

*Master Ingénierie de la Santé
Parcours Evaluation et Gestion des Risques sanitaires Environnementaux et
Professionnels, Option Recherche*

LES METHODES ALTERNATIVES A L'EXPERIMENTATION ANIMALE :
LE CAS DES ETUDES DE CANCEROGENESE



Laboratoire de Toxicologie Génotoxicité
Institut Pasteur de Lille

Date de la soutenance : 23 Mai 2017

Composition du jury :

- Président de jury : M. Hervé HUBERT
- Directeur de Mémoire : M. Fabrice NESSLANY
- Troisième membre du jury : M. Franck-Olivier DENAYER

Faculté Ingénierie et Management de la Santé - ILIS
42 rue Ambroise Paré
59120 LOOS

REMERCIEMENTS

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma reconnaissance.

A Fabrice Nesslany,

Je tiens en premier lieu à te remercier de m'avoir accueillie au sein de l'équipe de Toxicologie Génétique de l'Institut Pasteur de Lille. Je t'adresse également toute ma gratitude pour ta disponibilité et tes conseils judicieux qui ont contribué à alimenter ma réflexion lors de l'écriture de ce mémoire. Vraiment, un très grand merci à toi.

A toute l'équipe de Toxicologie Génétique de l'Institut Pasteur de Lille,

Madame Plus tient tout particulièrement à vous remercier pour votre accueil et pour son intégration à part entière dans l'équipe. Sophie, Killian, Florent, Éric, Valérie, Martine, Doris, Aurélie et tous les autres, ce contrat pro n'aurait définitivement pas été le même sans vous. Je n'ai pas de mot pour dire ce que vous êtes... Croyez bien que je mesure la chance que j'ai eu de travailler à vos côtés pendant ces quelques mois.

A Hervé Hubert,

Je ne vous oublie pas, merci d'être le président de jury pour la filière recherche. Je profite de ce paragraphe pour vous remercier pour tous vos conseils et pour faire en sorte de nous dispenser une formation de qualité, ce remerciement pouvant également s'adresser à tous les enseignants de l'ILIS.

A Franck-Olivier Denayer,

Je souhaite vous remercier d'avoir accepté d'être membre du jury de soutenance, mais aussi de m'avoir fait confiance. Merci d'avoir toujours fait en sorte de perturber notre homéostasie pour nous pousser au meilleur.

A Ludivine Canivet, Annabelle Deram, Audrey Hayet, Caroline Lanier, et Florent Occelli,

Merci d'avoir toujours été là et de continuer à me soutenir. Nous ne sommes plus très loin du dénouement.

Enfin, je voudrais exprimer ma reconnaissance à mes amis (Elodie, Isabelle, Audrey, Nico, Béno, Maud, Virg, Xav et mes Clacla) ainsi qu'à ma famille qui m'auront encouragée et supportée pendant les moments difficiles et qui auront accepté que je ne sois que peu disponible tout au long de ces trois années d'études. Merci d'être encore là.

Bertrand, Louane, Olivia, ce travail il est aussi pour vous...

« La question n'est pas : Peuvent-ils raisonner ? Peuvent-ils parler ? Mais :
Peuvent-ils souffrir ? »

Introduction to the Principles of Morals and Legislation
Jeremy Bentham (1748-1832)

TABLE DES MATIÈRES

Liste des abréviations	1
Liste des figures	2
Liste des tableaux	3
Introduction.....	4
1. Etat de l'Art.....	5
1.1. La cancérogenèse	5
1.1.1. Initiation	6
1.1.2. Promotion.....	6
1.1.3. Progression.....	7
1.2. Les agents cancérogènes.....	7
1.2.1. Les cancérogènes génotoxiques.....	7
1.2.2. Les cancérogènes non génotoxiques ou épigénétiques.....	11
1.3. Expérimentation animale et cancérogenèse.....	14
1.3.1. L'expérimentation animale en chiffres en France (MENESR, 2014).....	14
1.3.2. Lignes directrices	15
1.4. Alternatives actuelles	19
1.4.1. Les méthodes non analytiques.....	20
1.4.2. Les méthodes analytiques	23
1.5. Conclusion du contexte scientifique	26
2. Matériel et méthode	27
2.1. Les bonnes pratiques de laboratoire.....	27
2.2. Le matériel.....	28
2.2.1. Les cellules Bhas 42	28
2.2.2. Les milieux	28
2.2.3. Les solutions	29
2.3. Les substances testées	29
2.4. Protocole expérimental « Essai préliminaire de croissance cellulaire	30
2.4.1. Essai d'initiation.....	30
2.4.2. Essai de promotion.....	31
2.4.3. Lecture des absorbances	31
2.5. Protocole expérimental « Essai de transformation cellulaire »	32
2.5.1. Essai d'initiation.....	32
2.5.2. Essai de promotion.....	34
2.5.3. Lecture des absorbances pour les témoins positifs (essai de croissance cellulaire).....	35

2.5.4.	Fixation - Coloration au Giemsa (essai de transformation cellulaire)	36
2.5.5.	Codage des plaques.....	36
2.5.6.	Détermination de la fréquence de transformation.....	36
2.5.7.	Analyse statistique	39
2.5.8.	Critères de validité de l'essai.....	39
2.5.9.	Critères d'interprétation des résultats.....	40
3.	Résultats.....	41
3.1.	3-Méthylcholanthrène (MCA)	41
3.2.	N-Méthyl-N'-Nitro-N-NitrosoGuanidine (MNNG)	42
3.2.1.	Essai préliminaire de croissance cellulaire	42
3.2.2.	Essai définitif de transformation	42
3.3.	12-O-TétraDécanoylphorbol-13-Acétate (TPA).....	44
3.4.	Méthapyrilène.....	45
3.4.1.	Essai préliminaire de croissance cellulaire	45
3.4.2.	Essai définitif de transformation	46
3.5.	Caféine.....	48
3.5.1.	Essai préliminaire de croissance cellulaire	48
3.5.2.	Essai définitif de transformation	49
4.	Discussion.....	51
4.1.	Le protocole.....	51
4.2.	Dénombrement des foyers de transformation	53
4.3.	Résultats des essais de croissance cellulaire et de transformation	56
4.3.1.	Les produits positifs en initiation	56
4.3.2.	Les produits positifs en promotion	57
4.3.3.	Le produit négatif en initiation et en promotion	58
4.3.4.	Bilan des essais sur les substances recommandées par la ligne directrice.....	58
4.4.	Transposition des résultats à l'Homme.....	59
	Conclusion	62
	Bibliographie.....	63
	Annexes	73

LISTE DES ABREVIATIONS

ANSM :	Agence Nationale de Sécurité du Médicament
BaP :	Benzo[a]Pyrène
BPL :	Bonnes Pratiques de Laboratoire
CAS :	Chemical Abstract Society
CEEA :	Comité d’Ethique sur l’Expérimentation Animale
CI :	Concentration Inhibitrice
CLP :	Classifying Labelling Packaging
CPA :	CycloPhosphAmide
CV :	Cristal Violet
DDT :	Dichloro Dibenzo Trichloroéthane
DMSO :	DiMéthyl SulfOxyde
ECVAM :	European Centre for the Validation of Alternative Methods
EFSA :	European Food Safety Authority
ERO :	Espèce Réactive de l’Oxygène
HAP :	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
IARC :	International Agency for Research on Cancer
ICCVAM :	Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods
ICH :	International Conference Harmonisation
JaCVAM :	Japanese Centre for the Validation of Alternative Methods
LD :	Ligne Directrice
MCA :	3-MéthylCholAnthrène
MENESR :	Ministère de l’Education Nationale, de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche
MNNG :	N-Méthyl-N’-Nitro-N-NitrosoGuanidine
OCDE :	Organisation de Coopération et de Développement Economique
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PBS :	Phosphate Buffered Saline
PCB :	PolyChloroBiphényles
PPAR :	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PSM :	Poste de Sécurité Microbiologique
QSAR :	Quantitative Structure Activity Relationship
REACH :	Registration Evaluation Authorization and restriction of CHemicals
SCCS :	Scientific Committee on Consumer Safety
sd :	Standard Deviation
SHE :	Syrian Hamster Embryon
TPA :	12-O-TétradécanoylPhorbol-13-Acétate
US-EPA :	United States Environmental Protection Agency
WoE :	Weight of Evidence

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Caractère multi-étapes de la cancérogenèse (Stewart & Kleihues, 2005)	5
Figure 2 : Modèle initiation – promotion (d’après Griner & Kazanietz, 2007).....	6
Figure 3 : Schéma synthétisant les différents types de lésions primaires à l’ADN et les mécanismes de réparation associés (d’après Hoeijmakers, 2001)	9
Figure 4 : Schéma synthétisant les différents types de mutations	9
Figure 5 : Mécanismes épigénétiques impliqués dans la cancérogenèse (d’après Kim et al., 2011) ...	12
Figure 6 : Vue générale des différents modes d’action des cancérogènes chimiques (d’après Luch, 2005 - modifié)	13
Figure 7 : Schéma de plaque pour l’essai préliminaire de croissance cellulaire	30
Figure 8 : Représentation schématique de l'essai préliminaire de croissance - essai d'initiation (inspiré de Sakai et al., 2011b)	30
Figure 9 : Représentation schématique de l'essai préliminaire de croissance - essai de promotion (inspiré de Sakai et al., 2011b)	31
Figure 10 : Schéma de plaque - essai préliminaire de croissance cellulaire	32
Figure 11 : Schéma de plaque pour l'essai de transformation.....	32
Figure 12 : Représentation schématique des étapes de l'essai de transformation – essai d'initiation (inspiré de Sakai et al., 2011b)	33
Figure 13 : Représentation schématique des étapes de l'essai de transformation – essai de promotion (inspiré de Sakai et al., 2011b)	34
Figure 14 : Schéma de plaque - essai définitif de croissance cellulaire (plaque témoin positif)	35
Figure 15 : Schéma de plaque pour codage de l'essai de transformation	36
Figure 16 : Exemple de foyer transformé sur la paroi latérale du puits.....	37
Figure 17 : Extrait du photo catalogue en annexe de lu projet de ligne directrice pour le test de transformation cellulaire sur Bhas 42 (OCDE, 2016).....	38
Figure 18 : Extrait du photo catalogue pour la classification des foci sur Balb/c 3T3 de Sasaki et al. (2012a) – foyers positifs pour la transformation (type III).....	38
Figure 19 : Molécule de MCA	41
Figure 20 : Résultats - Essai d'initiation pour le MCA.....	41
Figure 21 : Molécule de MNNG	42
Figure 22 : Résultats - Essai d'initiation pour le MNNG	43
Figure 23 : Résultats - Essai de promotion pour le MNNG.....	44
Figure 24 : Molécule de TPA.....	44
Figure 25 : Résultats -Essai de promotion pour le TPA	45
Figure 26 : Molécule de Méthapyrilène	45
Figure 27 : Résultats de l’essai d’initiation pour le méthapyrilène	47
Figure 28 : Résultats de l’essai de promotion pour le méthapyrilène	48
Figure 29 : Molécule de caféine	48
Figure 30 : Résultats de l’essai d’initiation pour la caféine	50
Figure 31 : Résultats de l'essai de promotion pour la caféine	51
Figure 32 : Comparaison protocole 6 et 96 puits pour le TPA (d’après Arai et al., 2013).....	54
Figure 33 : Comparatif des plaques 96 puits avec ou sans peroxyde d'hydrogène	55

