont essentiellement les noyaux des cellules, beaucoup plus légers, qui sont récupérés.

D'autre part une technique de récupération des cellules par écrasement de l'organe sur un filtre de 100 µm de diamètre a été testée. Celle-ci permettrait d'exercer une pression moins importante sur les cellules qu'avec l'utilisation du potter.

D'après le résultat obtenu le nombre de cellules récupéré est satisfaisant, de plus, l'OTM est inférieur à 1,5, valeur très correcte pour un témoin négatif.

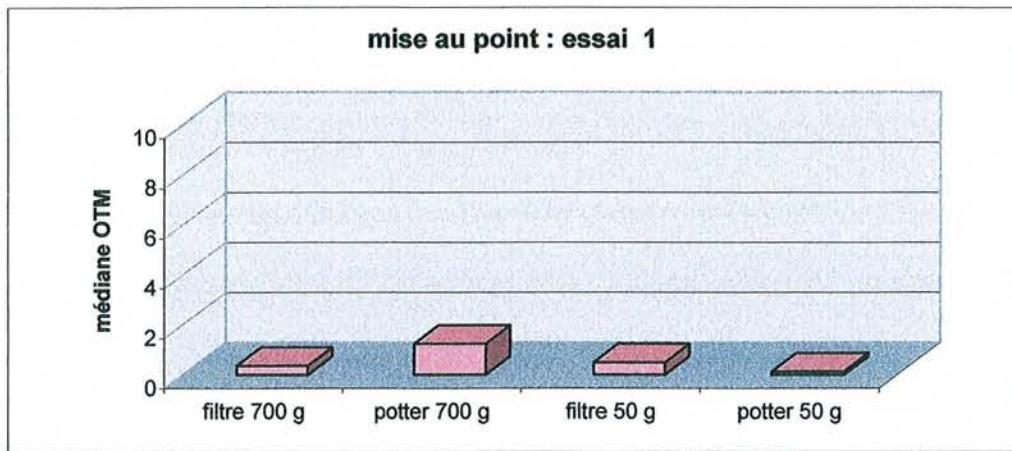


Figure 35 : mise au point de la technique d'isolement par homogénéisation : essai n°1

Le deuxième essai a permis de tester de nouveau l'utilisation du poter versus celle du filtre. De plus, une autre alternative est envisagée : l'usage d'une digestion enzymatique de l'organe émincé en boîte de Pétri. L'enzyme choisie est la trypsin. Quelle que soit la technique employée, un nombre suffisant de cellules est récupéré, mais surtout la valeur médiane d'OTM est satisfaisante, i. e. < 2 (figure 36).

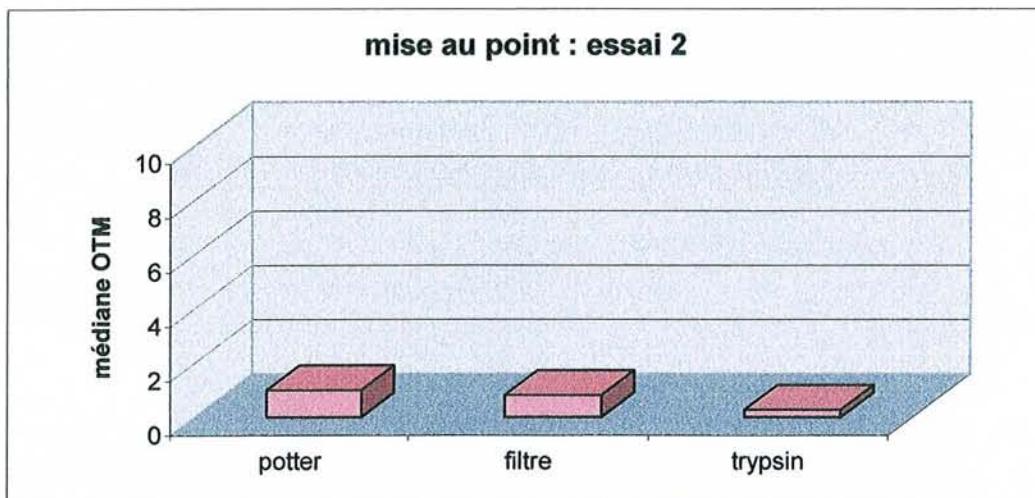


Figure 36 : mise au point de la technique d'isolement par homogénéisation : essai n°2

Bien que les trois techniques testées aient fourni des résultats satisfaisants, c'est la méthode du poter qui sera retenue, pour des raisons pratiques, de simplicité de mise en oeuvre, de répétabilité, et pour son emploi largement décrit dans la littérature.

Le troisième essai a été réalisé en étudiant la réponse après traitement avec un produit positif de référence : le Cyclophosphamide. Celui a été administré par gavage à raison de 30 mg/kg. Les résultats sont satisfaisants et confortent le choix de la technique car le nombre de noyaux récupéré est suffisant pour permettre une lecture aisée, et la valeur médiane d'OTM du témoin négatif est inférieure à 1. Nous pouvons conclure que cette technique d'isolement n'endommage pas l'ADN cellulaire, des lésions ne sont observées qu'après un temps long de traitement des animaux au CP.

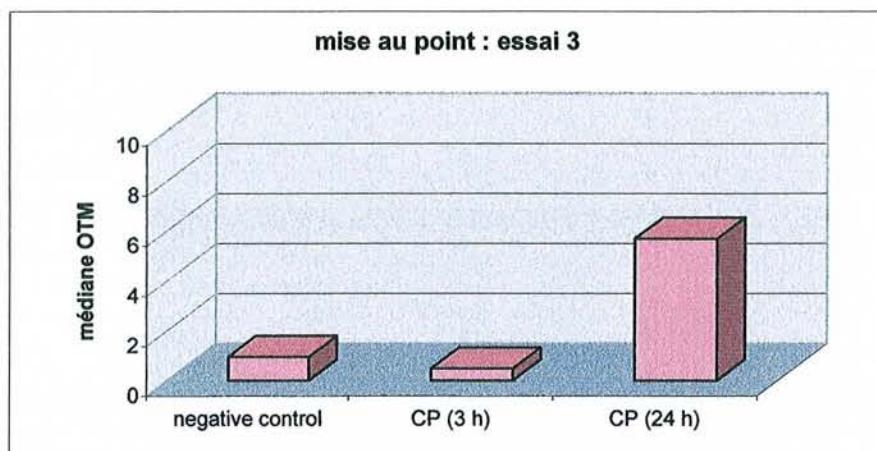
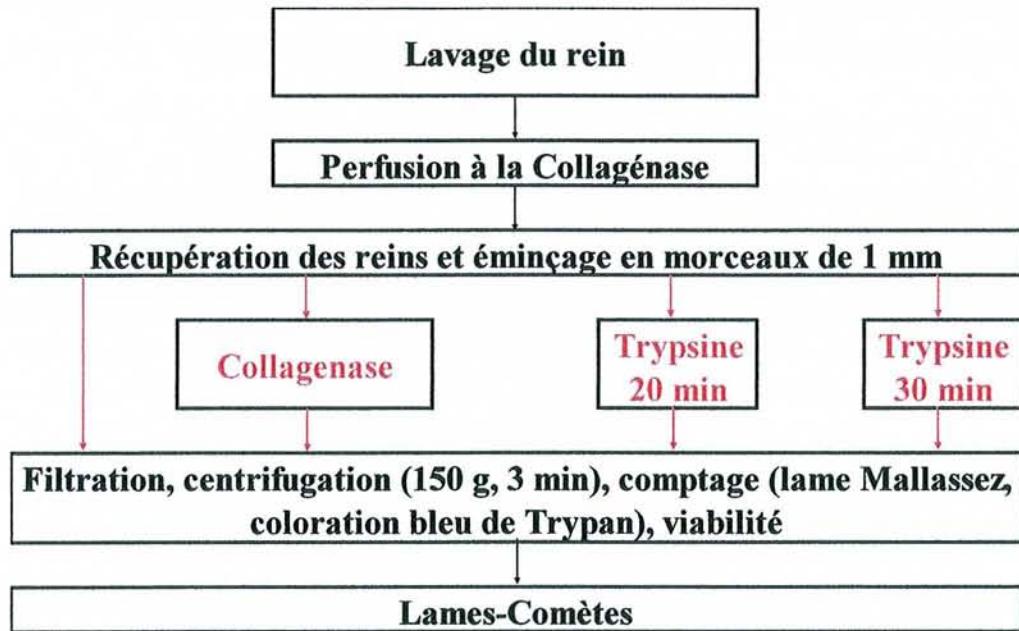


Figure 37 : mise au point de la technique d'isolement par homogénéisation : essai n°3

B. ISOLEMENT PAR METHODE ENZYMATIQUE SPECIFIQUE / CAS DES CELLULES RENALES

Comme nous l'avons mentionné précédemment (*cf méthodes*), nous nous sommes inspirés des travaux de Bruggeman et son équipe pour mettre au point cette technique d'isolement de cellules rénales (Bruggeman *et al*, 1989).

Le premier essai a été consacré à la seconde séquence de digestion enzymatique. Le schéma ci-dessous illustre la technique employée.



Lors de cet essai aucune lame comète n'a été réalisée le but étant de voir la viabilité des cellules et le nombre de cellules récupérées.

Les résultats sont présentés figure 38.

Nous pouvons constater une action spécifique de la Trypsine, celle-ci permet de dissocier un nombre important de cellules. La digestion à la collagénase seule reste moins satisfaisante. Ce premier essai démontre une bonne viabilité des cellules récupérées.

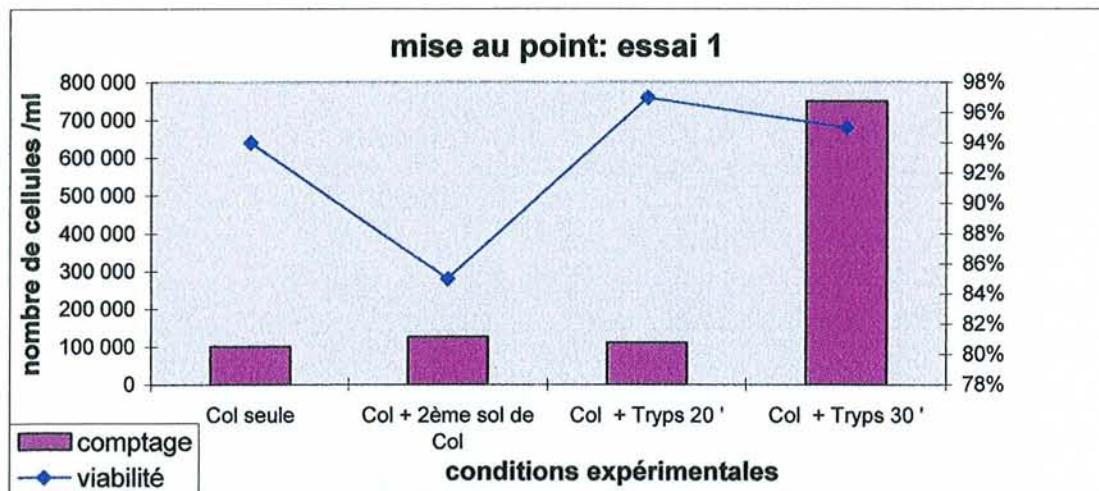


Figure 38 : mise au point de la technique d'isolement par perfusion *in situ* : essai n°1

Le second essai porte toujours sur la seconde étape de digestion enzymatique, il s'agit cette fois de faire varier les différents temps de contact de l'organe émincé avec la Trypsine. Cette enzyme a pour caractéristique d'être assez puissante ce qui pourrait endommager artéfactuellement les cellules. Cette fois, quelques lames comètes seront réalisées afin de s'assurer de l'intégrité de l'ADN des cellules récupérées. Trois temps différents de contact ont été testés : 20, 30, 40 minutes ainsi qu'un test supplémentaire sans ajout de Trypsine.

La figure 39 nous montre que le nombre de cellules récupérées est plus important avec la Trypsine. Le temps de contact de 30 minutes qui donne ici un très bon résultat sera retenu pour le protocole définitif. On observe une bonne viabilité avec cette technique. L'OTM est faible, bien représentatif d'un témoin négatif.

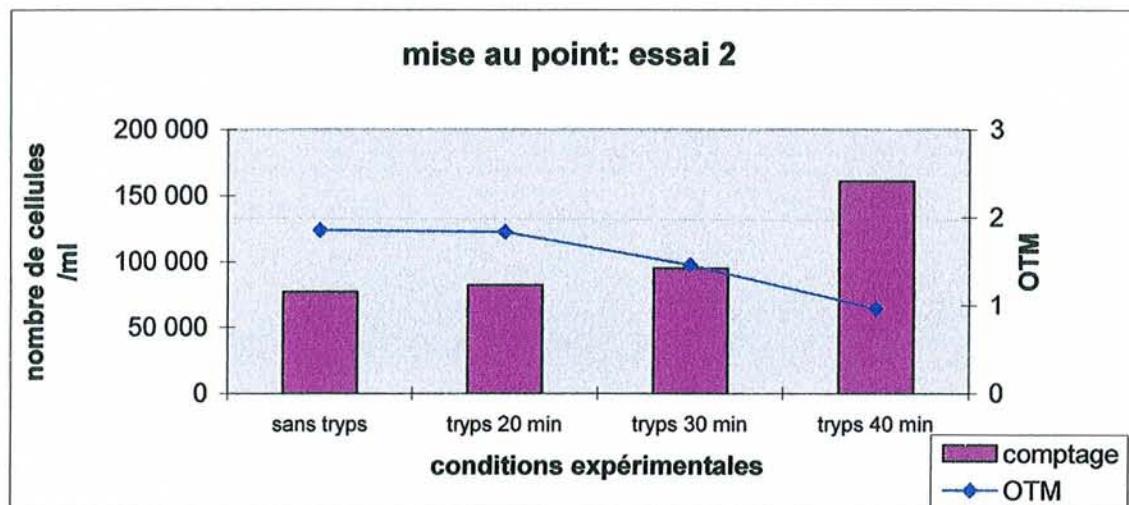


Figure 39 : mise au point de la technique d'isolement par perfusion *in situ* : essai n°2

Un troisième essai est consacré à l'étape de digestion à la collagénase. Deux concentrations différentes de l'enzyme, 0,05% et 0,025%, ont été testées.

Les résultats, figure 40 indiquent que le nombre de cellules vivantes obtenues est comparable quelle que soit la concentration d'enzyme employée. Nous retiendrons donc l'usage d'une collagénase à 0,025 % pour les tests à venir. Notons que la viabilité était cette fois encore d'environ 95 %.

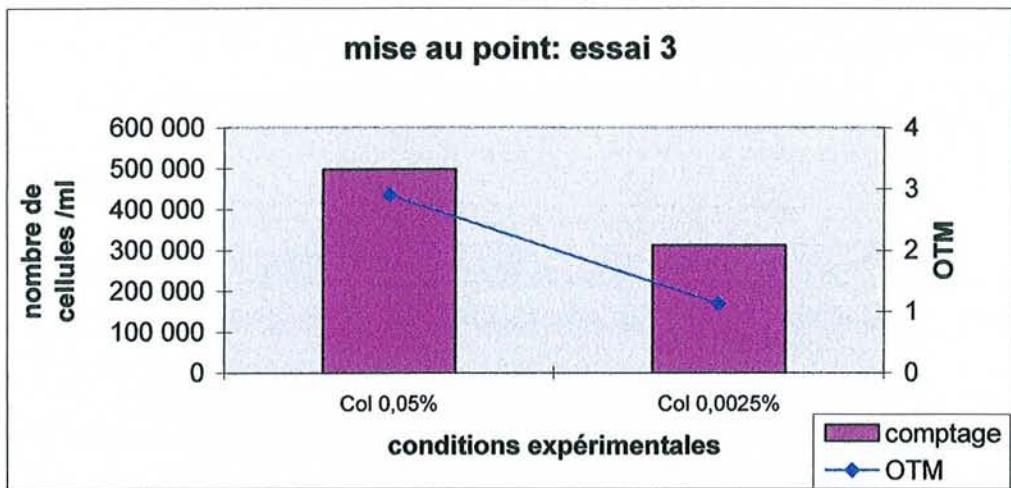


Figure 40 : mise au point de la technique d'isolement par perfusion *in situ* : essai n°3

- 💡 Le quatrième essai de mise au point a permis de confirmer le protocole choisi :
 - perfusion à la collagénase 0,025%.
 - seconde digestion enzymatique à la Trypsine pendant 30 minutes.

Les résultats sont les suivants :

Comptage : 86 400 cellules vivantes/ml

Viabilité : 86 %

OTM : compris entre 0,9 et 2,1.

II. RESULTATS DES DIFFERENTES ETUDES

Les résultats obtenus tout au long des différentes étapes de mise au point d'une part et de validation du test des Comètes d'autre part, seront exposés de la façon suivante :

Concernant les études *in vitro* tout d'abord, la médiane des OTM obtenus sera calculée et représentée graphiquement en fonction de chaque concentration de produit étudié.

Ensuite, les résultats des études *in vivo*, seront représentés par un graphique détaillant la distribution en fréquence des OTM. Les différents calculs réalisés : moyenne des log(OTM), écart type, ratio et intervalle de confiance, servant à l'analyse statistique seront présentés sous forme d'histogrammes.

Enfin, les différentes boxplot, réalisées pour l'étude statistique *in vivo* figurent quant à elles en annexes.

A. ETUDE DE COMPOSES GENOTOXIQUES *IN VITRO*

a) Le Benzo(a)pyrène

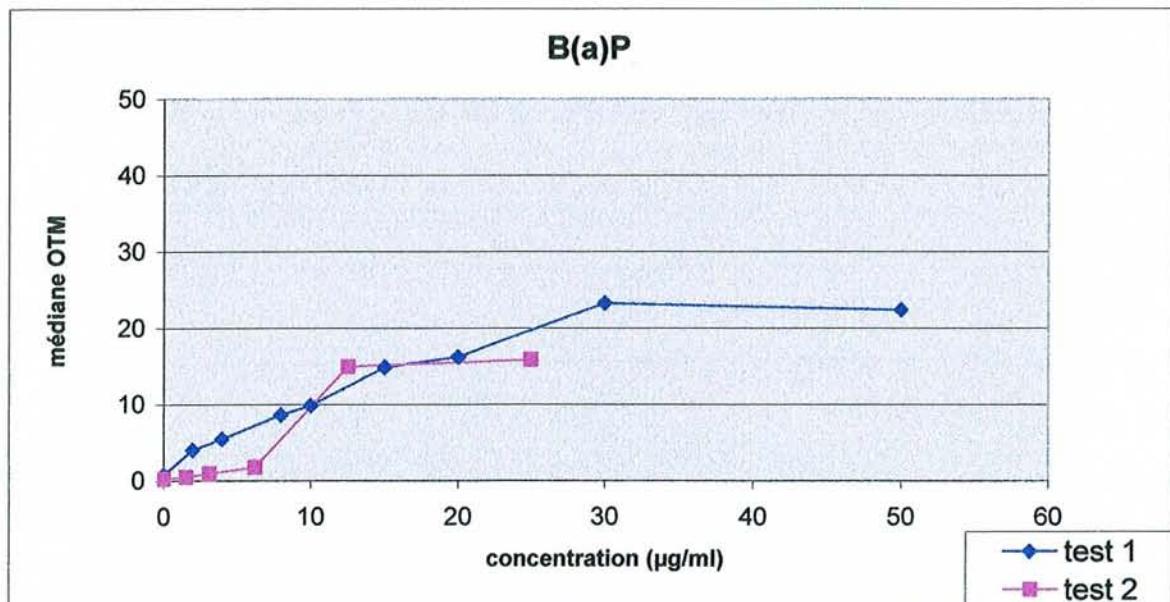


Figure 41 : Effets du Benzo(a)pyrène après 3 h sur cellules L5178Y.

Le premier test semble montrer une relation dose-effet du produit. Cependant on observe une augmentation très importante de l'OTM entre 6,25 et 12,25 $\mu\text{g/ml}$, ensuite à partir de cette dose 12,25 $\mu\text{g/ml}$, un effet plateau semble se produire, signifiant un effet toxique maximal.

Afin de confirmer les résultats et les hypothèses de cette première étude, un second essai a été réalisé, en augmentant le nombre de doses de B(a)P testées entre 6,25 et 12,25 $\mu\text{g/ml}$, et la gamme a été étendue au-delà de 12,25 $\mu\text{g/ml}$, jusqu'à 50 $\mu\text{g/ml}$. Notons que nous avons été limités pour le choix de la dose maximale par la solubilité du B(a)P. On note une bonne reproductibilité par rapport au premier essai et nous pouvons confirmer l'effet plateau observé. Cet étude a permis de mettre en évidence un effet génotoxique du Benzo(a)pyrène *in vitro*.

b) Le Cyclophosphamide

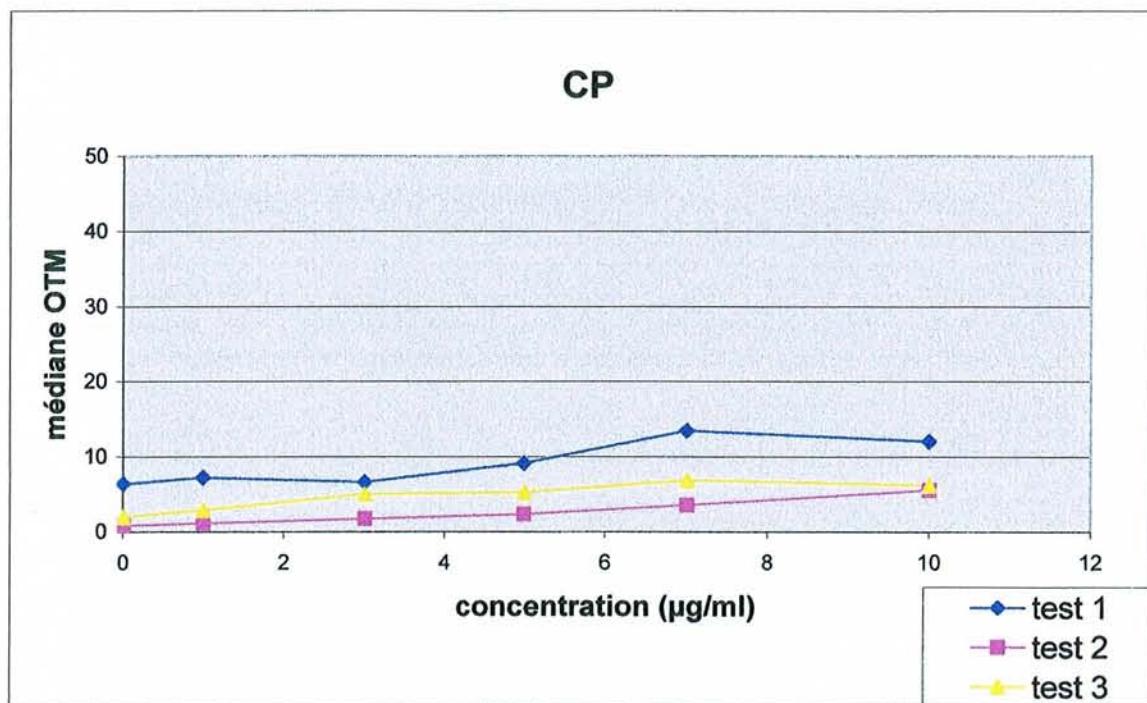


Figure 42 : Effets du Cyclophosphamide après 3 h sur cellules L5178Y

L'étude *in vitro* du Cyclophosphamide a été reproduite 3 fois, et dans les conditions d'applicabilité du test, a fourni une réponse négative quelle que soit la dose testée.

c) L'Ethyl-méthane sulfonate

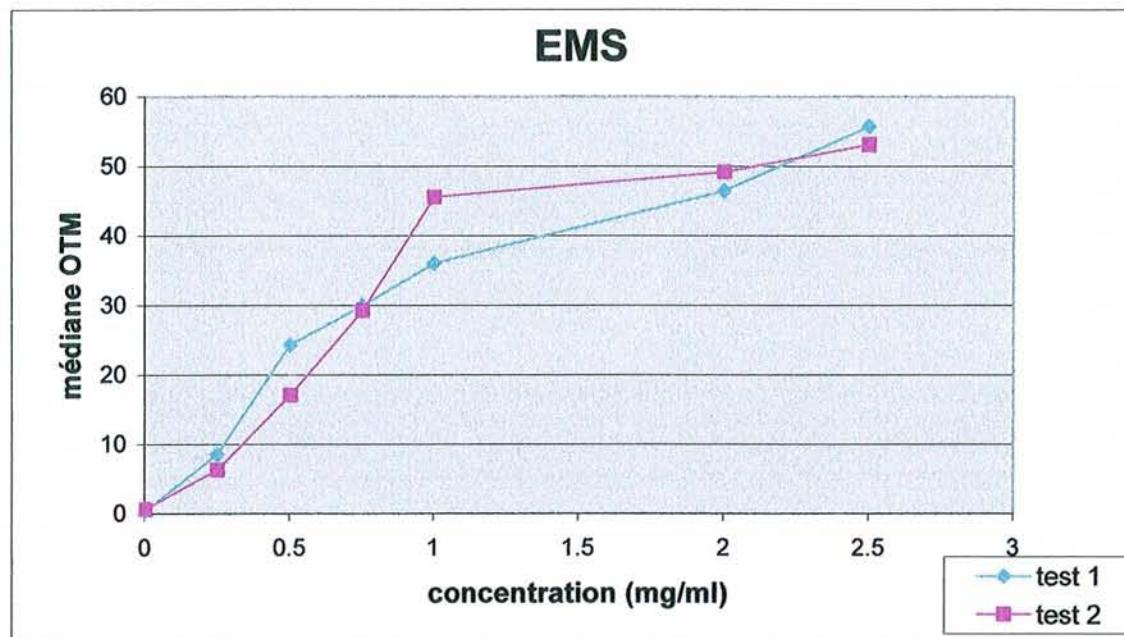


Figure 43: Effets de l'Ethyl-méthane sulfonate après 3 h sur cellules L5178Y

Notre étude *in vitro* révèle un résultat positif avec un effet dose-réponse, et ce de manière bien reproductible selon l'observation graphique.

d) Le Méthyl-méthane sulfonate

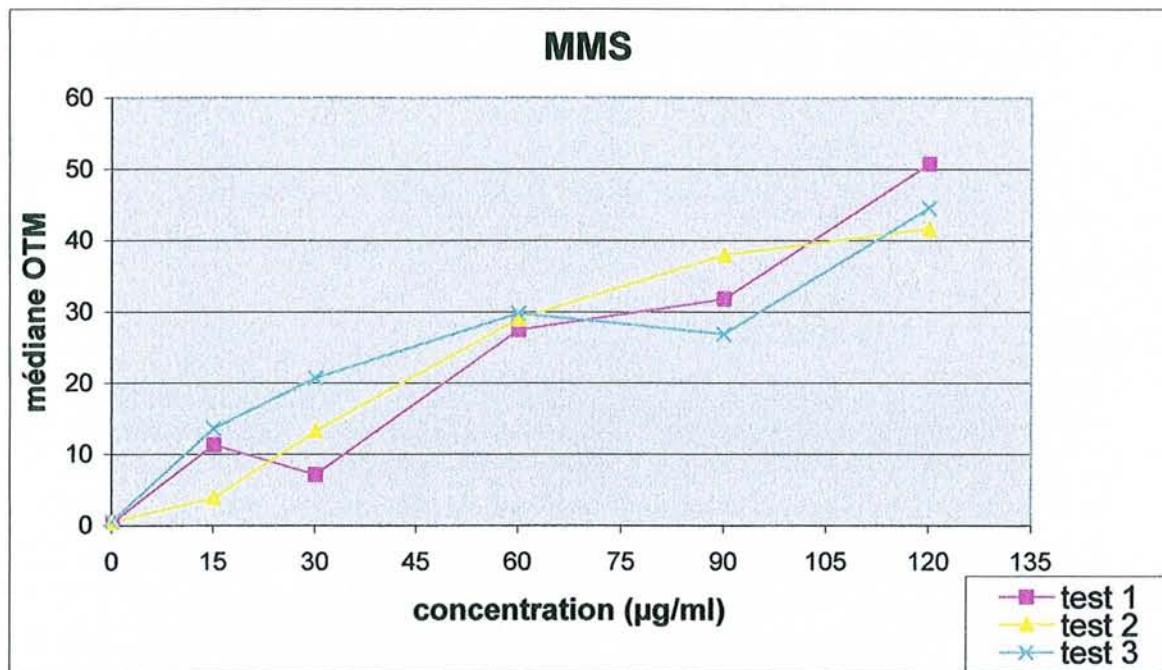


Figure 44: Effets du Méthyl-méthane sulfonate après 3 h sur cellules L5178Y

Les trois études réalisées sont bien reproductibles et reflètent bien l'effet génotoxique de ce constituant. Un effet dose-réponse est clairement observé.

Les résultats fournis par le MMS sont comparables à ceux obtenus pour son homologue l'EMS.

B. ETUDE DE COMPOSES GENOTOXIQUES *IN VIVO* SUR UN ORGANE CIBLE : LE FOIE

a) Le Benzo(a)pyrène

• Temps court

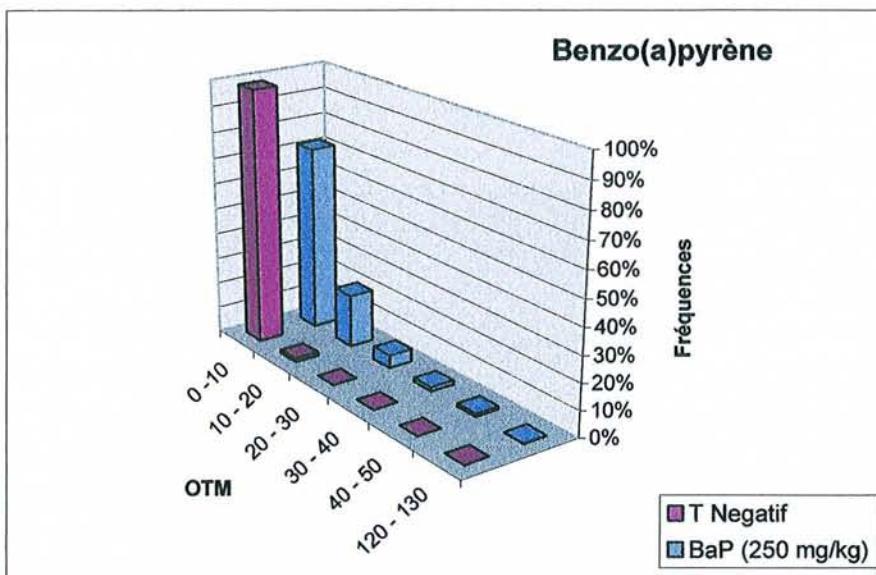


Figure 45: Effets du Benzo(a)pyrène sur cellules hépatiques *in vivo* après 3h.

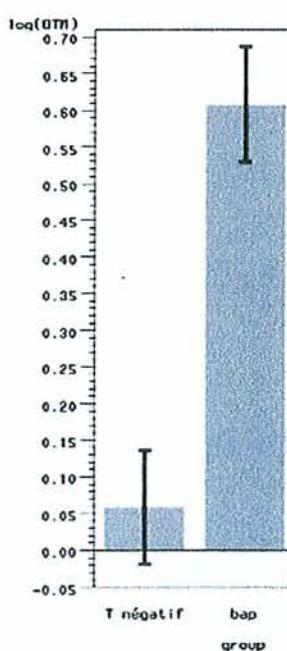


Figure 46 : moyenne et écart types des log(OTM) par groupe-B(a)P temps court

D'après les figures 45 et 46, nous pouvons observer un effet positif du B(a)P après 3 heures de traitement. Ceci est confirmé par le calcul statistique de l'intervalle de confiance du ratio groupe témoin versus groupe traité comme indiqué figure 47.

Group	Ratio	95% confidence interval	
BaP	3.582	1.956	6.557

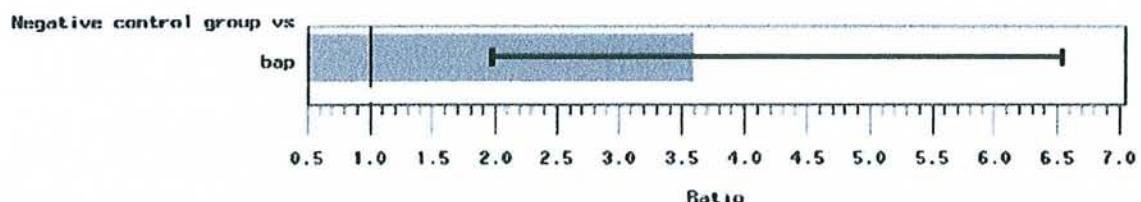


Figure 47 : Ratio groupe traité versus témoin négatif et intervalle de confiance à 95 % - B(a)P temps court

Temps long

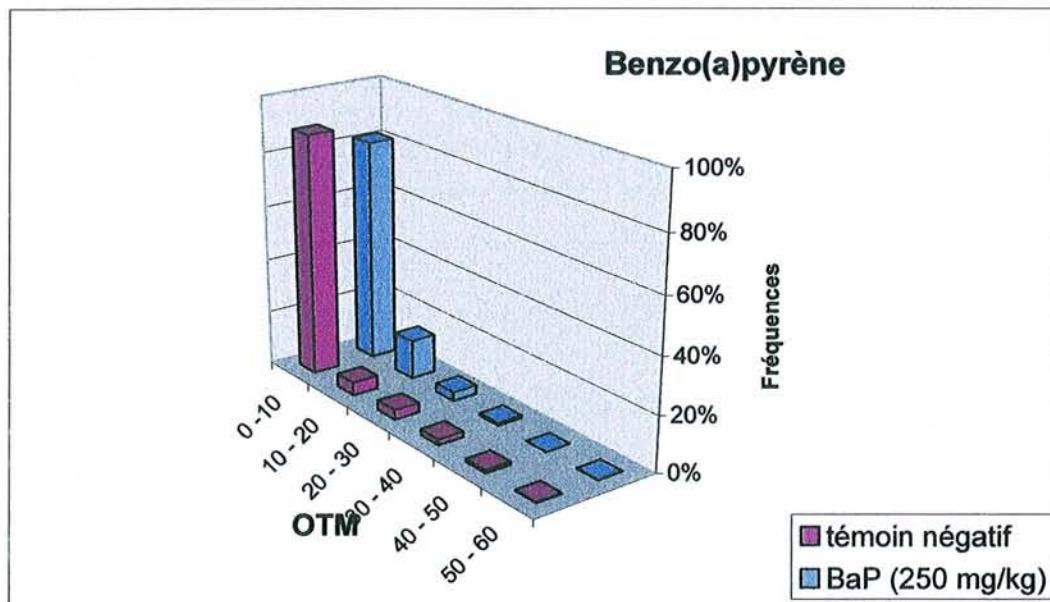


Figure 48: Effets du Benzo(a)pyrène sur cellules hépatiques *in vivo* après 24h.

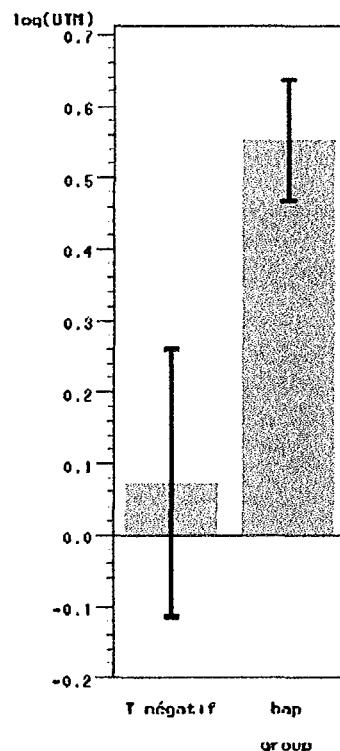


Figure 49 : moyenne et écart types des log(OTM) par groupe-B(a)P temps long

Group	Ratio	95% confidence interval	
BaP	3.093	1.662	5.758

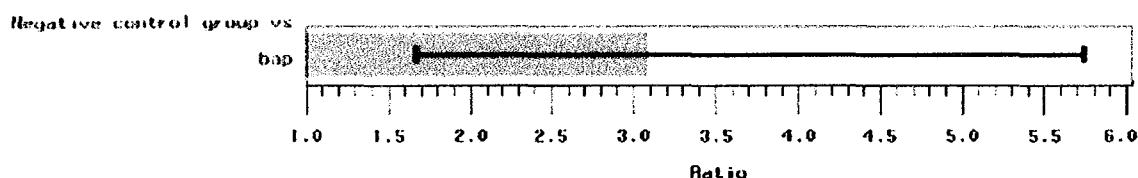


Figure 50: Ratio groupe traité versus témoin négatif et intervalle de confiance à 95 %- B(a)P temps long

De même que pour l'étude en temps court, le B(a)P produit un effet positif, statistiquement significatif à la dose de 250 mg/kg et après 24 heures de traitement.

Notons que l'effet positif obtenu est similaire entre le temps court et le temps long de traitement.

b) Le 2-Acétylaminofluorène

• Temps court

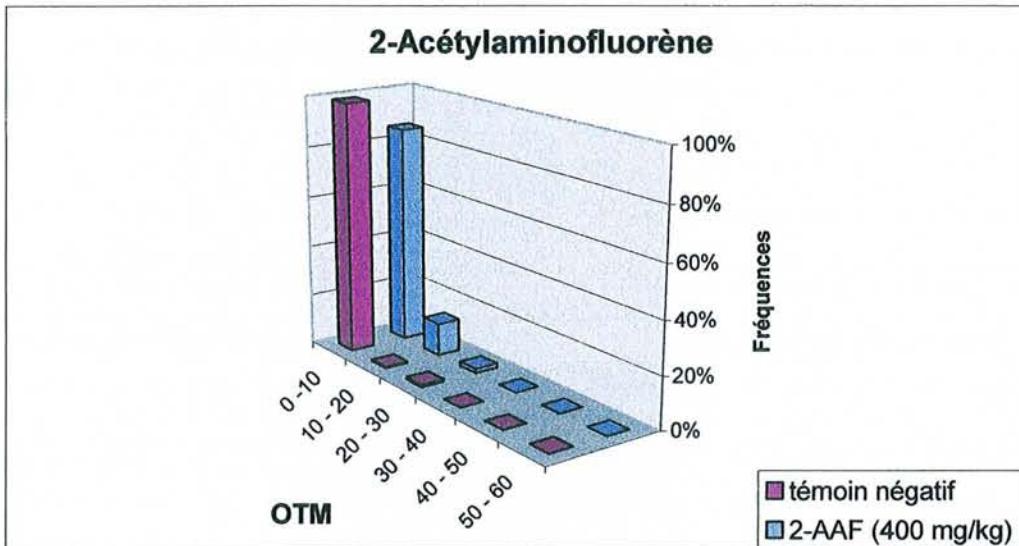


Figure 51: Effets du 2-Acétylaminofluorène sur cellules hépatiques *in vivo* après 3 h

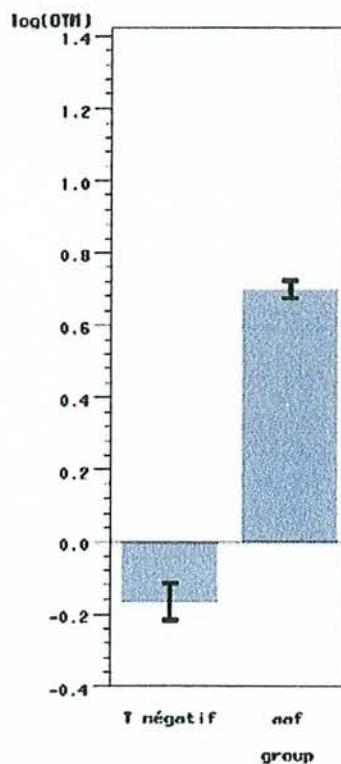


Figure 52 : moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-2-AAF temps court

Group	Ratio	95% confidence interval	
2-AAF	7.602	5.861	9.862

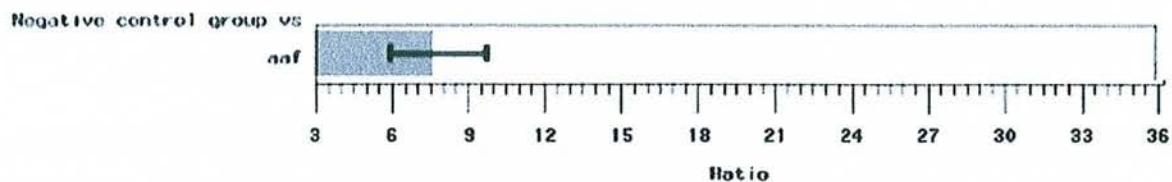


Figure 53 : Ratio groupe traité versus témoin négatif et intervalle de confiance à 95 % - 2-AAF temps court

Le résultat obtenu après un traitement court à 400 mg/kg de 2-AAF est positif et statistiquement significatif d'après le calcul de l'IC 95.