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Exemples de cancérogènes génotoxiques (d'après Ballet & Beaune, 1999).....	10
Tableau II : Exemples de cancérogènes non génotoxiques (d'après Ballet & Beaune, 1999)	13
Tableau III : Résultats des tests de génotoxicité et interprétation	18
Tableau IV : Descripteurs et QSAR pour les différentes étapes de cancérogenèse (Woo, 2015).....	22
Tableau V : Liste des substances à tester.....	29
Tableau VI : Résultats de l'essai d'initiation pour le MCA.....	41
Tableau VII : Concentrations testées lors de l'essai préliminaire pour le MNNG et croissances relatives calculées	42
Tableau VIII : Résultats de l'essai d'initiation pour le MNNG.....	43
Tableau IX : Résultats de l'essai de promotion pour le MNNG	44
Tableau X : Résultats de l'essai de promotion pour le TPA.....	45
Tableau XI : Concentrations testées lors de l'essai préliminaire pour le méthapyrilène et croissances relatives calculées	46
Tableau XII : Résultats de l'essai d'initiation pour le méthapyrilène	46
Tableau XIII : Résultats de l'essai de promotion pour le méthapyrilène	47
Tableau XIV : Concentrations testées lors de l'essai préliminaire pour la caféine et croissances relatives calculées	48
Tableau XV : Résultats de l'essai d'initiation pour la caféine.....	49
Tableau XVI : Résultats de l'essai de promotion pour la caféine	50

Introduction

Le cancer, terme général désignant un grand nombre de maladies, figure parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. En 2012, 8,2 millions de décès lui étaient imputables et au cours des deux prochaines décennies le nombre de nouveaux cas devrait augmenter de 70 % (OMS, 2015). Le cancer résulte d'interactions complexes entre (i) des facteurs propres à l'individu échappant à tout contrôle (âge, patrimoine génétique, ...), (ii) des comportements individuels (tabac, alcool, alimentation, ...) et (iii) l'exposition à des substances ou des situations en milieu professionnel ou dans l'environnement en général. A l'échelle mondiale, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) attribue à l'environnement en général 19 % des cancers en 2008 avec près de 1,3 millions de cas (OMS, 2011). L'association du cancer avec ces différents facteurs n'est toutefois pas nouvelle. En effet, en 1761 le physicien John Hill montrait que des sujets habitués à priser le tabac présentaient plus fréquemment des polypes nasaux. En 1775, Percivall Pott décrivait un cas de maladie professionnelle en faisant le lien entre l'exposition à la suie des jeunes ramoneurs et le développement chez ces mêmes sujets du cancer du scrotum.

Plus récemment, des études épidémiologiques ont montré que des facteurs, comme le mode de vie ou encore la pollution atmosphérique, étaient responsables de nombreux cas de cancers. De fait, l'Homme est de plus en plus exposé à des substances chimiques, la production mondiale ayant été multipliée par 400 depuis les années 1930 (El Yamani & Barrillon, 2006). Parmi les 100 000 substances chimiques recensées dans l'Union Européenne (UE), moins de 3 000 ont fait l'objet d'évaluations approfondies quant à leur dangerosité (Tordjman, 2009). Depuis plusieurs années, l'évolution de la société conduit à réfléchir à la question du recours à l'expérimentation animale, sur laquelle la recherche dans les sciences biologiques et médicales s'appuie largement. En plus de ce questionnement éthique, des aspects financiers et temporels sont à prendre en compte, et notamment dans le cas des études de cancérogenèse. En effet, ces études se font sur des nombres importants d'animaux et sur des périodes étendues car (i) le cancer n'atteint pas tous les sujets exposés et (ii) le délai d'apparition des effets peut être long.

Dans le cadre de REACH et face au grand nombre de substances devant être évaluées, une réflexion est menée afin de réduire, mais sans pour autant la supprimer, le recours à l'expérimentation animale. Ainsi pour limiter le recours à celle-ci, REACH encourage (i) le partage des données, qui est obligatoire pour les résultats des essais sur les animaux vertébrés, et (ii) le développement de méthodes alternatives. De plus, l'Union Européenne a été l'une des premières à interdire les tests sur les animaux dans l'industrie cosmétique avec l'application du règlement CE n°1223/2009, règlement refondant les précédents textes relatifs aux produits cosmétiques par souci de clarté. Afin de répondre au besoin de caractérisation du danger cancérogène en prenant en compte l'évolution des contextes éthique, réglementaire et sociétal, des méthodes alternatives à l'expérimentation animale doivent dans un premier temps être mises au point. Dans un second temps, elles doivent faire l'objet d'une validation au sein des laboratoires.

Dans la partie 1, un état de l'art sur la cancérogenèse et les agents cancérogènes est proposé afin de présenter différents mécanismes d'actions possibles. Par la suite, un état des lieux de l'expérimentation animale en France, mais également des lignes directrices sur les études de cancérogenèse est présenté. La partie 1 est conclue par les méthodes alternatives aux études de cancérogenèse dont le test de transformation cellulaire fait partie. La partie 2 présente le matériel et méthode et la partie 3 les résultats obtenus lors de la mise en place du test de transformation cellulaire sur les cellules Bhas 42 au sein du laboratoire. Ces résultats sont interprétés dans la partie 4 afin d'apporter des éléments de discussion autour de cette méthode alternative à l'expérimentation animale ayant pour but de répondre au besoin de caractérisation du danger cancérogène.

1. Etat de l'Art

1.1. La cancérogenèse

La cancérogenèse est un ensemble de phénomènes pathologiques aboutissant à la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse. Quelle que soit l'origine des cellules cancéreuses, au travers des études fondamentales et de l'observation des tumeurs, il a été suggéré que les cellules cancéreuses partagent des propriétés communes qui les distinguent des cellules normales. Une cellule normale reçoit en permanence des signaux soit des cellules voisines ou de facteurs extracellulaires, de molécules diffusibles (facteurs de croissance, hormones, ...) et est à même de les intégrer. Une cellule normale peut donc proliférer, se différencier, entrer en apoptose ou encore rester à un état quiescent¹. A l'inverse, une cellule cancéreuse devient insensible aux signaux extérieurs, et est incapable de les intégrer, et adopte alors un comportement qui lui est propre. Ainsi, les cellules tumorales sont caractérisées par six propriétés (Hanahan & Weinberg, 2000) :

- Indépendance vis-à-vis des signaux de prolifération ;
- Insensibilité aux signaux antiprolifératifs ;
- Résistance à l'apoptose ;
- Prolifération illimitée (perte de la sénescence) ;
- Capacité à induire l'angiogenèse ;
- Capacité d'invasion et de diffusion métastatique.

Le cancer implique donc une dégradation pathologique de différents processus (contrôle de la prolifération cellulaire, différenciation, apoptose, ...). Berenblum & Schubik (1947, 1949) dans leurs travaux sur le lapin exposé au goudron de houille et à l'huile de croton ont mis en évidence que la cancérogenèse présente une chronologie d'évènements. Depuis, le caractère multi-étapes faisant intervenir un grand nombre d'évènements génétiques et épigénétiques a communément été admis à travers différentes études ; celui-ci est illustré dans la figure 1.

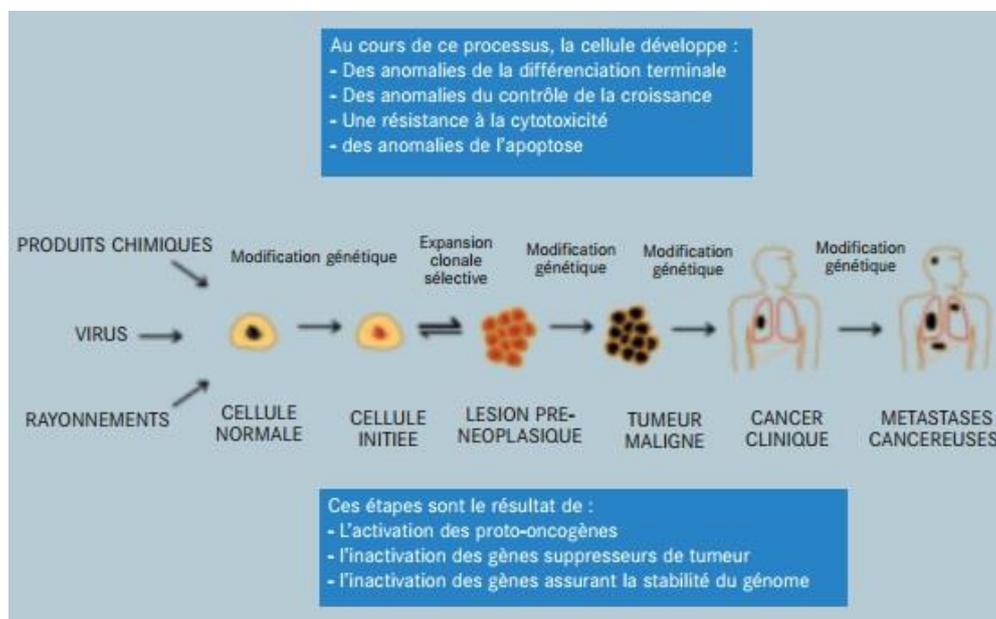


Figure 1 : Caractère multi-étapes de la cancérogenèse (Stewart & Kleihues, 2005)

¹ Phase de repos de la cellule, où elle arrête de se diviser et sort du cycle cellulaire

Ainsi, l'ensemble de ces phénomènes impliqués dans la cancérogenèse présentés dans la figure 1 peuvent se décomposer en trois grandes étapes, qui sont l'initiation, la promotion puis la progression (Weston & Harris, 2003 ; Devi, 2004 ; Stewart & Kleihues, 2005).

1.1.1. Initiation

Les travaux de Berenblum & Shubik ont abouti à la conclusion que l'étape d'initiation résultait de changements génotoxiques, prédisposant l'évolution d'une cellule normale vers une cellule maligne². Les dommages à l'ADN peuvent être pris en charge par différents mécanismes de réparation (Bertram, 2001 ; Jeng *et al.*, 2001), mais si ces mécanismes ne sont pas mis en jeu avant la division cellulaire, les dommages deviennent permanents, irréversibles et peuvent être transmis aux cellules filles (Farber, 1984). Les agents responsables d'atteinte génotoxique sont des cancérogènes dits « initiateurs ». Toutefois, toutes les cellules initiées n'aboutissent pas à la formation de tumeur maligne. Si des mutations interviennent sur des gènes régulant la croissance cellulaire et/ou la différenciation, une instabilité génétique progressive pourra être observée et pourra aboutir à une croissance non contrôlée, à une déficience de la différenciation, à l'invasion et aux métastases (Stewart & Kleihues, 2005).

1.1.2. Promotion

La promotion fournit un environnement propice à l'expansion clonale des cellules préalablement initiées. Ce phénomène est réversible et cette réversibilité a suggéré des mécanismes épigénétiques (Hennings *et al.*, 1993). Des substances, cette fois dites « promotrices », peuvent entraîner une stimulation de la prolifération cellulaire et une inhibition de l'apoptose, la cellule initiée pouvant évoluer vers une lésion pré-tumorale (Pairon, 2015). L'exposition à un promoteur à la suite d'un initiateur permet à la cellule de progresser d'un état initié à un état transformé (OCDE, 2007). Pour qu'une tumeur se développe, l'agent promoteur doit agir de manière répétée et rapprochée dans le temps après l'agent initiateur (Griner & Kazanietz, 2007 ; Oliveira, 2016), et est illustré dans la figure 2.

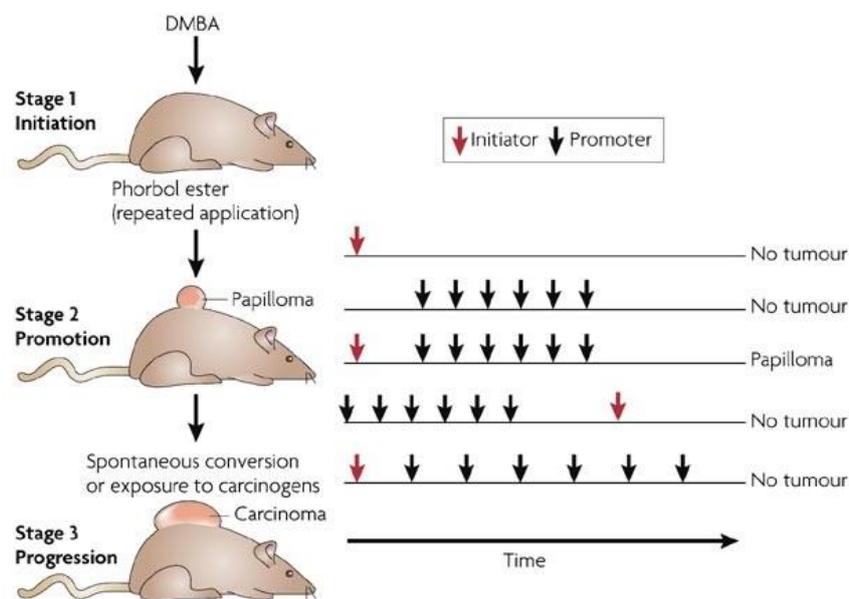


Figure 2 : Modèle initiation – promotion (d'après Griner & Kazanietz, 2007)

² Bénin : Suffixe « ome » (adénome, lipome, ...)

Malin : Origine épithéliale : « carcinome » (hépatocarcinome, ...)

Origine mésenchymateuse : « sarcome » (fibrosarcome, liposarcome, ...)

1.1.3. Progression

Cette étape est caractérisée par l'acquisition des propriétés de multiplication non contrôlée, de perte de différenciation, de l'invasion locale et métastatique. La transformation des cellules en cellules malignes constitue la dernière étape de la cancérogenèse (Klaunig *et al.*, 2000 ; Williams, 2001). Au cours de cette étape, la prolifération cellulaire est indépendante de la présence de stimuli (Lutz, 2000). La progression est également une étape irréversible et elle est caractérisée par (i) une instabilité génétique résultant des mutations et de la prolifération cellulaire (Pairon, 2015), (ii) une croissance rapide, (iii) un phénomène d'invasion. Les cellules échappent aux différents processus de contrôle cellulaire, tendent à s'infiltrer dans les tissus voisins (Faucet-Marquis, 2005), et peuvent également migrer *via* la voie sanguine ou lymphatique vers d'autres tissus de l'organisme, où elles se fixent et développent des métastases (Boyer *et al.*, 1999).

1.2. Les agents cancérogènes

Le développement du cancer peut être initié par différents types d'agents (cancérogènes chimiques, physiques - rayonnements, biologiques - virus) ou par des facteurs génétiques héréditaires (Stewart & Kleihues, 2005). Un agent est défini comme cancérogène s'il induit des tumeurs, une augmentation de leur incidence³ et/ou de leur caractère malin, ou s'il diminue la durée de leur apparition. Un cancérogène « fort » agit directement sur les trois étapes de la cancérogenèse, tandis qu'un cancérogène « faible » agit sur une des étapes ou indirectement sur une autre (Woo, 2015). Weisburger & Williams (2000) présentent la distinction entre cancérogène génotoxique et cancérogène épigénétique (non génotoxique). Les agents cancérogènes sont effectivement conventionnellement classés en deux catégories, en fonction de leur présumé mode d'action (Oliveira, 2016 ; van Benthem *et al.*, 2010), ce mode d'action pouvant être dépendant des conditions d'exposition⁴ :

- D'une part les agents cancérogènes génotoxiques (ou agents « initiateurs »), affectant l'intégrité du génome par des interactions avec l'ADN et/ou l'appareil mitotique ;
- D'autre part, les agents cancérogènes non génotoxiques (ou agents « promoteurs »), exerçant leurs effets selon d'autres mécanismes.

Cette dichotomie est importante, notamment dans les stratégies d'évaluation des risques, qui se révèlent différentes selon qu'un cancérogène est génotoxique ou non.

1.2.1. Les cancérogènes génotoxiques

Pour ces agents, il est en général admis qu'ils induisent des effets sans seuil et que, sauf exception, toute exposition comporterait un risque et ce, quel qu'en soit l'exposition (effet stochastique, la fréquence augmentant avec la dose). Cependant, l'établissement d'un lien entre l'exposition et la survenue d'un cancer est difficile en raison notamment du temps de latence pour l'apparition de la maladie. Ces cancérogènes génotoxiques peuvent avoir diverses origines :

- Une origine physique : les radiations ionisantes et rayonnements UV (Ravanat & Douki, 2016). Deux modes d'action principaux pour les radiations ionisantes sont impliqués dans les mécanismes de dégradation à l'ADN, un mécanisme direct par ionisation de l'ADN et un mécanisme indirect par radiolyse de l'eau aboutissant à la formation d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO), et notamment le radical hydroxyle qui est hautement réactif. La formation de ce radical hydroxyle est responsable de la plupart des lésions génotoxiques du « stress

³ L'incidence décrit le nombre de nouveaux cas ; la mortalité représentant le nombre de décès (Stewart & Kleihues, 2005)

⁴ http://www.prc.cnrs-gif.fr/reach/fr/toxicological_data.html

oxydant » (Greim & Albertini, 2012). De plus, certaines lésions sont spécifiques d'un agent, tels que les dimères de cyclobutane-pyrimidine sont spécifiques du rayonnement UV et ne sont pas du tout engendrées par des radiations ionisantes. Les dimères de thymine sont extrêmement stables et entraînent une torsion de l'ADN ce qui empêche un bon appariement lors de la réplication.

- Une origine chimique : les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP, dont le Benzo[a]Pyrène B[a]P par exemple), les amines aromatiques, les aflatoxines. Les agents alkylants ou intercalants peuvent entraîner la formation de liaison inter-brin ou intra-brin (cas de la mitomycine) ou encore des liaisons ADN-protéines. Les aflatoxines ou encore le BaP après activation métabolique entraînent la formation d'adduits, notamment au niveau de la peau, des poumons et de l'estomac (Oliveira, 2016) ;
- Une origine biologique : certains virus, bactéries ou parasites ont été identifiés comme des facteurs de risque élevé pour certains cancers. Chez l'Homme, au niveau mondial environ un cancer sur six est dû à une infection virale, bactérienne ou parasitaire. Le premier cancer associé à une infection a été observé en Afrique suite aux travaux de Burkitt qui étudiait une forme particulière de lymphome. Par la suite, Epstein et Barr ont identifié dans des cellules du lymphome de Burkitt la forme virale responsable : le virus d'Epstein-Barr ou EBV. Plusieurs autres agents infectieux sont classés cancérogènes avérés pour l'Homme par l'IARC⁵ (virus de l'hépatite B et carcinome hépatocellulaire ; papillomavirus humain et cancer du col de l'utérus) (Cancer-environnement).