Temps long

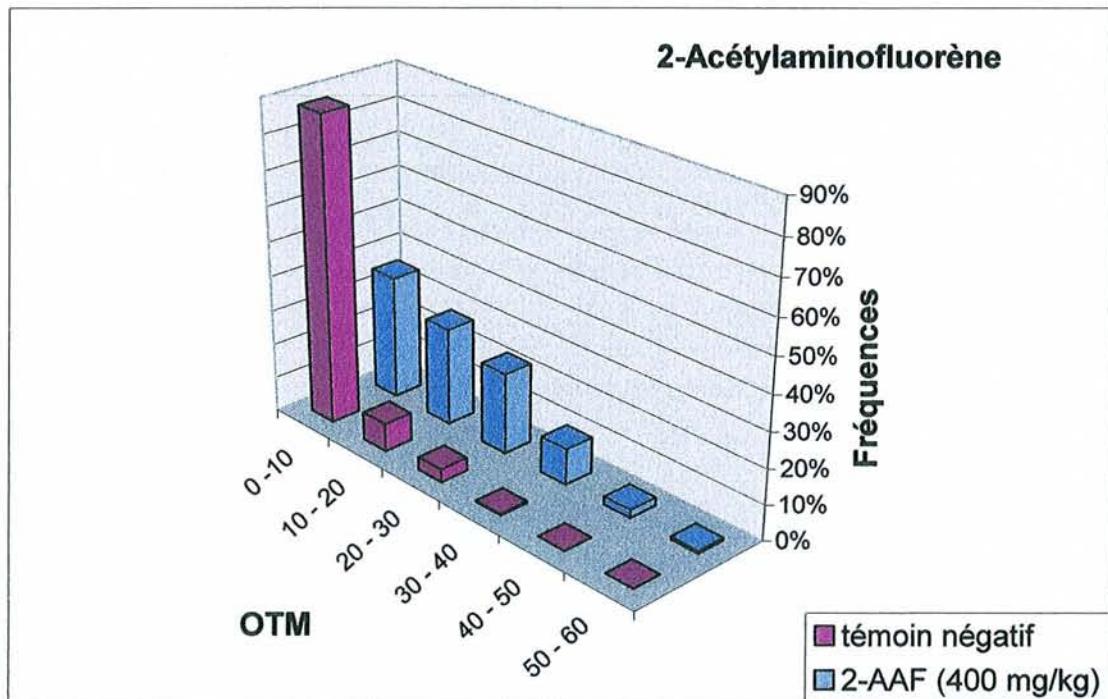


Figure 54: Effets du 2-Acetylaminofluorine sur cellules hépatiques *in vivo* après 24 h

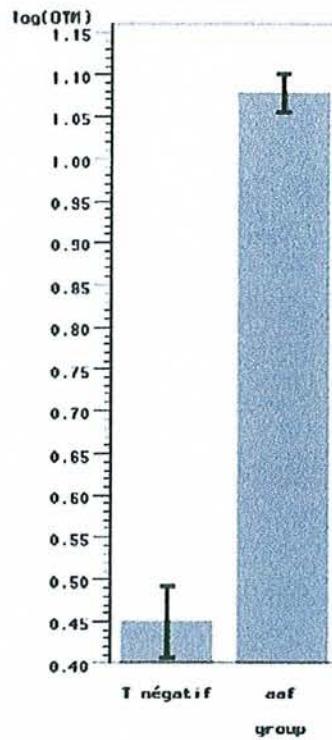


Figure 55 : moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-2-AAF temps long

Group	Ratio	95% confidence interval	
2-AAF	4.304	3.439	5.388

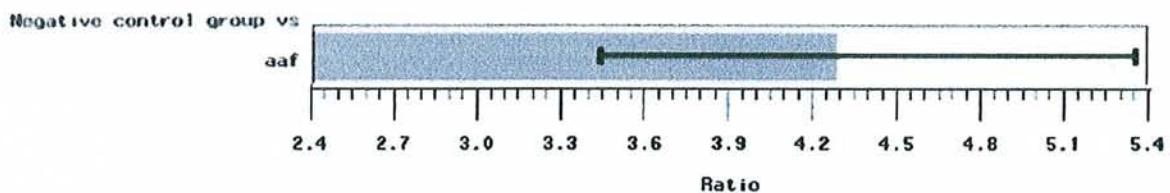


Figure 56 : Ratio groupe traité versus témoin négatif et intervalle de confiance à 95 %-
2-AAF temps long

Les résultats obtenus en temps long vont dans le même sens que ceux obtenus en temps court, nous pouvons observer un effet très nettement positif [figure 54 et 54](#), observation confirmée par l'analyse statistique, [figure 56](#).

L'effet génotoxique est beaucoup plus marqué après 24 heures de traitement qu'après 3 heures.

c) Le Cyclophosphamide

Temps court

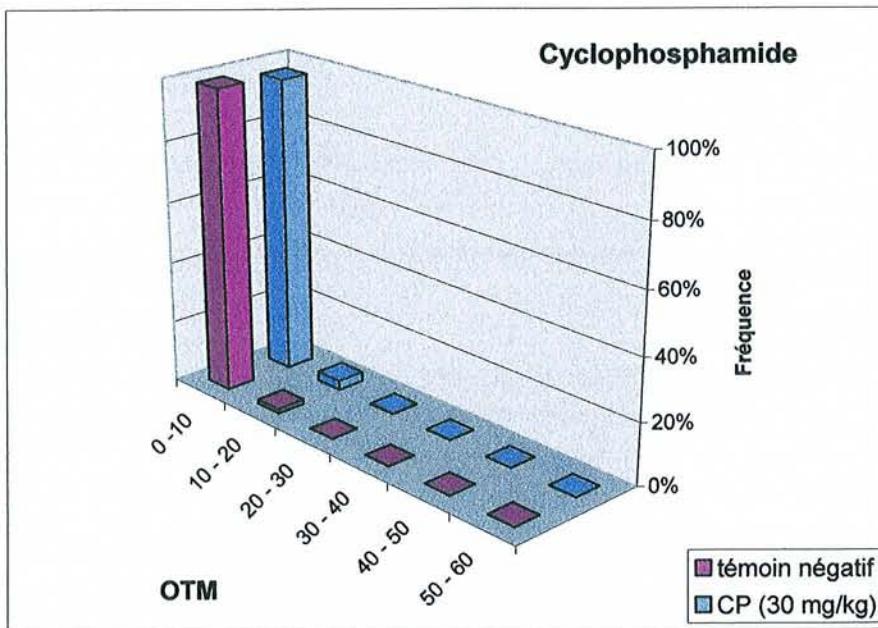


Figure 57: Effets du Cyclophosphamide sur cellules hépatiques *in vivo* après 3 h

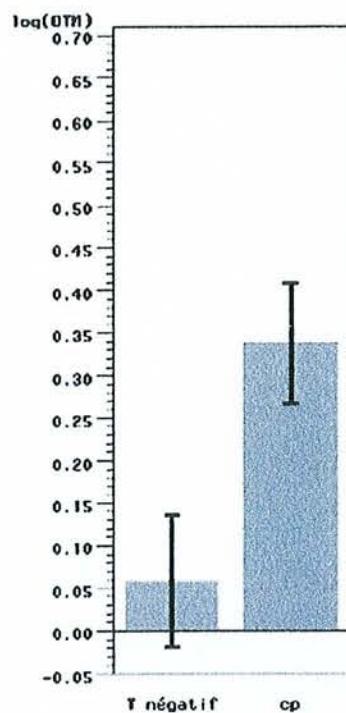


Figure 58 : moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-CP temps court

Group	Ratio	95% confidence interval	
CP	1.822	0.956	3.473

Negative control group vs

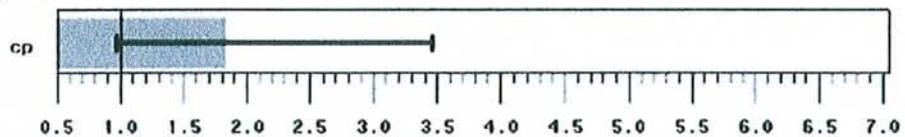


Figure 59 : Ratio groupe traité versus témoin négatif et intervalle de confiance à 95 % - CP temps court

Un traitement court à la dose de 30 mg/kg de Cyclophosphamide n'est pas suffisant pour produire un effet positif. Aucune différence statistiquement significative n'est mise en évidence par rapport au témoin négatif.

Temps long

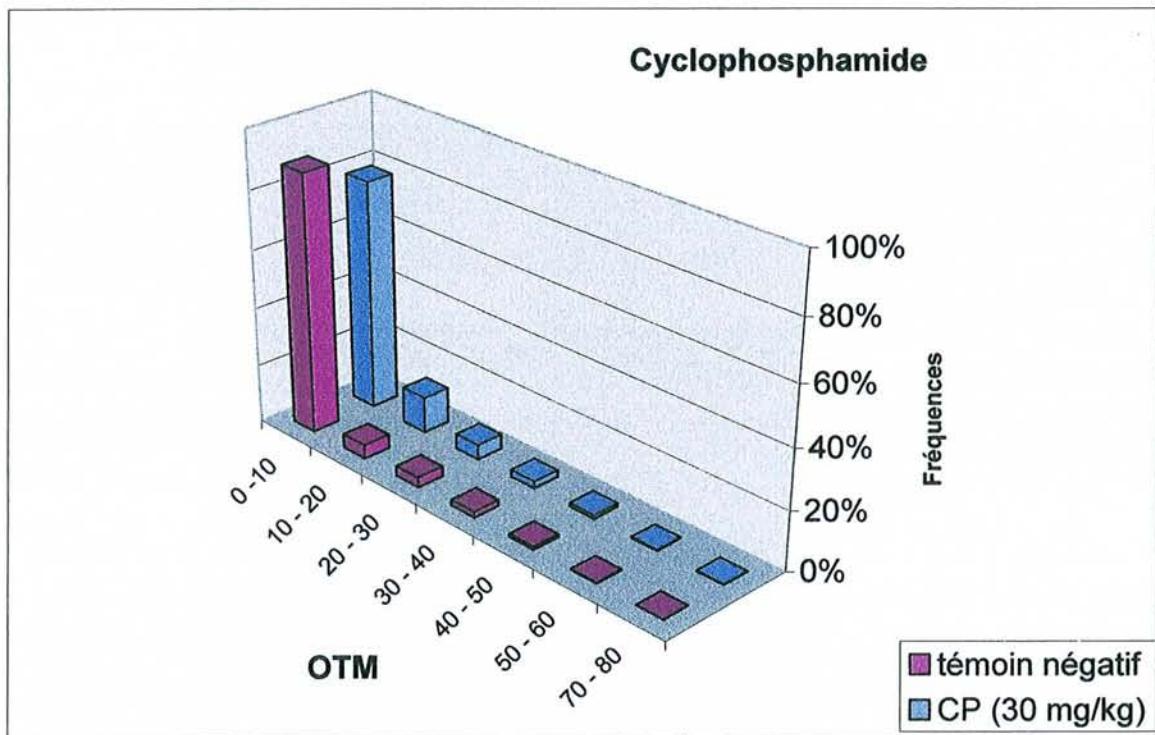


Figure 60 : Effets du Cyclophosphamide sur cellules hépatiques *in vivo* après 24 h

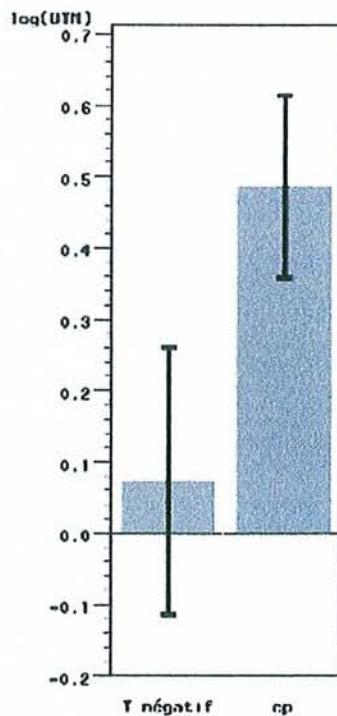


Figure 61 : moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-CP temps long

Après 24 h de traitement on observe par contre un effet positif du Cyclophosphamide d'après les graphiques 60 et 61.

La valeur 1 n'appartenant pas à l'intervalle de confiance du ratio groupe traité versus témoin négatif, il y a bien un effet significatif au seuil de 5 % d'erreur :

Group	Ratio	95% confidence interval	
CP	2.585	1.406	4.752

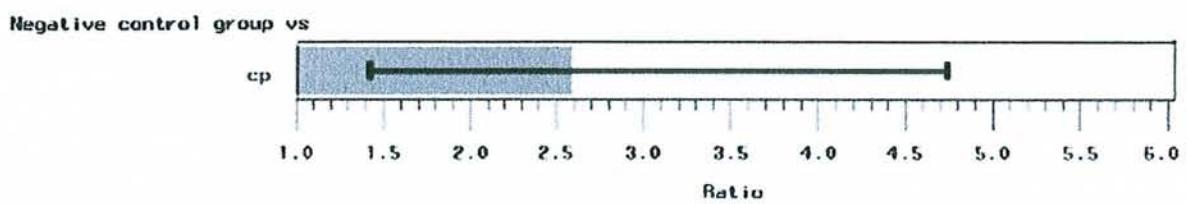


Figure 62 : Ratio groupe traité versus témoin négatif et intervalle de confiance à 95 %- CP temps long

d) Le Méthyl-méthane sulfonate

Temps court

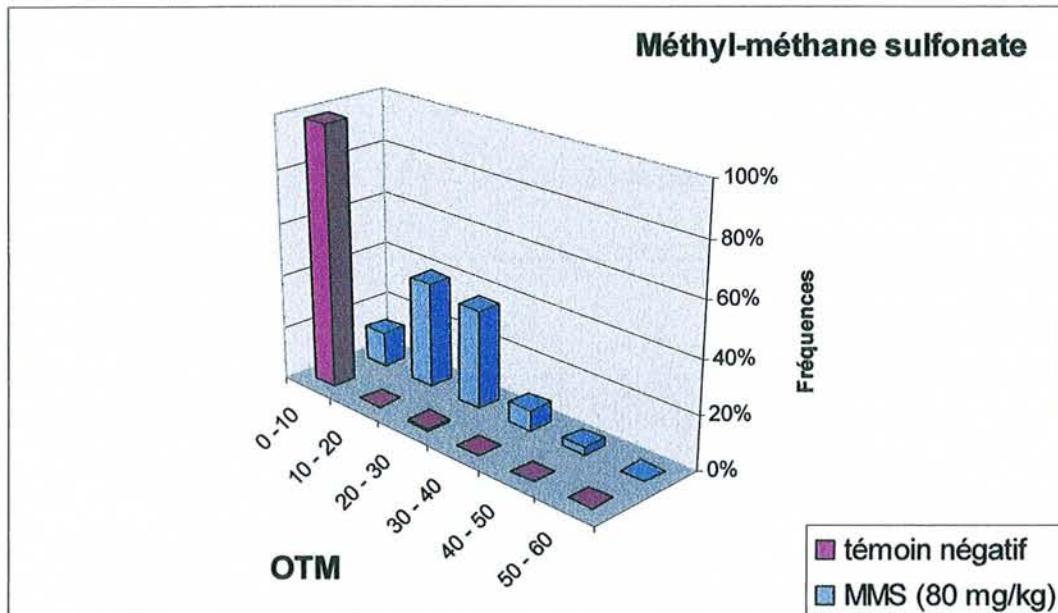


Figure 63: Effets du Méthyl-méthane sulfonate sur cellules hépatiques *in vivo* après 3 h

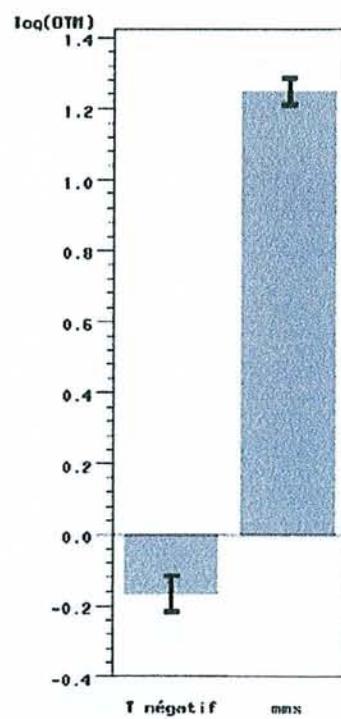


Figure 64 : moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-MMS temps court

Group	Ratio	95% confidence interval	
MMS	27.022	20.831	35.052

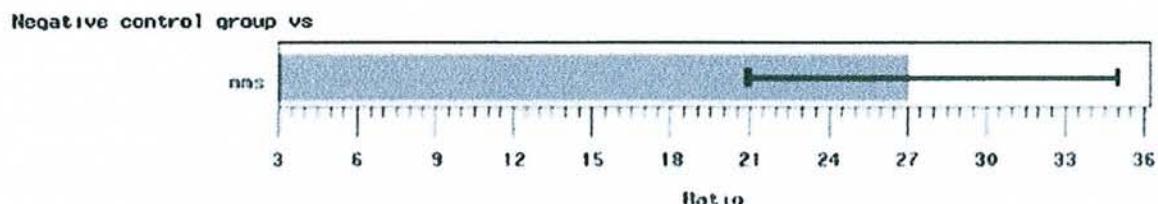


Figure 65 : Ratio groupe traité versus témoin négatif et intervalle de confiance à 95 % - MMS temps court

On observe d'après la distribution en fréquence [figure 63](#) un effet positif du MMS dès le temps court de traitement. L'analyse statistique va dans le même sens, le MMS produit un effet significatif par rapport au témoin négatif ([figure 65](#)).

Temps long

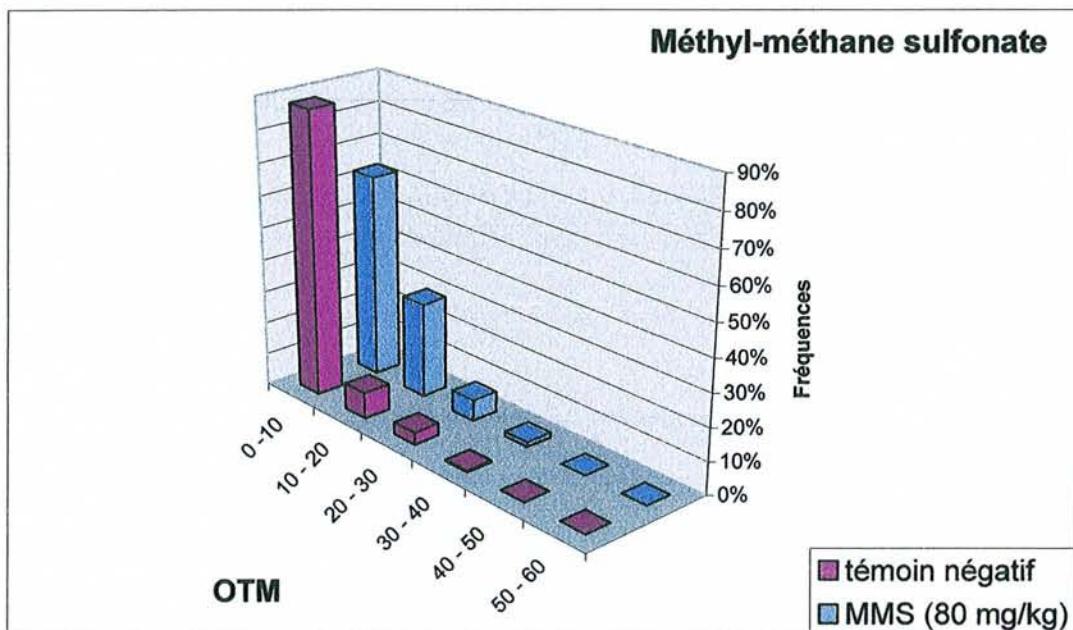


Figure 66 : Effets du Méthyl-méthane sulfonate sur cellules hépatiques *in vivo* après 24 h

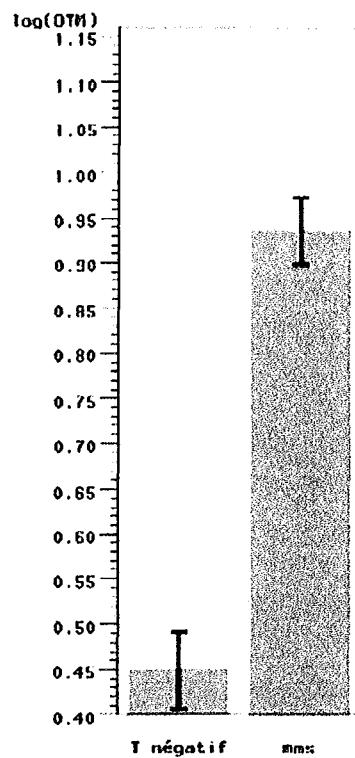


Figure 67 : moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-MMS temps long

Group	Ratio	95% confidence interval	
MMS	3.134	2.522	3.894

Negative control group vs

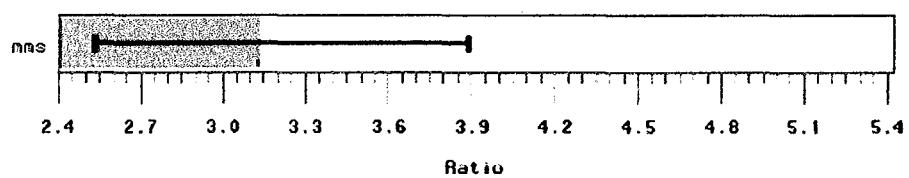


Figure 68 : Ratio groupe traité versus témoin négatif et intervalle de confiance à 95 %- MMS temps long

En conclusion, une réponse statistiquement significative par rapport au témoin négatif est observée à la fois en temps long et en temps court après traitement par du MMS à la dose de 80 mg/kg.

C. ETUDES *IN VIVO* SUR UN ORGANE CIBLE : LE REIN

a) Etude de composés génotoxiques

La streptozotocine

Temps court

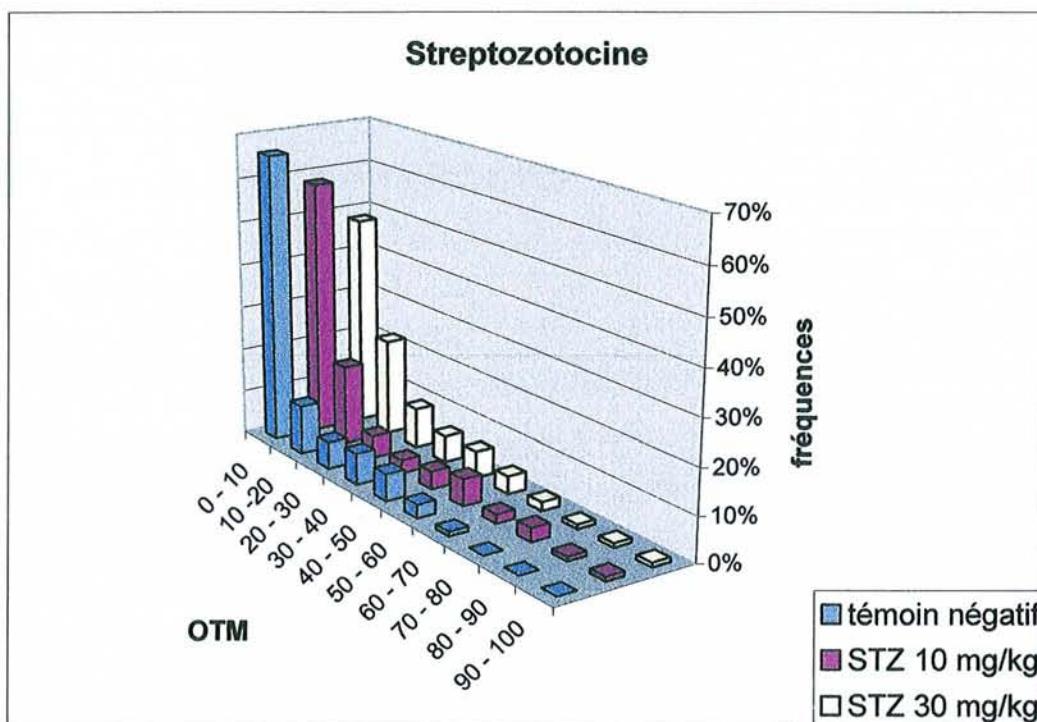


Figure 69 : Effets de la Streptozotocine sur cellules rénales *in vivo* après 3 h.

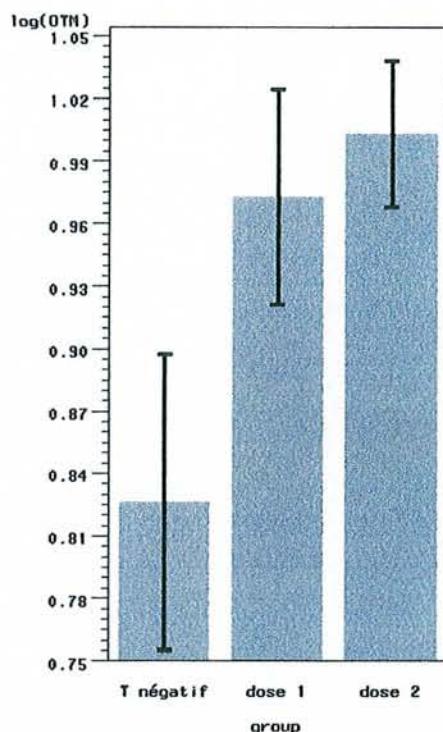


Figure 70 : moyennes et écart type des log(OTM) calculés pour chaque groupe-STZ temps court.

- ◆ D'après l'analyse de variance il existe une tendance significative par rapport au témoin ($p=0.0006$).
- ◆ D'après le calcul de l'intervalle de confiance à 95%, la Streptozotocine produit un effet statistiquement significatif après un temps court de traitement, et ce pour les deux doses testées (Cf. figure 71)

Group	Ratio	95% confidence interval	
dose 1	1.301	1.093	1.548
dose 2	1.395	1.172	1.660

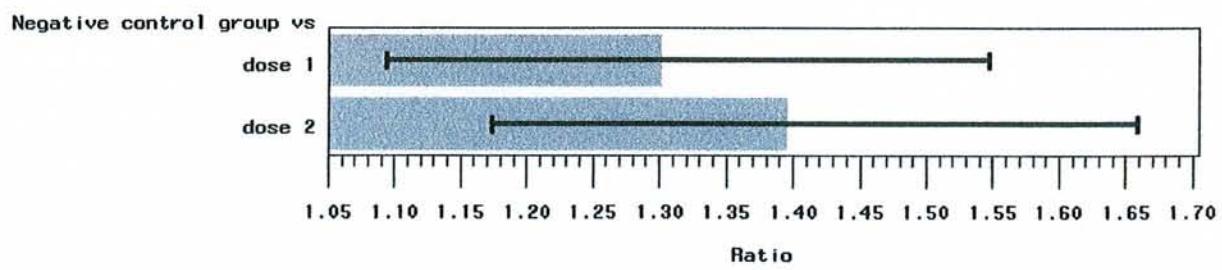


Figure 71 : Ratio de chaque groupe traité versus témoin négatif et intervalle de confiance à 95 % associé-STZ temps court

Temps long

Après 24 h de traitement, bien qu'acceptable, nous pouvons remarquer que la viabilité cellulaire est moins bonne (elle est pour certains animaux autour de 78 %).

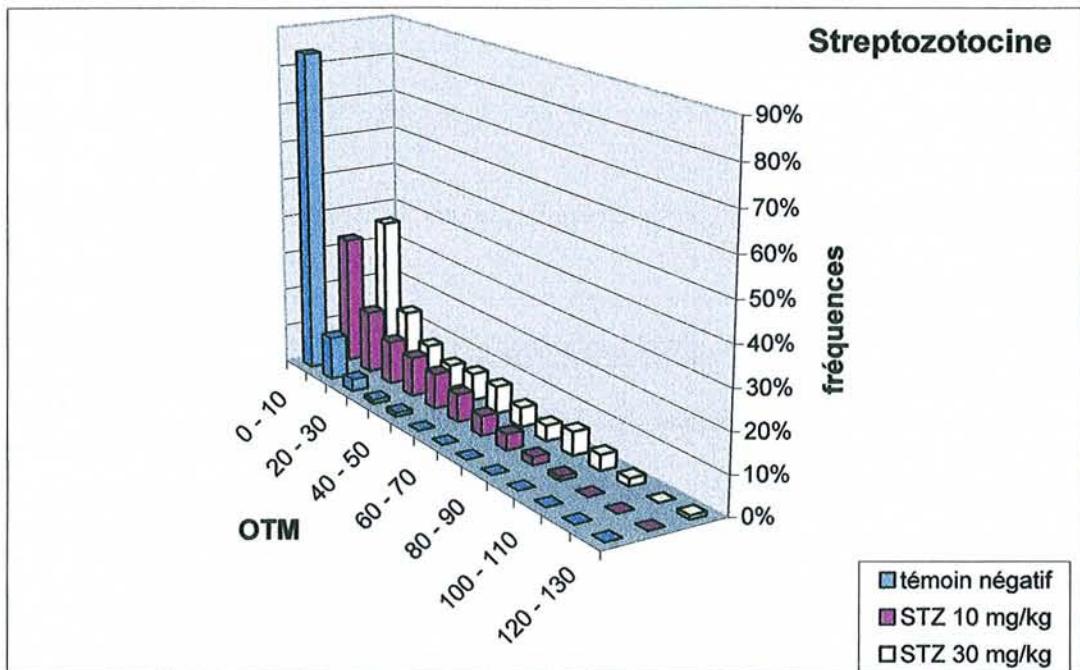


Figure 72 : Effets de la Streptozotocine sur cellules rénales *in vivo* après 24 h

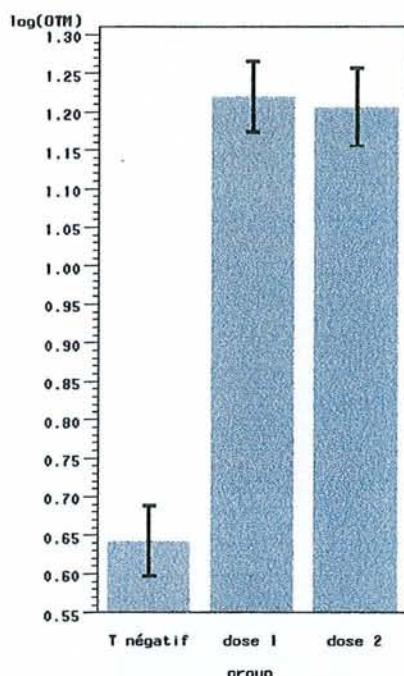


Figure 73 : moyenne et écart types des log(OTM) par groupe-STZ temps long

Les résultats obtenus sont illustrés figure 72 et 73, on observe ici un effet toxique en plateau. En effet, nous pouvons remarquer que les distributions en fréquences sont sensiblement identiques pour les deux doses.

- ❖ D'après l'analyse de variance il existe une tendance significative par rapport au témoin ($p<0.0001$).
- ❖ D'après le calcul de l'intervalle de confiance à 95%, la Streptozotocine produit un effet statistiquement significatif après un temps long de traitement, et ce pour les deux doses testées (Cf. figure 74)

Group	Ratio	95% confidence interval	
dose 1	3.780	2.833	5.044
dose 2	3.661	2.744	4.885

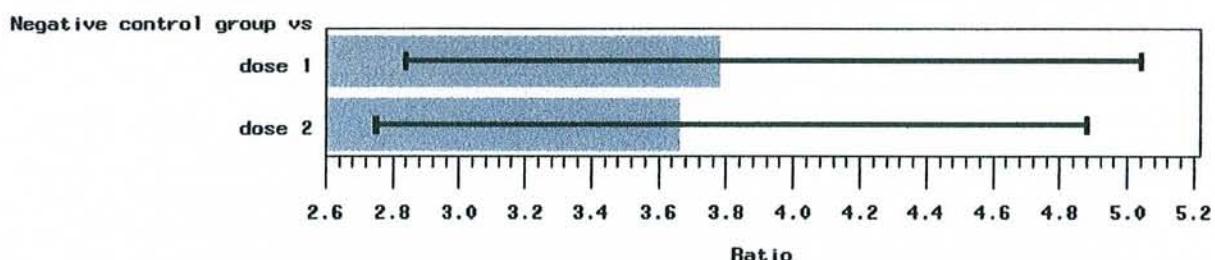


Figure 74 : Ratio groupe traité versus témoin négatif et intervalle de confiance à 95 % - STZ temps long

En conclusion, nous pouvons noter une différence de résultats entre le temps court et le temps long. Cependant, un temps de 3 heures de traitement est déjà suffisant pour permettre au produit d'exercer sa génotoxicité.

Les Acides Aristolochiques

❖ Temps court

On obtient une très bonne viabilité pour les deux doses (entre 93 et 99 %). Après 3 h de traitement, les Acides Aristolochiques ne semblent responsables d'aucun effet génotoxique d'après le graphique de la distribution en fréquence figure 75.

L'analyse statistique révèle pourtant :

- ◆ Un test de tendance significatif à 5% ($p=0.0118$).
- ◆ D'après le calcul de l'intervalle de confiance figure 77, les acides Aristolochiques n'ont pas d'effets significatifs à la dose de 10 mg/kg car la valeur1 appartient à l'intervalle de confiance, par contre le résultat est significatif au seuil de 5% d'erreur pour la dose 30 mg/kg.

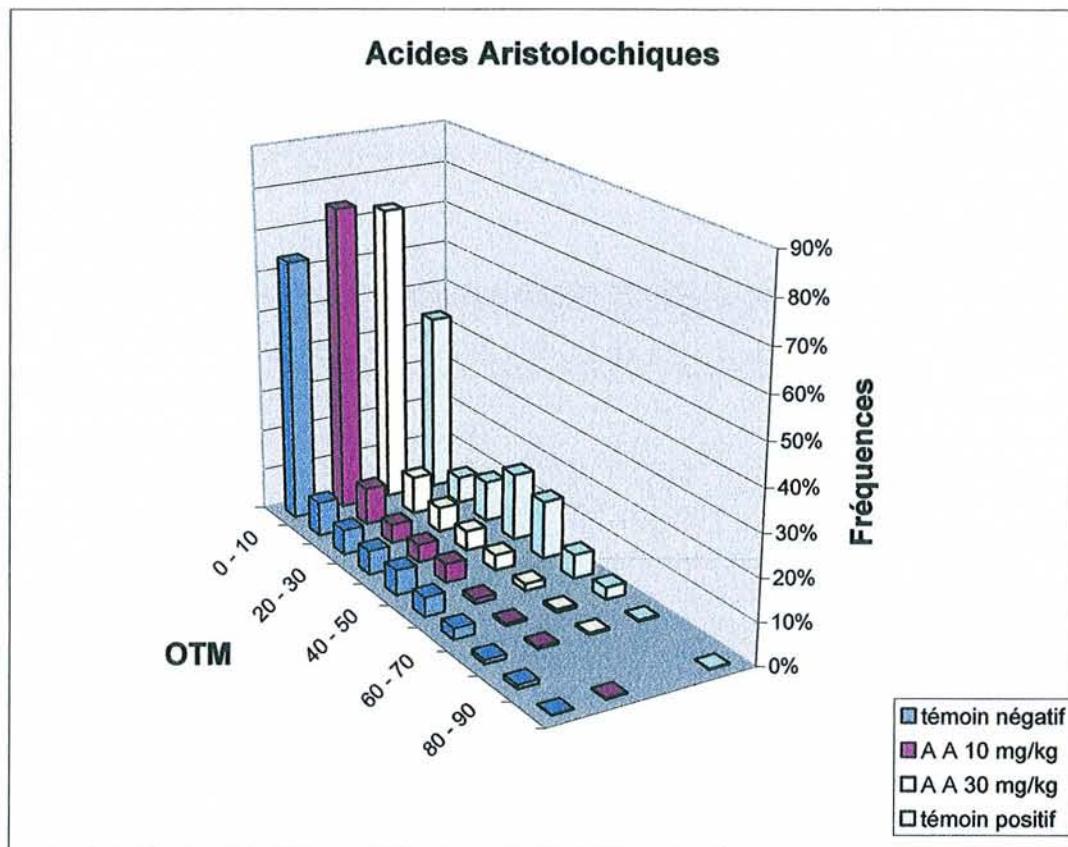


Figure 75 : Effets des Acides Aristolochiques sur cellules rénales *in vivo* après 3 h

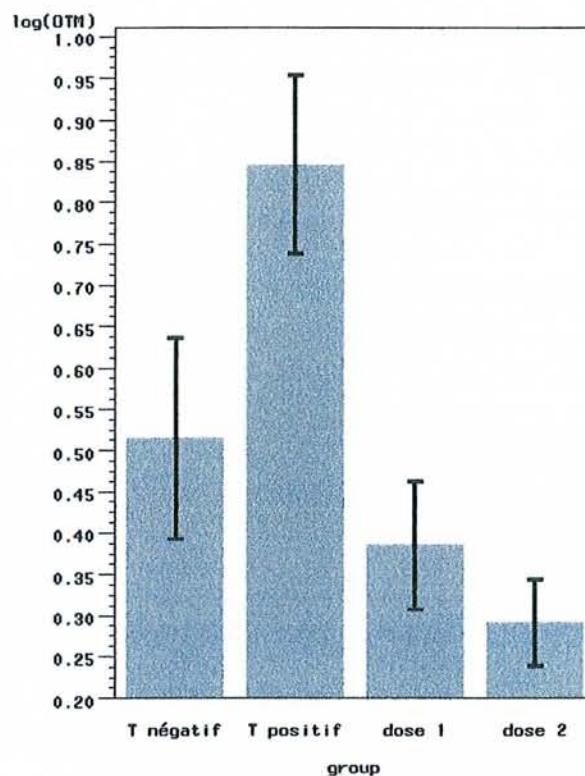


Figure 76 : moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-AA temps court

Group	Ratio	95% confidence interval	
dose 1	0.742	0.503	1.096
dose 2	0.598	0.405	0.883

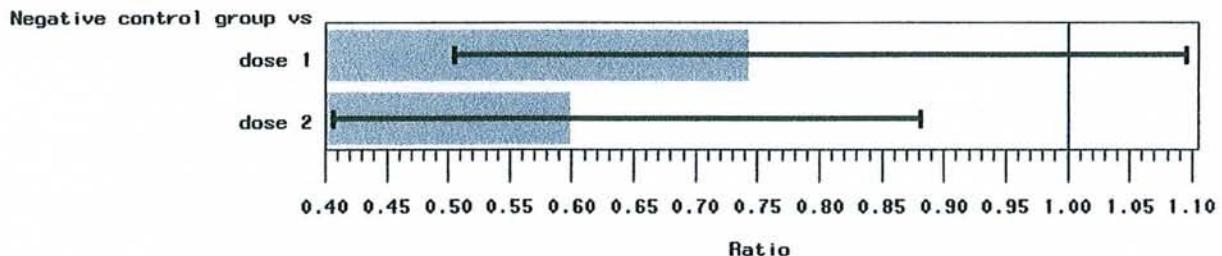


Figure 77 : Ratio et intervalle de confiance à 95%-AA temps court

4. Temps long

Après 24 h de traitement les résultats, présentés figures 78 et 79, sont les suivants :

- ❖ Il existe une tendance significative au seuil de 5% d'erreur avec $p<0,0001$.
- ❖ Les Acides Aristolochiques produisent un effet statistiquement significatif d'après le calcul de l'intervalle de confiance, et ce concernant les deux doses testées (Cf. figure 80).