Il est à noter que les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs ont été identifiés grâce aux études sur les virus oncogènes, et notamment par les travaux de Stehelin *et al.* (1976) sur la découverte du proto-oncogène c-src et la transformation néoplasique de fibroblastes aviaires. Ces proto-oncogènes (ras, fos, jun, *etc.*) sont des gènes qui jouent un rôle majeur dans le contrôle de la croissance et/ou de la différenciation cellulaire. Ils codent notamment pour des éléments de transduction de signaux mitogènes. Lorsque les proto-oncogènes sont activés par des mutations, ils deviennent des oncogènes et contribuent donc au passage d'un phénotype « normal » à un phénotype cancéreux. Stehelin *et al.* (1976) ont par la suite émis l'hypothèse que tous les cancers étaient le résultat de dommages sur les proto-oncogènes cellulaires, et pas uniquement dans le cas des rétrovirus. Ils ont enfin proposé que le cancer pouvait également survenir suite à une altération des gènes suppresseurs de tumeurs.

Ainsi, en fonction de l'agent considéré, différents types de lésions primaires à l'ADN peuvent être responsables de mutations. Ces lésions primaires sont présentées dans la figure 3.

⁵ Agence intergouvernementale de recherche sur le cancer, créée en 1965 par l'OMS

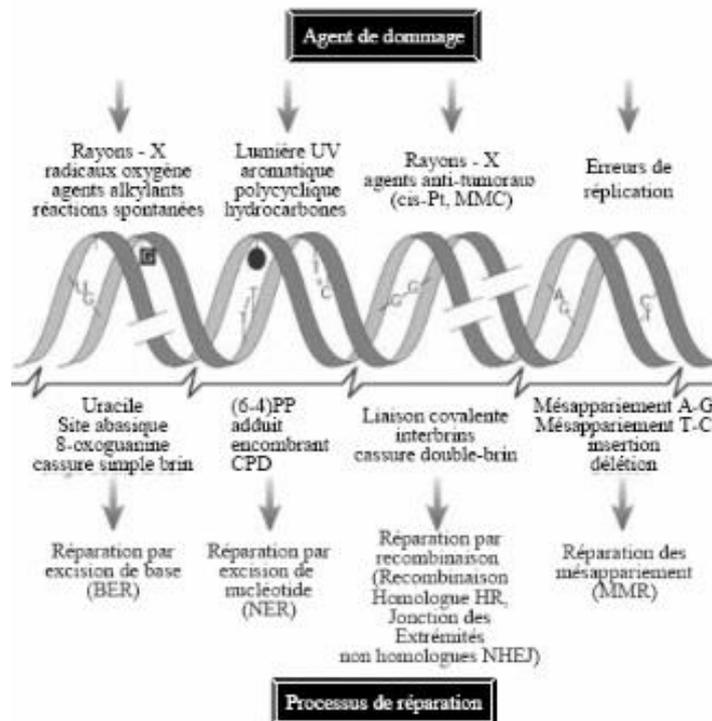


Figure 3 : Schéma synthétisant les différents types de lésions primaires à l'ADN et les mécanismes de réparation associés (d'après Hoeijmakers, 2001)

Comme le montre la figure 3, la cellule dispose de différents mécanismes enzymatiques susceptibles d'être mis en œuvre pour réparer les altérations pouvant impacter l'ADN, ces mécanismes de réparation étant théoriquement adaptés à chaque type de dommage. Pour Hartwig & Schwerdtle (2002), certains cancérogènes faibles sont susceptibles d'interagir et de provoquer des perturbations de ces mécanismes de réparation. Par exemple, le cobalt, l'arsenic, le nickel et le cadmium peuvent interférer avec les mécanismes Base Excision Repair (BER) et Nucleotide Excision Repair (NER). Lorsque les lésions à l'ADN ne sont pas réparées, différents types de mutations peuvent donc apparaître. Celles-ci sont présentées dans la figure 4.

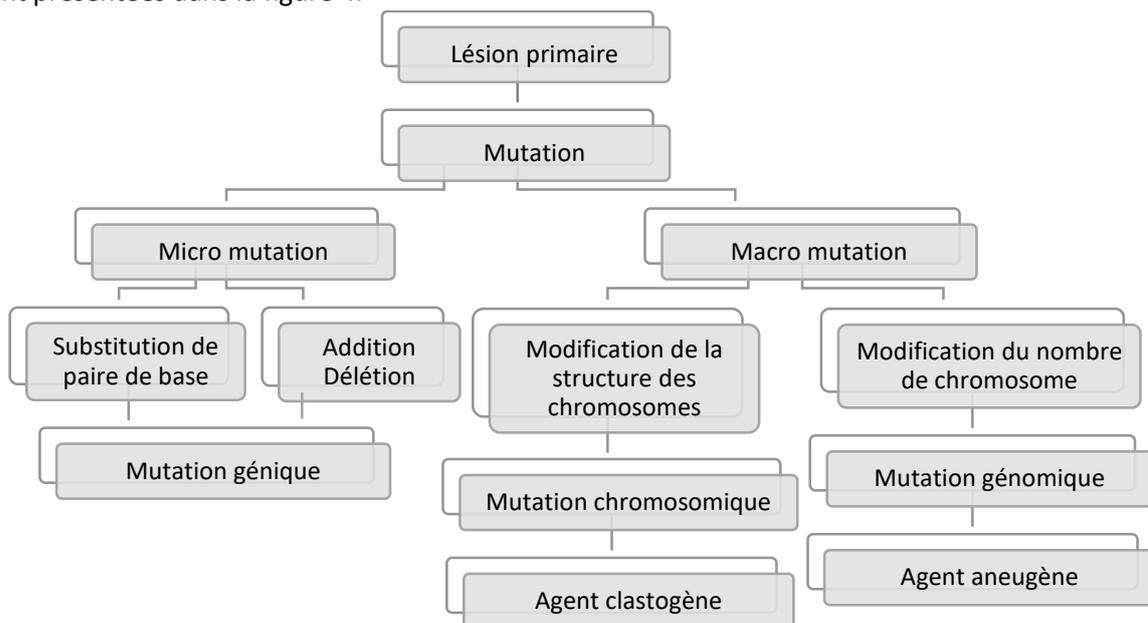


Figure 4 : Schéma synthétisant les différents types de mutations

Comme le montre la figure 4, une lésion primaire si elle n'est pas prise en charge par les mécanismes de réparation de l'ADN peut être à l'origine de différents types de mutations. Les mutations géniques correspondent à des mutations ponctuelles au niveau de la séquence primaire de l'ADN et peuvent entraîner la disparition de la fonction du gène muté par altération de la protéine (la drépanocytose est un exemple de pathologie présentant ce type de mutations). Les mutations structurelles peuvent être de deux types, soit (i) des aberrations chromatidiennes avec cassure d'une seule chromatide dans une même paire de chromosomes, ou (ii) des aberrations chromosomiques avec une cassure des deux chromatides au même endroit (cas très peu fréquent). Les mutations génomiques correspondent à des altérations quantitatives (anomalies du nombre de chromosomes), après action d'agents aneugènes avec par exemple des composants du fuseau mitotique aboutissant à une ségrégation anormale d'un ou plusieurs chromosomes.

Ces mutations peuvent aboutir par exemple à l'activation de proto-oncogènes (*ras*⁶, *myc*, *raf*, *her-2*, *jun*, *bcl-2*, ...) ou à l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (*PTEN*, *p53*⁷, *p16*, ...) (Pairon, 2015). Les mutations sur les proto-oncogènes sont dominantes et ne nécessitent donc qu'un évènement sur un des deux allèles pour observer l'effet oncogénique, qui correspond à un gain de fonction (Stewart & Kleihues, 2005). L'activation des oncogènes engendre la différenciation et la croissance cellulaire anarchique qui caractérisent les cellules cancéreuses (Faucet-Marquis, 2005). De plus, les protéines « *ras* » sont au cœur de nombreuses voies de signalisation, intégrant et interprétant les signaux venant de l'extérieur. Elles oscillent entre deux états, « actif » ce qui déclenche la prolifération des cellules et « inactif ». Lorsqu'une mutation survient sur un gène codant pour *ras*, les protéines sont continuellement actives, les cellules ne cessent de se diviser en multipliant les erreurs (Janssen *et al.*, 2002). En ce qui concerne les gènes suppresseurs de tumeurs, les deux allèles doivent être altérés pour atteindre un état permettant l'oncogenèse (mode récessif) et une modification de ces gènes entraîne la perte d'une propriété fonctionnelle essentielle au maintien de la prolifération cellulaire normale (Stewart & Kleihues, 2005).

Le tableau I présente quelques exemples d'agents génotoxiques, qu'ils soient directs ou non.

Tableau I : Exemples de cancérogènes génotoxiques (d'après Ballet & Beaune, 1999)

Type de cancérogène		Exemples
Génotoxiques	Directs (sans activation)	Organique : Agents alkylants, Mitomycine C (agent clastogène) Inorganique : nickel, cadmium, chrome
	Indirects (Avec activation métabolique)	HAP (BaP par exemple, agent clastogène), amines aromatiques, nitrosamines, aflatoxines, hydrazines

Comme le montre le tableau I, certains agents nécessitent une activation métabolique et pour certains d'entre eux les métabolites formés peuvent être plus toxiques que le xénobiotique d'origine (cas du BaP et des époxydes des HAP en général produisant des adduits à l'ADN volumineux).

⁶ La famille d'oncogènes *ras* est l'une des premières à avoir été reconnue porteuse de mutations dans une grande variété de cancers humains (Stewart & Kleihues, 2005)

⁷ Le gène *p53* est le gène suppresseur de tumeur le plus souvent altéré dans le cancer humain et est muté dans plus de 50 % de pratiquement tous les types de tumeurs (Stewart & Kleihues, 2005)

1.2.2. Les cancérogènes non génotoxiques ou épigénétiques

L'épigénétisme voit une première définition apparaître dans les années 40 par l'embryologiste Conrad Waddington et désigne le lien entre le génotype (l'ensemble des gènes) et le phénotype (l'ensemble des caractères exprimés). L'épigénétique correspond à l'étude des changements dans l'activité des gènes, qui n'impliquent pas de modification de la séquence d'ADN et qui peuvent être transmis lors des divisions cellulaires (Bourc'his, 2015).