Acides Aristolochiques

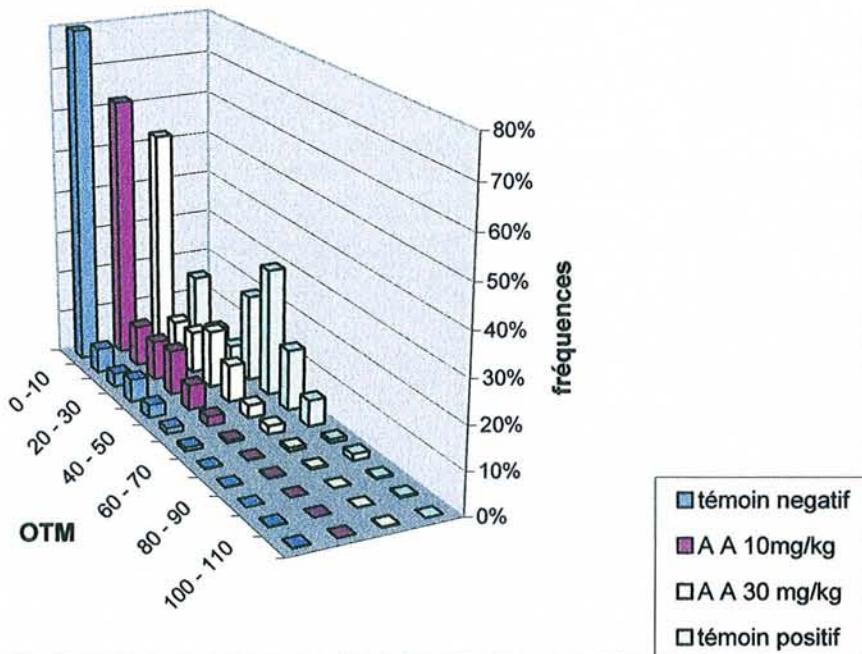


Figure 78 : Effets des Acides Aristolochiques sur cellules rénales *in vivo* après 24 h

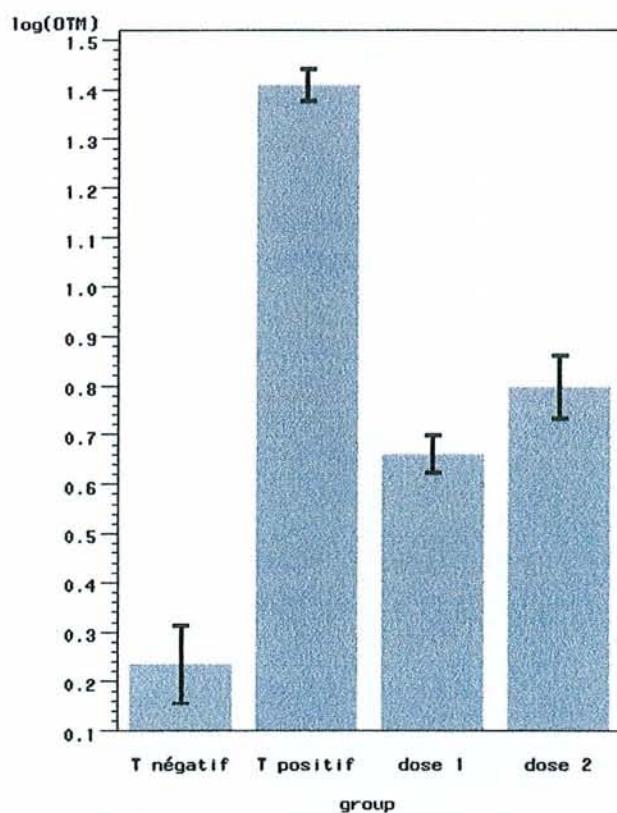


Figure 79 : moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-AA temps long

Group	Ratio	95% confidence interval	
dose 1	2.663	2.004	3.540
dose 2	3.650	2.747	4.852

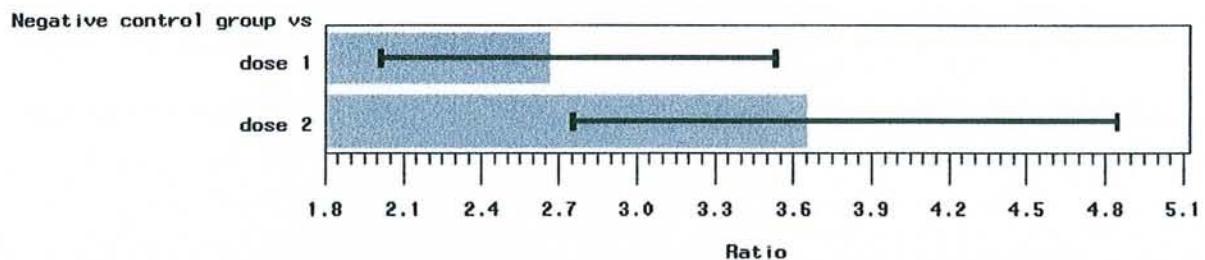


Figure 80 : Ratio et intervalle de confiance à 95%-AA temps long

L'Ortho-Nitroanisole



Temps court

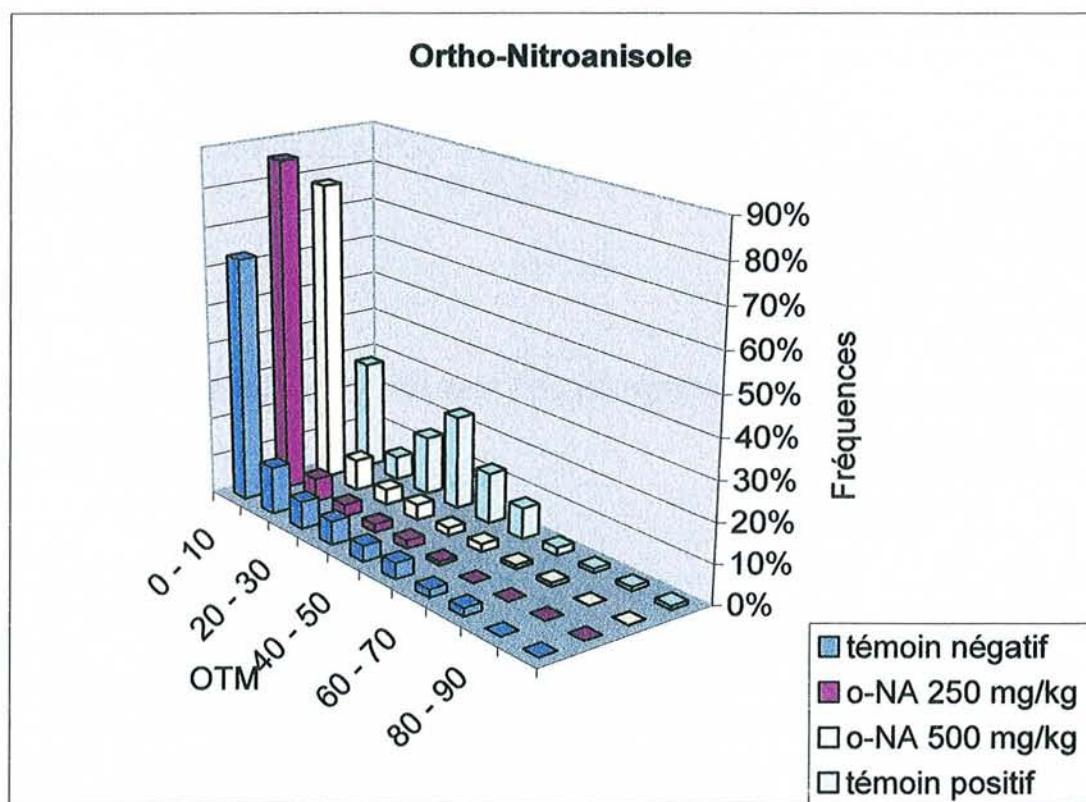


Figure 81 : Effets de l'Ortho-Nitroanisole sur cellules rénales *in vivo* après 3 h

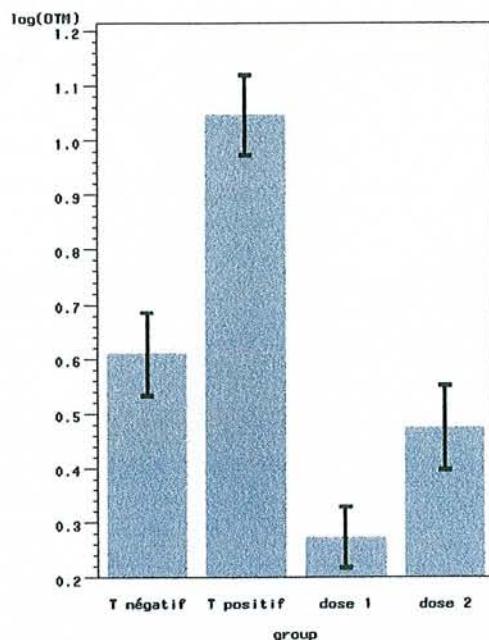


Figure 82 : moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-O-NA temps court

Nous n'observons pas d'effet génotoxique après 3 h de traitement, ni d'effet cytotoxique, la viabilité avoisinant les 90 %. Les résultats du test statistique ne mettent en évidence aucune tendance significative avec $p=0.0901$.



Temps long

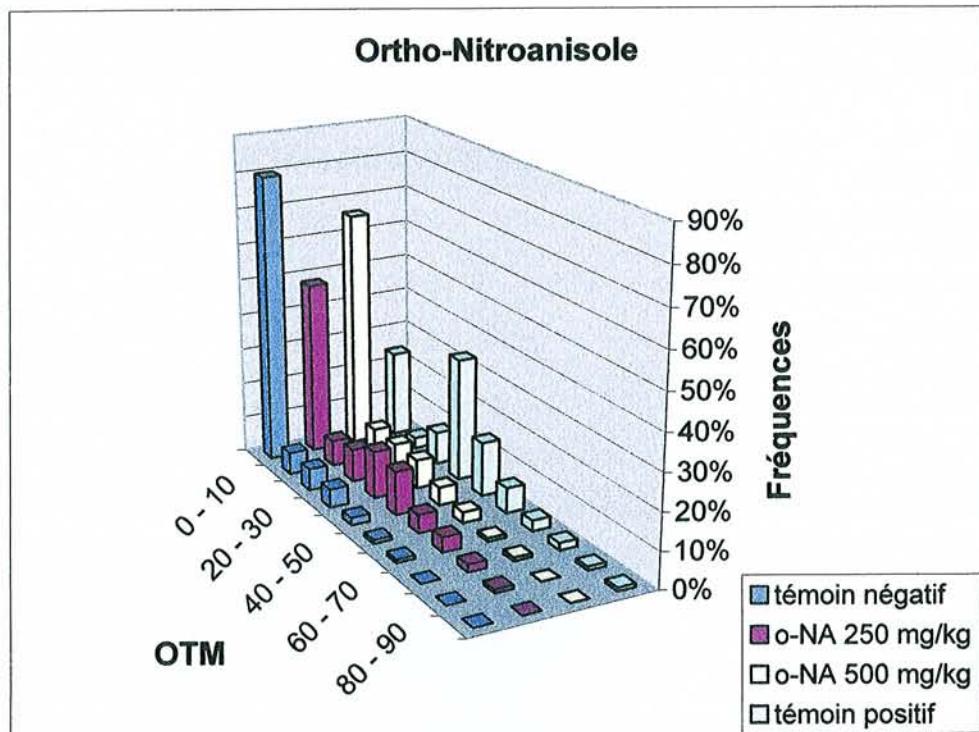


Figure 83 : Effets de l'Ortho-Nitroanisole sur cellules rénales *in vivo* après 24 h

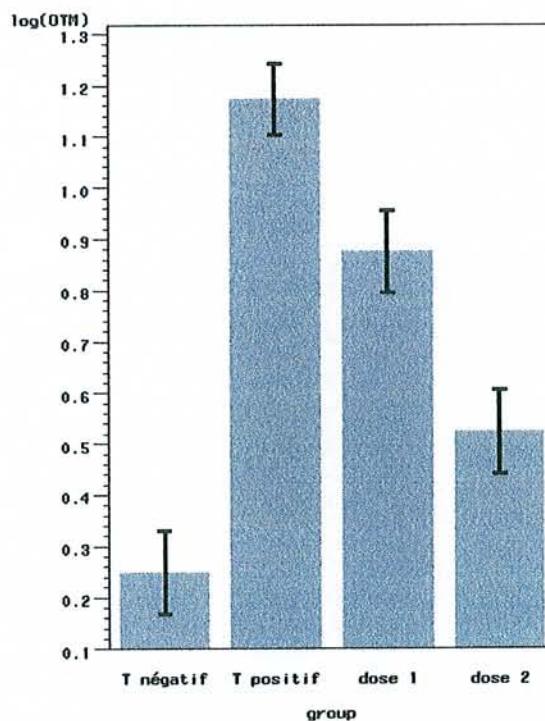


Figure 84 : moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-O-NA temps long

Group	Ratio	95% confidence interval	
dose 1	4.229	2.855	6.263
dose 2	1.882	1.271	2.787

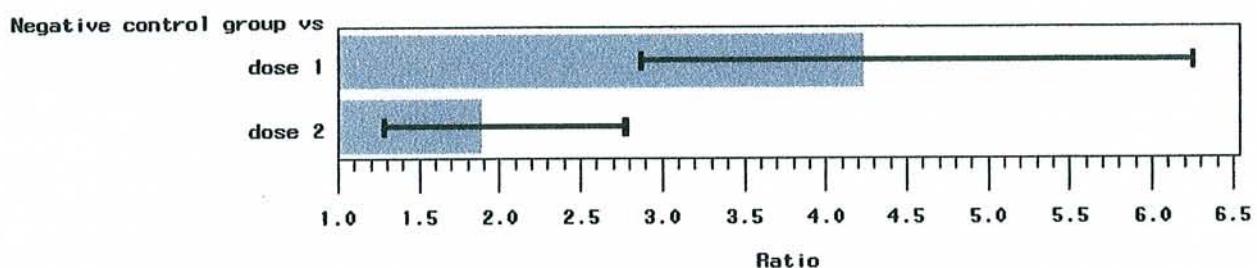


Figure 85 : Ratio et intervalle de confiance à 95%-O-NA temps long

Le pourcentage de cellule vivante est plus faible, 70 %, que celui obtenu après un temps court de traitement, cependant celui-ci reste acceptable.

La distribution en fréquence est présentée figure 83.

- ❖ On constate une augmentation statistiquement significative de l'OTM des animaux traités par rapport aux témoins, $p=0.0029$.
- ❖ D'après le calcul de l'intervalle de confiance cet effet significatif est retrouvé à la fois pour la dose 250 mg/kg et pour l'étude à 500 mg/kg (figure 85).

b) Etude d'un composé épigénétique : l'Acide Nitrilotriacétique

✿ Temps court

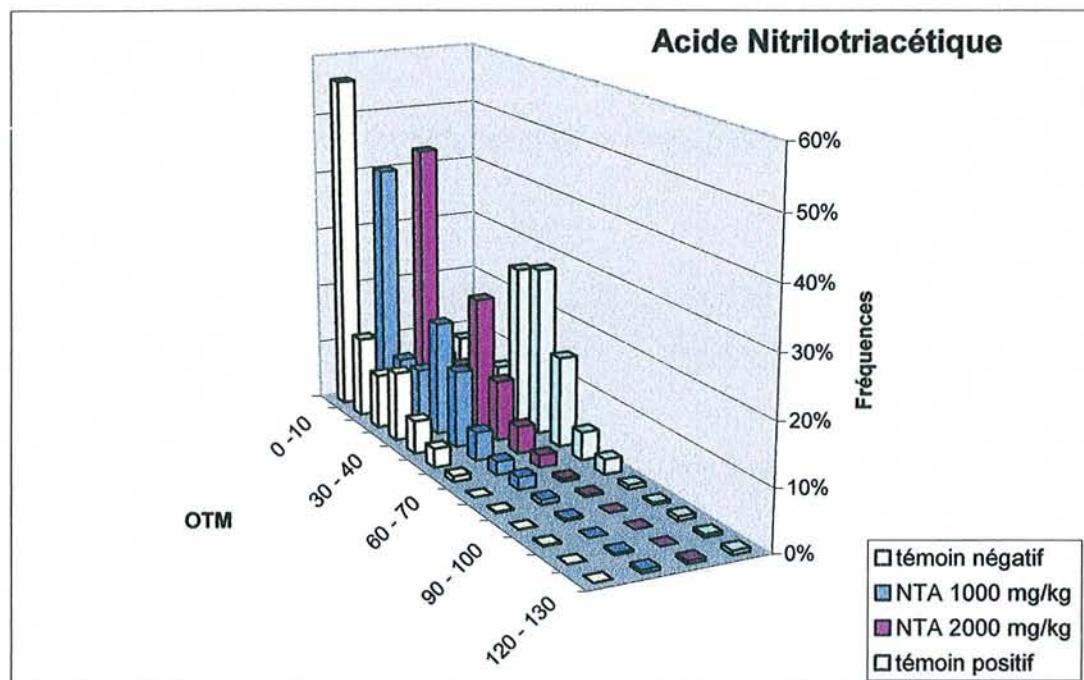


Figure 86 : Effets de l'Acide Nitrilotriacétique sur cellules rénales *in vivo* après 3 h

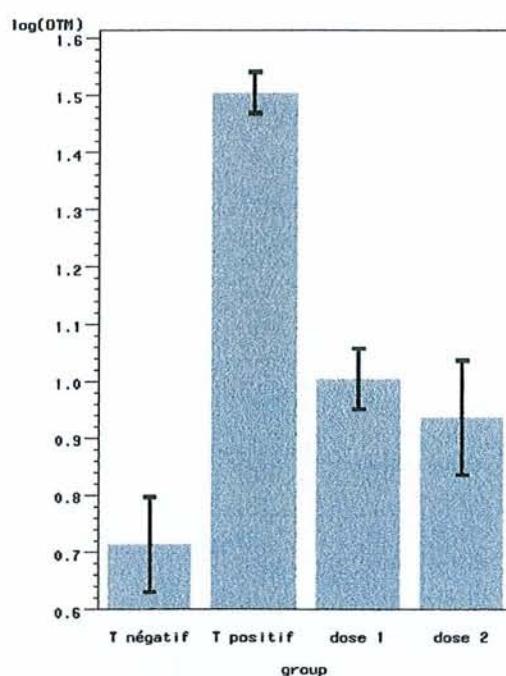


Figure 87 : moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-NTA temps court

Les figures 86 et 87 laissent observer un résultat positif pour les deux doses testées.

Ceci est confirmé par l'analyse statistique :

- ◆ L'analyse de variance met en évidence une tendance significative avec $p=0.0233$
- ◆ Les résultats fournis par le calcul de l'intervalle de confiance, figure 88 ci-dessous, démontrent un effet significatif du produit pour les deux doses.

Group	Ratio	95% confidence interval	
dose 1	1.951	1.263	3.014
dose 2	1.667	1.079	2.575

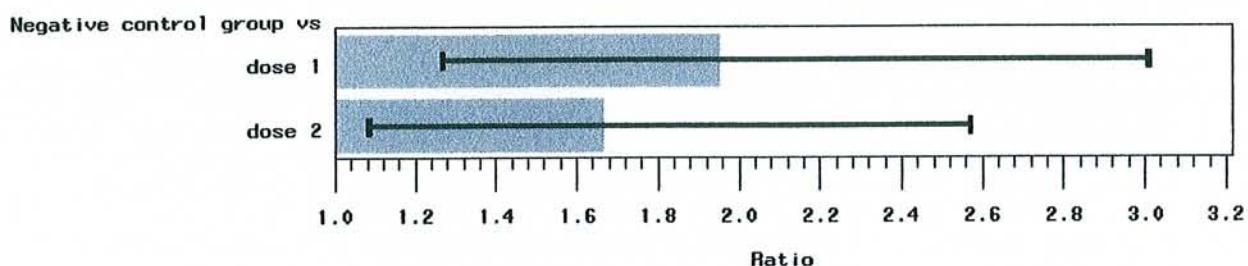


Figure 88 : Ratio et intervalle de confiance à 95%-NTA temps court

◆ Temps long

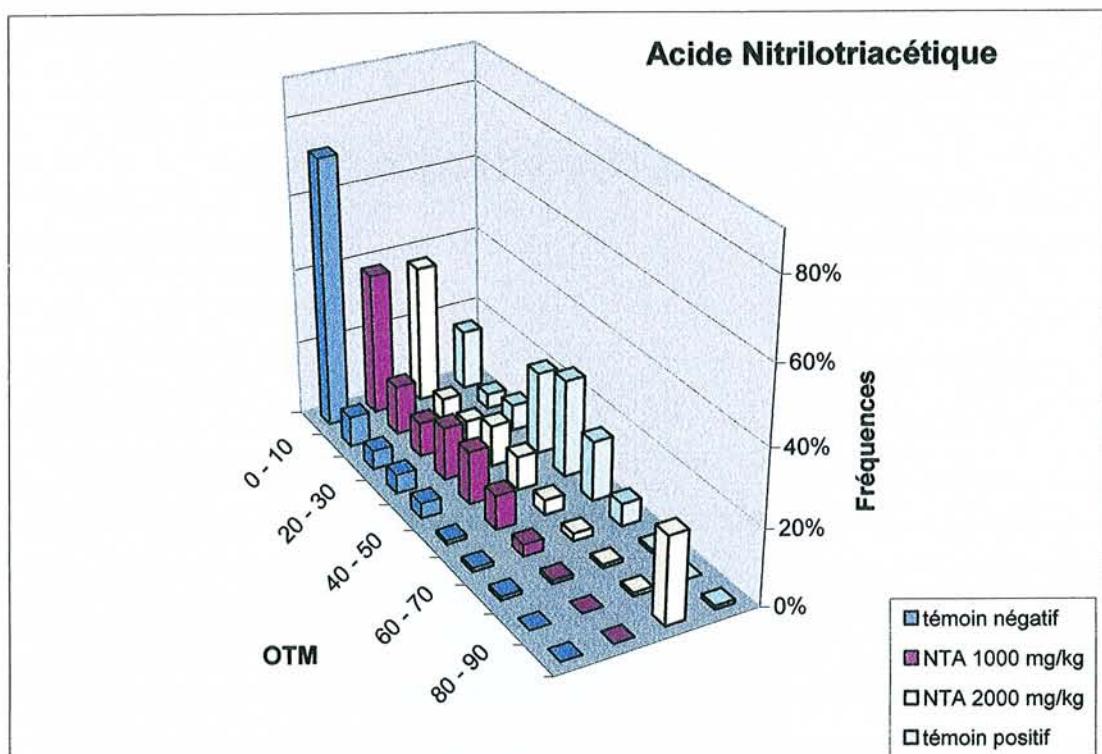


Figure 89 : Effets de l'Acide Nitrilotriacétique sur cellules rénales *in vivo* après 24 h

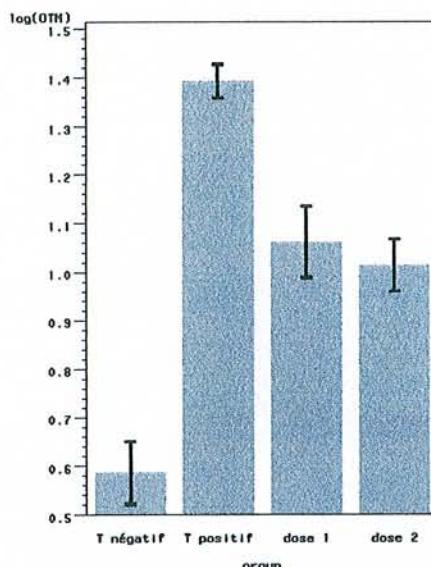


Figure 90 : moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-NTA temps long

Group	Ratio	95% confidence interval	
dose 1	2.990	2.136	4.185
dose 2	2.677	1.912	3.747

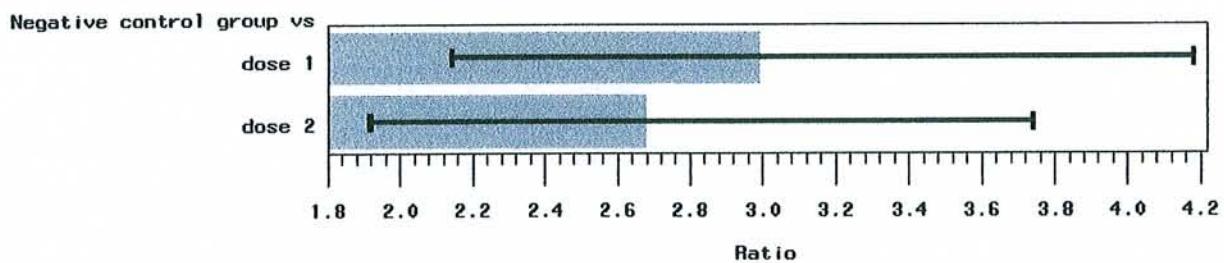


Figure 91 : Ratio et intervalle de confiance à 95%-NTA temps long

Les résultats obtenus pour l'étude temps long vont dans le même sens que ceux de l'étude temps court. Les distributions en fréquences obtenues pour chacune des deux doses sont comparables à celles du témoin positif (figure 89).

Remarquons tout de même concernant les cellules rénales exposées à 2000 mg/kg, un nombre important de comètes possède un OTM autour de 100, ce qui laisse supposer une toxicité importante du produit à cette dose. Ceci est confirmé par les résultats de l'étude de cytotoxicité, la viabilité cellulaire est de 70 % contre 98 % sous 1000 mg/kg.

Analyse statistique :

- ❖ Test de tendance significatif avec $p < 0.0001$
- ❖ Etant donné que 1 n'appartient à aucun des deux intervalles de confiance calculés, nous pouvons conclure à un effet significatif pour les deux doses d'Acide Nitrilotriacétique testées.

c) Etude d'un composé cytotoxique : l'Indométacine

• Temps court

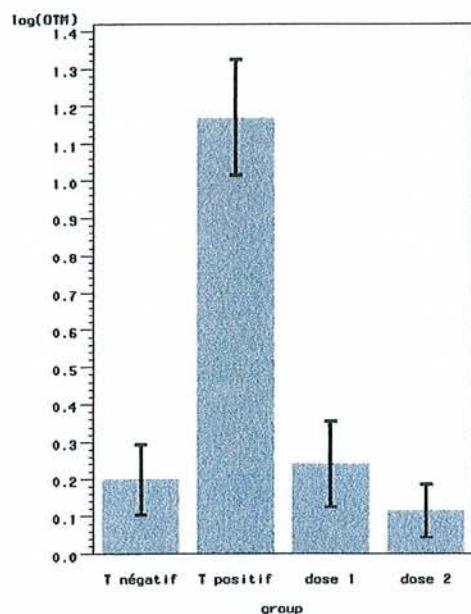
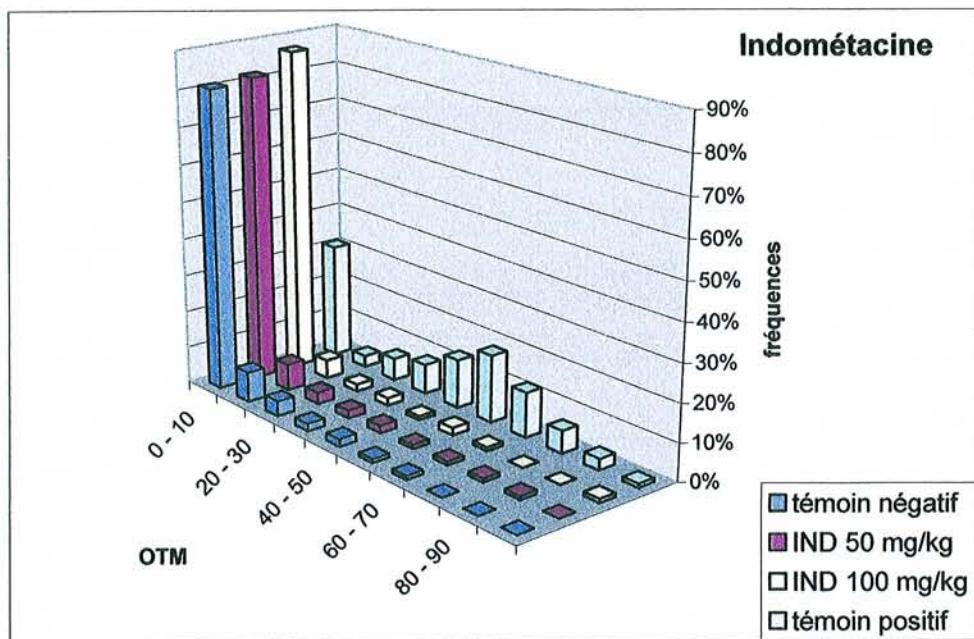


Figure 92 : Effets de l'Indométacine sur cellules rénales *in vivo* après 3 h : distribution en fréquence et calcul des moyenne et écart type des log(OTM)

Nous pouvons constater que les distributions en fréquences sont relativement identiques entre le témoin négatifs et les deux doses testées. Ce résultat négatif est confirmé par l'analyse statistique : il n'y a pas de tendance significative : $p= 0.5179$.

Group	Ratio	95% confidence interval	
dose 1	1.101	0.600	2.021
dose 2	0.824	0.449	1.513

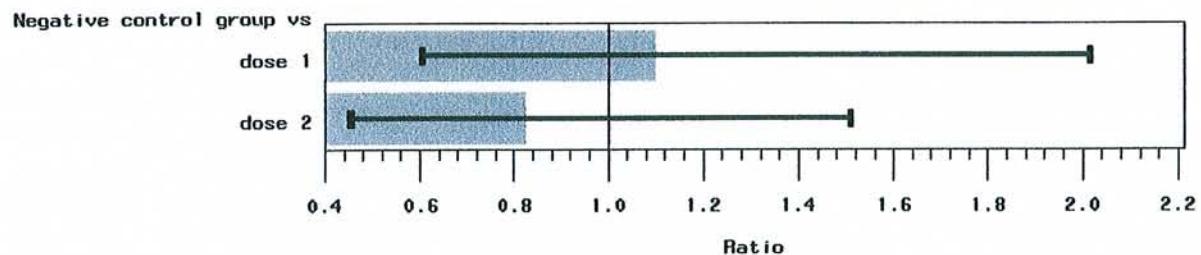
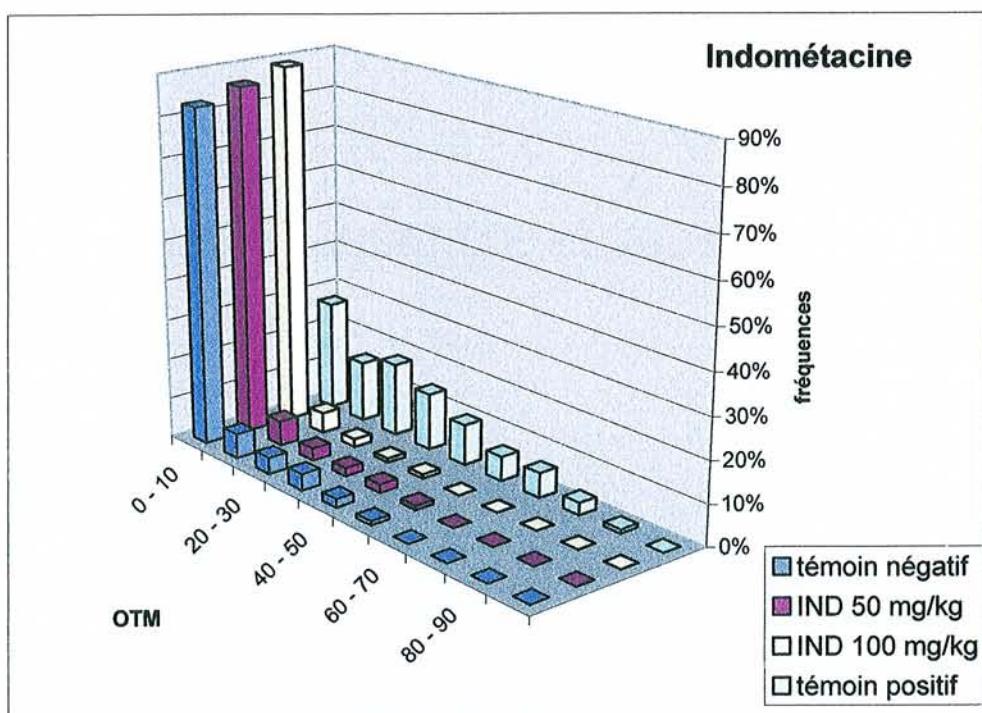


Figure 93 : Ratio et intervalle de confiance à 95%-IND temps court



Temps long



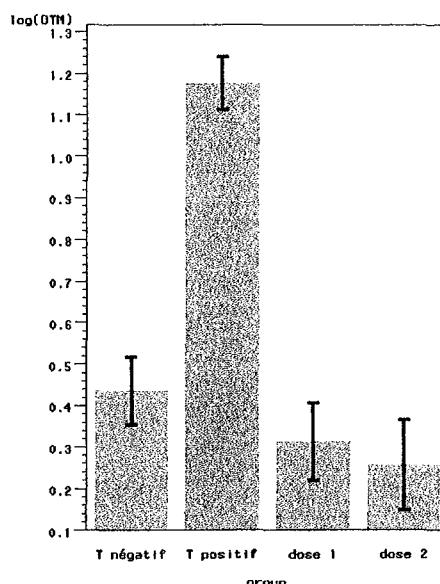


Figure 94 : Effets de l'Indométacine sur cellules rénales *in vivo* après 24 h : distribution en fréquence et calcul des moyenne et écart type des log(OTM)

Aucun effet n'a été produit par l'Indométacine après un temps long de traitement tant en terme de viabilité qu'en terme d'OTM.

Les distributions sont relativement identiques entre les doses testées et le témoin négatif.

L'analyse statistique confirme cette observation, aucune différence statistiquement significative n'a été montrée ($p=0,06$).

Group	Ratio	95% confidence interval	
dose 1	0.755	0.570	1.000
dose 2	0.664	0.501	0.879

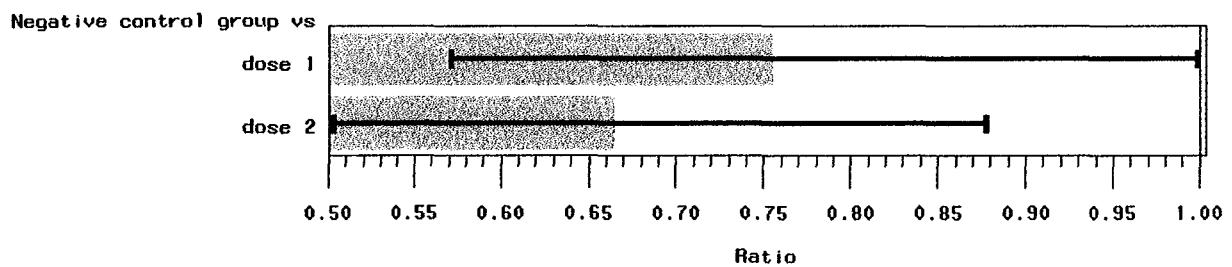


Figure 95 : Ratio et intervalle de confiance à 95%-IND temps long

TABLEAUX DE SYNTHESE DES RESULTATS *IN VIVO*

Les tableaux suivants résument les effets significatifs au seuil de 5 % d'erreurs des différents produits testés versus le témoin négatifs.

Etudes sur le foie :

Produit testé	Temps court	Temps long
BaP	*	*
CP	NS	*
MMS	*	*
2-AAF	*	*

Etudes sur le rein

*: significatif au seuil de 5%.

Produit testé	Temps court			Temps long		
	Test de tendance	Dose faible	Dose forte	Test de tendance	Dose faible	Dose forte
AA	0.0118*	NS	*	<0.0001*	*	*
IND	0.5179	NS	NS	0.0600	NS	NS
NTA	0.0233*	*	*	<0.0001*	*	*
O-NA	0.0901	NS	NS	0.0029*	*	*
STZ	0.0006*	*	*	<0.0001*	*	*

*: significatif au seuil de 5%.

QUATRIEME PARTIE :

DISCUSSION

I. LE TEST DES COMETES

A. L'ISOLEMENT CELLULAIRE *IN VIVO*

Lors de la mise au point d'une technique d'isolement cellulaire, de nombreux critères doivent être pris en compte et surtout respectés. Rappelons les plus importants :

- la récupération d'un nombre suffisant de cellules pour la réalisation du test,
- l'obtention de cellules en bon état, c'est à dire sans altération de l'ADN,
- la technique doit être reproductible, simple et rapide à mettre en œuvre.

Deux techniques très différentes l'une de l'autre ont été mises en œuvre au cours de notre travail *in vivo*. Elles présentent chacune des avantages et des inconvénients :

◆ La technique de **perfusion in situ** sur l'animal anesthésié a été appliquée pour les études menées sur le rein. Celle-ci semble répondre aux critères demandés.

Elle présente comme inconvénient d'être plus délicate à réaliser, en effet nous avons pu constater surtout au cours des premiers tests, que si l'animal est mal perfusé (par exemple en raison d'un cathéter mal placé), la quantité de cellules recueillie est plus faible et celles-ci sont parfois plus endommagées par la Trypsine en particulier. Il n'est pas rare sur une étude de 20 animaux de rencontrer ce type de problèmes. Il faut bien sûr en tenir compte pour l'interprétation des résultats.

En revanche son avantage principal réside dans le fait que l'organe est « lavé » de son sang, les tissus de soutien des cellules sont digérés. Ce point est très important, c'est un avantage majeur lorsque l'on réalise des études d'organospécificité que d'isoler un maximum de cellules spécifiques de l'organe étudié en les séparant des autres types cellulaires, en particulier des leucocytes du sang circulants.

◆ La technique d'**homogénéisation au potter** a été appliquée pour les études menées sur le foie. Celle-ci nous a permis comme avec la première méthode d'isoler un grand nombre de noyaux avec un bruit de fond satisfaisant.

L'inconvénient de cette technique correspond à l'avantage de la précédente, à savoir que plusieurs types cellulaires et surtout des cellules sanguines sont récupérées. Notons à ce

sujet que les cellules sanguines présentes dans le foie, peuvent être le reflet de ce qui se passe ailleurs dans l'organisme (transfert de métabolites par exemple) et peuvent venir fausser le résultats de l'étude d'hépatotoxicité. Un autre inconvénient est à noter : avec cette technique ce sont les noyaux des cellules qui sont récupérés, et aucune méthode de mesure de la cytotoxicité n'a été réalisée au cours de nos travaux sur le foie, la technique au bleu Trypan n'étant pas applicable dans ce cas. Or il est important de tenir compte des résultats de cytotoxicité pour l'interprétation des résultats (*voir ci-dessous évaluation et interprétation des résultats*).

L'avantage incontestable de cette méthode est qu'elle est beaucoup moins lourde, elle permet une rapidité et une simplicité de mise en œuvre, elle est beaucoup plus facilement reproductible et fait preuve d'une bonne répétabilité.

Afin de confirmer ces constatations et de terminer la validation de ces deux méthodes, il serait intéressant de vérifier, si l'une comme l'autre, elles sont applicables sur d'autres organes.

Il existe d'autres techniques d'isolement des cellules que celle choisie pour nos travaux. Par exemple :

- il est possible d'écraser l'organe à travers la toile d'un filtre ou de l'émincer en petit morceaux (Tice *et al*, 1991),
- l'incubation du tissu par des enzymes digestives type Collagénase et Trypsine peut se faire directement en boîte de Pétri (Brendler-Schwaab *et al*, 1994).

Les deux techniques employées pour nos travaux sont les plus décrites dans la littérature voire les plus utilisées à l'échelle internationale ; la méthode de perfusion est beaucoup pratiquée aux Etats-Unis, la technique d'homogénéisation a été mise au point et est largement utilisée au Japon.

B. EVALUATION ET INTERPRETATION DES RESULTATS

a) Le paramètre choisi, l'OTM

« Les méthodes utilisées pour quantifier la migration des fragments de l'ADN et donc l'étendue de ses lésions sont presque aussi nombreuses que les scientifiques utilisant cette technique » (Tice et al, 2000).

Il est important de signaler que certains auteurs n'utilisent pas de paramètres mathématiques pour quantifier les dommages de l'ADN. Certains se contentent de déterminer la proportion de cellules qui présente une fragmentation par rapport à celle dont le noyau est intact. D'autres effectuent un classement visuel des comètes en plusieurs catégories.

Les méthodes qui utilisent des valeurs numériques prennent souvent en compte la mesure de la longueur de migration de l'ADN, autrement dit la longueur de la queue de la comète.

L'OTM demeure ainsi le plus décrit, c'est un bon représentant.

Il serait intéressant, dans un souci d'harmonisation du test des Comètes, de fixer dans les lignes directrices du test le ou les paramètre(s) à employer.

b) Choix de la représentation graphique : La variabilité liée au test

La représentation graphique choisie pour la présentation des résultats est celle de la distribution en fréquence. En effet, il est important de souligner la variabilité de réponse que l'on peut observer. Celle-ci existe à plusieurs niveaux :

- au sein d'une même lame (variabilité intra-lame),
- mais aussi au sein d'un même animal (variabilité inter-lame),
- entre les animaux ayant reçu une même dose de façon évidente (variabilité inter-individuelle).

Les conditions expérimentales du test des Comètes que nous avons développées nous ont permis d'obtenir des lames de bonne qualité ainsi garantissant une analyse optimale. Nous pouvons donc tenter d'expliquer la variabilité observée en soulignant qu'un très grand nombre de paramètres intervient tout au long du protocole. Nous pouvons noter : la migration à

travers le gel qui peut ne pas se faire uniformément, l'état des cellules au moment de la manipulation, le décalage dans le temps au cours de la réalisation d'une expérience, l'électrophorèse (toutes les lames n'étant pas dans la même cuve), le manque d'uniformité dans la préparation des tampons, des gels,...

Cependant bien que cette variabilité quantitative au niveau de la réponse existe, nous avons pu constater que la réponse qualitative du test n'est pas influencée. En effet c'est pour cette raison que sont enregistrées plusieurs dizaines de cellules par lames, que nous réalisons plusieurs lames par animal et qu'enfin plusieurs animaux par dose testée sont inclus dans une étude. Ainsi la variation se produit sur l'ensemble des lames de l'expérience, sans affecter la réponse globale du test.

c) L'analyse statistique

Comme nous l'avons mentionné précédemment (*Cf Matériel & Methodes*), il n'existe pas de règle en matière de statistiques à appliquer au test des Comètes ; les tests mis en œuvre sont nombreux et variés, certaines publications se contredisent, certains auteurs n'en pratiquant pas. Ainsi la méthode sélectionnée selon une étude approfondie des travaux de Wiklund et Agurell ([Wiklund and Agurell, 2003](#)) semble bien s'adapter au contexte de nos travaux.

En effet, tout d'abord comme nous venons de le voir il existe d'importantes variabilités au sein d'une même lame, au sein d'une même distribution d'OTM. *La figure 94* nous montre la répartition des 50 OTM d'une même lame et ce pour 3 lames :

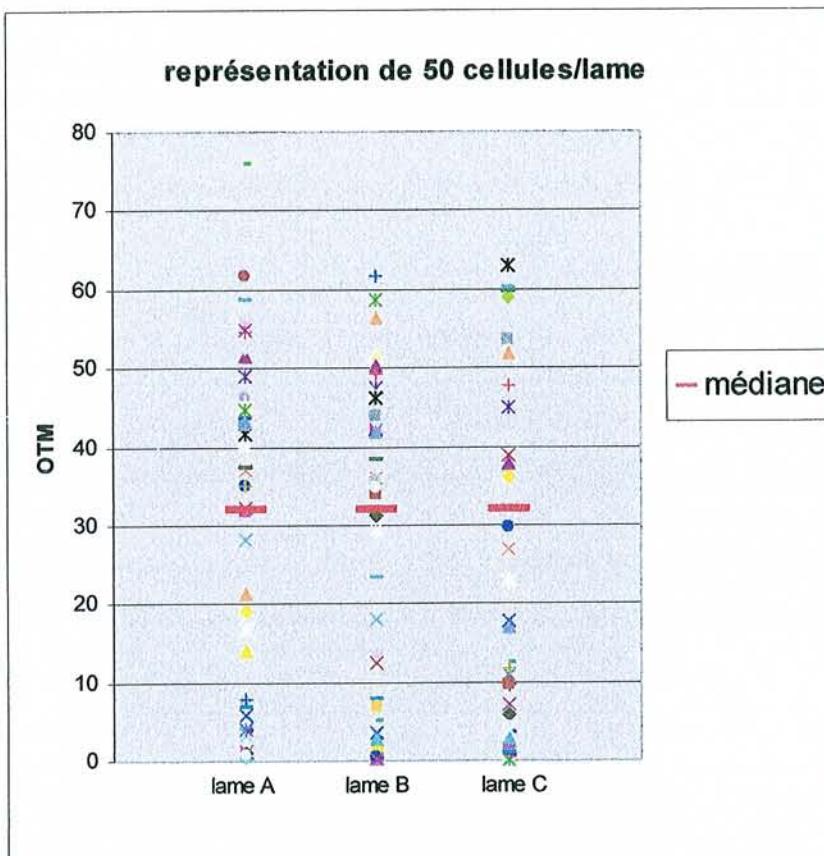


Figure 96 : répartition des 50 OTM d'une même lame (représentation de 3 lames)

Les points obtenus pour une même lame sont beaucoup trop éloignés, c'est pourquoi il paraît tout à fait adapté de transformer les données en logarithme puis de les traiter.

L'interprétation des résultats *in vivo* est parfois délicate car il se pose le problème des variations interindividuelles. Il faut donc pouvoir tenir compte dans l'étude statistique de la différence de réponse entre les animaux face à un même produit et dans les mêmes conditions, tout en s'intéressant à l'effet du produit testé. C'est dans cette optique que l'analyse de variance modèle 2 voies nous semble la mieux adaptée ; celle-ci renseigne sur la significativité de la tendance. En cas d'ANOVA statistiquement significative, le test de comparaison deux à deux vient compléter l'analyse permettant de déterminer le(s) niveau(x) de dose induisant une réponse statistiquement significative.

d) L'importance des études de cytotoxicité pour l'interprétation des résultats

Après avoir désigné un bon représentant mathématique, établi une représentation graphique et appliqué une méthode statistique bien adaptée, il est important qu'une l'interprétation biologique vienne compléter l'analyse des résultats. C'est pourquoi, les études de cytotoxicité ont une réelle importance.

En effet, il est nécessaire de savoir si la fragmentation de l'ADN observée est sans contexte attribuable à un phénomène génotoxique, et si elle n'est pas au contraire due à des phénomènes cytotoxiques tels qu'apoptose ou nécrose. En effet le mécanisme de mort cellulaire par apoptose se définit par une autodigestion de la cellule, et se manifeste par une fragmentation importante de l'ADN, venant alors interférer avec les résultats du test en constituant de faux positifs (Hartmann *et al*, 2003, Tice *et al*, 2000).

Afin d'écartier ces faux positifs, il est vivement recommandé d'utiliser des tests de cytotoxicité. Il en existe de nombreux décrits dans la littérature :

✿ Le test de viabilité cellulaire par coloration au Bleu Trypan appliqué aux essais *in vivo* sur le rein est le plus fréquemment employé. Une viabilité supérieure à 70 à 85 % selon les auteurs est tolérée. Cependant cette technique n'est pas applicable avec notre méthode d'isolement cellulaire par homogénéisation. De plus c'est un test de viabilité, il ne met en évidence que les cellules mortes dont la membrane cellulaire est altérée et ne permet pas de rendre compte de l'activité intracellulaire ainsi que du phénomène d'apoptose.

✿ Certains préconisent de réaliser des études d'histopathologie, uniquement en cas de résultats positifs. Cette technique peut également être discutée, dans la mesure où ce type d'analyse ne met en évidence que des phénomènes de nécrose. De plus, les temps de traitement appliqués pour les études ne sont pas toujours suffisants pour obtenir un état de nécrose de l'organe visible.

✿ Certains auteurs ne pratiquent pas de test de cytotoxicité et préconisent de distinguer visuellement les cellules en apoptose encore appelée « ghost-cell » ou « clouds » : celles-ci sont caractérisées par une tête très petite et une queue très importante contenant la majorité de l'ADN à l'état fragmenté. La méthode consiste à ne pas les retenir au moment de

l'analyse semi-automatique des comètes. Cependant cette technique est critiquée, la distinction entre un effet génotoxique et un phénomène d'apoptose est difficile à faire visuellement, en effet certains produits fortement génotoxiques comme l'EMS engendre des comètes que l'on peut qualifier de ghost-cell.

La méthode de TUNEL ou Kit Annexin est une méthode automatisée de détection de l'apoptose, elle serait quant à elle bien adaptée et à réaliser en parallèle pour s'affranchir de l'interférence liée à la composante apoptotique.

L'ATPmétrie semble également répondre aux attentes d'une étude de cytotoxicité. Elle est cependant délicate et nécessite l'emploi d'appareils très coûteux.

En conclusion, il existe de nombreuses techniques pour déterminer la cytotoxicité, mais très peu d'entre elles permettent une interprétation correcte, à savoir une distinction entre les cellules en apoptose et celles dont la fragmentation de l'ADN est due à un phénomène génotoxique. Pourtant cette distinction a une importance certaine dans l'interprétation des résultats.

C. LE TEST DES COMETES / AVANTAGES-INCONVENIENTS

a) Avantages

- Le test des Comètes est un test rapide, simple et peu coûteux.
- Ses domaines d'application sont nombreux.
- Il fait preuve d'une bonne sensibilité pour détecter les dommages de l'ADN.
- Il permet de collecter de nombreuses données, sur de nombreuses cellules individualisées, ce qui permet une meilleure analyse statistique.
- Il est applicable sur un faible nombre de cellules, sur tout type cellulaire et à un grand nombre d'organisme.
- Tout type de cellule eucaryote peut être employé pour le test, quelque soit l'organe ou le tissu étudié. Ceci constitue un avantage non négligeable par rapport aux autres tests de génotoxicité généralement applicables uniquement à un organe donné.

Cet avantage est important en vue d'une application du test à la recherche de l'organospécificité génotoxique.

b) Inconvénients

Le principal inconvénient du test des Comètes est que, dans les conditions d'application présentée, il ne permet pas la détection des agents pontants.

En effet, ce type de molécule crée des ponts au sein d'un même brin d'ADN mais également entre les deux brins. Il est également possible de voir des ponts se former entre un des deux brins et les protéines environnantes. Les fragments ainsi formés sont rattachés au squelette principal grâce à ces ponts.

Les molécules décrites dans la littérature comme ayant ce type d'action, sont la mitomycine C, qui est responsable de pont interbrin (DNA-DNA crosslinking), le formaldhéhyde qui lui forme des liaisons ADN-protéines (DNA-prot crosslinking) ou encore le cisplatine.

Cependant, cet aspect du test des Comètes est maintenant bien connu et il existe une méthode pour contourner ce problème : les cellules sont traitées simultanément avec le produit testé et avec un témoin positif de référence, agent clastogène bien connu (un agent alkylant tel que le MMS par exemple, fortement positif dans des conditions standard). Si le produit étudié agit exclusivement par un mécanisme de pontage, on enregistrera alors une diminution de réponse de l'agent positif de référence en présence du produit pontant comparativement à la réponse obtenue avec l'agent positif de référence seul. .

Il faut noter que cette méthode ajoute une étape supplémentaire dans la réalisation du test et qu'elle n'a été mise en œuvre qu'au cours d'essais *in vitro* à ce jour. Nous pouvons nous interroger alors sur l'application du test des Comètes dans le cadre d'un Screening de première intention. Ce dernier se voulant avant tout être une technique rapide de détection.

Nous pouvons citer comme autres inconvénients :

- ✿ Il n'existe pas de protocole standard.
- ✿ Il n'y a pas de recommandations pour l'analyse des résultats.
- ✿ Il n'existe pas encore d'étude collaborative de grande ampleur.

II. APPLICATION ET VALIDATION DU TEST

A. LES ETUDES *IN VITRO*

L'objectif de ce travail est de démontrer la sensibilité du test des Comètes lorsqu'il est appliqué à l'étude de témoins positifs de référence, génotoxiques.

Nous pouvons constater que les essais de validation du test *in vitro* n'ont pas été menés de la même façon qu'*in vivo*. Notamment, aucune analyse statistique n'a été réalisée pour le traitement des résultats.

Le principe de cette validation était de comparer les résultats obtenus à des valeurs historiques, aux valeurs de référence de la littérature utilisant les mêmes techniques. Pour compléter l'interprétation ils sont également confrontés aux réponses fournies par d'autres tests de mutagenèse et ce pour chaque produit testé :

Le Benzo(a)pyrène a fourni une réponse positive, un effet génotoxique dose-réponse a été mis en évidence au cours de nos essais *in vitro*. Ces résultats corroborent les données de la littérature, en effet de nombreuses études démontrent un effet positif et significatif du B(a)P, la fragmentation de l'ADN étant fonction de la dose testée (Monteith *et al*, 1995, Speit and Hartmann, 1995, Yusuf *et al*, 2000, Valentin-Severin *et al*, 2003). Les résultats du test des Comètes sont comparables à ceux obtenus avec d'autres tests de mutagenèse : le test d'aberration chromosomique (avec des concentrations en B(a)P allant de 2 à 10 µg/ml, Monteith *et al*, 1995,) et le test du micronoyau (pour des concentrations de 1 à 15 µM, Valentin-Severin *et al*, 2003).

Le Cyclophosphamide, par contre, présente au cours de nos essais *in vitro*, dans les conditions d'applicabilité du test (sur cellules L5178Y, avec activation métabolique par du S9 de foie), des résultats négatifs, qui ne sont pas en accord avec les données sur le produit, ni avec son mécanisme d'action.

Les données de la littérature sont également contradictoires. Par exemple, une étude menée *in vitro* sur des cellules sanguines traitées donne des résultats similaires aux nôtres (Hartmann *et al*, 1995). La solution envisagée est d'augmenter la concentration en S9, mais de façon limitée car ce dernier peut être cytotoxique à forte concentration, des réponses positives ont ainsi été obtenues. En revanche, une étude sur cellules HepG2 démontre des résultats positifs mais, après 3 jours d'incubation (Yusuf *et al*, 2000), de même, Tice et son équipe

(Tice *et al*, 1991) ont obtenu un résultat positif sur cellules CHO, à la dose de 250 µg/ml et avec un temps de traitement de 8 heures. Après un temps court, ils ont eux aussi obtenu un taux de lésions non significatif par rapport au témoin négatif. Ceci nous laisse donc suggérer que le CP requiert une activation métabolique longue et complexe avant d'exercer son action : ainsi le temps de traitement appliqué était peut-être trop court. Nous pouvons également penser que la dose testée était peut-être insuffisante.

Concernant le **2-Acetyl-aminofluorène**, une étude *in vitro* avait été envisagée, mais ne figure pas dans ce manuscrit : aucun résultat n'a pu être exploité suite à une perte importante de gels au cours des différentes manipulations. Il serait intéressant pour la validation du test de refaire cette étude. En ce qui concerne les données de la littérature *in vitro*, le 2-AAF induit un effet génotoxique et dose-dépendant après 4 heures de traitement sur les cellules CHO (Rundell *et al*, 2003), d'autres études sur les cellules HepG2 fournissent le même type de résultats (Yusuf *et al*, 2000, Valentin-Severin *et al*, 2003) après 20 heures d'exposition.

Les données de la littérature concernant **l'Ethyl-méthane sulfonate** sont bien comparables à celles de nos travaux. Une augmentation significative de la moyenne de l'OTM après 4 h de traitement à des doses similaires à celles de nos études a été obtenue sur cellules CHO (Wagner *et al*, 1998). Cette étude a été réalisée en parallèle avec un test du micronoyau *in vitro* dont les résultats sont positifs. D'autres études sur ces mêmes cellules CHO vont dans le même sens (Miyamae *et al*, 1997b, Rundell *et al*, 2003). De plus cette fragmentation de l'ADN très importante correspond bien à un effet génotoxique, elle est due à l'effet clastogène direct de l'EMS, il est bien démontré qu'il n'y a pas d'interférence par des phénomènes d'apoptose (pour des doses de 2 à 16 mM, Rundell *et al*, 2003).

Un autre test des Comètes réalisé sur cellules V79 et sur lymphocytes humains ainsi qu'un test d'aberration chromosomique permettent de conclure cette fois encore à une nette génotoxicité de l'EMS et ce avec un haut degré de concordance entre les deux tests (Hartmann *et al*, 2003).

Enfin, l'EMS est régulièrement pris comme témoin positif sans activation métabolique dans les études de génotoxicité.

Le Méthyl-méthane sulfonate est tout comme son homologue l'EMS très souvent utilisé comme témoin positif dans la littérature.

Par exemple, un effet génotoxique est démontré après 4 h de traitement sur cellules HepG2 (Valentin-Severin *et al*, 2003), Miyamae et son équipe obtiennent le même type de réponse sur les cellules L5178Y et sur cellules CHO (Miyamae *et al*, 1997a, 1997b). Un effet dose-réponse significatif est également décrit sur cellules MRC5 (Speit and Hartmann, 1995).

Enfin, une étude comparative test des Comètes versus test d'aberration chromosomique *in vitro* sur cellules de sang humain et sur cellules de poumon de hamster démontre le même type de réponse positive pour les deux tests pour une gamme de dose allant de 0 à 7,7 µg/ml (Gianotti *et al*, 2002).

Notons qu'il est rare de trouver dans la littérature une étude menée exactement dans les mêmes conditions d'applications, avec les mêmes cellules, les mêmes temps de traitement, le même paramètre utilisé pour quantifier la fragmentation de l'ADN, i.e. l'OTM,...Ainsi, la comparaison n'est que relative et il devient délicat de baser notre interprétation sur ces données.

De même, les résultats des études *in vitro* ont été présentés sous forme de médiane des OTM, certains auteurs préfèrent la moyenne et l'écart type.

La méthode statistique qui a été mise au point pour l'étude *in vivo*, pourra être appliquée aux études *in vitro*. L'effet dose sera mis en évidence par le trend test, mais cette fois modèle une voie (simple analyse de variance) et le test de comparaison deux à deux : dose testée versus témoin négatif sera appliqué afin de déterminer, dans le cas où une tendance statistiquement significative est réellement observée, à partir de quelle dose cet effet significatif se produit. Il sera donc plus judicieux à l'avenir d'appliquer cette analyse statistique afin de compléter le raisonnement et l'interprétation des résultats.

Enfin, il faut noter que la reproductibilité est également un critère intéressant pour valider une réponse positive ou négative.

Cette validation du test *in vitro* devra être poursuivie et complétée en testant davantage de molécules et notamment des toxiques ayant un mécanisme d'action autre que clastogène direct.

B. VALIDATION DU TEST *IN VIVO*

a) Etudes sur cellules hépatiques

L'objectif de cette partie de la validation du test *in vivo* est d'étudier la sensibilité du test des Comètes. Les résultats positifs attendus concernant les produits génotoxiques testés (qui sont des positifs de référence) ont bien été obtenus :

Le Benzo(a)pyrène est responsable d'une effet positif, similaire entre le temps court et le temps long de traitement.

Il en est de même pour le **Méthyl-méthane sulfonate**, agent clastogène qui induit des cassures directes. Il produit ses effets même après un temps court de traitement car il agit directement sans transformation métabolique.

Le foie est donc bien l'organe cible de ces constituants. Concernant le MMS, un essai a également été envisagé sur le rein et sur un prélèvement de sang, il s'agit d'un essai sur quelques animaux, les résultats vont dans le même sens.

Le **2-Acetyl-aminofluorène** est responsable d'un effet plus marqué en temps long qu'en temps court. Rappelons que le 2-AAF forme des adduits à l'ADN après une métabolisation complexe. Ce produit subit une hydroxylation par l'intermédiaire du cytochrome P450, le radical hydroxylamine formé est très réactif et est converti en entités électrophiles hautement réactives par des réactions de phase II.

L'étude du **Cyclophosphamide** se distingue de celle des autres produits par ses résultats négatifs en temps court et positifs en temps long. Un temps de 3 heures est semblablement trop court pour permettre une métabolisation dans l'organisme animal ainsi qu'une action sur l'ADN. Pourtant, plusieurs études prouvent que le CP est l'un des constituants les plus génotoxiques, c'est un véritable agent mutagène (Heddle *et al*, 1981, IARC, 1981). Par exemple, Tice et son équipe ont publié un rapport concernant l'étude de 11 patients atteints de cancer et traités par de fortes doses de CP, les résultats démontrent d'importantes lésions de l'ADN mises en évidence par le test des Comètes (Tice *et al*, 1992). Enfin, il est important de noter que l'organe cible du CP n'est pas spécifiquement le foie mais davantage la moelle osseuse. Ceci permet également de donner une interprétation au résultat négatif obtenu. Il serait donc intéressant de réaliser un nouveau test des Comètes mais sur

cellules de la moelle cette fois. A ce sujet les études réalisées par le test du micronoyau fournissent des réponses positives (Monteith *et al*, 1995).

Comparaison des résultats, études *in vitro* versus études *in vivo*

Trois produits ont été étudiés à la fois *in vitro* et *in vivo* sur le foie, ce qui permet d'établir une évaluation comparative de nos résultats.

Le MMS présente des résultats positifs concordants entre les différentes études, en accord avec les données de la littérature et avec celles concernant son mécanisme d'action.

Il en est de même pour l'étude du B(a)P.

Par le contre le CP, a quant à lui fourni des réponses contradictoires entre les études *in vitro* et celle menées *in vivo* sur le foie. Ceci ne permet pas une interprétation correcte des résultats et ne nous autorise pas de conclure quant à l'effet génotoxique du CP. Le résultat négatif *in vitro* pourra être confirmé par d'autres études sur d'autres types cellulaires, avec d'autres systèmes d'activation métabolique,...de même d'autres études seront envisagées, en modifiant la dose, la voie d'administration et l'organe cible *in vivo*.

b) Etudes sur cellules rénales

L'objectif de cette étude sur le rein est tout d'abord de mettre en évidence l'applicabilité du test des Comètes aux études d'organospécificité, les produits testés ayant tous un tropisme et une toxicité rénale connue.

Il s'agit également d'étudier la spécificité du test en comparant les réponses fournies par nos études à celles attendues et suggérées par les différents mécanismes d'action des produits : génotoxique, épigénétique et toxique non cancérogène.

Etudes de composés génotoxiques :

Nous avons démontré à travers cette étude une bonne sensibilité du test des Comètes, car les produits génotoxiques sont bien retrouvés positifs.

La Streptozotocine fut le premier produit testé sur le rein. C'est pourquoi aucun témoin positif de référence ne figure dans cette étude. Aussi, d'après les données bibliographiques, le résultat positif obtenu était attendu, en effet de nombreuses études ont déjà été réalisées sur le rein aussi bien sur rat que souris,...(Schmezer *et al*, 1994, Liegibel *et al*, 1992, Kraynak *et al*, 1995). De cette façon la Streptozotocine a été choisie pour toutes les études suivantes comme témoin positif à la dose de 20 mg/kg.

Les résultats obtenus pour les études menées sur **les Acides Aristolochiques** sont satisfaisants, en accord avec ceux de la littérature et avec le mécanisme d'action génotoxique connu (Lord *et al*, 2004, Vanherwegen, 2002). En effet ces herbes chinoises néphrotoxiques, elles sont de part leur génotoxicité notamment, responsables d'insuffisances rénales et de tumeurs de tout l'appareil urinaire. Une réponse positive dès le traitement court à la dose faible de 10 mg/kg aurait été attendue. Ce résultat s'explique par le fait que les Acides Aristolochiques constituent un mélange et leur métabolisation peut être relativement longue.

Tout comme les Acides Aristolochiques, un traitement de 3 heures à **l'Ortho-Nitroanisole** est trop court pour permettre à ce composé de se lier, selon son mécanisme d'action, de façon covalente à l'ADN et d'engendrer des cassures. En ce qui concerne l'exposition des animaux pendant 24 h, nous observons une réponse fortement positive pour la dose faible, en revanche les résultats obtenus sous un traitement de 500 mg/kg sont plus faibles.

Il est donc difficile de conclure à la positivité du produit dans ces conditions. Cependant, il est important de noter que visuellement un grand nombre de débris cellulaires apparaît, ce qui laisse supposer que la dose administrée était trop élevée, ainsi une quantité trop conséquente de cellules mortes en résulte. Il serait donc intéressant pour vérifier cette hypothèse de renouveler cette expérience en temps long en choisissant une dose inférieure à 500 mg/kg en guise de dose forte.

Cette constatation nous permet de confirmer la nécessité de réaliser le test des Comètes *in vivo* à plusieurs niveaux de doses et avec deux temps de traitement.

Etude d'un composé néphrotoxique non génotoxique

Les résultats fournis par **l'Indométacine** ne démontrent aucun effet génotoxique. La toxicité rénale de ce produit existe pourtant, mais elle ne s'exerce pas directement sur l'ADN. En effet, cette molécule inhibe la cyclo-oxygénase et donc la synthèse des prostaglandines, ce qui provoque essentiellement une vasoconstriction rénale et donc une cytotoxicité importante. Nous ne remettrons pas en cause les doses testées, elles ont été établies d'après d'autres études réalisées antérieurement au laboratoire sur l'estomac. Il est important de noter également qu'il n'est pas possible de tester des doses supérieures, l'aspect macroscopique des organes observés au moment de l'autopsie de l'animal démontre des saignements, des ulcérations dans tout le système digestif de l'animal, les reins eux-mêmes ont présenté une coloration anormale. Nous savons par ailleurs que l'Indométacine augmente la mortalité des cellules épithéliales à haut niveau de doses, produisant ainsi des nécroses et des hémorragies importantes.

Afin de bien confirmer cette réponse spécifique du test des Comètes, un second produit non génotoxique sera envisagé : la Streptomycine.

Etude d'un composé épigénétique

Selon les données concernant l'Acide Nitrilotriacétique, il s'agit d'un cancérogène épigénétique, qui induit des tumeurs en agissant autour du gène. La génotoxicité de ce produit n'est pas clairement établie dans la littérature (Anderson *et al*, 1985, Leibold *et al*, 2002).

Le résultat attendu en réalisant le test des Comètes était négatif. Or les expériences réalisées ici suggèrent le contraire. Ce qui suppose une action sur l'ADN proprement dite de ce constituant (dès 3 heures de traitement et dès la dose faible de 1000 mg/kg).

Afin de déterminer s'il s'agit d'une mauvaise réponse du test ou bien d'une réelle action génotoxique, il serait intéressant de tester l'Acide Nitrilotriacétique tout d'abord en Comète *in vitro*. Afin de mettre en évidence d'éventuelles mutations, un test d'Ames pourra être envisagé sur les souches TA 98, TA 100, et TA 102. Egalement une synthèse non programmée de l'ADN, nommé encore test UDS pourra être réalisée sur du rein, enfin une analyse de métaphase pourra également être envisagée et nous permettra de voir si le mécanisme d'action du constituant réside dans les mutations chromosomique. Des fractions microsomiales rénales pourront être employée pour l'activation métabolique.

L'objectif de ce travail étant d'étudier l'applicabilité du test des Comètes aux des études mécanistiques il sera intéressant de poursuivre cette validation par l'étude d'un autre composé épigénétique, le D-limonène sera envisagé.

CONCLUSION

Le test des comètes, test d'altération primaire de l'ADN, se distingue des autres tests de génotoxicité par sa sensibilité pour détecter une faible quantité de lésions. Il présente l'avantage d'être applicable sur tout type cellulaire, organe ou tissu.

L'objet de cette étude est, dans un premier temps, de mettre au point et de valider un protocole du test des Comètes. Dans un second temps, il s'agit d'employer ce test à la recherche de l'organospécificité de cancérogènes génotoxiques, de cancérogènes épigénétiques et de composés cytotoxiques, tout en déterminant les limites du test des Comètes au travers l'étude de ses spécificités.

Ainsi pour être reconnu ce nouveau test doit être validé sur un grand nombre de produits cancérogènes génotoxiques bien connu. Nous avons ainsi démontré une bonne sensibilité du test des Comètes, les résultats obtenus pour les positifs de référence que sont le B(a)P, le 2-AAF, le MMS, et l'EMS sont significatifs. Les produits cancérogènes génotoxiques : la STZ, les AA et l'O-NA tous trois néphrotoxiques, ont fournit également des résultats clairement positifs.

Ensuite, nous pouvons conclure à une bonne spécificité du test au vu des résultats obtenus sur l'Indométabacine (retrouvée négative), ce qui tant à démontrer l'absence d'interférence des effets toxiques.

Toutefois, les réponses obtenues pour le NTA, à ce jour, produit agissant selon un mécanisme épigénétique, révèlent une activité directe sur l'ADN inattendue. Dans ce dernier cas, il est envisagé de poursuivre l'évaluation de la génotoxicité de ce produit à l'aide d'études complémentaires de mutagenèse. De même, concernant le CP *in vitro*, une étude plus approfondie devra être menée.

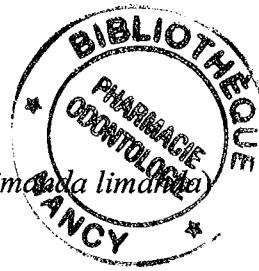
Ces travaux constituent une étape de la validation du Test des Comètes en tant que test spécifique et sensible, tant *in vitro* que *in vivo* pour la recherche de l'organospécificité des toxiques.

Une première proposition de lignes directrices a été proposée par Raymond Tice et son équipe (Tice *et al*, 2000). Nous avons constaté au travers de notre étude que certains paramètres demeurent encore trop variables d'un laboratoire à l'autre. Il est donc nécessaire d'harmoniser encore d'avantage les procédures et ce d'autant plus qu'il existe aujourd'hui une réelle volonté de réaliser des études interlaboratoires à travers le monde.

La recherche de la génotoxicité organospécifique est une préoccupation majeure sur le plan international. D'un point de vue réglementaire, elle est au programme de l'« International Workshop on Genotoxicity Testing Procedures » : Congrès International IWGTP qui se tiendra à San Francisco en septembre 2005.



BIBLIOGRAPHIE



Akcha F., Hubert F. V. and Pfhöhl-Leszkowicz A.

Potential value of the Comet Assay and DNA adduct measurement in dab (*Limnæda limnæda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds.

Mutat. Res., 2003; 534: 21-32

Anderson R. L., Bishop W. E. and Campbell R. L.

A review of the environmental and mammalian toxicology of nitrilotriacetic acid.

CRC Crit. Rev. Toxicol., 1985; 15: 1

Anderson D. and Plewa M. J.

The International Comet Assay Workshop.

Mutagenesis, 1998; 13: 67-73

Anderson D., Yu TW. and McGregor D. B.

Comet Assay responses as indicators of carcinogen exposure.

(Review)

Mutagenesis, 1998; 13: 539-555

Andreoli C., Leopardi P., Rossi S. and Crebelli R.

Processing of DNA damage induced by hydrogen peroxide and methyl methane sulfonate in human lymphocytes: analysis by alkaline single cell gel electrophoresis and cytogenetic methods.

Mutagenesis, 1999; 14: 497-503

Avishai N., Rabinowitz C. and Baruch R.

Use of the Comet Assay for studying environmental genotoxicity.

Comparisons between visual and image analyses

Environ. Mol. Mutagen., 2003; 42: 155-165

Bauer E., Recknagel R. D., Fiedler U., Wollweber L., Bock C. and Greulich K. O.

The distribution of the tail moments in the single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square (χ^2) not a Gaussian distribution.

Mutat. Res., 1998; 398: 101-110

Bergamo R. R., Cominelli F., Kopple J. D. and Zipser R. D.

Comparative acute effects of aspirin, diflunisal, ibuprofen and indometacin on renal function in healthy man.

Am J. Nephrol., 1989; 9: 460-463

Bocker W., Rolf W., Bauch T., Muller W. U. and Streffler C.

Automated Comet Assay analysis.

Cytometry, 1999; 35: 134-144

Bowden R. D., Buckwater M. R., McBride J. F., Johnson D. A., Murray B. K. and O'Neill K. L.

Tail profile: a more accurate system for analyzing DNA damage using the Comet Assay.

Mutat. Res., 2003; 537: 1-9

Brendler-Schwaab S. Y., Schmezer P., Liebliegel U., Weber S., Michalek K., Tompa A. and Pool-Zobel B. L.

Cells of different tissues for *in vitro* and *in vivo* studies in toxicology: compilation of isolation methods.

Toxicol. in vitro, 1994; 8: 1285-1302

Bruggeman I. M., Mertens J. J. W. M., Temmink J. H. M., Lans M. C., Vos R. M. E. and Van Bladeren P. J.

Use of monolayers of primary rat kidney cortex cells for nephrotoxicity studies.

Toxicol. in vitro, 1989; 3: 261-269

Casarret & Doull's,

Toxicology, The basic science of poisons.

Ed D. Curtis, Klassen, 6th Edition, 2001: 491-510

Cavallo D., Ursini C. L., Setini A., Chianese C., Piegari P., Perniconi B. and Iavicoli S.
Evaluation of oxidative damage and inhibition of DNA repair in an *in vitro* study of nickel exposure.

Toxicol. in vitro, 2003; 17: 603-607

Chabner B. A., Allegra C. A., Curt G. A. et Calabresi P.

Médicament anticancéreux.

In : Les bases pharmacologiques de l'utilisation des médicaments.

Goodman & Gilman, Eds. 9^{ème} ed., 1998, McGraw-Hill International,
Chapitre 51 pp 1225-1277

Choucroun P., Gillet D., Dorange G., Sawicki B. and Dewitte J. D.

Comet Assay and early apoptosis.

Mutat. Res., 2001 ; 478 : 89-96

CIRC

Liste des évaluations du CIRC

Evaluations globales de la cancérogénicité pour l'homme.

Site internet : <http://193.51.164.11/monoeval/glistfr.htm>

Consulté le 27/09/2004

Collins A., Dusinska M., Franklin M., Samorovska M., Petrovska H., Duthie S., Fillion L., Panayiotidis M., Raslova K. and Vaughan N.

Comet Assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and application.

Environ. Mol. Mutagen., 1997; 30: 139-146

Collins A. R.

The Comet Assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations.

Mol Biotechnol., 2004; 26: 249-61. Review.

Duez P., Dehon G., Kumps A. and Dubois J.

Statistics of the Comet Assay: a key to discriminate between genotoxic effects.

Mutagenesis, 2003; 18: 159-166

Eastman A. and Barry M.A.

The origin of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair or apoptosis?

Cancer Invest., 1992; 10: 229-240

Ejchart A. and Sadlej-Sosnoxska N.

Statistical evaluation and comparison of the Comet Assay results.

Mutat. Res., 2003; 534: 85-92

Fairbairn W. D., Olivie P. J. and O'Neill K. L.

The Comet Assay: a comprehensive review.

Mutat. Res., 1995; 339: 37-59

Fontaine F. R., Degraaf Y. C., Ghaoui R., Sallustio B. C., Edwards J. and Burcham P. C.

Optimisation of the Comet genotoxicity Assay in freshly isolated murine hepatocytes:

detection of strong *in vitro* DNA damaging properties for styrene.

Toxicol. in vitro, 2004; 18: 343-350

Freifelder D.

Biologie Moléculaire

Ed Masson, Paris, 1990

Frieauff W., Hartmann A. and Sutter W.

Automatic analysis of slides processed in the Comet Assay.

Mutagenesis, 2001; 16: 133-137

Friedberg E. C., Walker G. C. and Siede W.

DNA repair and mutagenesis.

ASM press, Washington, 1995

Friedberg E. C.

DNA damage and repair.

Nature, 2003; 421: 436-440

Friedberg E. C.

Site internet consulté le 03/03/2005

http://saturn.roswellpark.org/cmb/hberman/DNA_Repair/DNA_Repair.htm

Garaj-Vrhovac V. and Kopjar N.

The alkaline Comet Assay as biomarker in assessment of DNA damage in medical personnel occupationally exposed to ionizing radiation.

Mutagenesis, 2003; 18: 265-271

Garry S., Nesslany F., Aliouat EM., Haguenoer JM. and Marzin D.

Assessment of genotoxic effect of benzo(a)pyrene in endotracheally treated rat using the Comet Assay.

Mutat Res., 2003; 534: 33-43

Garry S., Nesslany F., Aliouat E., Haguenoer J. M. and Marzin D.

Hematite (Fe_2O_3) enhances benzo(a)pyrene genotoxicity in endotracheally treated rat, as determined by Comet Assay.

Mutat. Res., 2003; 538: 19-29

Giannotti E., Vandin L., Repeto P. and Comelli R.

A comparison of the *in vitro* Comet Assay with the *in vitro* chromosome aberration assay using whole human blood or Chinese hamster lung cells: validation study using a range of novel pharmaceuticals.

Mutagenesis, 2002; 17: 163-170

Grover P., Danadevi K., Mahboob M., Rozati R., Saleha Banu B. and Rahman M. F.

Evaluation of genetic damage in workers employed in pesticide production utilizing the Comet Assay.

Mutagenesis, 2003; 18: 201-205

Harman W. A., McCamish L. E. and Henry C. A.

Isolation of hepatocytes from postnatal mice.

J. of Pharmacol. Methods, 1987; 17: 157-163

Hartmann A., Herkommmer K., Gluck M. and Speit G.

DNA-Damaging effect of cyclophosphamide on human blood cells *in vitro* and *in vivo* studies with the single-cell gel test (Comet Assay).

Environ. Mol. Mutagen, 1995; 25: 180-187

Hartmann A., Elhajouji A., Kiskinis E., Poetter F., Martus H., Fjallman A., Frieauff W. and Suter W.

Use of the alkaline Comet Assay for industrial genotoxicity screening: comparative investigation with the micronucleus test.

Food. Chem. Toxicol., 2001; 39: 843-858

Hartmann A., Plappert U., Poetter F. and Suter W.

Comparative study with the alkaline Comet Assay and the chromosome aberration test.

Mutat. Res., 2003; 536: 27-38

Hartmann A., Agurell E., Beavers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V. and Tice R. R.

Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet Assay.

Mutagenesis, 2003; 18: 45-51

Hartmann A., Schumacher M., Plappert-Helbig U., Lowe P., Suter W. and Mueller L.

Use of the alkaline *in vivo* Comet Assay for mechanistic genotoxicity investigations.

Mutagenesis, 2004; 19: 51-59

Heddle J. A., Bora K. C. and Stoltz D. R.

Comparative mutagenicity of myleran and cyclophosphamide.

In de Serres FJ, ShelbyMD (eds): Comparative Chemical Mutagenesis.