Les modifications épigénétiques sont induites par l'environnement au sens large (alimentation, tabagisme, stress, ...) et peuvent conduire à des modifications dans l'expression des gènes. Une dérégulation des processus épigénétiques pourrait contribuer à la cancérogenèse en perturbant des processus cellulaires fondamentaux (réparation ou réplication de l'ADN par exemple, ou encore en agissant sur les mécanismes assurant l'équilibre entre auto-renouvellement et différenciation des cellules souches) (IARC, 2009). Les modifications les mieux caractérisées sont la méthylation de l'ADN et conduisent à l'inactivation des gènes concernés. Les modifications des histones changent quant à elles l'état de compactage de l'ADN pouvant favoriser ou limiter l'accessibilité aux gènes (Bourc'his, 2015).

Les anomalies épigénétiques contribuent également au développement et à la progression de maladies humaines, et en particulier du cancer. En effet, les processus épigénétiques interviennent dans des phénomènes tels que la division cellulaire, la différenciation, la survie ou encore la mobilité, *etc.* L'altération de ces phénomènes peut favoriser la transformation de cellules saines en cellules cancéreuses. Certaines modifications activant des oncogènes ou inhibant des gènes suppresseurs de tumeurs ont pu être mises en évidence, et des mutations sur des gènes codant pour des enzymes responsables de marquages épigénétiques ont été identifiées (Bourc'his, 2015).

Tout comme certains produits génotoxiques, une gamme d'agents non génotoxiques peut provoquer le cancer chez l'Homme et/ou l'animal (Yamasaki *et al.*, 1996). Pour ce type d'agent, des effets sans seuil sont supposés exister et être mesurables et correspondent à des effets déterministes, la gravité augmentant avec la dose. Ces cancérogènes épigénétiques ne sont pas détectables par les études de mutagenèse car ils n'entraînent pas d'altérations du patrimoine génétique. Ils peuvent avoir comme conséquences une modification de l'expression des gènes, des modifications biochimiques et/ou morphopathologiques et/ou immunitaires, ... (Pairon, 2015). Les agents épigénétiques opèrent plus largement comme des « promoteurs » et nécessitent une exposition élevée et continue (Weisburger & Williams, 2000), les agents « promoteurs » étant des agents non génotoxiques qui favorisent la cancérogenèse en stimulant la division cellulaire (IARC, 2009). Les changements épigénétiques seraient capables d'altérer la balance oncogènes - gènes suppresseur de tumeur, ces derniers étant le plus souvent affectés par les modifications épigénétiques (Perri *et al.*, 2017).

La figure 5 présente une vue synthétique de différents mécanismes épigénétiques impliqués dans la cancérogenèse.

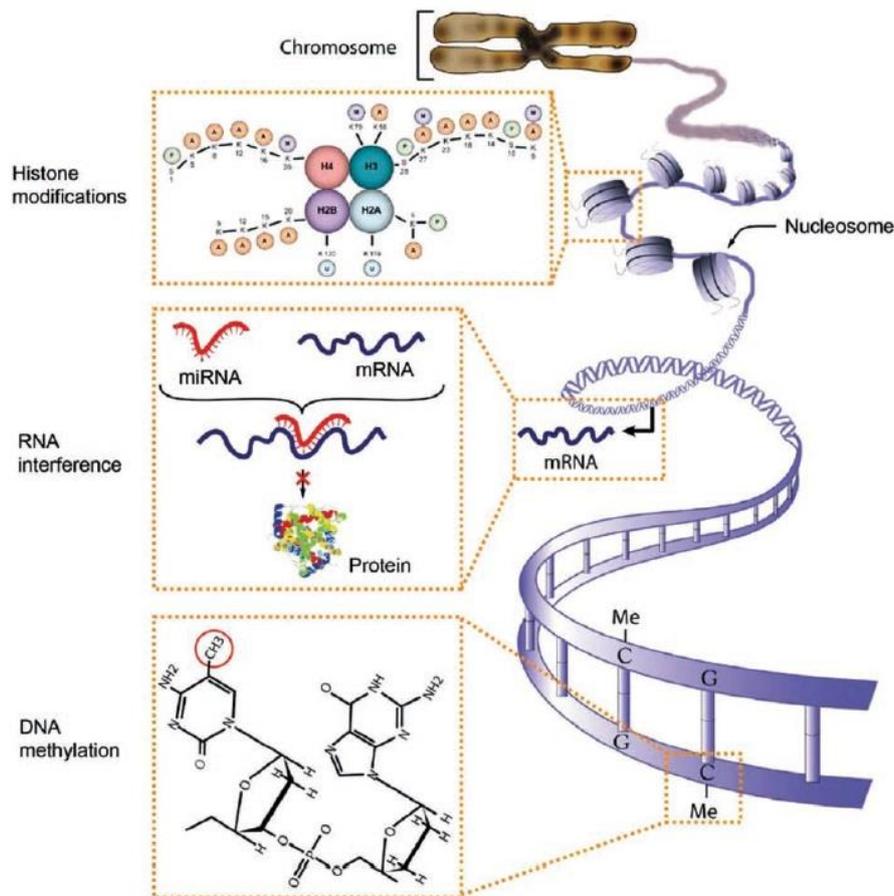


Figure 5 : Mécanismes épigénétiques impliqués dans la cancérogenèse (d'après Kim *et al.*, 2011)

Un des premiers changements épigénétiques décrit dans la cancérogenèse humaine est la méthylation de l'ADN, qui est hautement dérégulé dans les cellules cancéreuses. Pour Petkov *et al.* (2015), la méthylation de l'ADN est un mécanisme impliqué dans l'étape d'initiation de la cancérogenèse et pour Virani *et al.* (2012) il est l'un des mécanismes épigénétiques les plus étudiés. Le génome cancéreux est généralement hypo-méthylé, même si certaines régions sont hyper-méthylées par surexpression d'enzymes du type DNA-méthyltransférases. La dérégulation de la méthylation de l'ADN est en interaction avec d'autres voies épigénétiques, et en particulier avec les protéines impliquées dans le contrôle des interactions entre l'ADN et les histones.

Les deux modifications les plus connues des histones sont la méthylation et l'acétylation. La méthylation des histones est associée à la régulation de la transcription (activation ou répression) tandis que l'acétylation des histones est fortement associée à l'activation de la transcription, mais également au maintien de la structure de la chromatine et à la réparation de l'ADN (Dawson, & Kouzarides, 2012). Il est à noter que les enzymes entraînant des modifications des histones peuvent également avoir d'autres cibles. La phosphorylation est également un phénomène impliqué dans la modification des histones. Ces phénomènes altèrent la charge des protéines et modifient leurs propriétés ioniques. La phosphorylation des histones est un phénomène faisant partie de processus cellulaires essentiels, tels que mitose, apoptose, réparation, réplication et transcription de l'ADN (Dawson & Kouzarides, 2012).

Des petits fragments d'ARN non codants (miRNA) sont également impliqués dans la transcription et la post-transcription, et des études récentes ont montré que les miRNA régulent la prolifération cellulaire et l'apoptose, phénomènes importants dans le développement du cancer. Ils peuvent lorsqu'ils sont

amplifiés aboutir (i) à une inhibition de la traduction des gènes en protéines après fixation sur les gènes cibles par complémentarité de bases ou (ii) à une surexpression des oncogènes et/ou à une dérégulation des gènes suppresseurs de tumeurs (Zhang *et al.*, 2007).

D'autres cancérogènes non génotoxiques sont susceptibles (i) d'agir sur la signalisation cellulaire et notamment sur le récepteur Aryl hydrocarbon Receptor⁸ (AhR) (cas des dioxines), (ii) d'interagir avec le récepteur Pregnane X Receptor⁶ (PXR), (iii) de perturber le fonctionnement cellulaire (cas des pesticides organochlorés et de l'activité œstrogéno-mimétiques, INSERM, 2008). Le tableau II présente quelques exemples d'agents cancérogènes non génotoxiques.

Tableau II : Exemples de cancérogènes non génotoxiques (d'après Ballet & Beaune, 1999)

Types de cancérogènes	Exemples
Non génotoxiques	Esters de phorbol (dont le 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate, TPA); pesticides organochlorés (DDT, chlordane, lindane, ...); Tétrachloro-Dibenzo-Dioxine (TCDD), dioxine dite de SEVESO ; Polychlorobiphényles (PCB) ; œstrogènes, androgènes

La figure 6 présente une vue générale synthétisant les différents modes d'action des cancérogènes génotoxiques et épigénétiques.

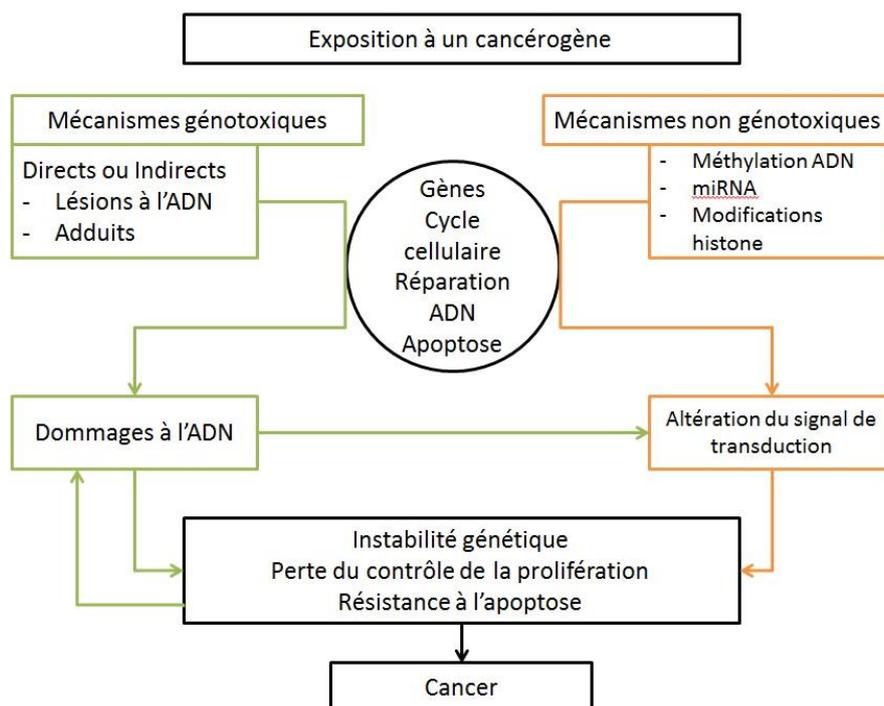


Figure 6 : Vue générale des différents modes d'action des cancérogènes chimiques (d'après Luch, 2005 - modifié)