New York, Plenum Press, pp 893-916

Hengstler J. G., Hengst A., Fuchs J., Taner B., Pohl J. and Oesch F.
Induction of DNA crosslink and DNA strand lesions by Cyclophosphamide after activation by CYP 450 2B1.
Mutat. Res., 1997; 373: 215-223

Hininger I., Chollat-Namy A., Sauvaigo S., Osman M., Faure H., Cadet J., Favier A. and Roussel A.M.
Assessment of DNA damage by Comet Assay on frozen total blood: method and evaluation in smokers and non-smokers.
Mutat. Res., 2004; 558: 75-80

IARC

Cyclophosphamide.

In "Evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some antineoplastic and immunosuppressive agents, Vol 26"
Lyon, France: World Health Organisation, International Agency for Research in Cancer, pp 165-202.

INRS

Fiches toxicologiques

Site internet consulté le 2103/2005 :
<http://www.inrs.fr>

Kiskinis E., Suter W. and Hartmann A.

High throughput Comet Assay using 96-well plates.
Mutagenesis, 2002; 17: 37-43

Klaude M., Eriksson S., Nygren J. and Ahnström G.

The Comet Assay: mechanisms and technical considerations.
Mutat. Res., 1996; 363: 89-96

Konca K., Landoff A., Banasik A., Lisowska H., Kuszewski T., Gozdz S., Koza Z. and Wojcik A.

A cross-platform public domain PC image-analysis program for the Comet Assay.
Mutat. Res., 2003; 534: 15-20

Kraynak A. R., Storer R. D., Jensen R. D., Kloss M. W., Soper K. A., Clair J. H., Deluca J. G., Nichols W. W. and Eydellooth R. S.

Extent and persistence of streptozotocin-induced DNA damage and cell proliferation in rat kidney as determined by *in vivo* alkaline elution and BrdUrd labelling assays.
Toxicol. and Applied Pharmacol., 1995; 135: 279-286.

Lee M., Kwon J. and Chung MK.

Enhanced prediction of potential rodent carcinogenicity by utilizing Comet Assay and apoptotic assay in combination.
Mutat. Res., 2003; 541: 9-19

Leibold E., Deckardt K., Mellert W., Potthoff-Karl B., Grundler O. and Jackh R.

NTA and Fe(III)NTA: differential patterns of renal toxicity in subchronic studies.
Hum. Exp. Toxicol., 2002; 21: 445-52

Léonard A.

Les mutagènes de l'environnement et leurs effets biologiques.
ED Masson, Paris, 1990.

Liegibel U., Tinwell H., Callander R. D., Schmezer P. and Ashby J.

Clastogenicity to the mouse bone marrow of the mouse germ cell genotoxin streptozotocine.
Mutagenesis, 1992; 7: 471-474

Liu B. H., Yu F. Y., Wu T. S., Li S. Y., Su M. C., Wang M. C. and Shih S. M.

Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin.

Toxicol. and applied pharmacol., 2003; 191: 255-263

Longin A., Souchier C., French M. and Bayron P. A.

Comparison of anti-fading agents used in fluorescence microscopy: image analysis and laser confocal microscopy study.

The J. of Histochem. and Cytochem., 1993; 41: 1833-1840

Lord G. M., Hollstein M., Arlt V. M., Roufosse C., Pusey C. D., Cook T. and Schmeiser H. H.

DNA adducts and p53 mutation in a patient with Aristolochic acid-associated nephropathy.

Am. J. Kidney Dis., 2004; 43: 11-17

Matsumoto Y.

Mol. Cell. Biol.; 1994, 14: 6187

Site internet consulté le 03/03/2005: http://egp.gs.washington.edu/images/BER_01.gif

McKelvey-Martin V. J., Green M. H. L., Schmezer P., Pool-Zobel B. L., De Méo M. P. and Collins A.

The single cell gel electrophoresis assay (Comet Assay): A european review.

Mutat. Res., 1993; 288: 47-63

Meintieres S., Nesslany F., Pallardy M. and Marzin D.

Detection of ghost cells in the standard alkaline Comet Assay is not a good measure of apoptosis.

Environ. Mol. Mutagen., 2003; 41: 260-269

Mendoza S. A.

Nephrotoxic drugs.

Invited review

Pediatr. Nephrol., 1988; 2: 466-476

Mengs U.

On the histopathogenesis of rat forestomach carcinoma caused by aristolochic acid.

Arch. Toxicol., 1983; 52: 209-220

Merck O. and Speit G.

Detection of crosslinks with the Comet Assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity.

Environ. Mol. Mutagen., 1999; 33: 167-172

Mohler D.

Emory University

Site internet: <http://nano.chem.emory.edu/~dlm/chromatin.html>

Consulté le 10/03/2005

Miyamae Y., Aizen K., Ohara K., Mine Y. and Sasaki Y. F.

Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell gel electrophoresis (Comet) Assay.

1-Relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens.

Mutat. Res., 1997; 393: 99-106

Miyamae Y., Kouichi I., Kinae N., Tsuda S., Murajami M., Tanaka M. and Sasaki Y. F.

Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell gel electrophoresis (Comet) Assay.

2- Relationship between DNA migration and alkaline condition.

Mutat. Res., 1997; 393: 107-113

Miyamae Y., Yamamoto M., Sasaki Y. F., Kobayashi H., Igarashi Soga M., Shimol K. and Hayashi M.

Evaluation of a tissue homogenization technique that isolates nuclei for the *in vivo* single cell gel electrophoresis (Comet) Assay: collaborative study by five laboratories.

Mutat. Res., 1998; 418: 131-140

Monteith D. K. and Vanstone J.

Comparison of the microgel elctrophoresis assay and other assays for genotoxicity in the detection of DNA damage.

Mutat. Res., 1995; 345: 97-103

Olive P. L., Wlodek D. and Banath J. P.

DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis.

Cancer Res., 1991; 51: 4671-4676

Ostling O. and Johanson K. J.

Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1984; 123: 291-298

Papadopoulo D. and Moustacchi E.

Recombinaison génétique et instabilité génétique

Dynamique nucléaire et plasticité du génome - UMR 218 CNRS/IC

Institut Curie, site internet consulté le 03/03/2005 :

http://www.curie.fr/recherche/themes/detail_equipe.cfm/lang/_fr/id_equipe/61.htm

Paz-y-Mino C., Davalos M. V., Sanchez M. E., Arevalo M. and Leone P. E.

Should gaps be included in chromosomal aberration analysis ? Evidence based on the Comet Assay.

Mutat. Res., 2002; 516: 57-61

Piperakis S. M., Petrakou E., Tsilimigaki S., Sagnou M., Monogiudis E., Haniotakis G., Karkaseli H. and Sarikaki E.

Biomonitoring with the Comet Assay of greek greenhouse workers exposed to pesticides.

Environ. Mol. Mutagen., 2003; 41: 104-110

Rajaguru P., Suba S., Palanivel M. and Kalaiselvi K.

Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline Comet Assay on fish and earthworm tissues.

Environ. Mol. Mutagen., 2003; 41: 85-91

Rundell M. S., Wagner E. D. and Plewa M. J.

The Comet Assay: genotoxic damage or nuclear fragmentation?

Environ. Mol. Mutagen., 2003; 42: 61-67

Rydberg B. and Johanson K. J.

Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells.

In : DNA Repair Mechanisms. Hanwalt PC & Friedberg C,

Eds. Academic Press, New York, 1978: 465-468

Sasaki Y. F., Tsuda S., Izumiyama F. and Nishidate E.

Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) Assay.

Mutat. Res., 1997; 388: 33-44

Sasaki Y. F., Kawaguchi S., Kamaya A., Ohshita M., Kabasawa K., Iwama K., Kazuyuki T. and Tsuda S.

The Comet Assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives.

Mutat. Res., 2002; 519: 103-119

Schmezer P., Eckert C., Liegibel U. M.

Tissue-specific induction of mutations by streptozotocin in vivo.

Mutat. Res., 1994 ; 307: 495-499

Schnurstein A. and Braunbeck T.

Tail Moment *versus* Tail Length- Application of an *in vitro* version of the Comet Assay in biomonitoring for genotoxicity in native surface waters using primary hepatocytes and gill cells from zebrafish (*Danio rerio*).

Ecotoxicol. and Environ. Safety, 2000; 49: 187-196

SIGMA

Product Information

Site internet consulté le 24/03/2005: <http://www.sigmaaldrich.com>.

Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R. and Schneider E. L.

A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells.

Exp. Cell. Res., 1988; 175: 184-191

Singh N. P., Tice R. R., Stephens R. E. and Schneider E. L.

A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscop slides.

Mutat. Res., 1991; 252: 289-296

Speit G. and Hartmann A.

The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (Comet Assay)

Mutagenesis, 1995; 10: 555-559

Speit G., Dennog C. and Lampl L.

Biological significance of DNA damage induced by hyperbaric oxygen.

Mutagenesis, 1998; 13: 85-7

Speit G., Schütz P., Bonzheim I., Trenz K and Hoffmann H.

Sensitivity of the FpG protein towards alkylation damage in the Comet Assay.

Toxicology letters, 2004; 146: 151-158

Stiborova M., Miksanova M., Smroek S., Bieler C. A., Breuer A., Klokow K. A., Schmeiser H. H. and Frei E.

Identification of a genotoxic mechanism for 2-nitroanisole carcinogenicity and of its carcinogenic potential for humans.

Carciogenesis, 2004; 25: 833-840

Storer R. D., McKelvey T. W., Kraynac A. R., Elia M. C., Barnum J. E., Harmon L. S., Nichols W. W. and DeLuca J. G.

Revalidation of the in vitro alkaline elution/rat hepatocyte assay for DNA damage: improved criteria for assessment of cytotoxicity and results for 81 compounds.

Mutat. Res., 1996; 368: 53-101

Tice R. R., Andrews P. W., Hirai O. and Singh N. P.

The single cell gel (SCG) Assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells.

In Witmer C. R., Snyder R. R., Jollow D. J., Kalf G. F., Kocsis J. J. and Sipes I. G. (eds) *Biological Reactive Intermediates IV, Molecular and Cellular Effects and their Impact on Human Health*.

Plenum Press, New York, NY, 1991: 157-164

Tice R. R., Strauss G. H. S. and Peter W. P.

High dose alkylating agents with autologous bone-marrow support in patients with breast cancer: Preliminary assessment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis technique assay.

Mutat. Res., 1992; 271: 101-113

Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J. C., and Sasaki Y. F.

Single cell gel/Comet Assay : guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing

Environ. Mol. Mutagen., 2000; 35: 206-221

Tsimiligaki S. I., Messini-Nikolaki N., Kanariou M. and Piperakis S. M.
A study on the effect of seasonal solar radiation on exposed populations.
Mutagenesis, 2003; 18: 139-143

Valentin-Severin I., Le Hegarat L., Lhuguenot JC., Le Bon AM. and Chagnon MC.
Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between Comet and Micronucleus Assays.
Mutat. Res., 2003; 536: 79-90

Vanherwegen J. L.
Urémie chronique et cancer des voies urinaires secondaires à la prise d'extraits végétaux utilisés en phytothérapie chinoise.
Médecine/sciences, 2002; 18: 1095-101

Wagner E. D., Rayburn A. L., Anderson D. and Plewa M. J.
Analysis of mutagens with single cell gel electrophoresis, flow cytometry, and forward mutation assays in an isolated clone of Chinese hamster ovary cells.
Environ. Mol. Mutagen., 1998 ; 32 : 360-368

Wagner E. D., Anderson D., Dhawan A., Rayburn A. L. and Plawa M. J.
Evaluation of EMS-induced DNA damage in the single cell gel electrophoresis (Comet) Assay and with flow cytometric analysis of micronuclei.
Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis Supplement, 2003; 2: 1-11

Wang JC. and Qian BL.
Detection of DNA damage in peripheral lymphocytes by 7 compounds using Comet Assay
Acta Pharmacologica Sinica, 1997; 18: 451-454

Wheater P. R., Burkitt H. G. and Daniels V. G.
Traduit par les Dr Bellot J. et Lange F;
Histologie fonctionnelle / manuel et atlas
Ed MEDSI.

Wiklund S. J. and Agurell E.
Aspect of design and statistical analysis in the Comet Assay.
Mutagenesis, 2003; 18: 167-175

Woods J. A., O'Leary K. A., McCarthy R. P. and O'Brien N. M.
Preservation of Comet Assay slides: comparison with fresh slides.
Mutat. Res., 1999; 429: 181-187

Yusuf A. T., Vian L., Sabatier R. and Cano JP.
In vitro detection of indirect-acting genotoxins in the Comet Assay using Hep G2 cells.
Mutat. Res., 2000; 468: 227-234

Zegura B., Lah T. T. and Filippic M.
The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage.
Toxicology, 2004; 200: 59-68