Comme le montre la figure 6, entre l'exposition à des cancérogènes et la survenue du cancer, de nombreuses étapes sont nécessaires et les mécanismes d'action des agents cancérogènes selon leur caractère génotoxique ou non sont variés. De plus, le métabolisme de certaines substances est parfois complexe et peut faire appel à de nombreuses enzymes pour lesquelles existent des polymorphismes génétiques (INRS, 2000). Ce polymorphisme peut générer des métabolites différemment soit

⁸ La principale fonction des récepteurs AhR et PXR est l'adaptation de l'organisme à l'afflux de xénobiotiques, puisqu'ils sont responsables de l'induction de systèmes enzymatiques et de leur élimination

qualitativement soit quantitativement, et chez l'Homme les arylamine N-acétyl-transférases NAT1 et NAT2 font partie des exemples d'enzymes polymorphes les mieux documentés (Deloménie *et al.*, 1998). Les enzymes de réparation de l'ADN sont également polymorphes, ce qui fait que pour des expositions équivalentes, deux individus de même poids, même âge, même sexe auront des capacités de réponse vis-à-vis des lésions à l'ADN différentes (Pfohl-Leszkowicz, 2010). Cette notion de susceptibilité interindividuelle couplée aux différents mécanismes d'action des cancérogènes sont à l'origine de la lourdeur, de la durée et de la complexité des études de cancérogénèse.

1.3. Expérimentation animale et cancérogénèse

L'expérimentation animale soulève un questionnement scientifique et éthique. En 1959, Russell & Burch ont publié « *The Principles of Humane Experimental Technique* » dans lequel ils ont statué sur le fait que toute expérimentation sur l'animal devrait intégrer autant que possible le concept des 3R (Replacement, Reduction, Refinement). Ce concept des 3R est soutenu par la réglementation, les lignes directrices mais également par les différentes pratiques de travail, et pour Workman *et al.* (2010), les 3R devraient faire partie intégrante des plannings de recherche sur le cancer.

Historiquement, le cancer du foie (avec le cancer de la peau) a été l'un des modèles expérimentaux les plus utilisés pour (i) comprendre les mécanismes de la cancérogénèse et (ii) permettre une étude fine de la relation entre la dose et l'effet cancérogène. De plus, de nombreuses substances chimiques permettent d'induire facilement et de façon reproductible des cancers du foie chez le rat et la souris, et les tumeurs hépatiques permettent un bon dénombrement et une bonne caractérisation de différents paramètres (forme entre autres) (Ballet & Beaune, 1999).

1.3.1. L'expérimentation animale en chiffres en France (MENESR, 2014).

Entre 1990 et 2013, des enquêtes trisannuelles sur l'utilisation des animaux à des fins scientifiques ont été réalisées pour répondre aux obligations réglementaires européennes (Directive 86/609/CEE, article 13). A compter de 2014, cette enquête est devenue annuelle en application de la nouvelle Directive relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (2010/63/UE). Ainsi, pour l'année 2014 en France, dans les établissements utilisateurs bénéficiant d'une autorisation, la souris (*Mus musculus*) est l'animal le plus utilisé (48,2 % ; plus de 850 000 animaux) ; viennent ensuite les poissons, toutes espèces confondues (30,3 %) puis le rat (*Rattus norvegicus*) avec 7,4 % (plus de 130 000 animaux). Les primates non humains ne représentent que 0,06 % des animaux (1 103). L'objet des études le plus fréquent est la mise au point, la production ou les essais de qualité, d'efficacité et d'innocuité de médicaments à usage humain ou vétérinaire, de denrées alimentaires, de compléments alimentaires pour animaux et d'autres substances ou produits (52 %). Il est à noter que 51 % des animaux ont été utilisés dans le cadre de procédures imposées par la législation ou la réglementation, et parmi ces 51 %, la quasi-totalité (98,2 %) répond à des obligations réglementaires de l'Union Européenne.

Le degré de gravité des procédures expérimentales est défini réglementairement par l'arrêté du 1^{er} Février 2013 (relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation des projets impliquant l'utilisation d'animaux dans des procédures expérimentales, annexe – section 1). Ce degré de gravité est déterminé en fonction de l'intensité de la douleur, de la souffrance, de l'angoisse ou du dommage durable qu'un animal donné risque de subir au cours de la procédure expérimentale. Les différentes classes de procédures expérimentales sont définies de la manière suivante :

- Légère : les animaux sont susceptibles d'éprouver une douleur, une souffrance ou une angoisse légère de courte durée, mais également celles sans incidence significative sur le bien-être ou l'état général des animaux ;

- *Tous animaux confondus, ces procédures sont les plus nombreuses (54 %) et concernent principalement les poissons (48,9 %) et les souris (31,3 %) ;*
- Modérée : les animaux sont susceptibles d'éprouver une douleur, une souffrance ou une angoisse légère de courte durée ou une douleur, une souffrance ou une angoisse légère de longue durée, ainsi que celles susceptibles d'avoir une incidence modérée sur le bien-être ou l'état général des animaux ;
 - *Ces procédures utilisent principalement des souris (69,7 %) ;*
- Sévère : les animaux sont susceptibles d'éprouver une douleur, une souffrance ou une angoisse intense ou une douleur, une souffrance ou une angoisse modérée de longue durée, mais également celles susceptibles d'avoir une incidence grave sur le bien-être ou l'état général des animaux ;
 - *Ces procédures utilisent principalement des souris (76,1 %) ; ce type de procédures figure parmi les moins nombreuses (9 % de toutes les procédures) ;*
- Sans réveil : procédure expérimentale menée intégralement sous anesthésie générale, au terme desquelles l'animal ne reprend pas conscience.
 - *Ces procédures utilisent principalement des souris (43,8 %) et figurent parmi les moins nombreuses (6 % de toutes les procédures).*

1.3.2. Lignes directrices

1.3.2.1. Pour les études de cancérogenèse

La ligne directrice (LD) OCDE n°451 sur les études de cancérogenèse a été initialement adoptée en 1981 et a été périodiquement revue en fonction des progrès scientifiques, des nouvelles pratiques d'évaluation mais également des considérations relatives au bien-être animal. Egalement, les nouvelles exigences réglementaires ont rendu nécessaire sa révision (OCDE, 2009a). Tout protocole d'étude doit faire l'objet d'une validation préalable par un Comité d'Ethique sur l'Expérimentation Animale⁹ (CEEA).

La plupart des études de cancérogenèse sont menées sur des espèces de rongeur et les principales voies d'exposition sont la voie orale, la voie cutanée et l'inhalation ; le choix de la voie dépendant des caractéristiques physico-chimiques de la substance et de la voie d'exposition prédominante chez l'Homme. La LD 451 porte principalement sur la voie orale, la voie cutanée et l'inhalation nécessitant des dispositifs techniques d'une grande complexité (OCDE, 2009a). L'étude de cancérogenèse donne des éléments d'informations sur :

- Le risque pour la santé susceptible d'apparaître suite à une exposition répétée pendant une période pouvant couvrir la vie entière de l'espèce considérée ;
- Les effets toxiques de la substance (y compris le pouvoir cancérogène) ;
- Les organes cibles et leur potentielle possibilité d'accumulation ;
- Une estimation de la dose sans effet nocif observé pour ce qui est des effets toxiques, et dans le cas des cancérogènes non génotoxiques sur la réponse tumorale.

Des critères de sécurité concernant l'exposition humaine sont alors établis. Il est à noter que lors de la réalisation d'une étude de cancérogenèse, il est recommandé de suivre les principes et considérations de l'OCDE sur la reconnaissance, l'évaluation et l'utilisation des signes cliniques comme effets observés éthiquement acceptables dans les expérimentations animales menées (OCDE, 2009a). En effet, si l'animal présente des signes cliniques progressifs de détérioration de son état, une décision

⁹ Un CEEA est composé d'au moins un chercheur, un technicien, un animalier, un vétérinaire et une personne extérieure. Les CEEA sont enregistrés et agréés par le MENESR (au 17 Décembre 2015, leur nombre s'élève à 126)

d'euthanasier ou non l'animal devra être prise en considérant d'une part la valeur des informations obtenues en maintenant l'animal dans l'étude et d'autre part son état général (OCDE, 2000).

Les rats et les souris sont les espèces animales les plus couramment choisies dans le cadre des études de cancérogenèse, notamment en raison de (i) leur durée de vie relativement courte, (ii) leur utilisation fréquente dans les études pharmacologiques et toxicologiques et (iii) leur sensibilité à l'induction de tumeurs. Cependant d'autres espèces sont parfois envisagées si celles-ci permettent une meilleure prédiction des effets de la substance sur la santé humaine (OCDE, 2009a). Le choix de l'espèce s'effectue donc en fonction de la pertinence scientifique, des aspects zootechniques et/ou éthiques.

Les études sont réalisées sur des animaux adultes sains (les femelles étant nullipares et non gravides), acclimatés aux conditions de laboratoire depuis au moins sept jours et n'ayant jamais subi de protocoles expérimentaux ; pour les rongeurs, l'administration de la substance à étudier commence avant l'âge de huit semaines. Des animaux des deux sexes sont utilisés, en nombre suffisant pour permettre l'évaluation biologique et statistique, ce qui engendre le coût élevé des études de cancérogenèse, pouvant aller de deux à trois millions d'euros.

Chaque groupe de dose, comme les groupes témoins correspondant, comprend au moins 50 animaux de chaque sexe ; un groupe supplémentaire d'animaux satellites (généralement cinq animaux de chaque sexe) peut être inclus si nécessaire pour le suivi pathologique au cours de l'étude. La LD 451 recommande d'utiliser au moins trois doses et un groupe témoin (groupe non traité ou recevant le véhicule si la substance est administrée dans un véhicule). L'exposition se fait généralement sur sept jours par semaine, et ce sur une période de 24 mois. Cette période peut être allongée ou raccourcie en fonction de la durée de vie de la souche utilisée, cette décision devant faire l'objet d'une justification. Une période de 18 mois peut toutefois être plus appropriée, et notamment pour certaines espèces de souris (AKR/J, C3H/J ou C57BL/6J).