ANNEXES

ANALYSE STATISTIQUE DES ETUDES *IN VIVO*

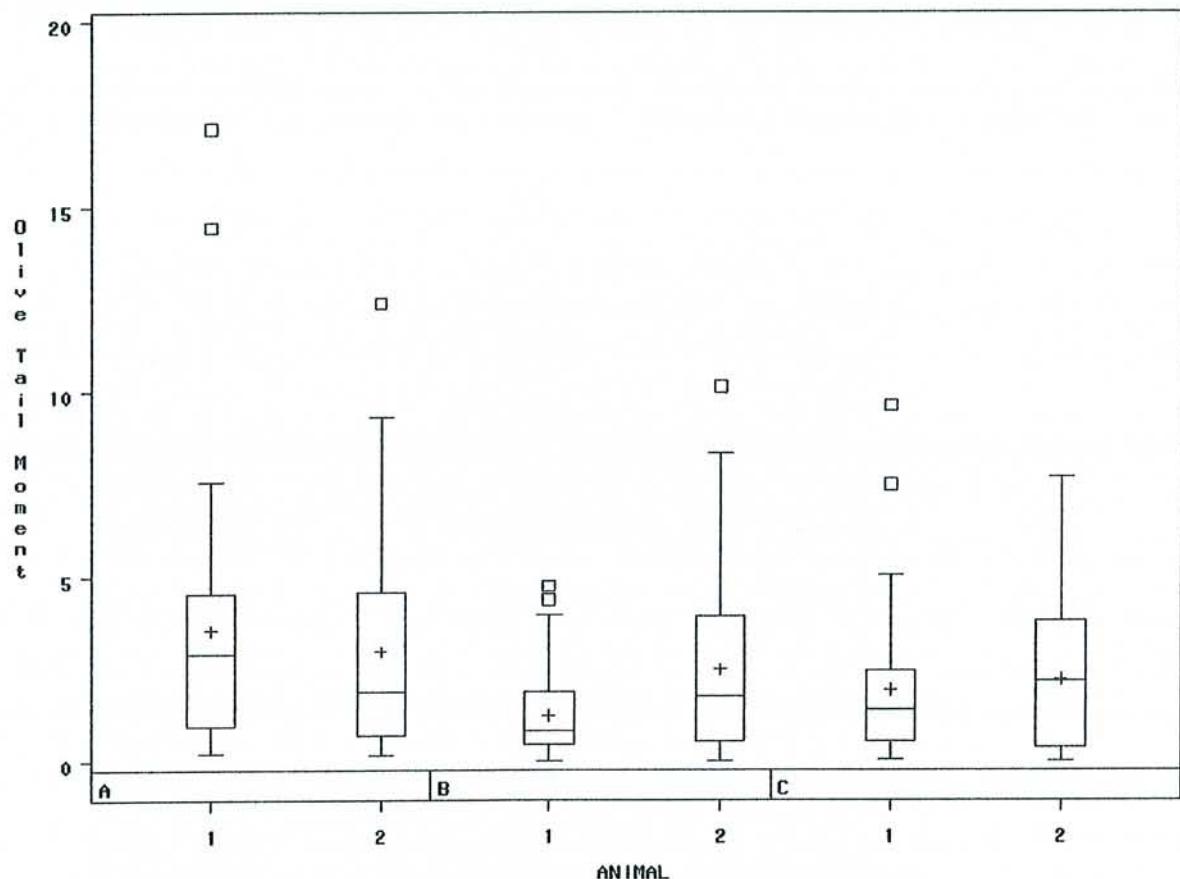
BOXPLOTS



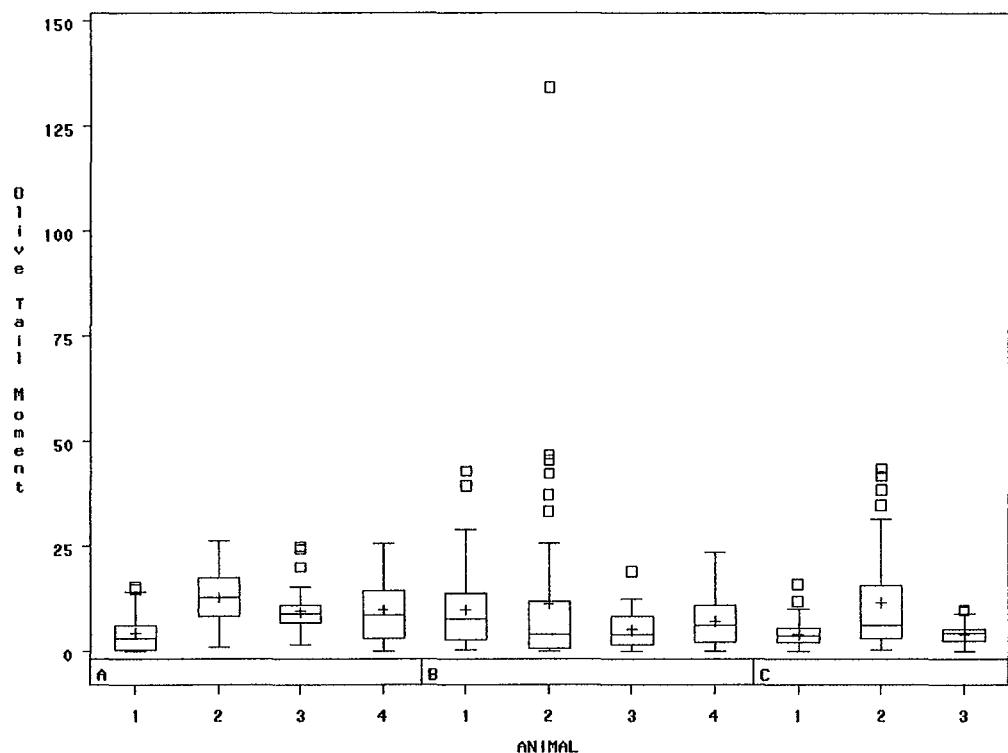
Etudes *in vivo* sur le foie

Le Benzo(a)pyrène

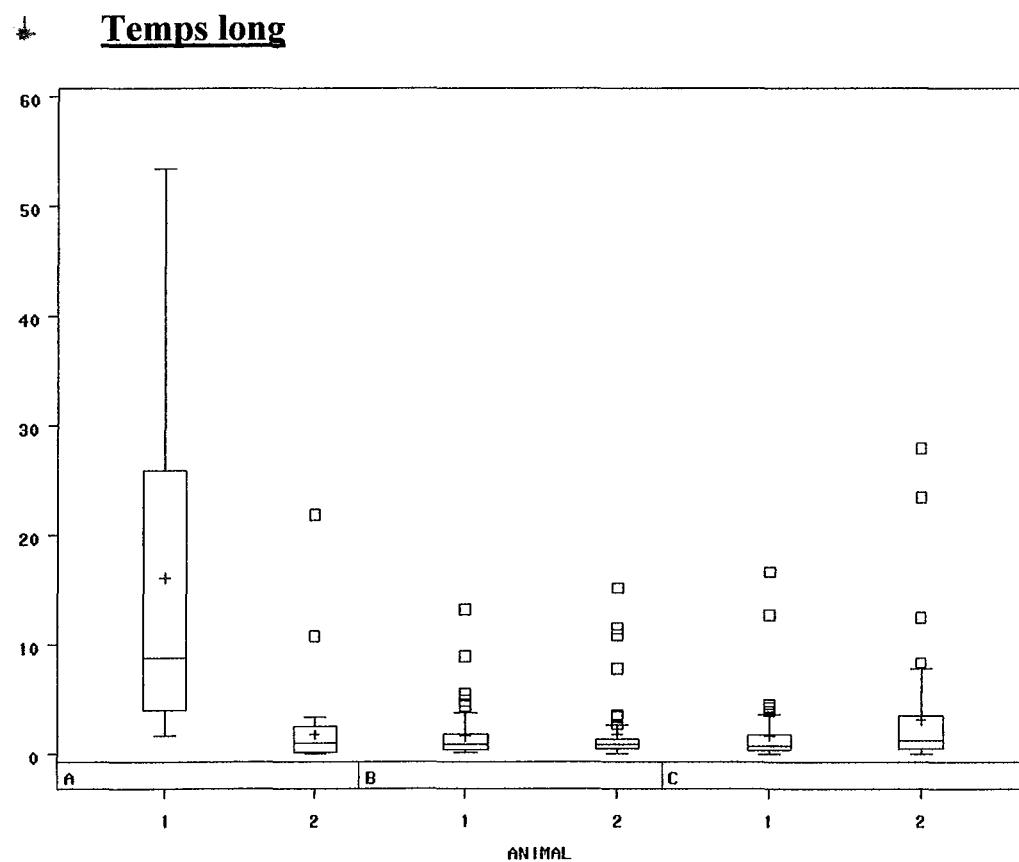
✿ Temps court



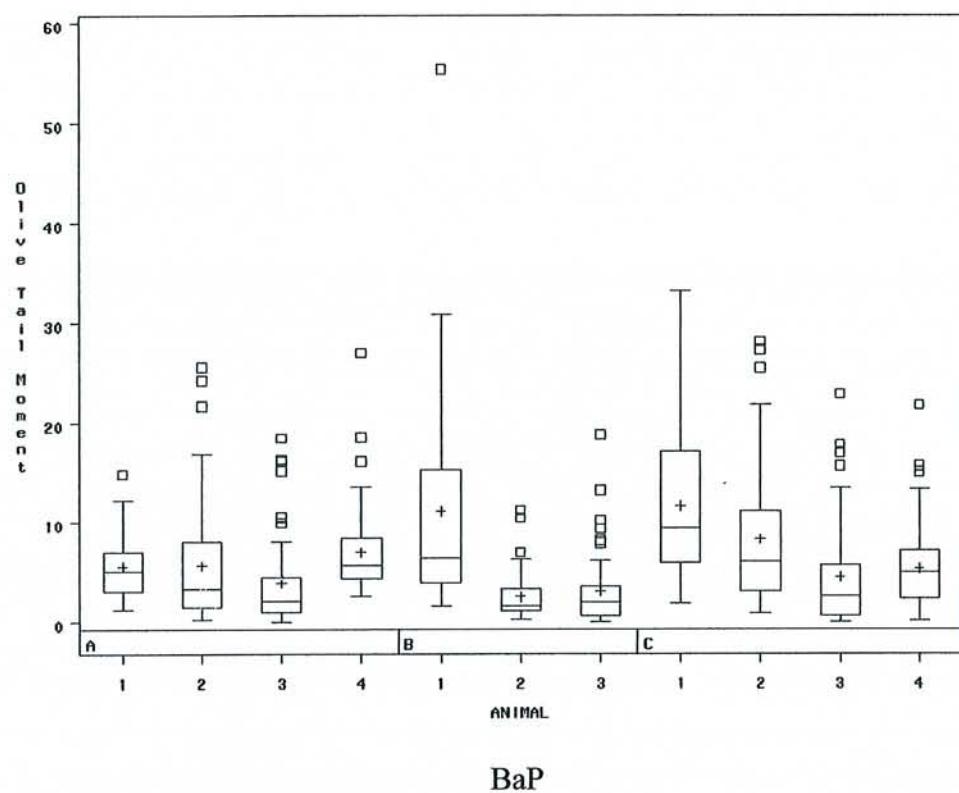
Negative control group



BaP

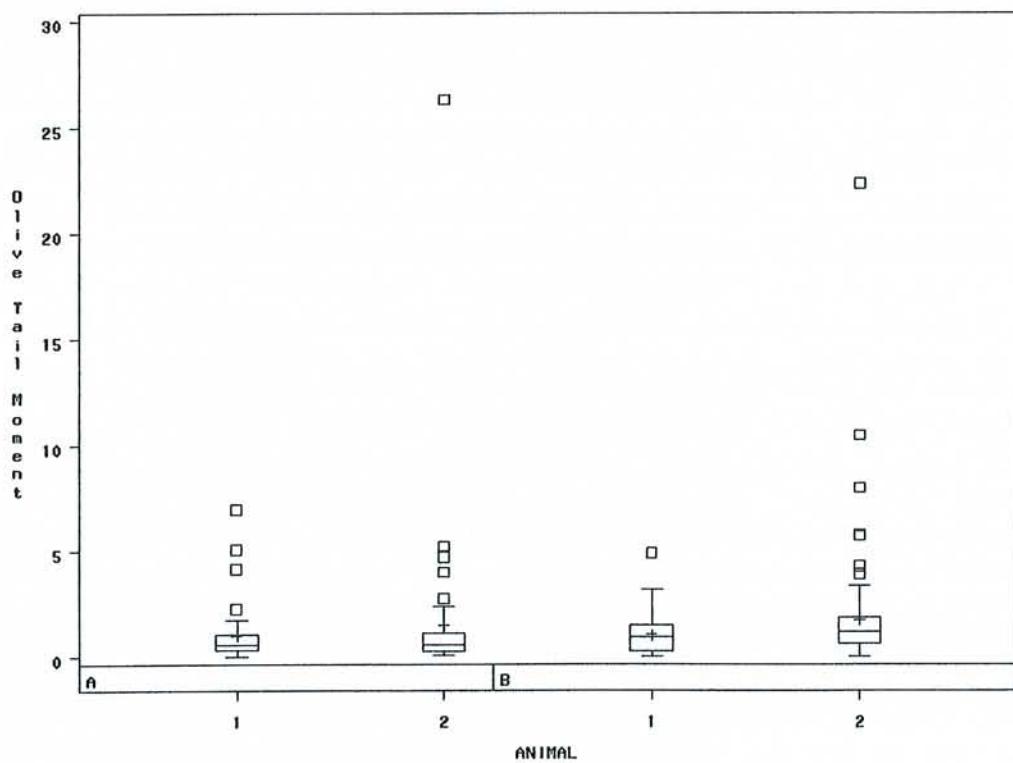


Negative control group

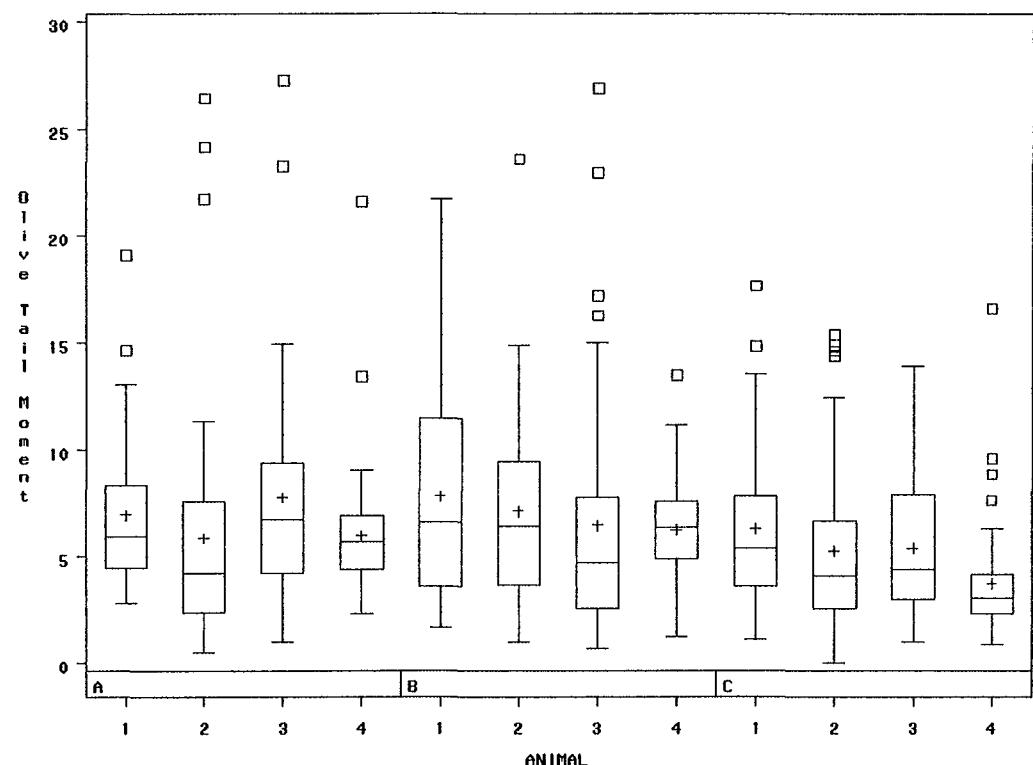


Le 2-Acétylaminofluorène

Temps court

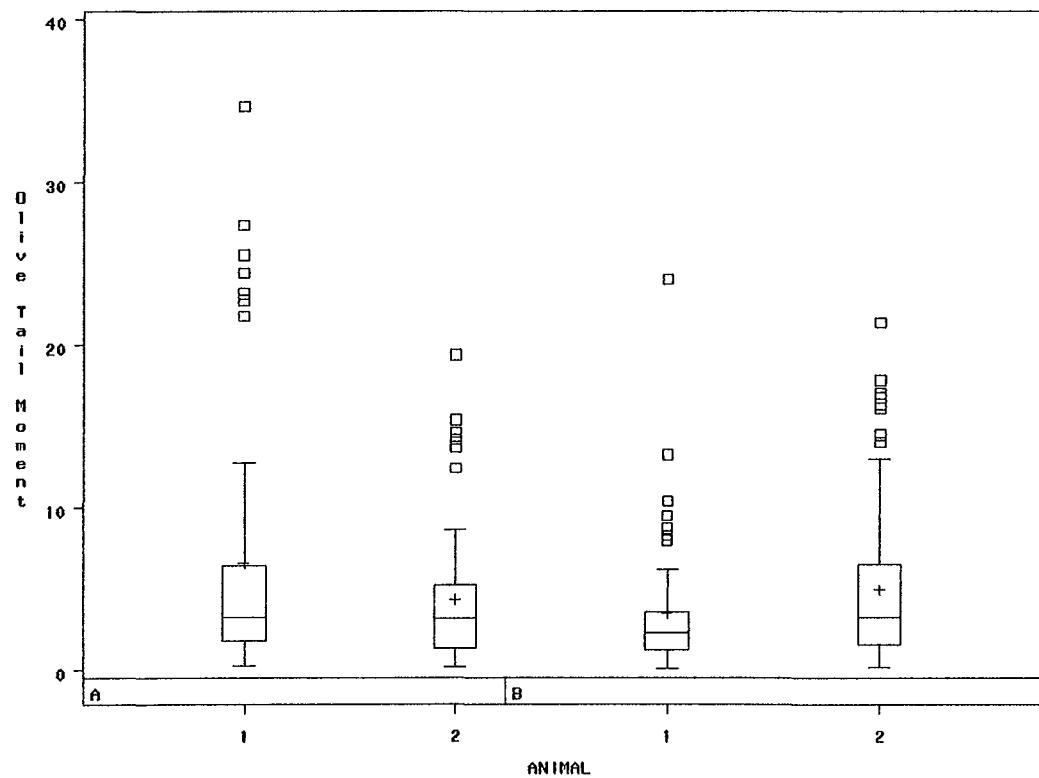


Negative control group

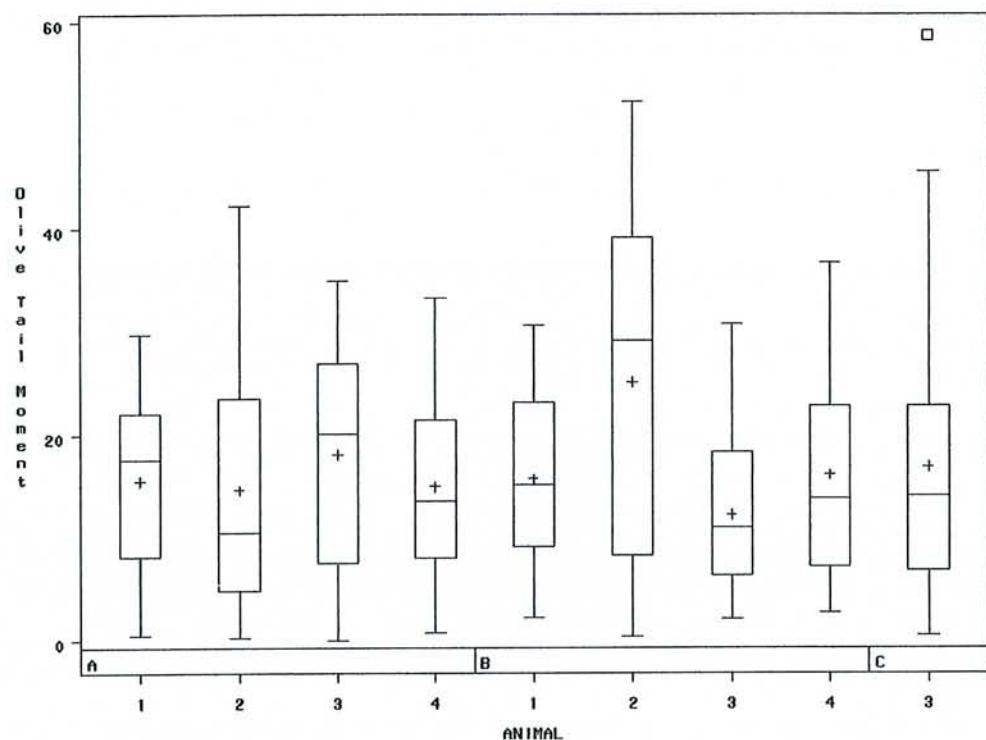


2-AAF

* **Temps long**

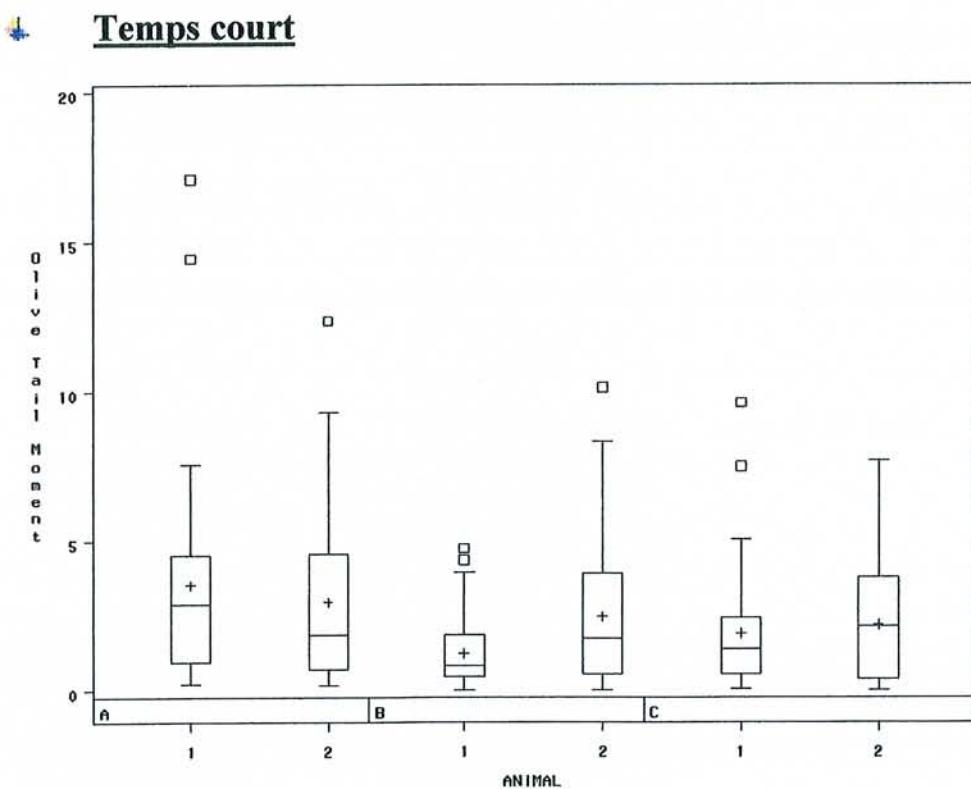


Negative control group

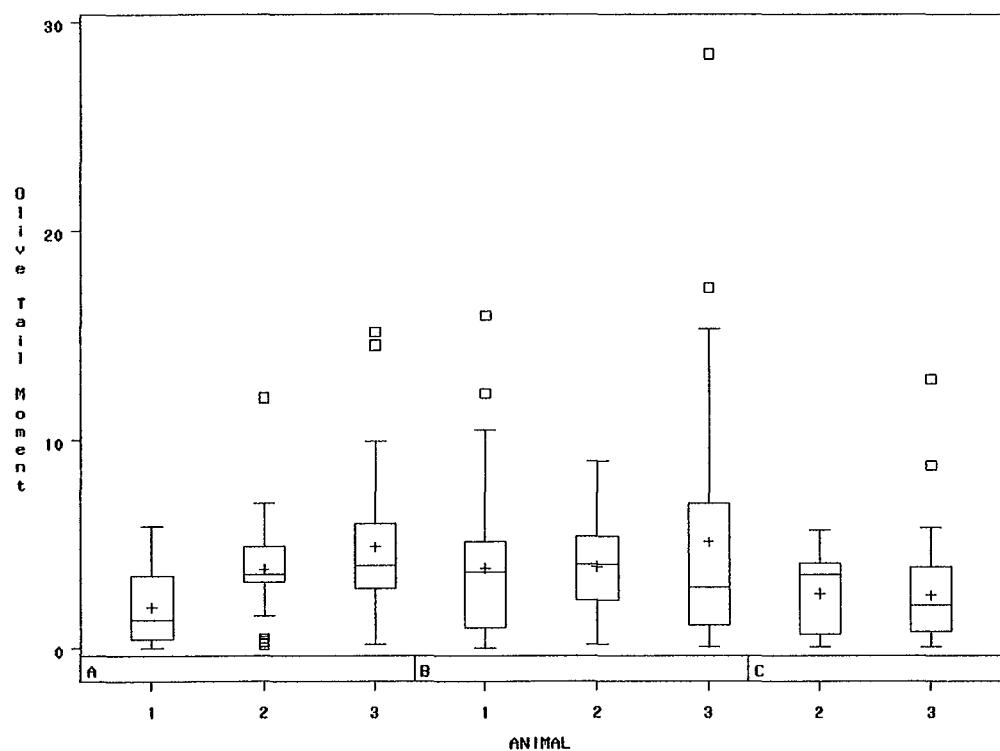


2-AAF

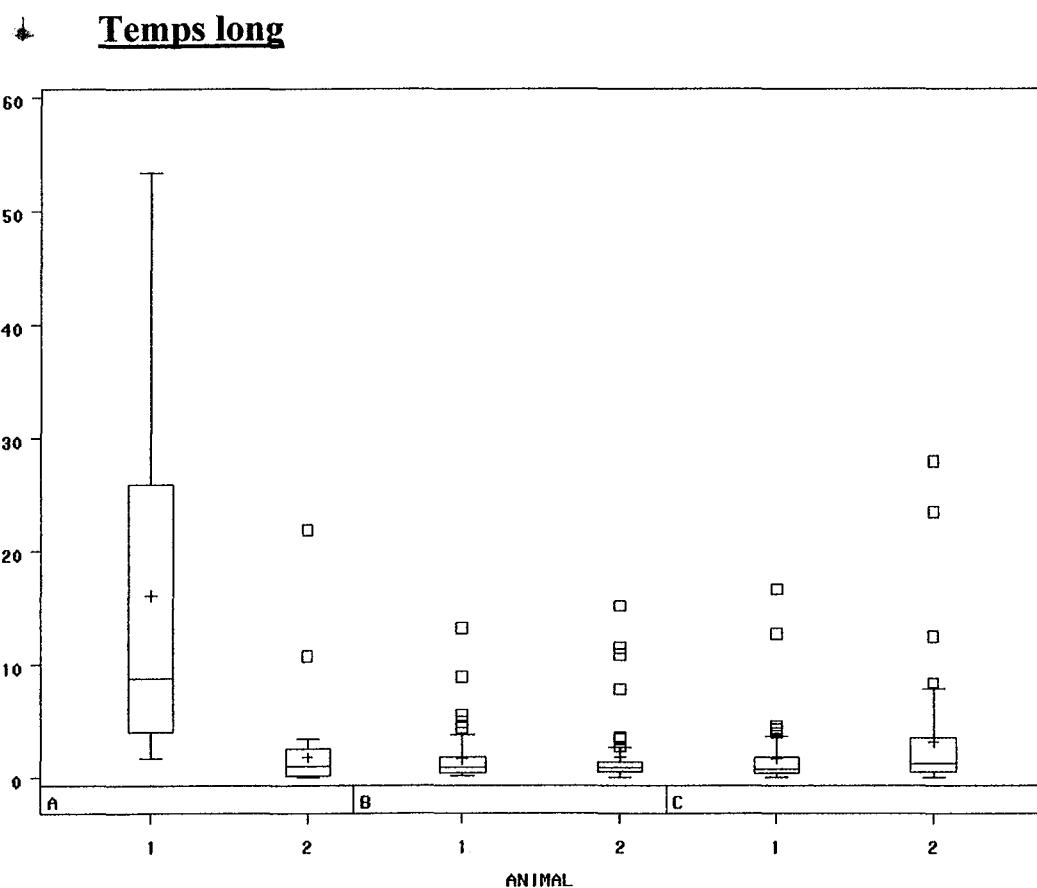
Le Cyclophosphamide



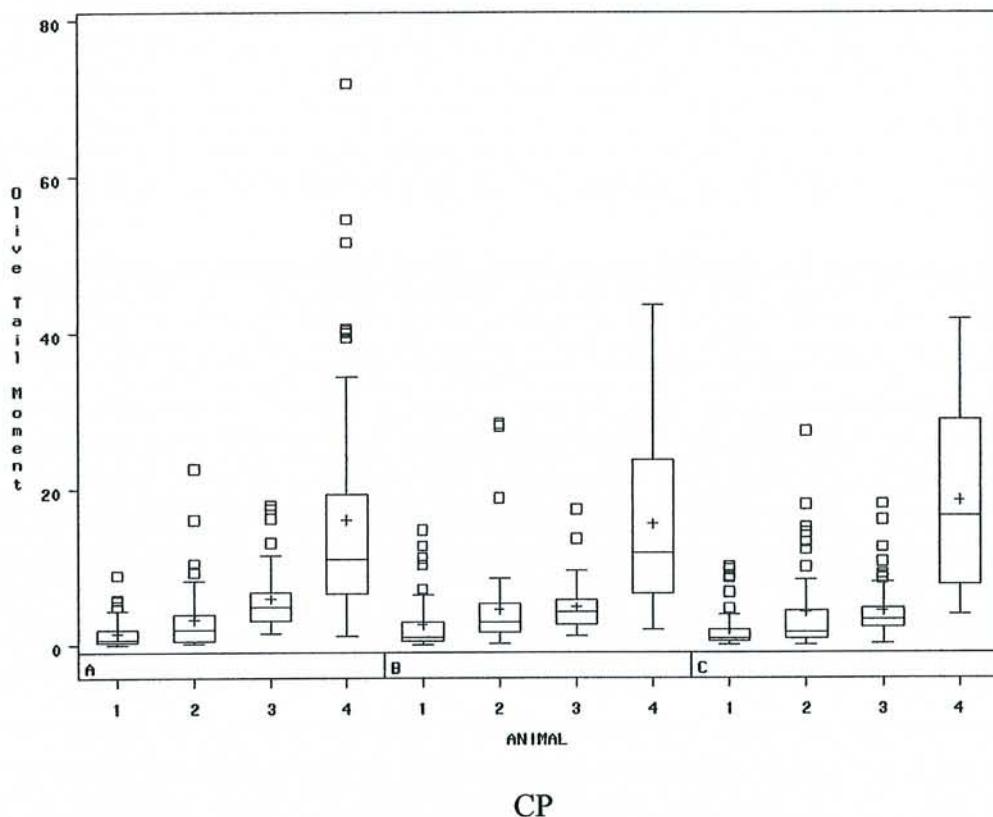
Negative control group



CP

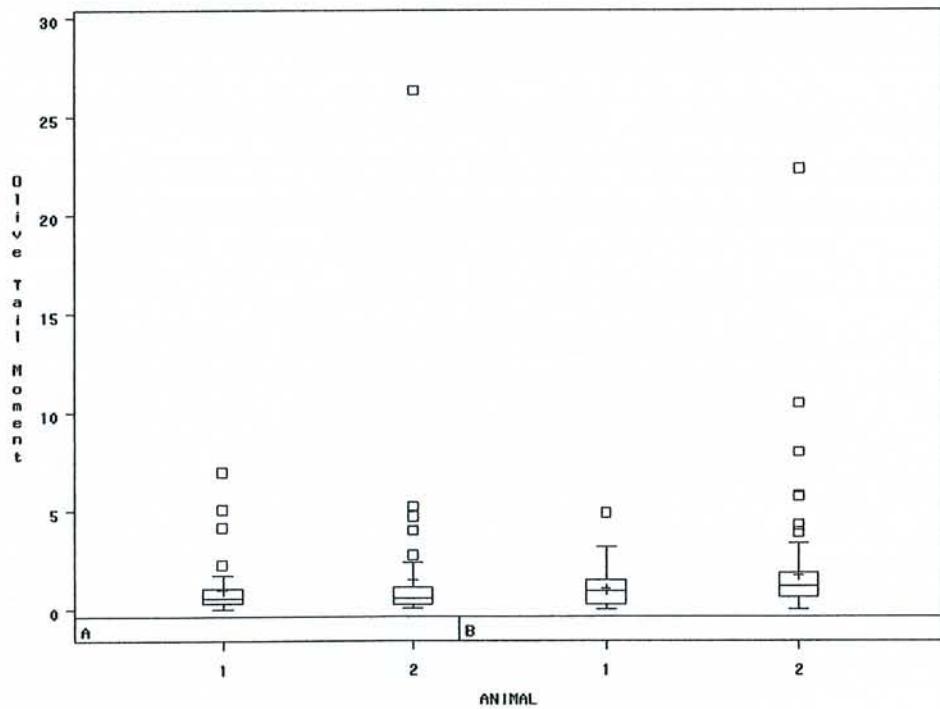


Negative control group

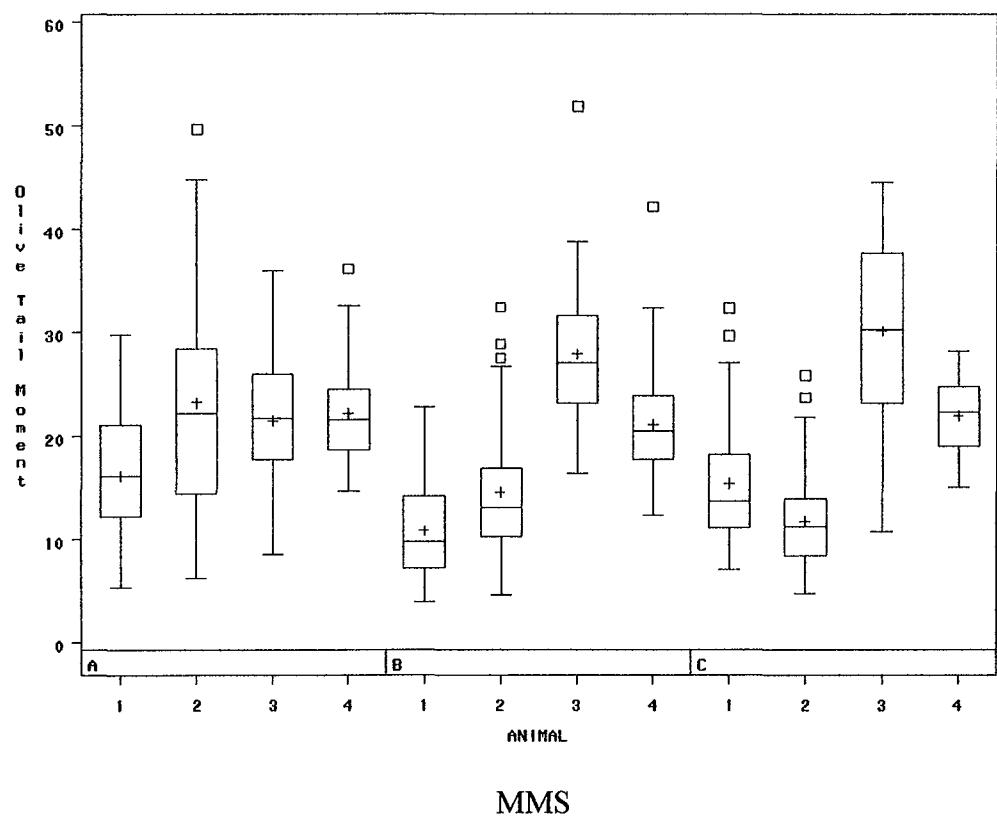


Le Méthyl-méthane sulfonate

Temps court



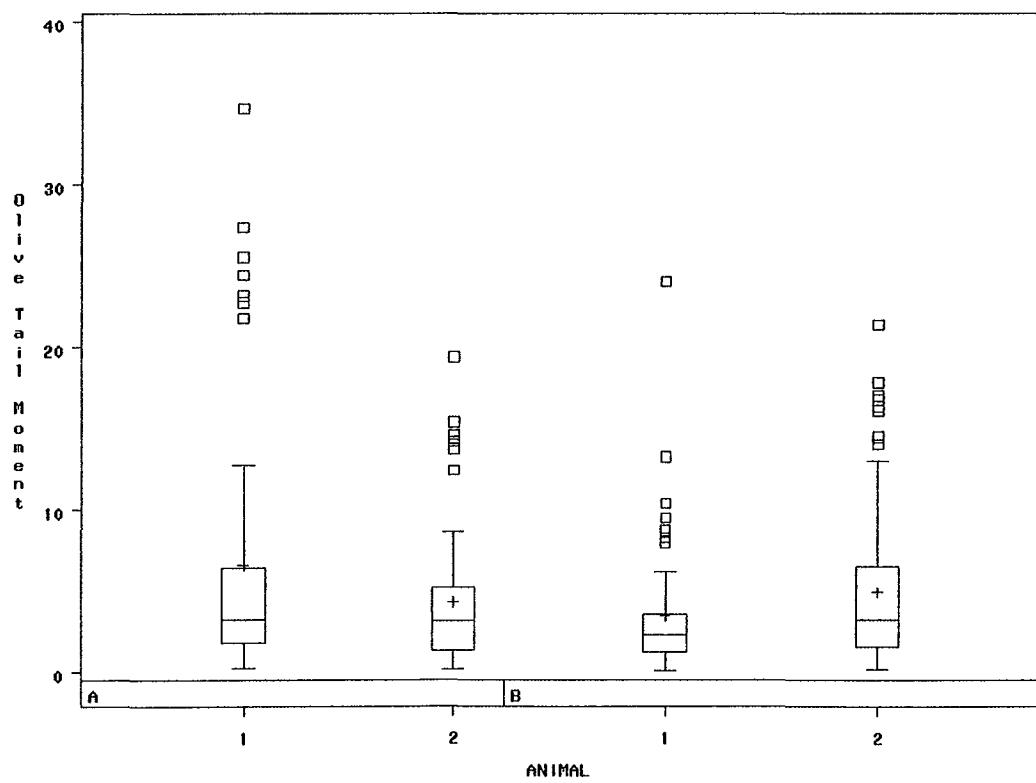
Negative control group



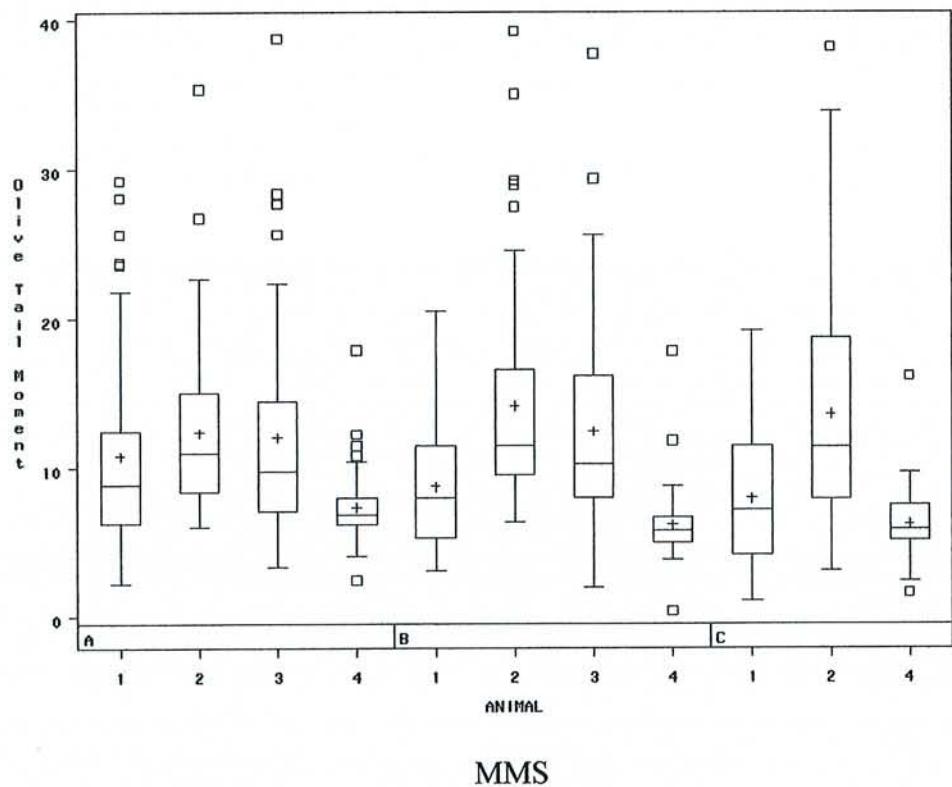
MMS

↓

Temps long



Negative control group

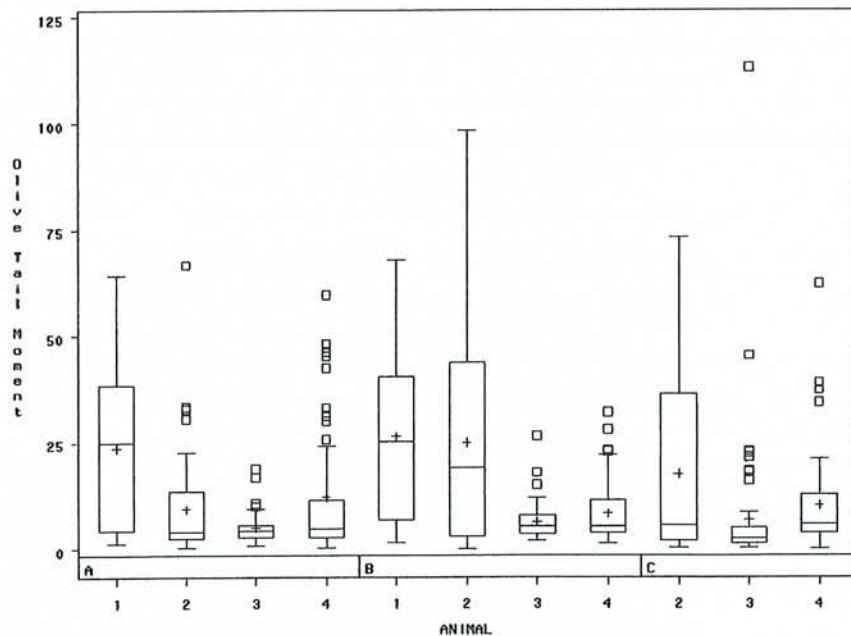


Etudes *in vivo* sur le rein

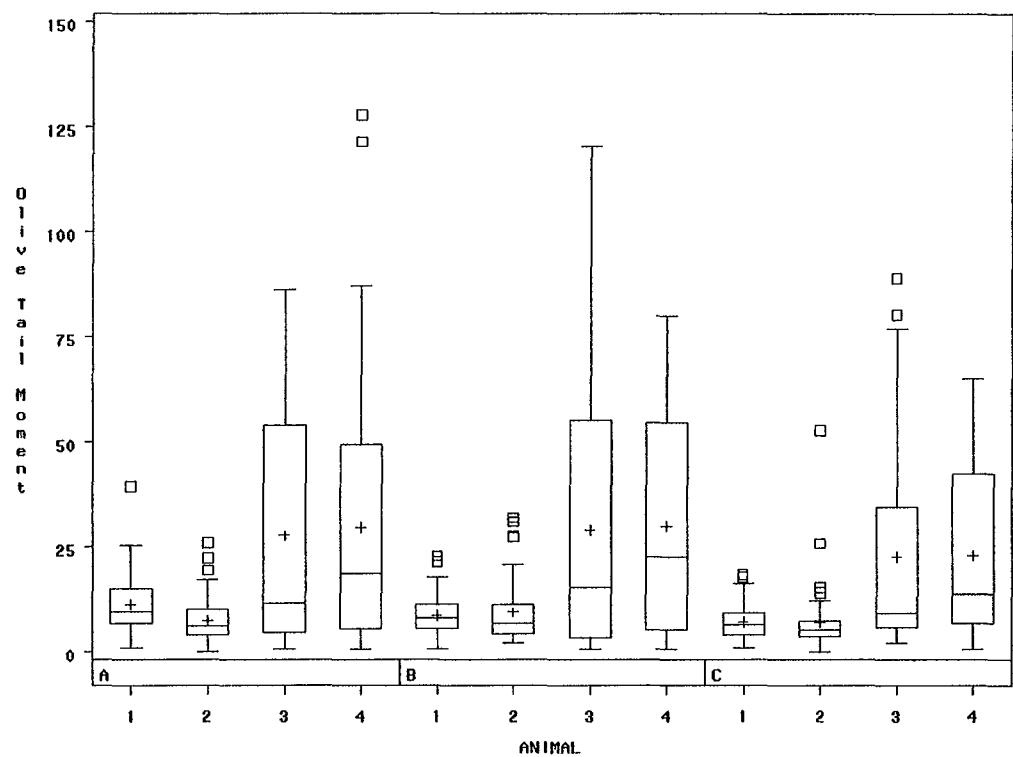
Streptozotocine



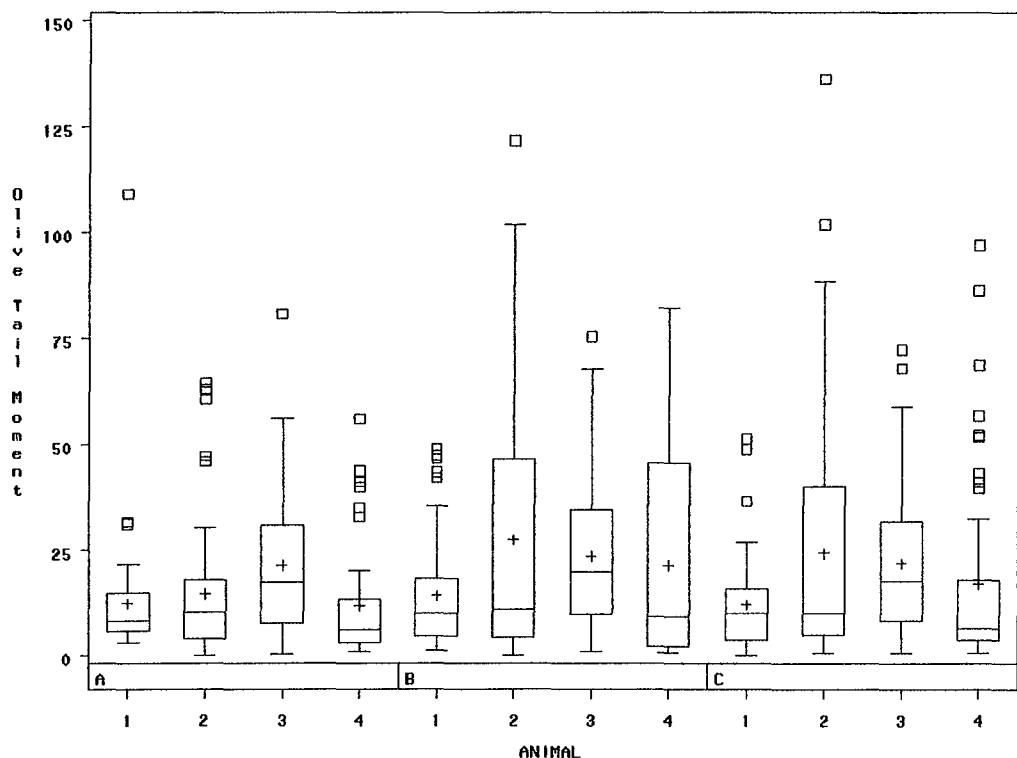
Temps court



Negative control group

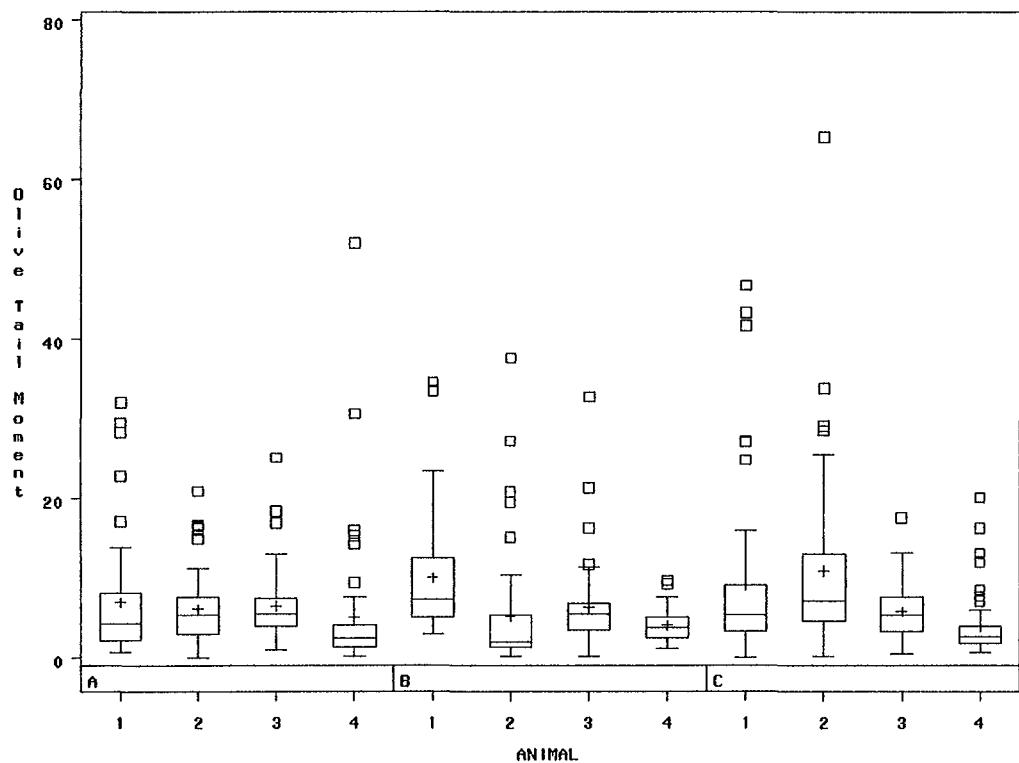


Dose 1

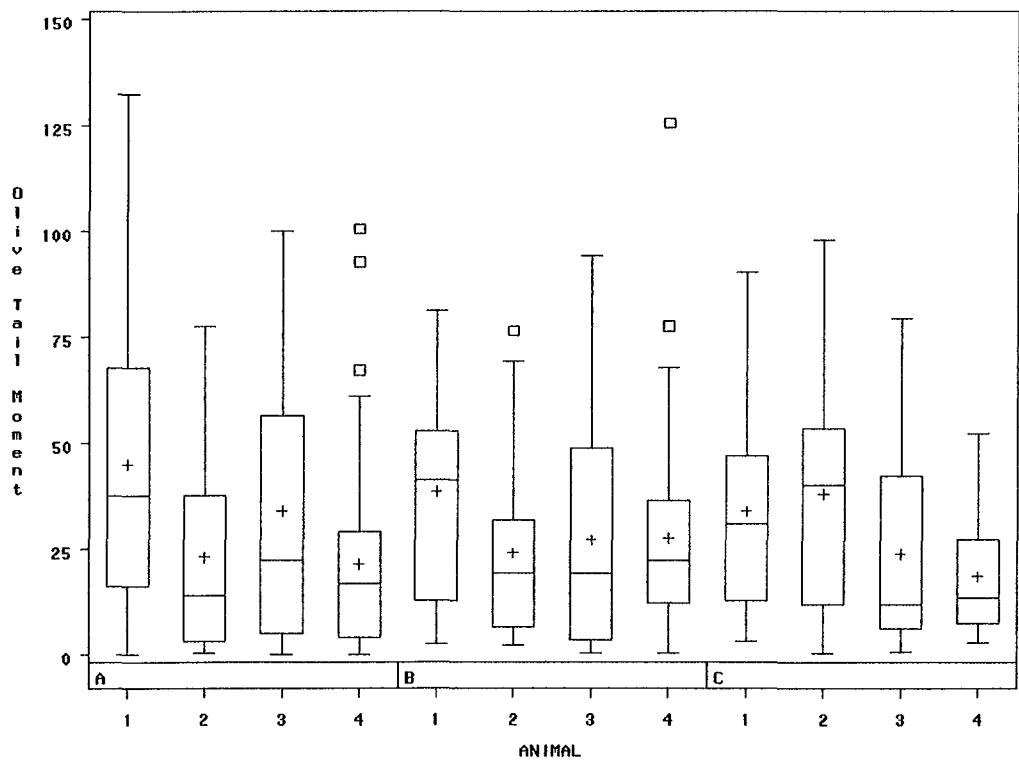


Dose 2

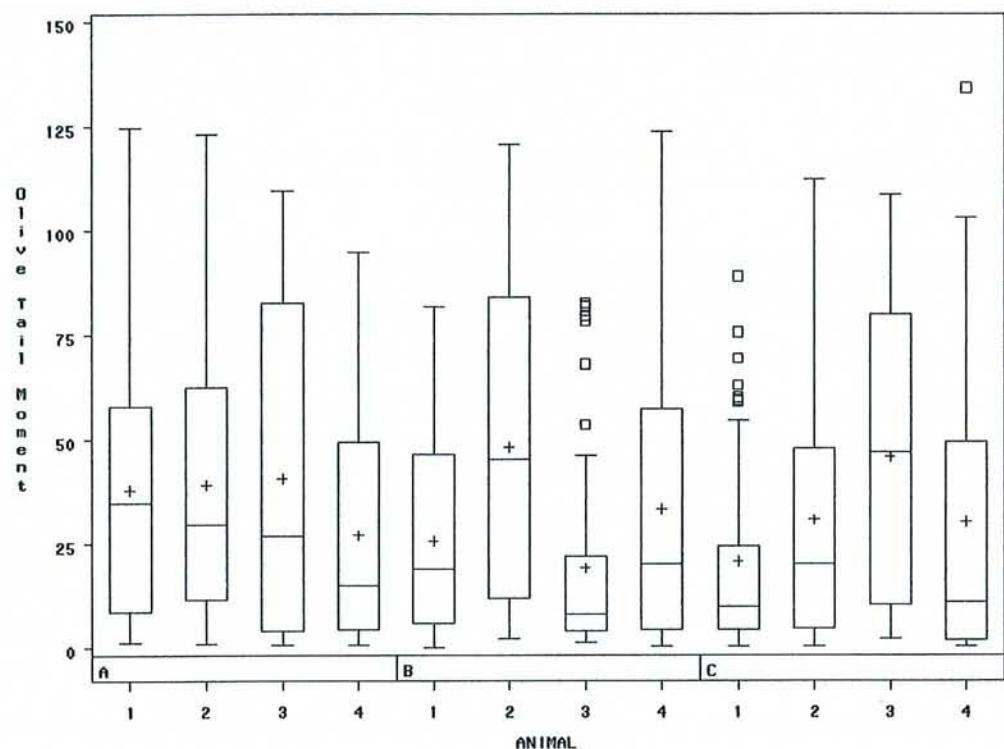
* **Temps long**



Negative control group



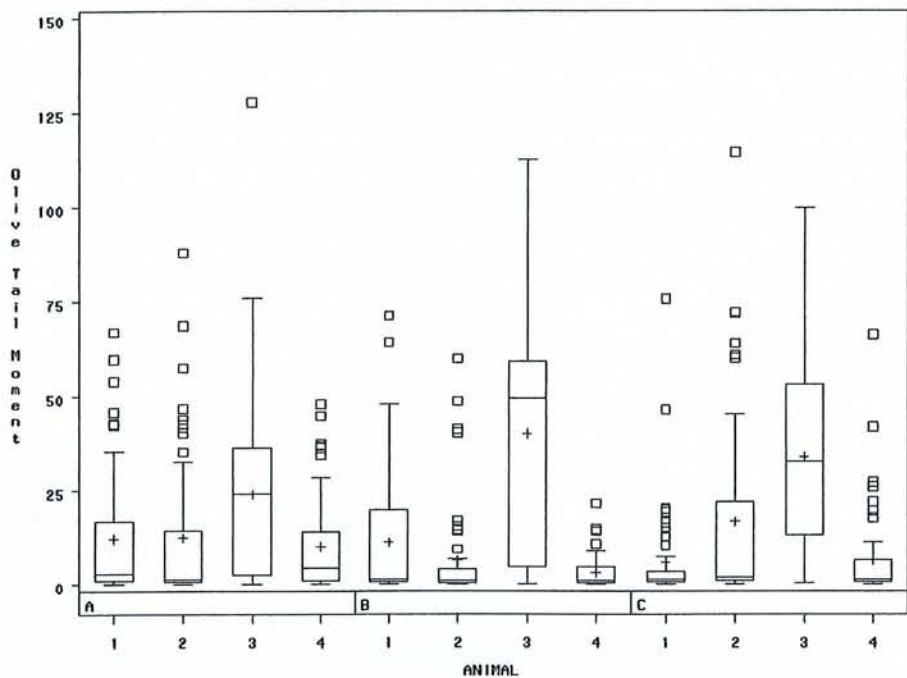
Dose 1



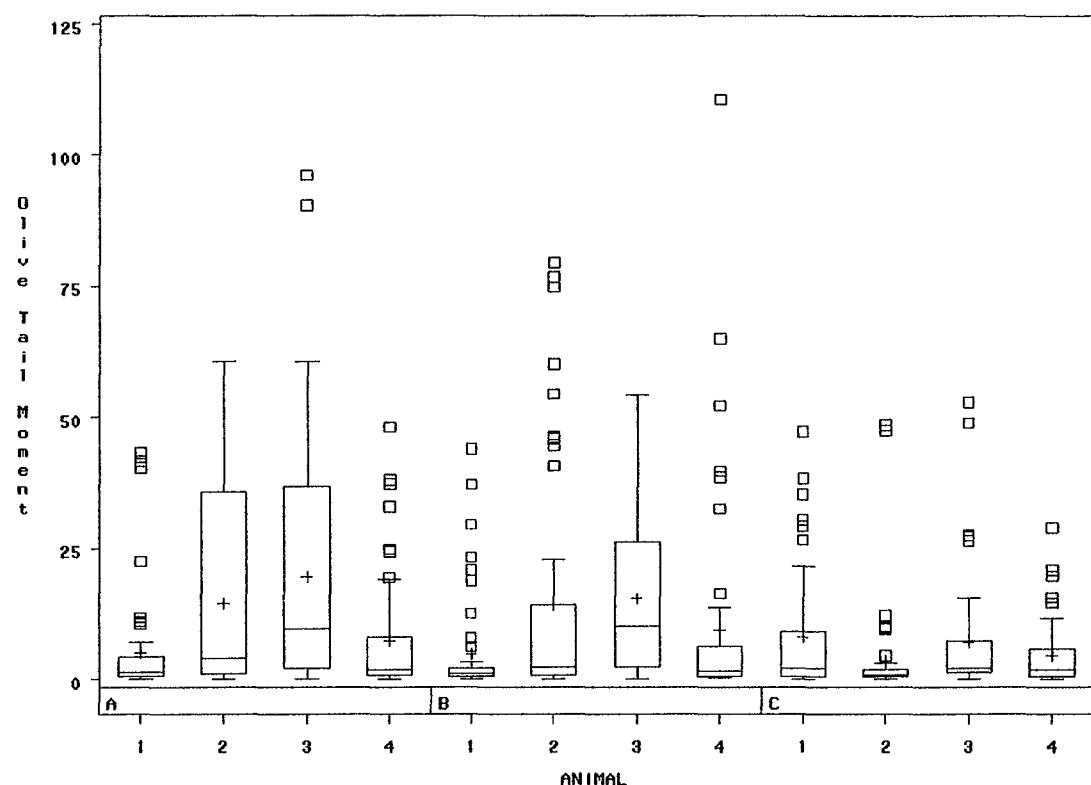
Dose 2

Acides aristolochiques

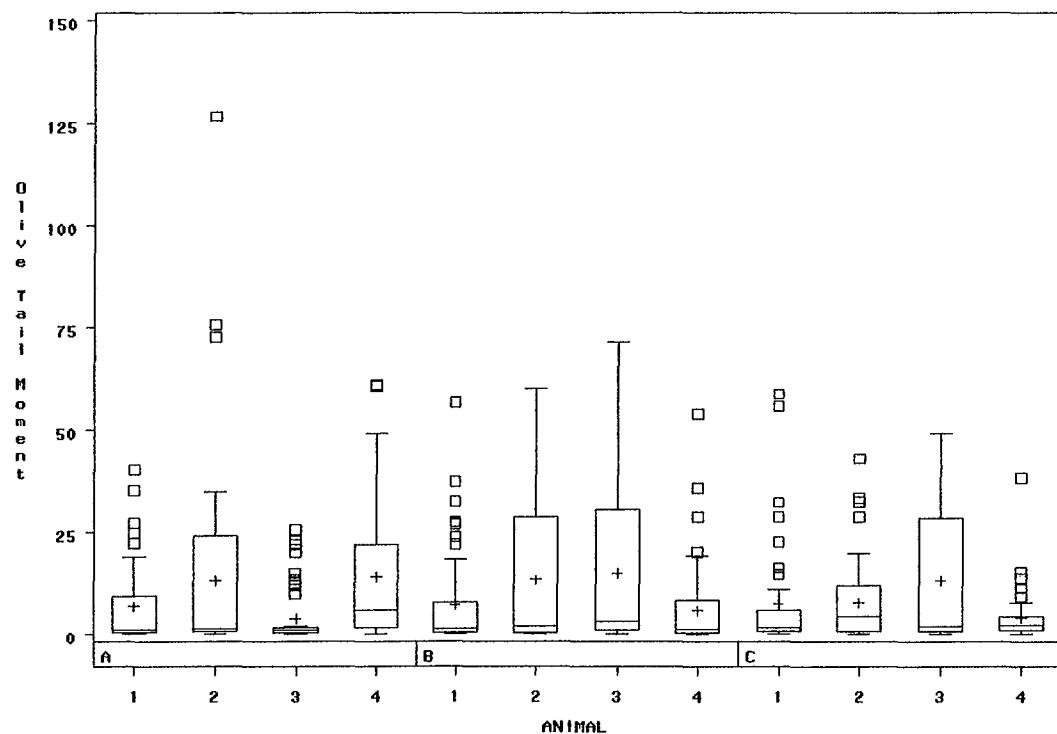
Temps court



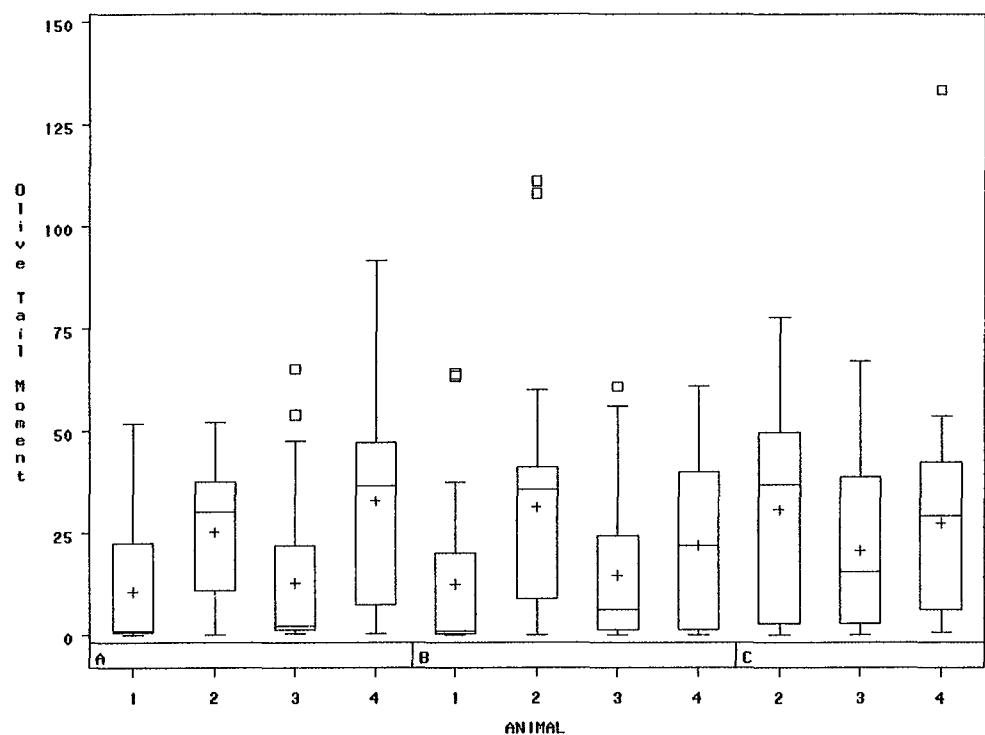
Negative control group



Dose 1

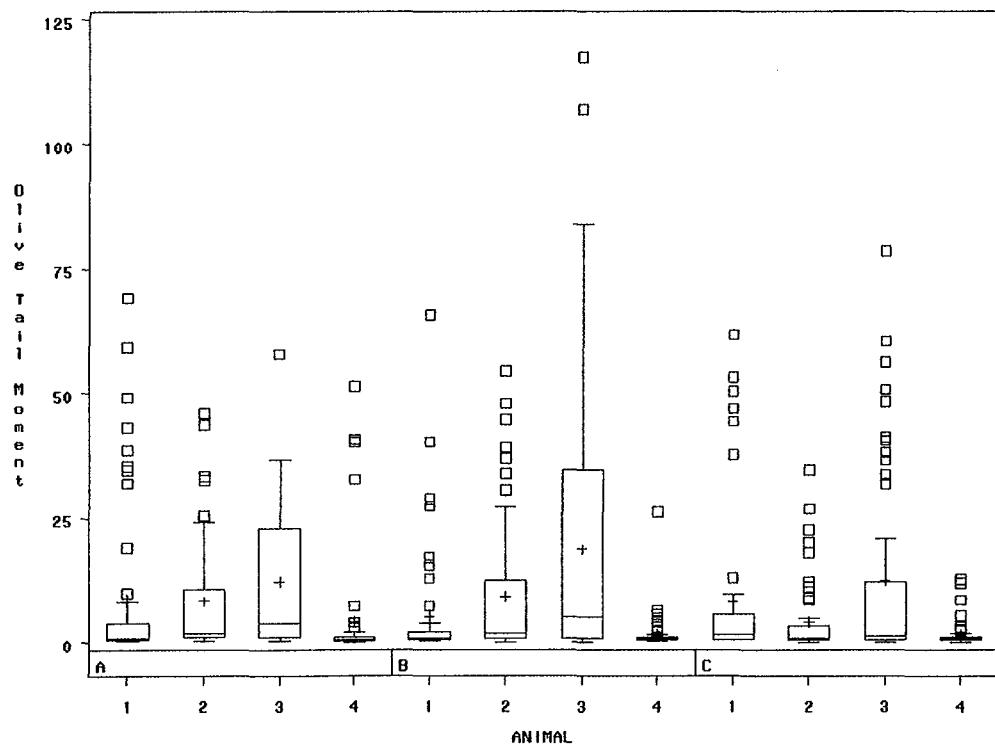


Dose 2

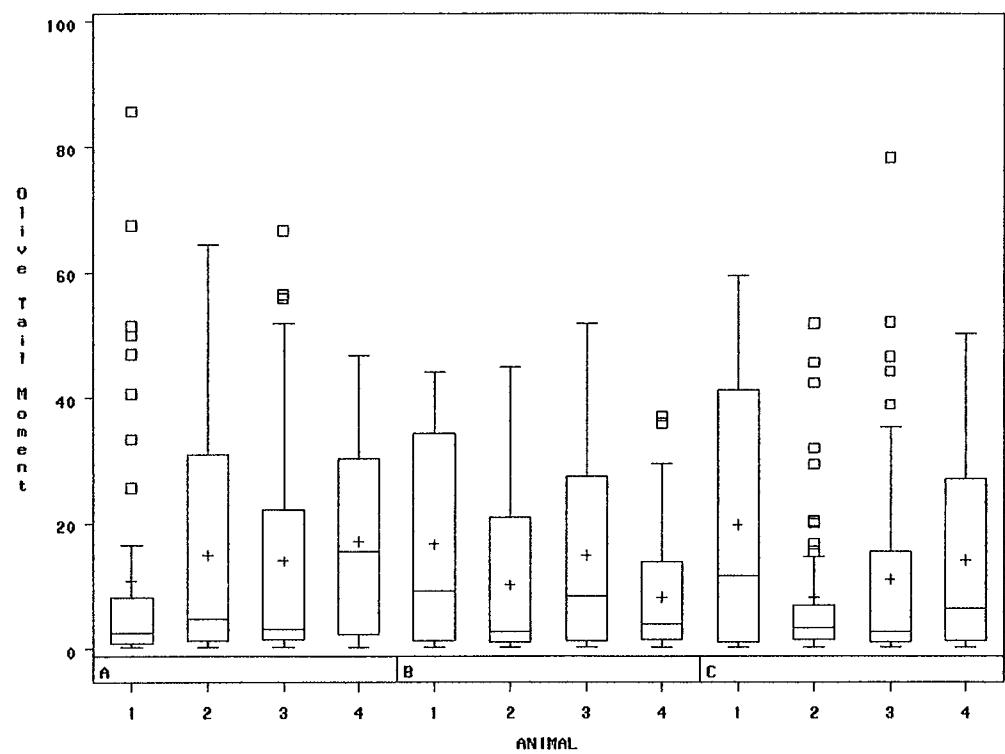


Positive control group

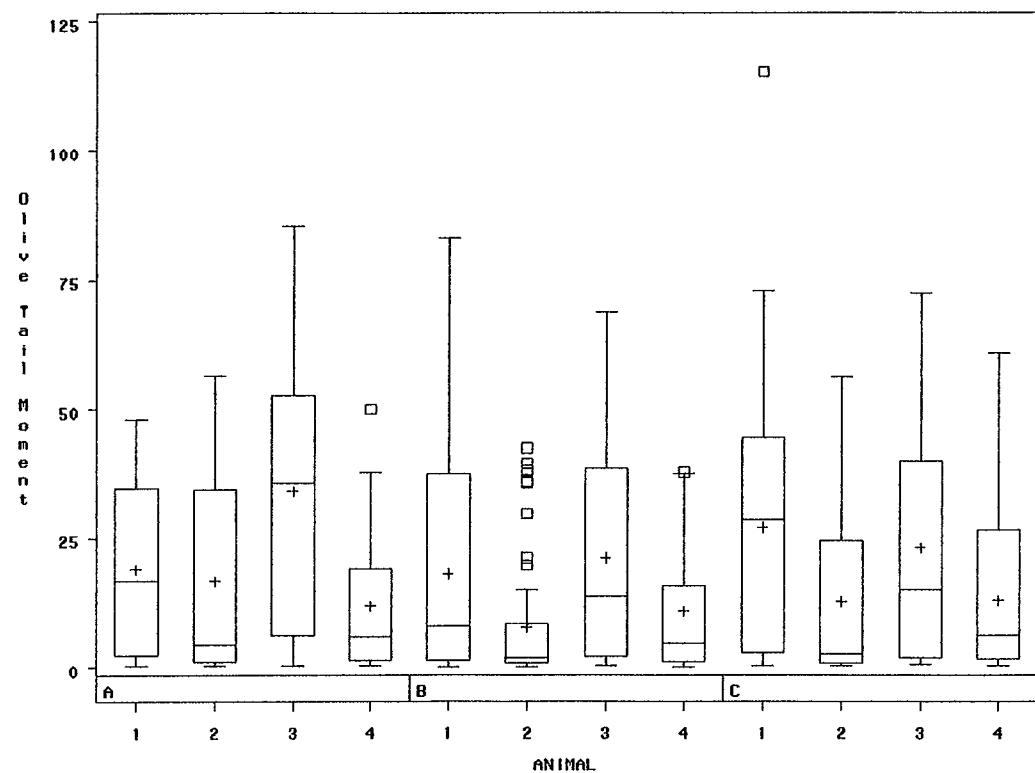
↓ **Temps long**



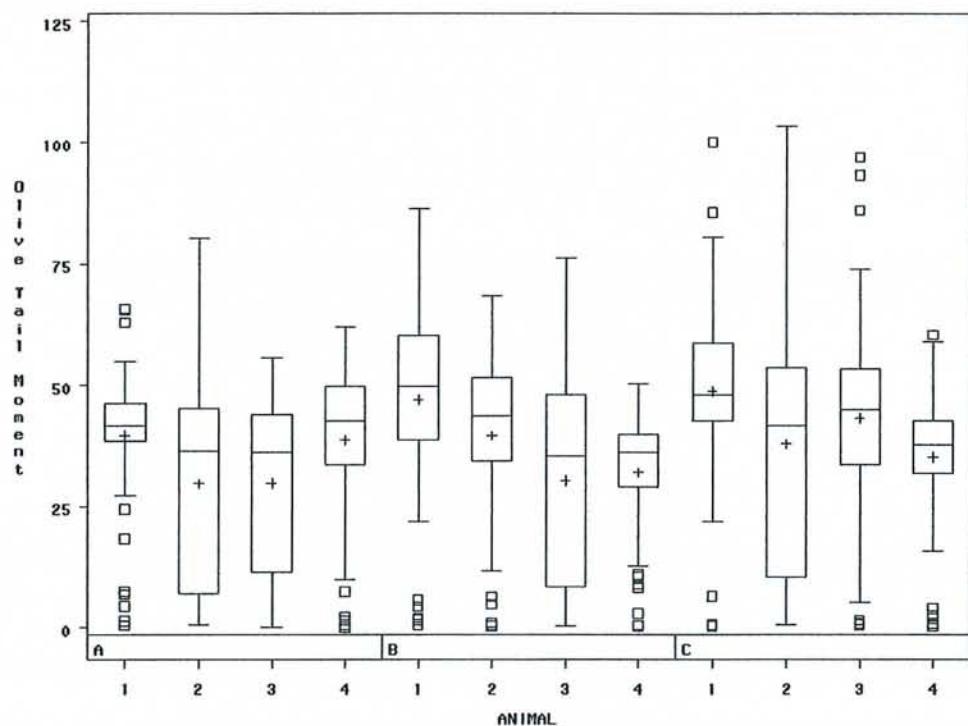
Negative control group



Dose 1



Dose 2

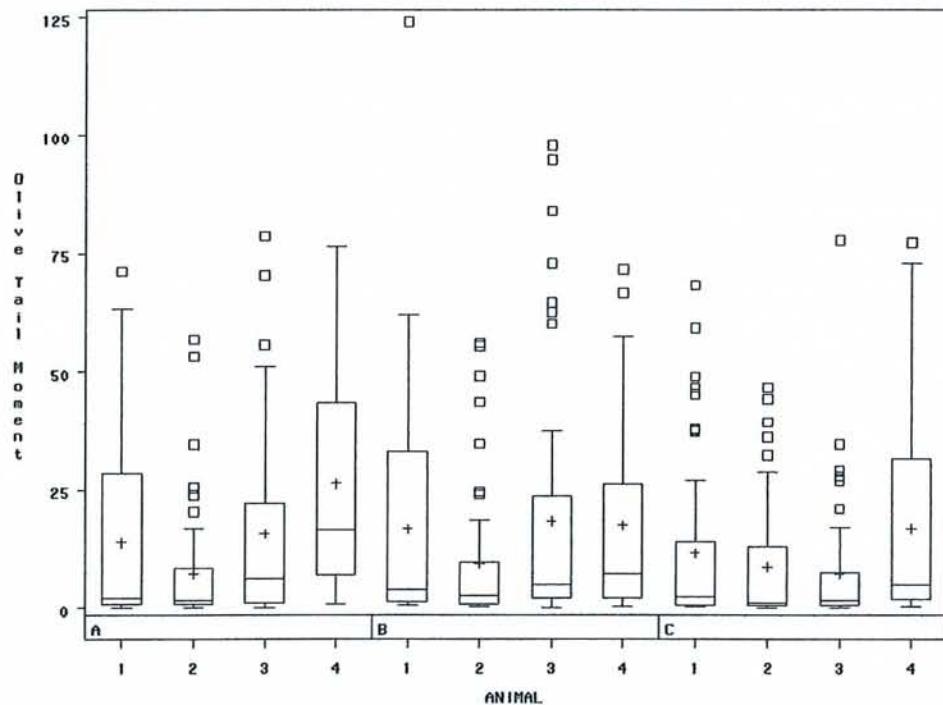


Positive control group

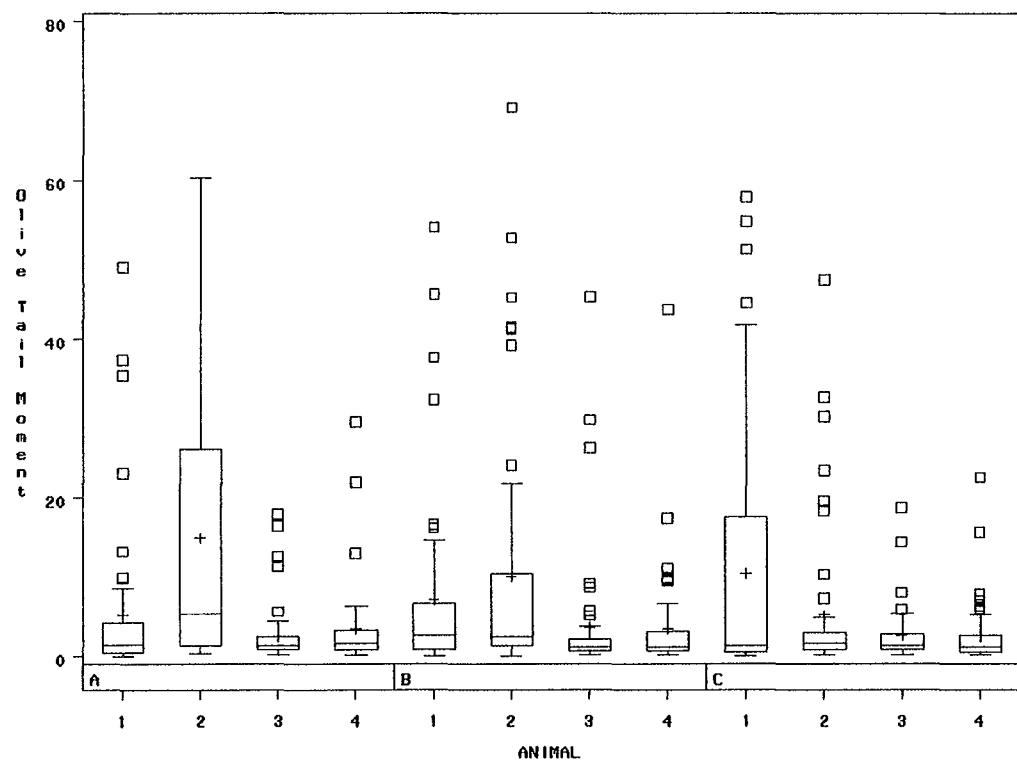
Ortho-Nitroanisole



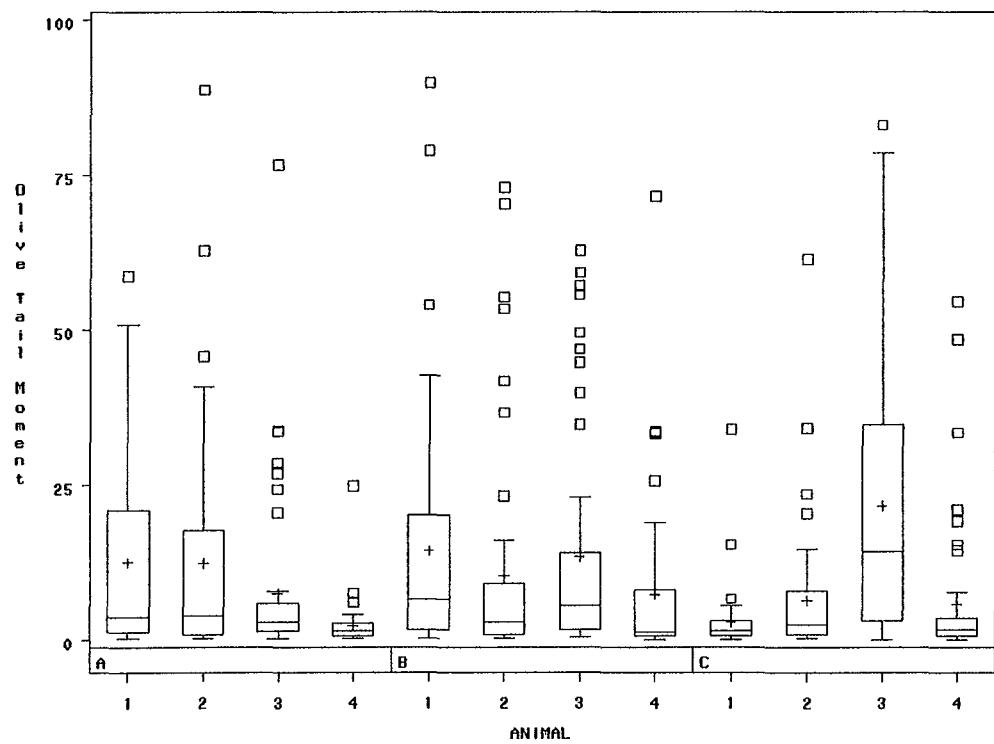
Temps court



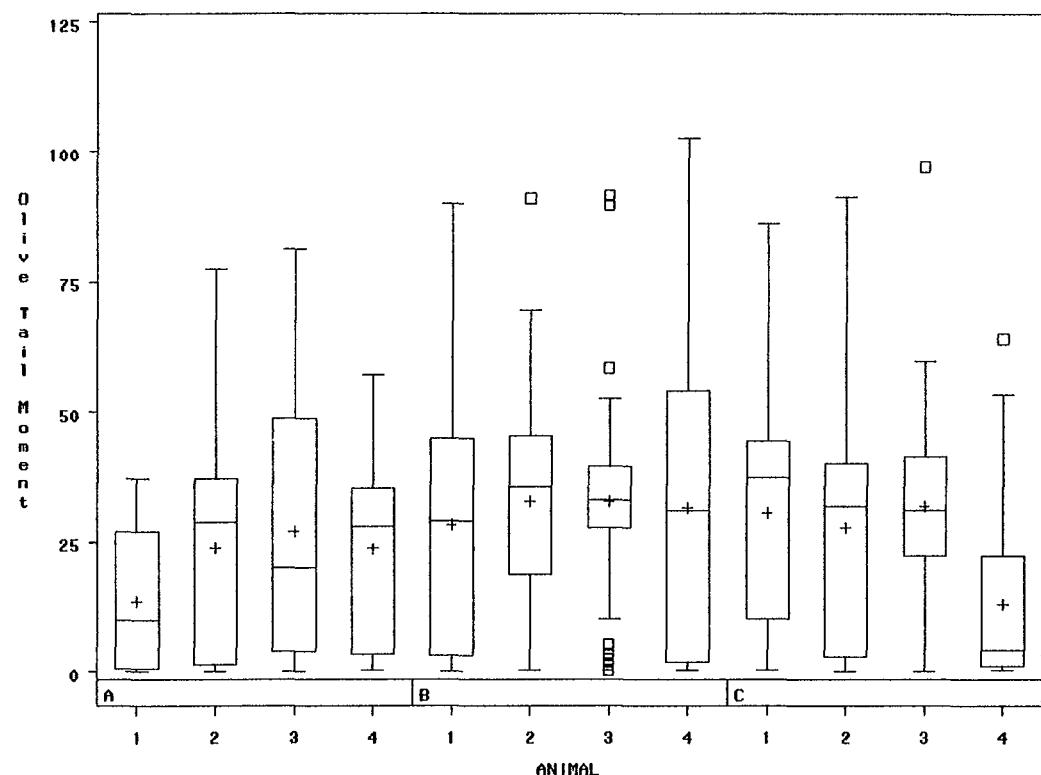
Negative control group



Dose 1

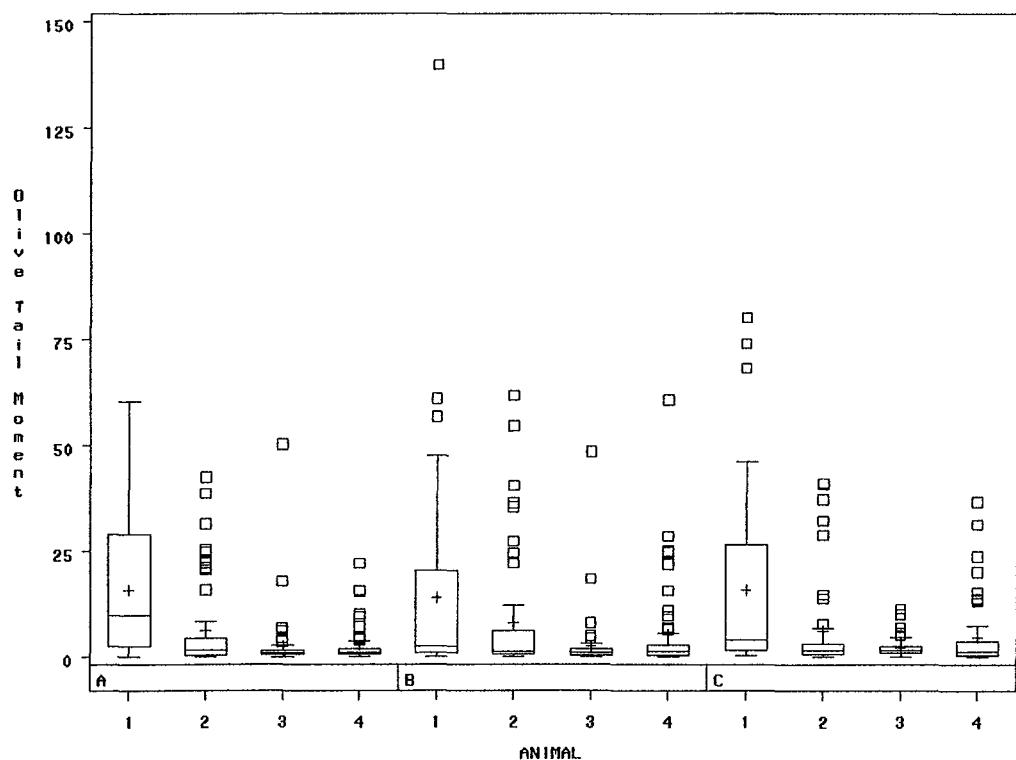


Dose 2

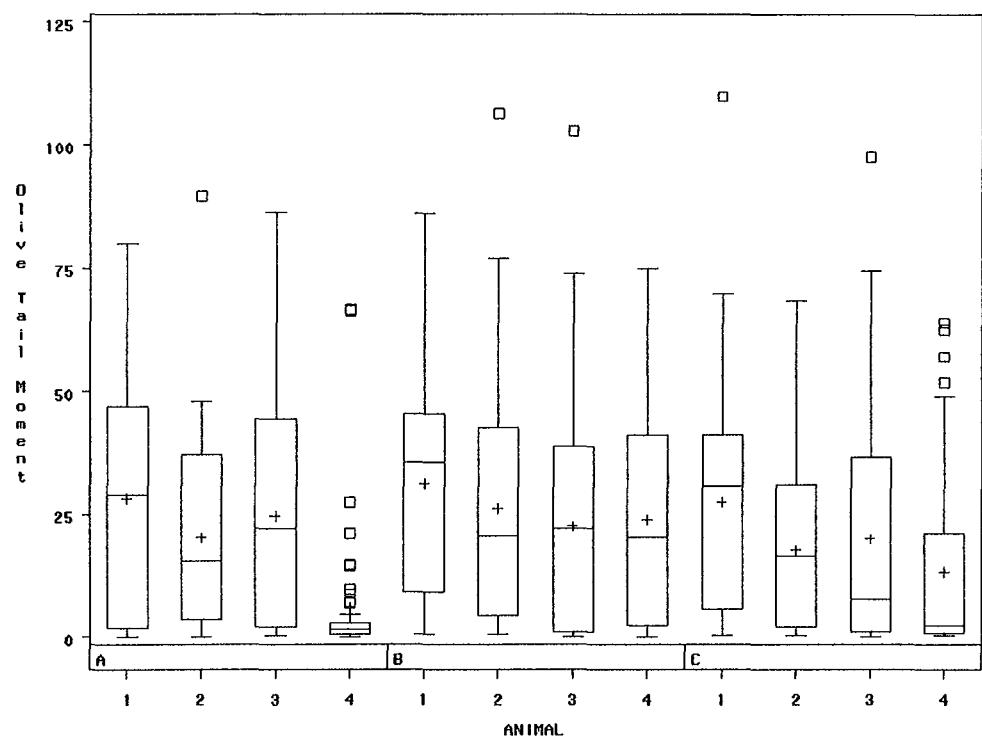


Positive control group

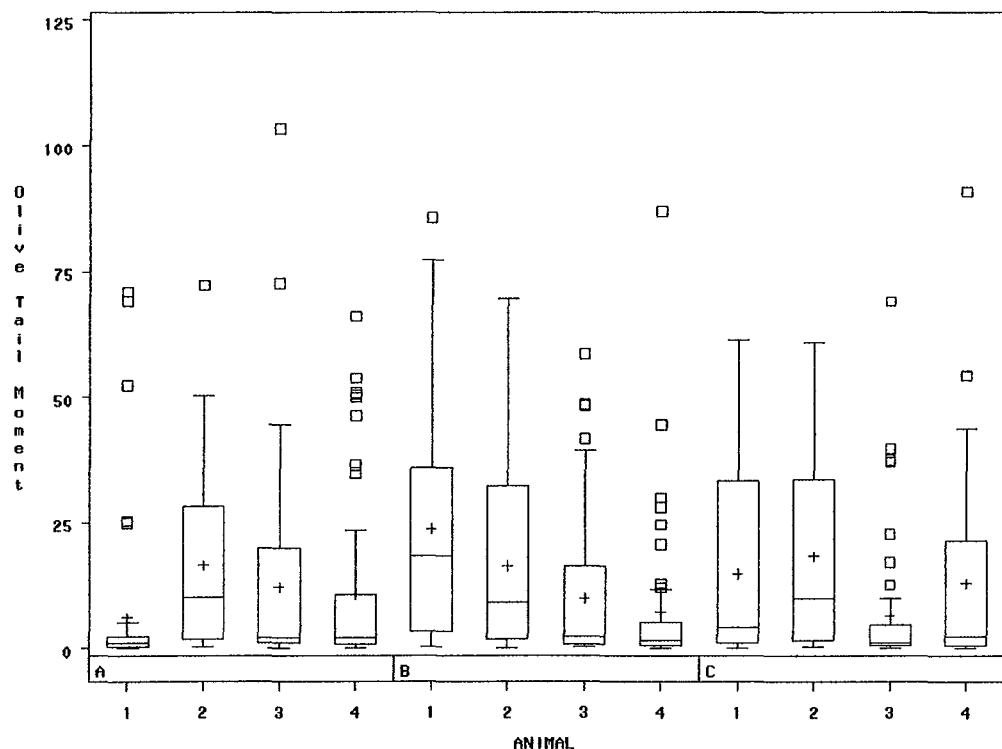
↓ **Temps long**



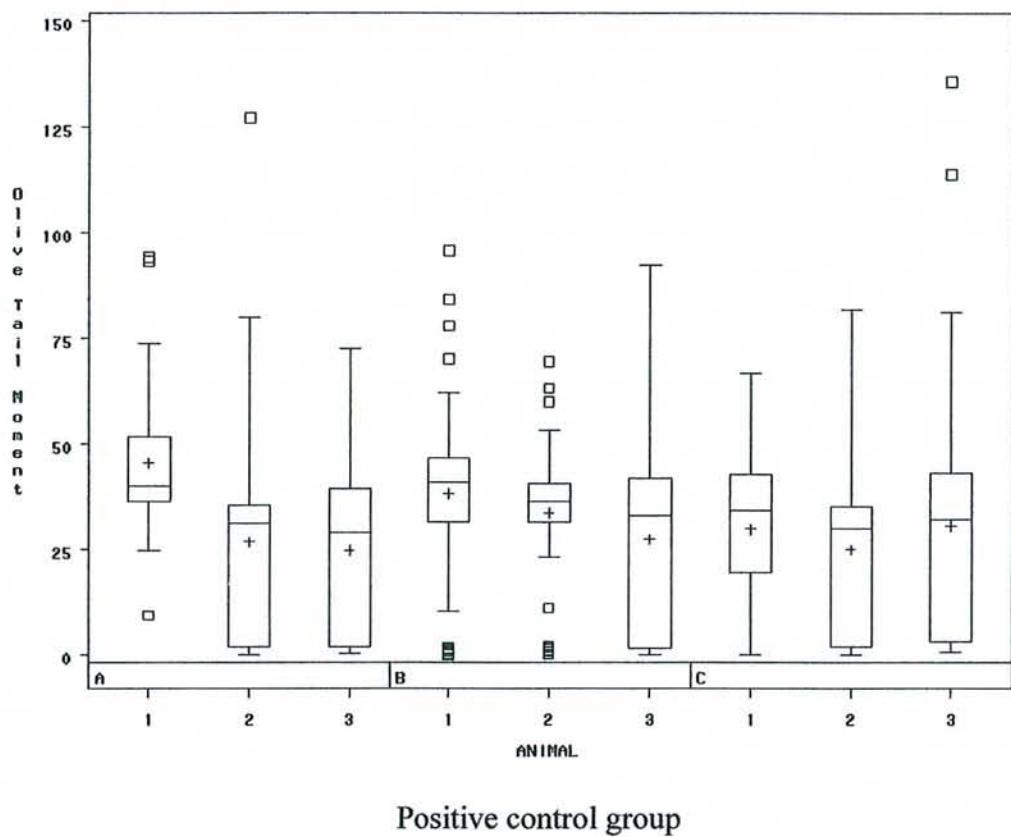
Negative control group



Dose 1

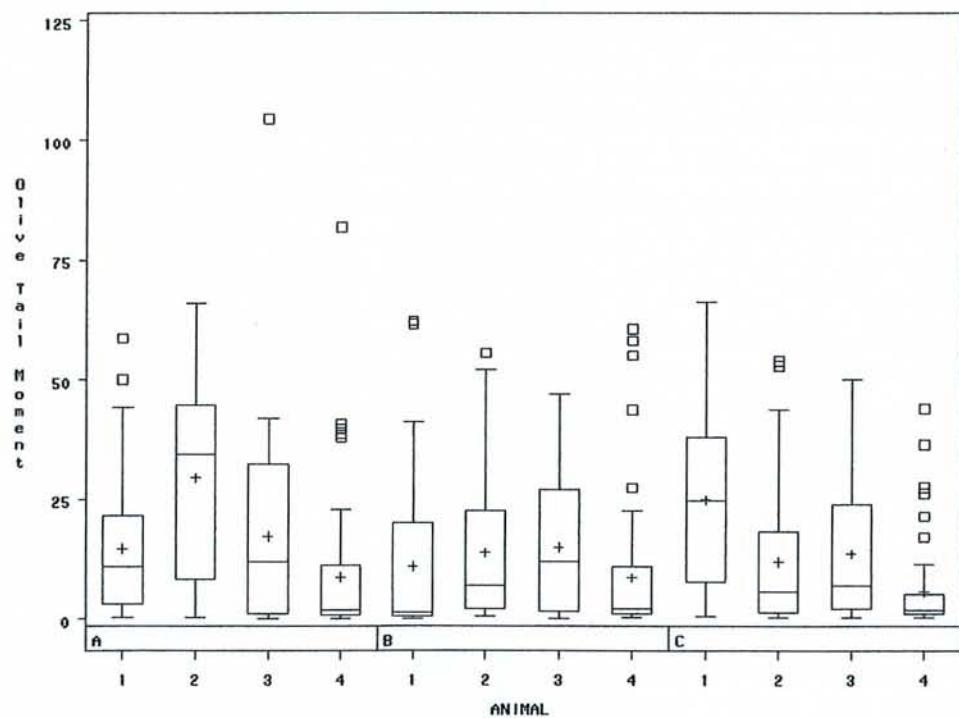


Dose 2

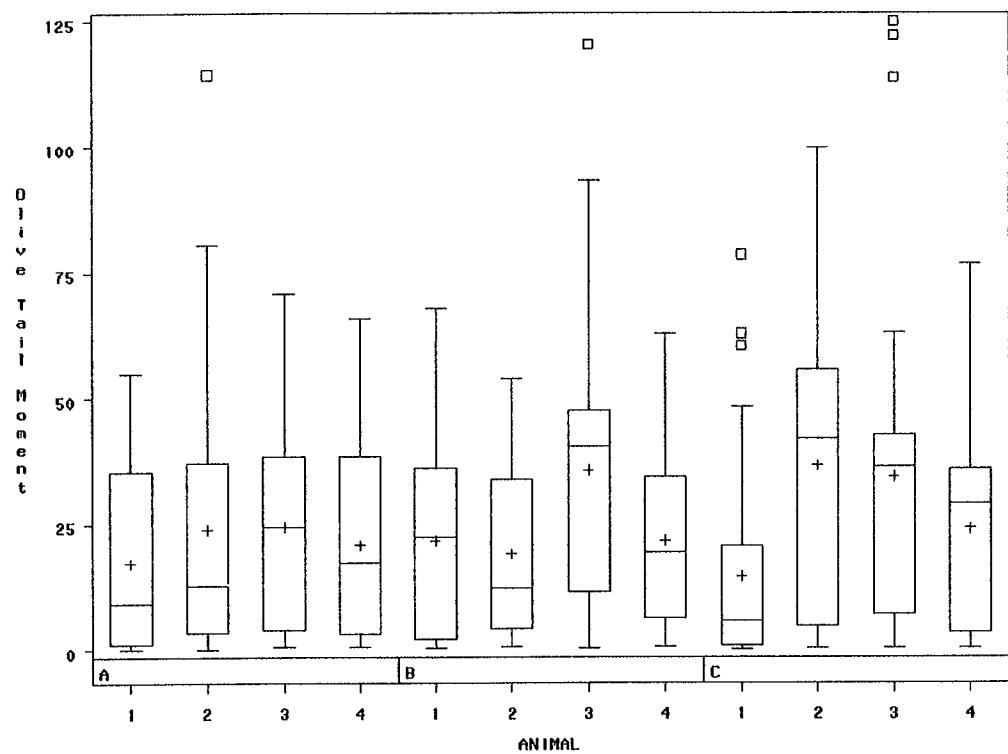


Acide Nitrilotriacétique (NTA)