1.3.2.2. Etude combinée de toxicité chronique et de cancérogenèse OCDE n°453

L'objectif de ce type d'étude est d'identifier des effets cancérogènes et chroniques pour des mammifères, et de déterminer des relations dose-effet à la suite d'une exposition prolongée et répétée. Le rat est classiquement l'espèce utilisée dans ces études. Cette étude combinée donne des informations sur les risques pour la santé susceptibles de découler d'une exposition répétée pendant une période couvrant la vie entière de l'espèce considérée, et notamment sur les effets toxiques de la substance, les organes cibles et la possibilité d'accumulation dans ces organes et dans le cas de substances cancérogènes non génotoxiques une estimation des réponses tumorales (permettant d'établir des critères de sécurité pour l'exposition humaine) (OCDE, 2009b).

L'essai combiné permet une meilleure efficacité en temps et en coûts, mais également un moindre recours aux animaux par rapport à la conduite des deux essais séparément, sans pour autant compromettre la qualité des données obtenues. Comme pour la ligne directrice n°451, le recours à d'autres espèces peut être envisagé si les données disponibles supposent une meilleure prédiction des effets de la substance sur la santé humaine (OCDE, 2009b).

Les trois principales voies d'administration utilisées dans les études de toxicité chronique et de cancérogenèse sont la voie orale, la voie cutanée et l'inhalation ; le choix de la voie d'administration dépendant également (i) des propriétés physico-chimiques de la substance et (ii) de la voie d'exposition chez l'Homme (OCDE, 2009b). Le protocole expérimental est globalement identique à celui de la LD 451 pour le choix des animaux à opérer pour ce type d'étude. La phase de cancérogenèse de cette étude combinée dure également 24 mois, pour correspondre à la majeure partie de la durée de vie des animaux utilisés ; cependant, cette période peut également être raccourcie.

1.3.2.3. Etude de cancérogénèse court terme sur des modèles transgéniques (TGN)

L'utilisation de modèles d'animaux transgéniques permet de vérifier *in vivo* des effets observés *in vitro* (GIS, 2010). L'espèce généralement utilisée est la souris qui est rendue hypersensible aux agents cancérogènes par des modifications du patrimoine génétique (addition, délétion, modification de gènes ou de séquences d'ADN) afin que le processus cancéreux soit détecté plus rapidement. Ces études se font généralement sur une période de six mois *a contrario* des 18/24 mois pour les études de cancérogénèse selon les lignes directrices de l'OCDE. Différents mécanismes peuvent être utilisés à cette fin :

- Activation et/ou surexpression d'un oncogène
 - Tg.AC, gène v-Ha-*ras* sous le contrôle de zéta-globuline de souris ;
 - Tg.*ras* H2, gène *ras* humain, cinq à six copies ;
- Inactivation de gène suppresseur de tumeurs (p53 +/-) ;
- Inactivation de gène de réparation de l'ADN (XPA +/-).

Lorsqu'un gène est invalidé ou altéré, les souris sont dites « knock-out », alors que lorsqu'un gène est ajouté au génome murin les souris sont dites « knock-in » ; les études de cancérogénèse sur des modèles transgéniques utilise à 95 % des souris « knock-out » (GIS, 2010).

Pour ce type d'étude, ce sont 20 à 25 animaux par sexe et par dose qui sont nécessaires, avec un lot témoin négatif, un lot témoin positif et trois lots d'animaux traités. Le traitement se fait sur une période de 26 semaines, à une fréquence variable. Le suivi des animaux s'effectue sur différents paramètres, tels que le poids, la consommation de nourriture, un examen clinique, une palpation, la pesée des organes, des examens biochimiques, hématologiques, histopathologiques, ... (Nesslany, 2013).

La localisation et le type histologique des tumeurs sont le plus souvent identiques aux tumeurs spontanées observées chez des animaux non modifiés et l'incidence des tumeurs hépatiques ne semble pas accrue dans ces modèles (Ballet & Beaune, 1999). Les principaux avantages de ces méthodes sont le gain de temps et l'utilisation d'un nombre d'animaux moins important. Cependant, le gain de temps obtenu par le recours à ce type d'animaux est à relativiser au regard du coût élevé que représente l'utilisation de ces animaux. Les études sur animaux transgéniques sont autorisées réglementairement pour les médicaments humains, et le coût de ce type d'étude se situe autour d'un million d'euro.

1.3.2.4. Tests de génotoxicité

Les tests de génotoxicité peuvent être définis comme des tests *in vitro* ou *in vivo* conçus pour détecter les substances capables d'induire des dommages génétiques directement ou indirectement par différents mécanismes (EMEA, 1998). Beaucoup ont été développés à partir de 1975 avec divers objectifs : simplicité des tests, coût peu élevé, facilement disponibles et interprétables (Pairon, 2015). Les tests à court terme sont classés selon (i) le modèle cellulaire employé (bactéries, cellules de mammifères, cellules humaines, ...), et (ii) le type de tests (dommages primaires de l'ADN, mutations géniques, aberrations chromosomiques). Une distinction peut également s'opérer selon que la substance soit un génotoxique direct ou indirect et qu'elle nécessite donc l'utilisation d'une activation métabolique, par exemple d'un système exogène d'activation métabolique¹⁰. L'évaluation exhaustive du potentiel génotoxique ne peut toutefois pas se faire par la mise en œuvre d'un unique test, mais plutôt par différents tests complémentaires (EMEA, 1998). C'est pourquoi, pour couvrir l'ensemble des

¹⁰ Le plus communément utilisé est la fraction post-mitochondriale (S9), préparé à partir de foies de rongeurs traités par un inducteur enzymatique (Arochlor 1254 par exemple)

évènements génétiques pouvant mener à des phénomènes de mutagenèse, la plupart des législations (le Scientific Committee on Consumer Safety SCCS pour la cosmétique ; le International Conference of Pharmaceuticals for Human Use ICH avec la Directive S2(R1) sur l'évaluation de la génotoxicité des produits pharmaceutiques destinés à l'utilisation humaine et l'interprétation des données ; ...) recommande de réaliser deux tests parmi les trois suivants :

- Un test de mutation génique : par exemple le test de mutation reverse sur bactéries (test d'Ames, selon la ligne directrice OECD n°471) ;
- Un test d'aberrations chromosomiques : par exemple le test des micronoyaux *in vitro* (selon la ligne directrice OCDE n°487) comme test couvrant la clastogénèse et l'aneuploïdie ;
- Un test de mutation génique : par exemple le test sur les cellules V79 Hprt¹¹, selon la ligne directrice OCDE n°476, et/ou chromosomique (par exemple le test MLA/TK¹²).

Le tableau III présente l'interprétation des résultats de ces tests de génotoxicité en fonction des résultats, positifs ou négatifs.

Tableau III : Résultats des tests de génotoxicité et interprétation

Tests	Résultats			
Ames <i>in vitro</i>	-	+	+	-
Micronoyaux ou Aberrations chromosomiques	-	+	-	+
Interprétation	Probablement non mutagène <i>in vivo</i>	Probablement mutagène <i>in vivo</i>	Investigations complémentaires nécessaires	

Comme le montre le tableau III, si les résultats de ces tests sont négatifs, la substance n'a probablement pas de potentiel mutagène. Si les résultats de deux tests sont positifs, il est très probable que la substance ait un potentiel mutagène. Dans ces deux cas, des tests supplémentaires ne sont pas toujours nécessaires. Dans le cas où un des tests est positif, une expérimentation complémentaire peut être utilisée pour mieux évaluer le potentiel mutagène (et/ou clastogène) de la substance. Pour l'évaluation de la génotoxicité des produits pharmaceutiques, des tests *in vivo* sont compris dans la batterie d'évaluations car (i) certaines substances sont génotoxiques *in vivo* et pas *in vitro*, et (ii) qu'il est souhaitable d'intégrer des tests tenant compte de l'absorption, distribution métabolisation et excrétion.

D'après la Directive S2(R1) et le SCCS, l'ajout d'un troisième test ne permettrait pas une meilleure prédictivité mais plutôt un résultat plus « sûr » en élargissant le spectre des modifications génétiques détectées. De plus, l'augmentation du nombre de tests peut diminuer la précision des prédictions en augmentant l'incidence de résultats positifs sans lien avec la cancérogénicité chez les rongeurs.

Afin d'interpréter au mieux ces tests pour l'appréciation du potentiel cancérogène, et notamment génotoxique, certains pièges inhérents à ces tests sont à considérer (Pairon, 2015) :

- En ce qui concerne la substance à l'essai en elle-même : différents éléments sont à prendre en considération :
 - La pureté du produit ;
 - La stabilité dans le solvant et/ou le milieu de culture ;
 - Existence de modifications induite par le pH du milieu, par la pression osmotique ;

¹¹ Essai *in vitro* de mutation génique sur cellules de mammifères utilisant le gène Hprt (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase)

¹² Essai *in vitro* de mutation génétique sur cellules de mammifères utilisant le gène TK (Thymidine Kinase)

- Cytotoxicité.
- Par les conditions de traitement (durée de traitement et dose) ;
- Les limites propres des tests :
 - Le test d'Ames par exemple n'est pas un test approprié à certaines substances, telles que la vinblastine (produit agissant sur la division cellulaire), le diéthylstilbestrol DES (action après fixation sur un récepteur) ou le cadmium (déplétion en histidine). De plus, ce test ne peut détecter (i) les produits contenant de l'histidine (ou du tryptophane), ou (ii) intervenant dans la synthèse de ces acides aminés, ni (iii) sur les bactéricides (Pairon, 2015). Enfin, il est à noter que pour certaines autres substances, *i.e.* nanoparticules, composés biocides et antibiotiques, le test de mutation reverse n'est pas adapté.