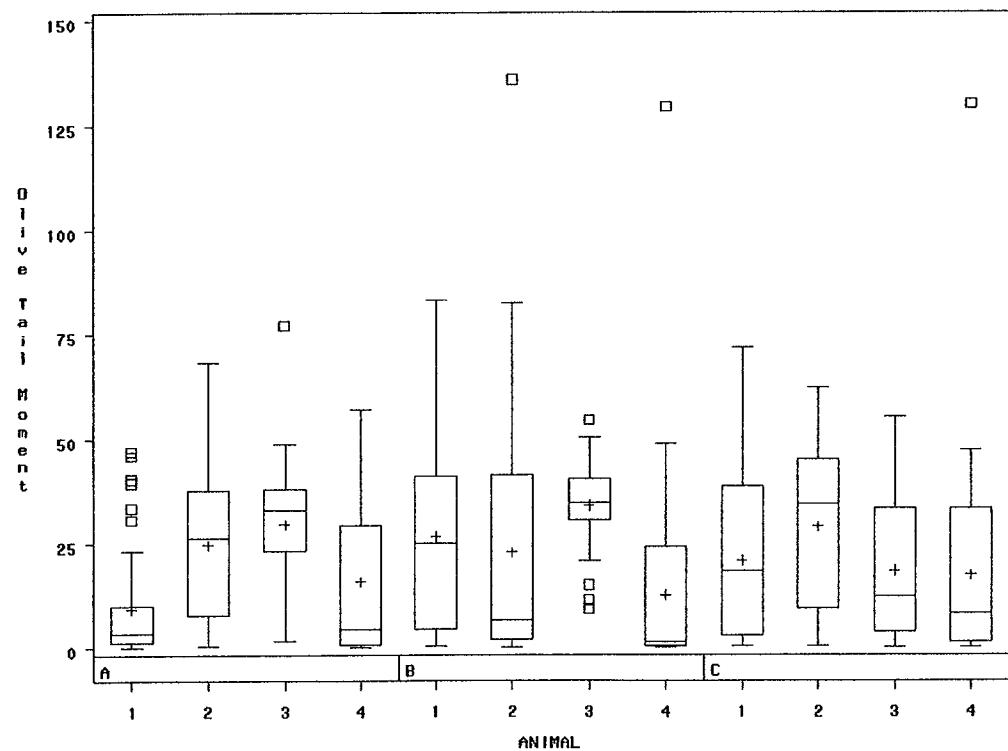
Temps court



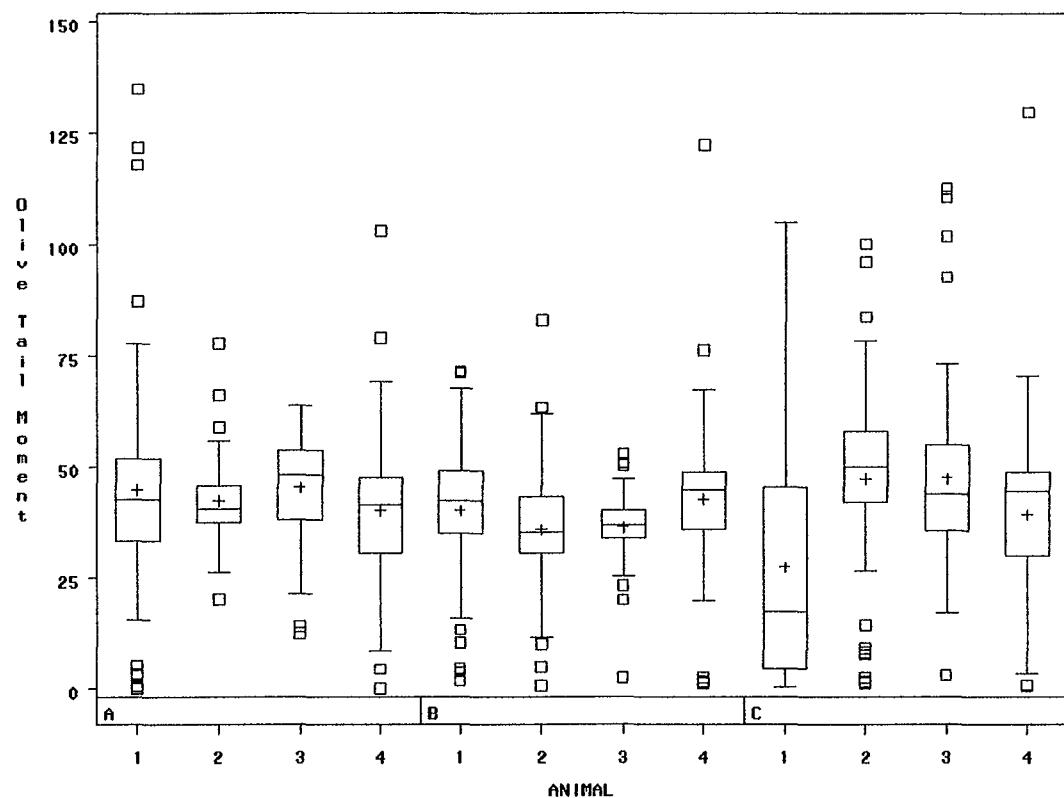
Negative control group



Dose 1

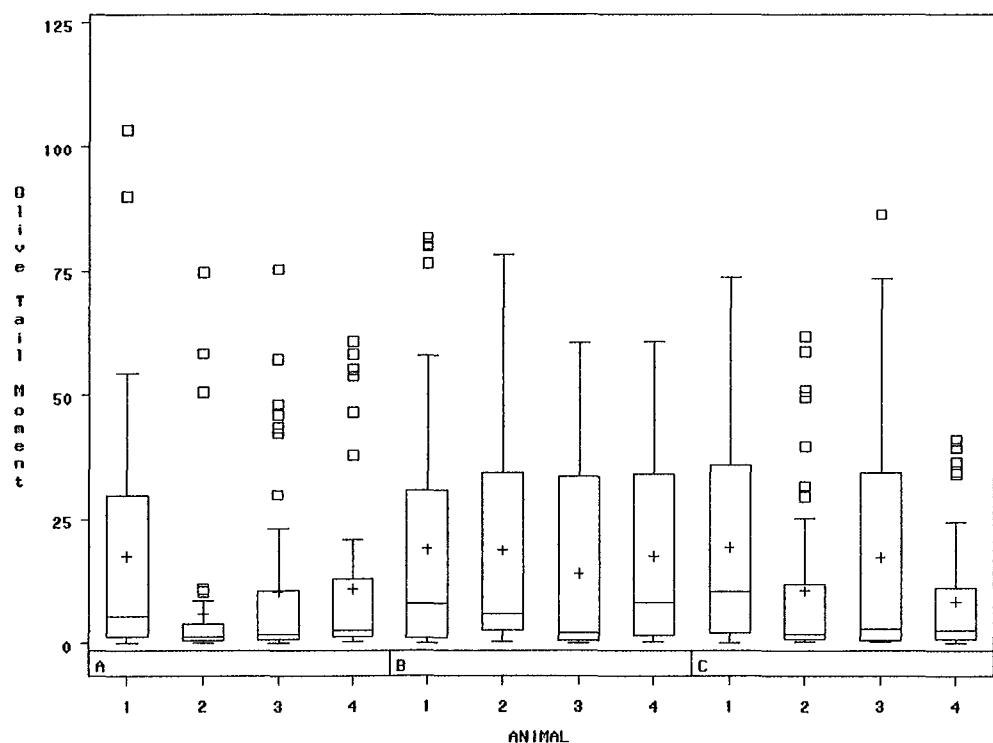


Dose 2

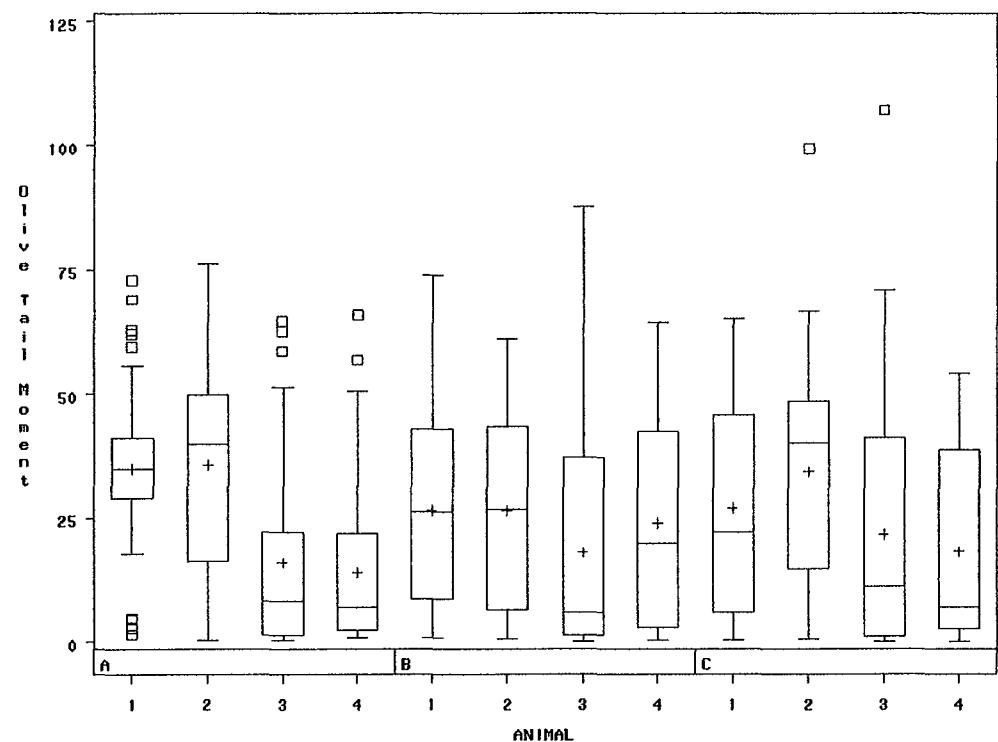


Positive control group

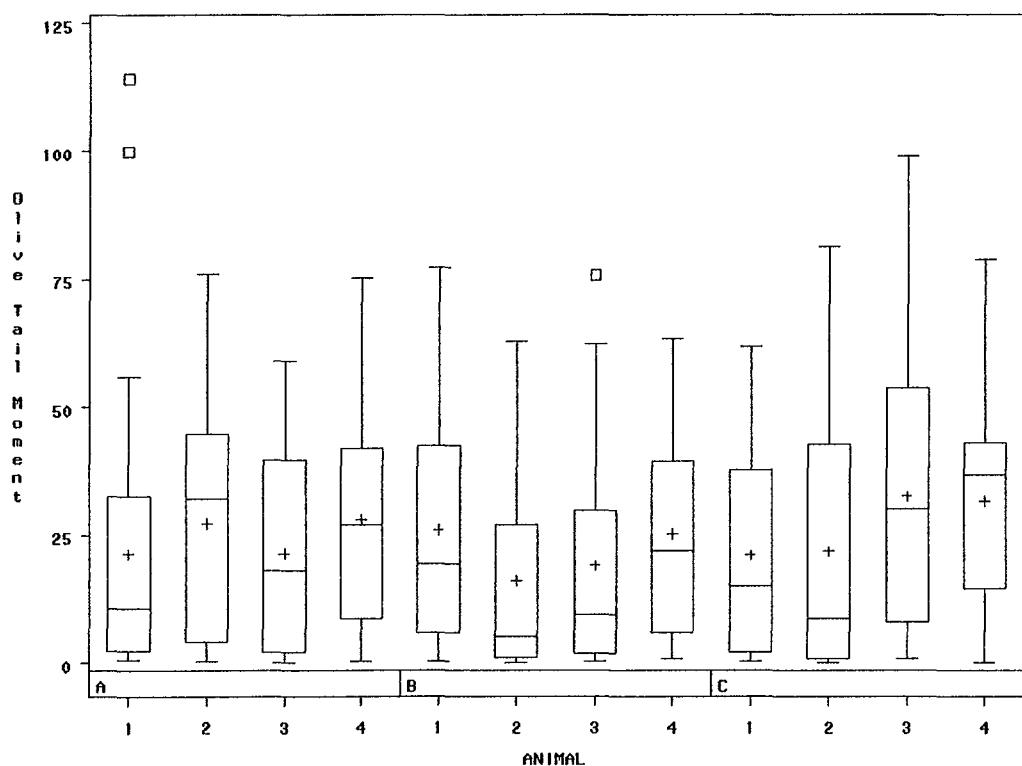
✿ Temps long



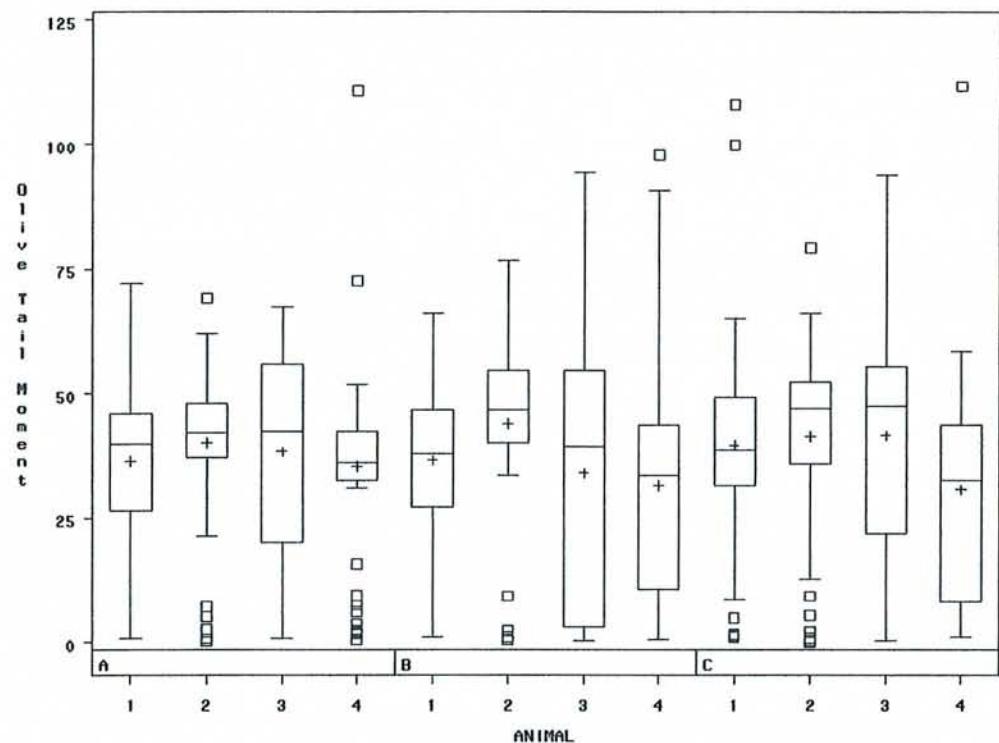
Negative control group



Dose 1



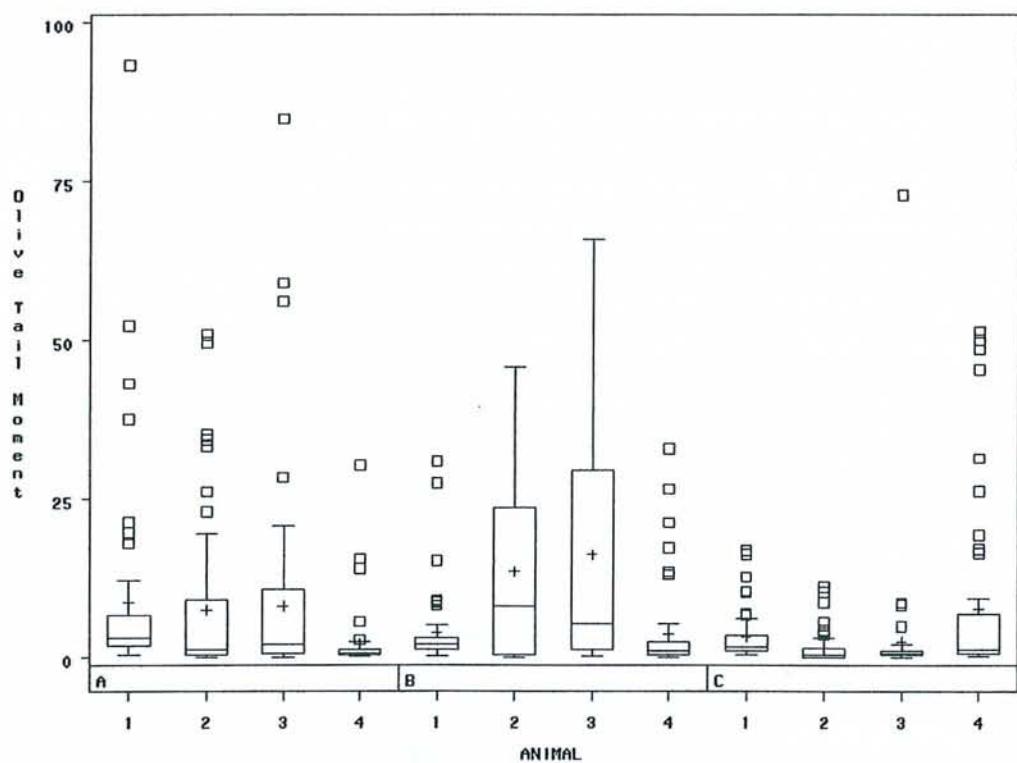
Dose 2



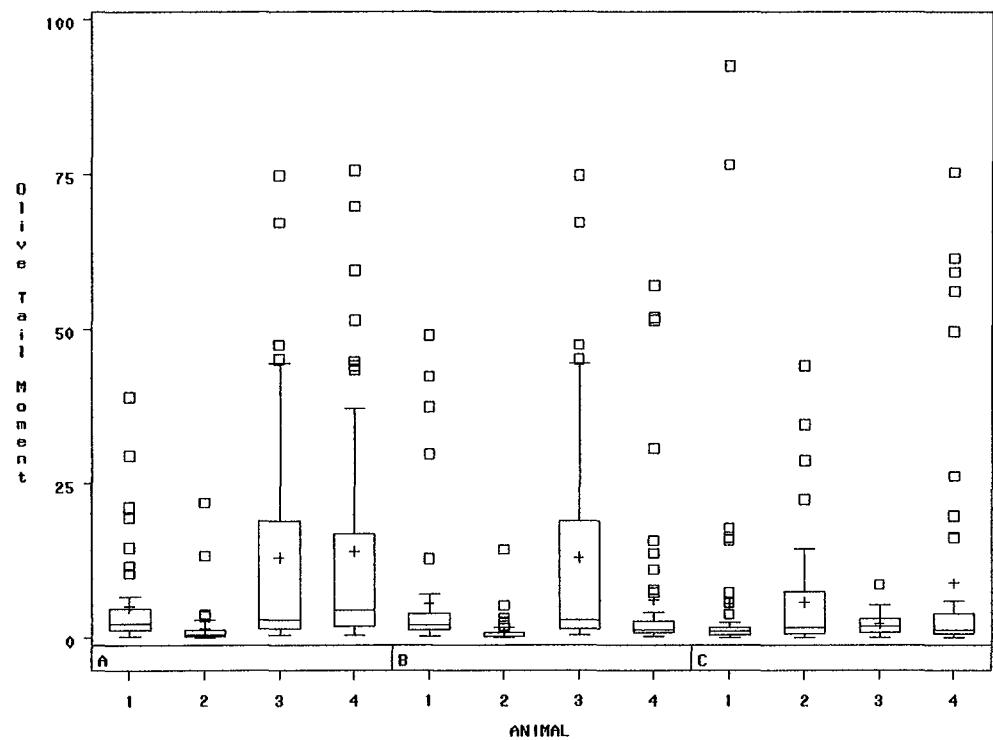
Positive control group

Indométacine

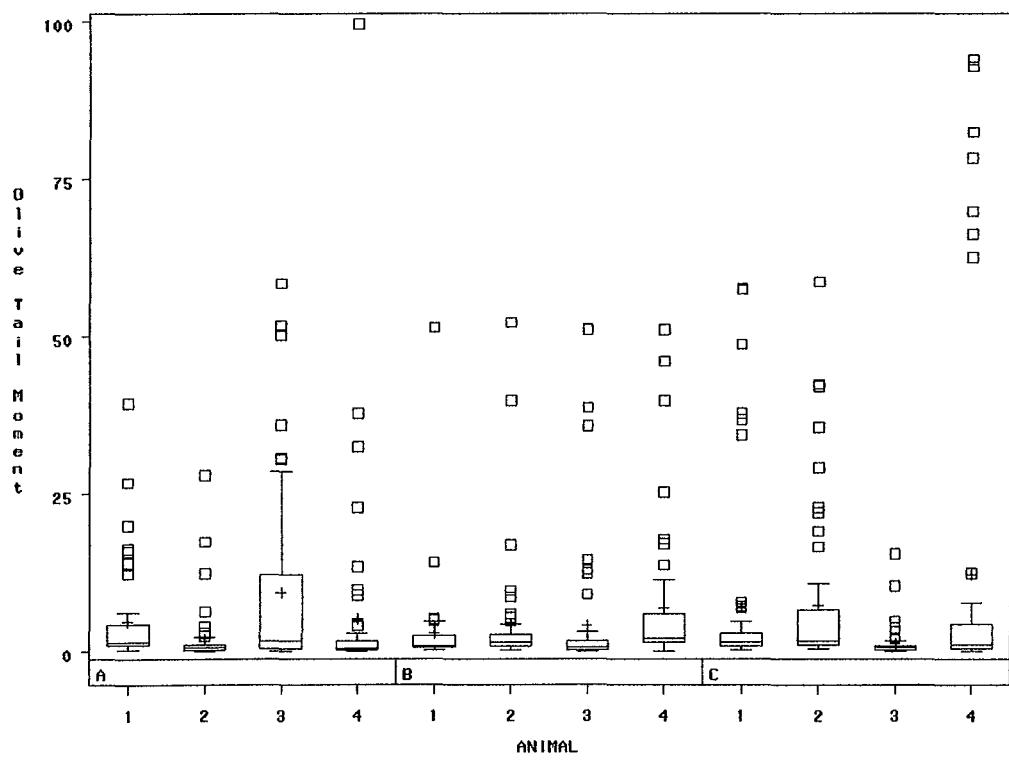
Temps court



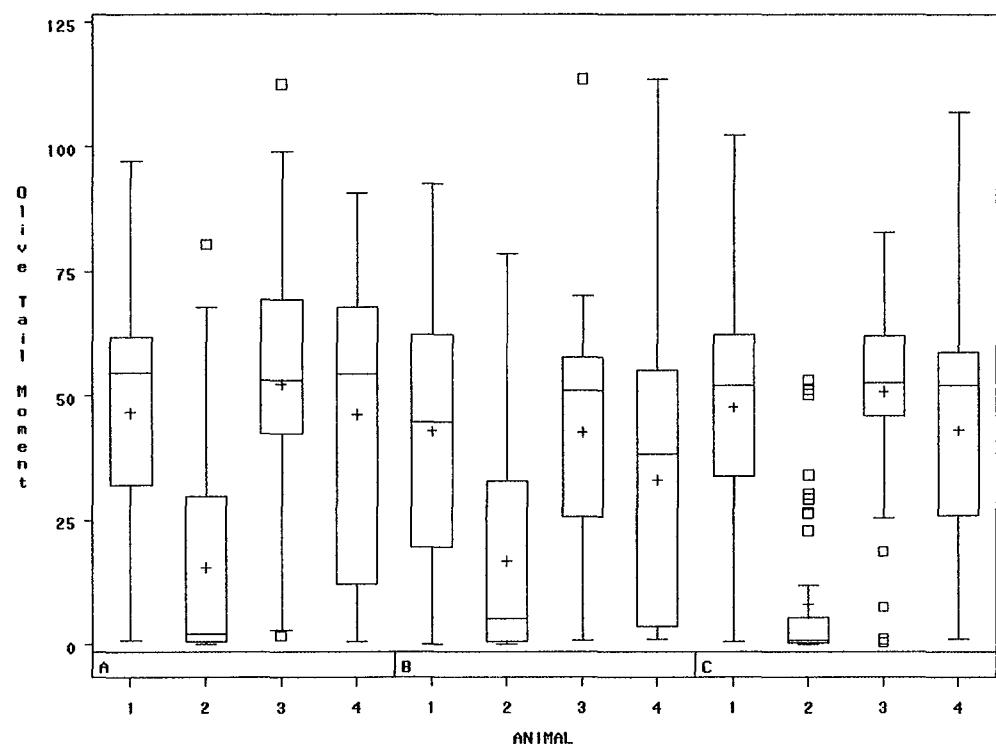
Negative control group



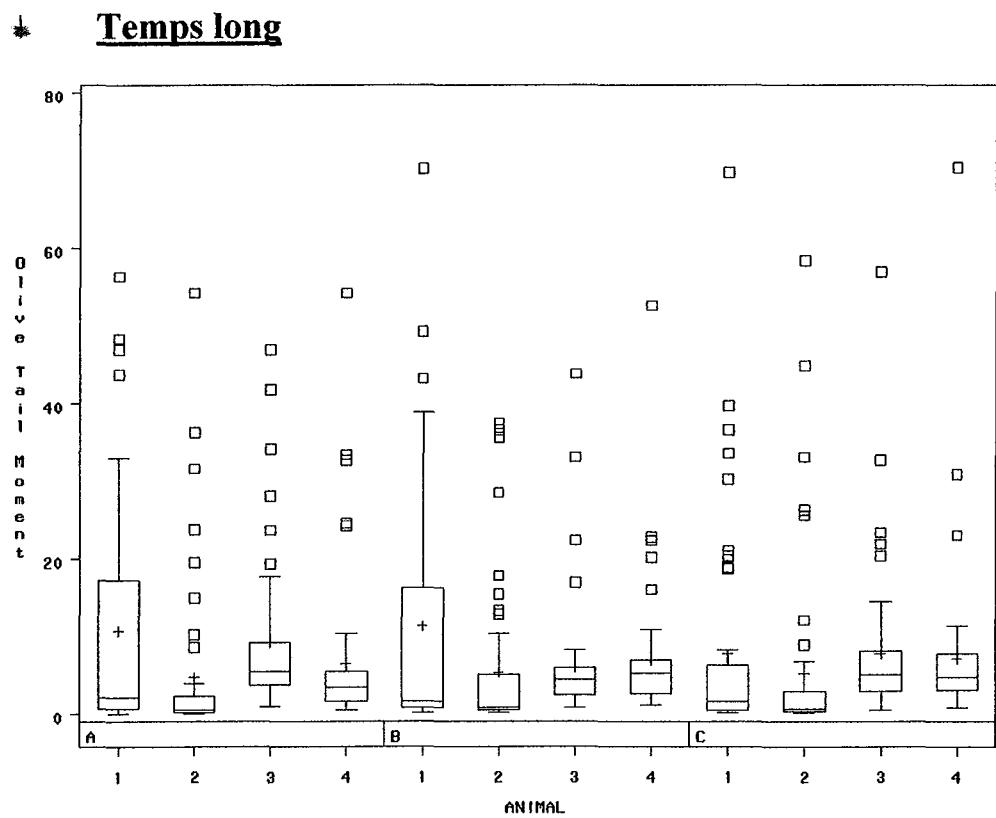
Dose 1



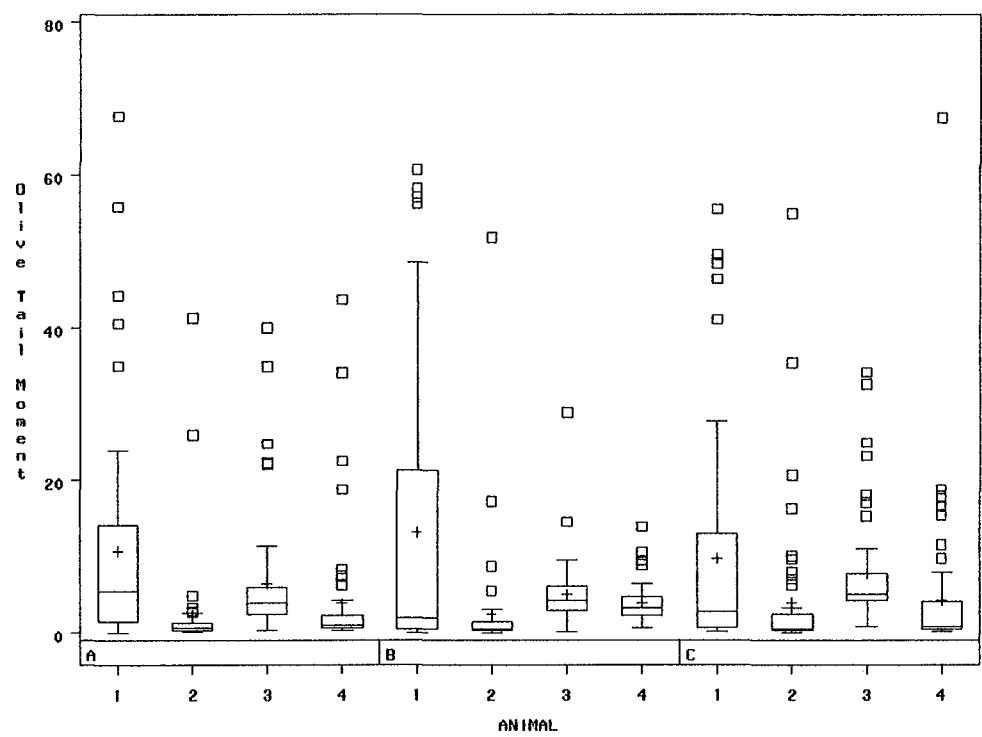
Dose 2



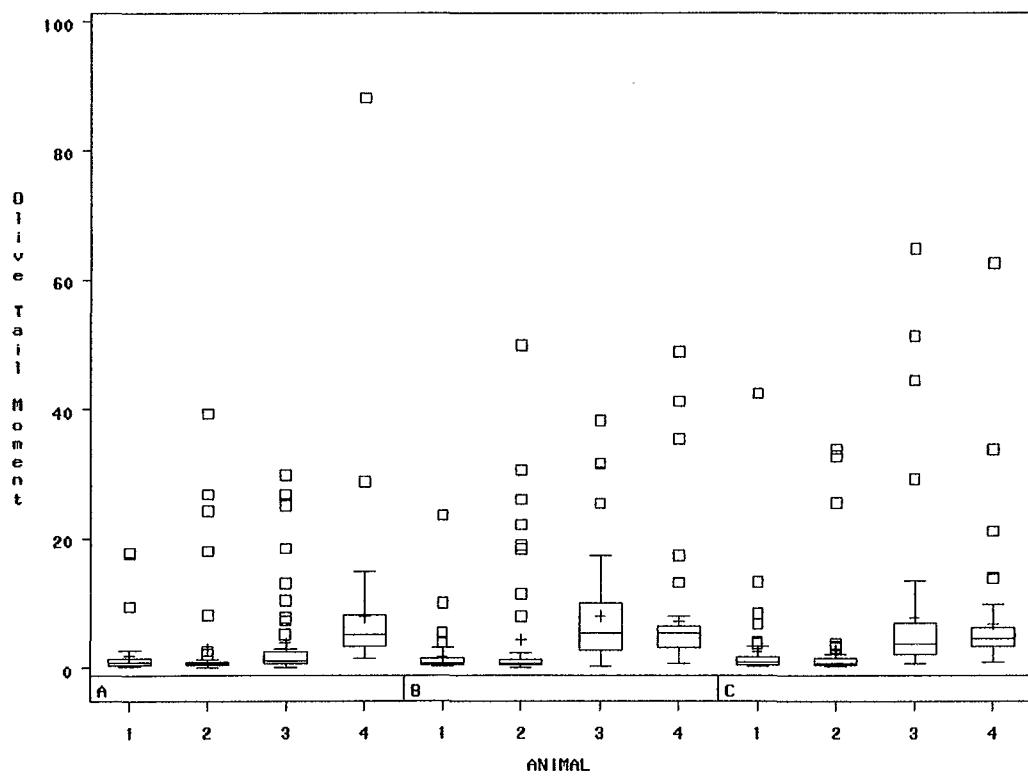
Positive control group



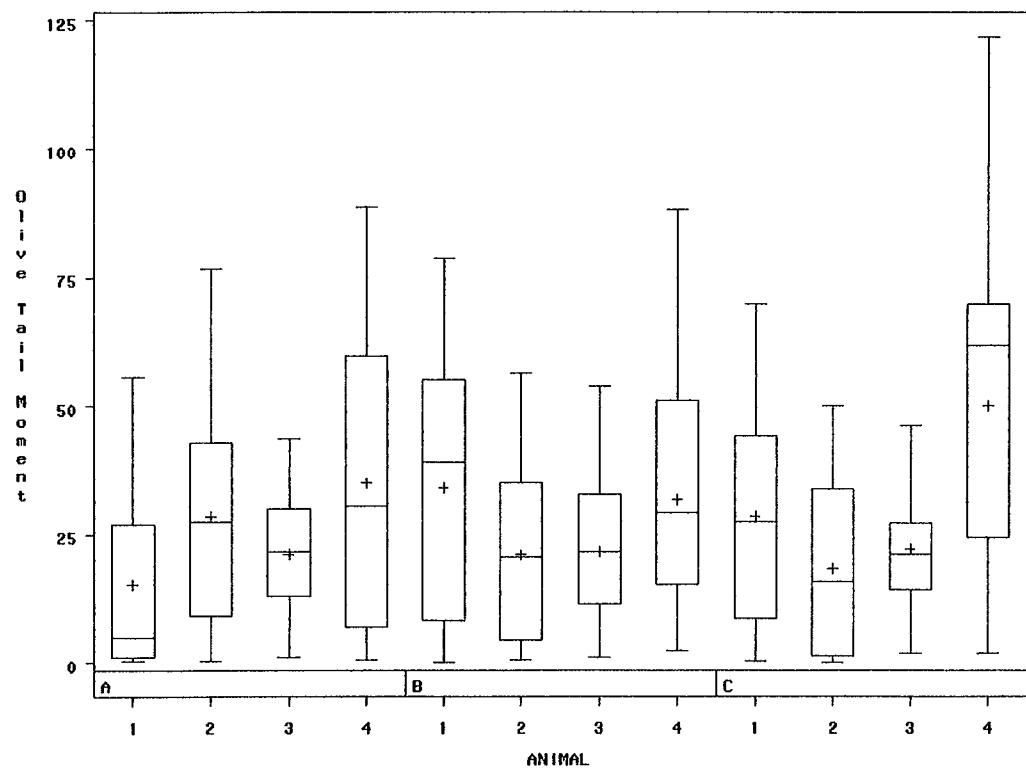
Negative control group



Dose 1



Dose 2



Positive control group

LISTE DES ABREVIATIONS

A A = Acides Aristolochiques

2-AAF = 2-Acétylaminofluorène

AP = Apurique ou Apyrimidique

B(a)P = Benzo(a)pyrène

CDB = Cassure double-brin

CHO = Cellules d’Ovaires de Hamster Chinois

CMC = CarboxyMéthylCellulose.

Col = Collagénase

CP = Cyclophosphamide

DMSO = Diméthysulfoxyde

EMS = Ethyl-méthane sulfonate

EPPI = Eau pour préparation injectable

Fpg-protéine = formamidopyrimidine-DNA glycosylase.

HBSS = Hanks Balance Salt Solution

IARC = Agence Internationale de Recherche sur le Cancer

IC 95 = Intervalle de Confiance à 95 %

IND = Indométacine

LMPA = Low Melt Point Agarose

MMS = Méthyl-méthane sulfonate

N = azote

NA = Normal Agarose

NTA = Acide Nitrilotriacétique

O-NA = Ortho-nitroanisole

OTM = Olive Tail Moment

PBS = Phosphate Buffer Saline

SCGE = Single Cell Gel Electrophoresis Assay

STZ = Streptozotocine

SVF = Sérum de veau fœtal

TDC = test des Comètes

Tryps = Trypsine

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique des comètes

Figure 2 : Principales lésions produites par les agents génotoxiques (Léonard, 1990)

Figure 3 : Dommages à l'ADN, mécanismes de réparation (a) et conséquences (b)

Figure 4 : Origine des cassures de l'ADN (Eastmann and Barry, 1992)

Figure 5 : Sites d'alkylation des bases de l'ADN (Friedberg, 2005)

Figure 6 : Exemple d'un site AP (Friedberg, 2005)

Figure 7 : Dimère de Thymine formé par les UV (Friedberg, 2005)

Figure 8 : La photoréactivation (Friedberg, 2003)

Figure 9 : La réparation par recombinaison homologue et le processus « End-Joining » (Papadopoulo, 2005)

Figure 10 : Le système de réparation par excision de bases (Matsumoto, 2003)

Figure 11 : Le système de réparation par excision de nucléotide (Friedberg, 2003)

Figure 12 : Principales étapes du test des Comètes

Figure 13 : « Un sandwich » de trois couches d'agarose

Figure 14 : Organisation de l'ADN : « de la double hélice au chromosome » (Mohler, 2005)

Figure 15 : Les différents types de comètes

Figure 16 : Photo du microscope équipé d'une caméra et relié à l'ordinateur (salle d'analyse d'image Sanofi-Aventis-Montpellier)

Figure 17 : Ecran de travail du logiciel Komet 5-Kinetic Imaging

Figure 18 : Une comète sélectionnée et mesurée par le logiciel Komet 5-Kinetic Imaging

Figure 19 : Schéma de la structure macroscopique du rein

Figure 20 : Schéma du néphron

Figure 21 : Anatomie macroscopique du foie

Figure 22 : Vascularisation du foie

Figure 23 : Schéma du lobule hépatique

Figure 24 : Métabolisme du Cyclophosphamide

Figure 25 : Fixation de l'EMS à l'ADN

Figure 26 : Activation métabolique et fixation à l'ADN des acides aristolochiques

Figure 27 : Microplaquette de 96 trous

Figure 28 : Photographie de l'incision du rat au niveau de la cavité abdominale

Figure 29 : Photographies du système veineux et artériel rénal et de la perfusion par cathétérisation de l'aorte abdominale

Figure 30 : Photographie du rein émincé, étape de digestion à la Trypsine

Figure 31 : Photographie du potter type Dounce

Figure 32 : Photographie de la cellule de Mallassez / Formules de comptage et viabilité

Figure 33 : Calcul du moment caudal selon Olive.

Figure 34 : Représentation graphique de la boxplot

LISTE DES GRAPHIQUES - RESULTATS

Figure 35 : Mise au point de la technique d'isolement par homogénéisation : essai n°1

Figure 36 : Mise au point de la technique d'isolement par homogénéisation : essai n°2

Figure 37 : Mise au point de la technique d'isolement par homogénéisation : essai n°3

Figure 38 : Mise au point de la technique d'isolement par perfusion : essai n°1

Figure 39 : Mise au point de la technique d'isolement par perfusion : essai n°2

Figure 40 : Mise au point de la technique d'isolement par perfusion : essai n°3

Figure 41 : Effets du Benzo(a)pyrène après 3 h sur cellules L5178Y

Figure 42 : Effets du Cyclophosphamide après 3 h sur cellules L5178Y

Figure 43 : Effets de l'Ethyl-méthane-sulfonate après 3 h sur cellules L5178Y

Figure 44 : Effets du Méthyl-méthane-sulfonate après 3 h sur cellules L5178Y

Figure 45 : Effets du Benzo(a)pyrène sur cellules hépatiques *in vivo* après 3h

Figure 46 : Moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-B(a)P temps court

Figure 47 : Ratio groupe traité versus témoin négatif et intervalle de confiance à 95 %-B(a)P temps court

Figure 48 : Effets du Benzo(a)pyrène sur cellules hépatiques *in vivo* après 24h

Figure 49 : Moyenne et écart types des log(OTM) par groupe-B(a)P temps long

Figure 50 : Ratio groupe traité versus témoin négatif et intervalle de confiance à 95 %-B(a)P temps long

Figure 51 : Effets du 2-Acétylaminofluorène sur cellules hépatiques *in vivo* après 3 h

Figure 52 : Moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-2-AAF temps court

Figure 53 : Ratio groupe traité versus témoin négatif et intervalle de confiance à 95 %-2-AAF temps court

Figure 54 : Effets du 2-Acétylaminofluorène sur cellules hépatiques *in vivo* après 24 h

Figure 55 : Moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-2-AAF temps long

Figure 56 : Ratio groupe traité versus témoin négatif et intervalle de confiance à 95 %-2-AAF temps court

Figure 57 : Effets du Cyclophosphamide sur cellules hépatiques *in vivo* après 3 h

Figure 58 : Moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-CP temps court

Figure 59 : Ratio groupe traité versus témoin négatif et intervalle de confiance à 95 %-CP temps court

Figure 60 : Effets du Cyclophosphamide sur cellules hépatiques *in vivo* après 24 h

Figure 61 : Moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-CP temps long

Figure 62 : Ratio groupe traité versus témoin négatif et intervalle de confiance à 95 %-CP temps long

Figure 63 : Effets du Méthyl-méthane-sulfonate sur cellules hépatiques *in vivo* après 3 h

Figure 64 : Moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-MMS temps court

Figure 65 : Ratio groupe traité versus témoin négatif et intervalle de confiance à 95 %-MMS temps court

Figure 66 : Effets du Méthyl-méthane-sulfonate sur cellules hépatiques *in vivo* après 24 h

Figure 67 : Moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-MMS temps long

Figure 68 : Ratio groupe traité versus témoin négatif et intervalle de confiance à 95 %-MMS temps long

Figure 69 : Effets de la Streptozotocine sur cellules rénales *in vivo* après 3 h

Figure 70 : Moyennes et écart type des log(OTM) calculés pour chaque groupe-STZ temps court

Figure 71 : Ratio de chaque groupe traité versus témoin négatif et intervalle de confiance à 95 % associé-STZ temps court

Figure 72 : Effets de la Streptozotocine sur cellules rénales *in vivo* après 24 h

Figure 73 : Moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-STZ temps long

Figure 74 : Ratio groupe traité versus témoin négatif et intervalle de confiance à 95 %-STZ temps long

Figure 75 : Effets des Acides Aristolochiques sur cellules rénales *in vivo* après 3 h

Figure 76 : moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-AA temps court

Figure 77 : Ratio et intervalle de confiance à 95%-AA temps court

Figure 78 : Effets des Acides Aristolochiques sur cellules rénales *in vivo* après 24 h

Figure 79 : Moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-AA temps long

Figure 80 : Ratio et intervalle de confiance à 95%-AA temps long

Figure 81 : Effets de l'Ortho-Nitroanisole sur cellules rénales *in vivo* après 3 h

Figure 82 : Moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-O-NA temps court

Figure 83 : Effets de l'Ortho-Nitroanisole sur cellules rénales *in vivo* après 24 h

Figure 84 : Moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-O-NA temps long

Figure 85 : Ratio et intervalle de confiance à 95%-O-NA temps long

Figure 86 : Effets de l'Acide Nitrilotriacétique sur cellules rénales *in vivo* après 3 h

Figure 87 : Moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-NTA temps court

Figure 88 : Ratio et intervalle de confiance à 95%-NTA temps court

Figure 89 : Effets de l'Acide Nitrilotriacétique sur cellules rénales *in vivo* après 24 h

Figure 90 : Moyenne et écart type des log(OTM) par groupe-NTA temps long

Figure 91 : Ratio et intervalle de confiance à 95%-NTA temps long

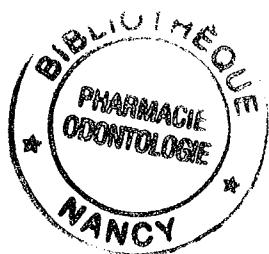
Figure 92 : Etude de l'indométacine temps court : distribution en fréquence et calcul des moyenne et écart type des log(OTM)

Figure 93 : Ratio et intervalle de confiance à 95%-IND temps court

Figure 94 : Effets de l'Indométacine sur cellules rénales *in vivo* après 24 h : distribution en fréquence et calcul des moyenne et écart type des log(OTM)

Figure 95 : Ratio et intervalle de confiance à 95%-IND temps long

Figure 96 : Répartition des 50 OTM d'une même lame
(représentation de 3 lames)



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

DEMANDE D'IMPRIMATUR

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE

Présenté par Nadia ZENNOUCHE

Sujet :**Le Test des Comètes :**Validation et Etude de sa Sensibilité et Spécificité
in vitro et *in vivo*Jury :

Président : Mlle Anne-Marie BATT, Professeur
Directeur : M. Daniel MARZIN, Professeur
Juges : Mme Brigitte MOLINIER, Docteur
 M. Fabrice NESSLANY, Directeur d'études

Vu,

Nancy, le 13 Avril 2005

Le Président du Jury

Mlle Anne-Marie BATT
Professeur

Le Directeur de Thèse

M. Daniel MARZIN
Professeur

N° 2184

Vu et approuvé,

Nancy, le 21 avril 2005

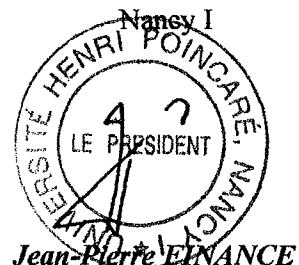
Le Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré – Nancy I,
Chantal FINANCE

Vu,

Nancy, le 4 mai 2005

Le Président de l'Université Henri Poincaré -

Nancy I



LE TEST DES COMETES :
VALIDATION ET ETUDE DE SA SENSIBILITE ET SPECIFICITE
IN VITRO ET IN VIVO

Thèse soutenue le 13 mai 2005

Par Nadia ZENNOUCHE

RESUME

Durant la phase de développement d'une substance, une batterie de tests en toxicologie génétique est appliquée afin de sélectionner les futurs candidats médicaments, pesticides, produits cosmétiques, chimiques,...

Le test des Comètes ou « Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) Assay », en conditions alcalines, est défini comme une technique microélectrophorétique rapide, simple et sensible, qui permet une évaluation directe des lésions de l'ADN de cellules eucaryotes individualisées après traitement *in vitro* ou *in vivo*.

Il permet de mettre en évidence des lésions primaires de l'ADN telles que des cassures simple et double-brin, des adduits aux bases de l'ADN, des intercalations,...

Actuellement en cours d'évaluation et de validation, le test des Comètes pourrait être utilisé en seconde intention pour confirmer ou non le(s) résultat(s) positif(s) observé(s) lors de la batterie de tests réglementaires ; il pourrait également permettre la mise en évidence une possible spécificité d'action et/ou l'organospécificité du produit étudié.

L'objet de cette recherche est la validation du test sur des cancérogènes génotoxiques connus, *in vitro* et *in vivo* sur un organe cible, le foie, afin d'évaluer la sensibilité de ce test et de l'appliquer dans le cadre d'un screening primaire *in vitro*. Par ailleurs, les travaux *in vivo* sur le rein ont pour objectif d'évaluer la spécificité du test lorsqu'il est appliqué à des études mécanistiques. Il s'agit pour cela de déterminer dans quelle mesure le test des Comètes est capable de faire la distinction entre un cancérogène génotoxique et un cancérogène épigénétique, ainsi que d'évaluer l'interférence des phénomènes cytotoxiques.

MOTS CLES : Test des Comètes, électrophorèse alcaline, toxicologie génétique, ADN, lésions, validation, organospécificité.

Jury de thèse	Intitulé du Laboratoire	Nature
Professeur A. M. Batt Professeur D. Marzin	Toxicologie, Université Nancy I Toxicologie, Université Lille II Institut Pasteur Lille	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/>
Mme B. Molinier M. F. Nesslany	Toxicologie, Sanofi-Aventis Toxicologie, Institut Pasteur Lille	Bibliographique <input type="checkbox"/>
		Thème 1

Thèmes 1 – Sciences fondamentales 2 – Hygiène / Environnement
3 – Médicament 4 – Alimentation - Nutrition
5 – Biologie 6 – Pratique professionnelle