Les tests *in vitro* sont considérés comme très sensibles¹³ tandis que les tests *in vivo* tendent à être très spécifiques¹⁴. Aucune batterie de tests n'est idéale et nécessite de connaître les « pièges » des tests à court terme. Ces tests indiquent un potentiel génotoxique dans les conditions du test et le principal intérêt de ces tests est de mettre en évidence les substances capables d'altérer l'ADN et d'induire de ce fait la phase d'initiation de la cancérogenèse. Des résultats positifs *in vitro* sont plus à utiliser comme une indication d'un éventuel potentiel cancérogène et constitue donc une première étape, tandis que les méthodes *in vivo* apportent des résultats positifs en étude de cancérogenèse et entraînent des présomptions fortes pour l'Homme.

1.4. Alternatives actuelles

Le terme « alternatives » a été inventé en 1978 par le physiologiste David Smyth dans son ouvrage « Alternatives to Animal Experiments ». Cette définition n'est pas qu'une reformulation de la règle des 3R (Replacement, Reduction, Refinement), elle impose à ceux impliqués de quelque manière que ce soit dans l'utilisation d'animaux de laboratoire d'avoir une responsabilité morale et de produire des arguments convaincants attestant que l'expérimentation animale est nécessaire (Balls, 2007). Cependant, ce concept des « 3R » a mis du temps à acquérir de la reconnaissance et à être accepté (Balls, 2007). Ces recommandations sont d'abord passées inaperçues avant de servir de référence à de nombreux textes réglementaires (GIS 2010) et ont permis une réflexion sur l'expérimentation animale.

L'émergence des méthodes alternatives mettant en application le principe des 3R a fait apparaître au niveau international différents acteurs, tels que l'European Union Reference Laboratory for Alternatives to Animals Testing (EURL ECVAM), qui a pour but de promouvoir l'adoption scientifique et réglementaire des tests alternatifs. L'EURL ECVAM coordonne à un niveau européen une évaluation indépendante de tests pertinents et fiables pour des buts spécifiques, et ce pour des produits de différentes sortes (médicaments, vaccins, cosmétiques, ...). Egalement au niveau européen, le Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) fournit un avis sur les risques pour la santé et la sécurité pour certains produits (cosmétiques et leur ingrédients, jouets, textiles, ...). Ce comité suit de près les progrès réalisés dans le développement et la validation de méthodes alternatives pour l'évaluation des produits finis qui ne peuvent plus être testés chez l'animal (SCCS, 2016).

Francopa est la plateforme française dédiée au développement, à la validation et à la diffusion de méthodes alternatives en expérimentation animale. Elle a été créée en 2007 et est soutenue par le Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie, par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, par l'INERIS et l'ANSM.

¹³ Sensibilité : nombre de tests positifs vis-à-vis des substances non cancérogènes génotoxiques

¹⁴ Spécificité : nombre de tests négatifs vis-à-vis des substances non cancérogènes génotoxiques

Dans le cadre des méthodes alternatives, différentes méthodes répondant à chacun des 3R peuvent être instaurées. Les méthodes de substitution sont celles qui remplacent les méthodes *in vivo*, et qui permettent donc de supprimer le recours à des animaux vivants. Les animaux peuvent être remplacés par des systèmes *in vitro* (culture cellulaire), *in silico*, ou par un remplacement relatif pour lequel les animaux utilisés ont un potentiel de perception de la douleur qui est significativement moins élevé (GIS, 2010).

Pour les méthodes de réduction, le nombre d'animaux nécessaire à une étude est choisi sur la base d'une étude statistique, afin de trouver un équilibre entre réduction et représentativité. La maîtrise de la génétique permet également d'utiliser moins d'animaux, en effet l'utilisation de souches de rats ou de souris dits consanguins diminue la variabilité génétique ce qui permet également de réduire l'hétérogénéité interindividuelle et donc le nombre d'animaux. Les technologies « omics¹⁵ » permettent également de réduire l'utilisation des animaux de laboratoire en conduisant de nouvelles formes d'investigations sur le vivant et d'obtenir ainsi de nombreuses informations sur la réponse cellulaire et/ou tissulaire à une exposition *in vitro* ou *in vivo* à des composés chimiques. Ces technologies sont de plus en plus utilisées en recherche biomédicale, en amont ou en aval d'expérimentation sur les animaux (GIS, 2010). Toutefois, leur utilisation (i) nécessite encore des validations des modèles pour lesquels elles seront employées, et (ii) représente un coût économique (CNRS, 2009). Il est à noter cependant que dans le cadre d'études réglementaires, le nombre minimum d'animaux est fixé par les textes.

Dans le cadre des alternatives de « raffinement » (appelées également alternatives d'optimisation), diverses améliorations permettent de réduire les contraintes imposées aux animaux, que ce soit au niveau des conditions d'hébergement ou liées aux études (manipulations par des techniciens ; douleur aiguë ou chronique). Des modifications peuvent être apportées à l'élevage ou aux procédures expérimentales afin de réduire la douleur et la détresse, et d'améliorer ainsi le bien-être des animaux (GIS, 2010). Dans le cas des études de cancérogenèse ou pour les maladies inflammatoires, il n'est pas toujours possible de supprimer la douleur, et pour répondre à ce type de contrainte, la notion de point d'arrêt anticipé a été créée, celui-ci dépendant du modèle d'étude. Il peut correspondre à une perte de poids ou d'appétit, un changement de comportement ou une modification de constantes sanguines.

Les méthodes alternatives peuvent se diviser en deux grandes sous catégories :

- Les méthodes non analytiques, (*in silico* ou QSAR) qui sont des méthodes ayant recours à des modèles mathématiques afin de prédire le potentiel cancérogène de substances ;
- Les méthodes analytiques, qui reposent sur des méthodes *in vitro*, avec notamment la transformation cellulaire et la communication intercellulaire des gap-jonctions. Celles-ci peuvent également être utilisées pour identifier des cancérogènes non génotoxiques.

1.4.1. Les méthodes non analytiques

Le développement d'outils informatiques fiables couplés à la puissance informatique a permis de mettre en place des techniques de simulation numérique (Inserm). Le terme *in silico* est utilisé pour signifier « réaliser sur ordinateur » ou « *via* une simulation informatique » (ECVAM), le silicium étant retrouvé dans les puces informatiques de tous les ordinateurs. Il a été défini en 1989 et est utilisé pour la première fois par le mathématicien Pedro Miramontes par analogie avec les termes latins « *in vivo* »

¹⁵ Ces technologies peuvent se définir comme des techniques d'analyse à haut débit permettant une analyse simultanée d'un grand nombre de variables en biologie (mesure de matériel génétique, de protéines, de métabolites, etc.).

et « in vitro » qui sont communément utilisés en biologie et qui font référence à des expérimentations réalisées dans des organismes vivants ou « dans le verre ».

Un large ensemble de méthodes numériques est regroupé sous ce terme *in silico*, méthodes utilisant les mathématiques pour simuler ou modéliser un phénomène biologique à l'aide de l'outil informatique (INSERM). Ces méthodes utilisent des bases de données issues des expérimentations *in vitro* et/ou *in vivo* (Prevot, 2014). Ces méthodes prédictives contribuent à l'identification précoce des dangers ainsi qu'à une meilleure compréhension des réactions physico-chimiques. De plus, ces méthodes sont moins coûteuses et plus rapides, et se substituent à l'expérimentation animale (Prevot, 2014).

L'utilisation de l'approche *in silico* est encouragée par (i) le règlement REACH n°1907/2006/CE, (ii) les Notes of Guidances du SCCS pour l'évaluation des ingrédients et des produits cosmétiques et (iii) la ligne directrice M7 de l'ICH pour l'évaluation du potentiel mutagène des impuretés de produits pharmaceutiques. Au sein de ces méthodes non analytiques, deux grands types d'approches sont généralement distingués : la modélisation de données et la modélisation moléculaire (Jacob, 2012).

1.4.1.1. La modélisation de données

Les principales approches ayant recours à la modélisation de données sont les méthodes dites de Relation Quantitative Structure Activité (Quantitative Structure Activity Relationship, QSAR) et les méthodes Relation Quantitative Structure Propriété (Quantitative Structure Property Relationship, QSPR) (Jacob, 2012). Les Structure Activity Relationship (SAR) définissent quant à elles une relation qualitative entre une structure et la présence ou absence d'une propriété ou d'une activité considérée (ECHA, 2009). Les (Q)SAR ont été inventés il y a plus de 50 ans par Corwin Hansch et depuis ces méthodes ont évolué et se sont diversifiées (Cherkasov *et al.*, 2014).

Que ce soit dans le cadre de REACH ou du règlement CLP (Classifying, Labelling, Packaging), les méthodes (Q)SAR peuvent être prises en considération dans des approches du type WoE¹⁶ (weight of evidence) afin d'obtenir des éléments de preuve lorsque des données expérimentales ne sont pas disponibles. Les résultats de ces modèles peuvent être utilisés pour autant que (i) les résultats sont issus d'un modèle (Q)SAR validé scientifiquement, (ii) la substance relève du domaine d'applicabilité du modèle (Q)SAR, (iii) les résultats conviennent pour la classification et l'étiquetage et/ou pour l'évaluation des risques et (iv) une description suffisante et fiable de la méthode appliquée est fournie (annexe XI du Règlement REACH).

Le principe de ce type de méthodes est de mettre en place une relation mathématique reliant des propriétés moléculaires microscopiques appelées « descripteurs » à un effet expérimental pour une série de composés chimiques similaires, l'effet expérimental pouvant être une activité biologique une toxicité ou encore une affinité pour un récepteur (INSERM). Cette méthode repose sur le postulat que des molécules chimiques similaires ont des activités biologiques semblables. Le choix de la base de données expérimentales de référence est décisif, celle-ci devant comporter des données expérimentales fiables. Le lien entre les descripteurs et la base de données est déterminé grâce à des régressions multilinéaires (MLR), des régressions aux moindres carrés partiels (PLS, « Partial Least Square »), des arbres de décisions, ... (INSERM).

¹⁶ Ce type d'approche utilise toutes les informations disponibles pour un effet et permet d'éviter des essais supplémentaires ; elle requiert un jugement d'experts

Différents outils ont été développés, et notamment (i) Oncologic® par l'US-EPA afin d'étudier le potentiel cancérigène de substances grâce à l'outil informatique (basé sur des méthodes SAR), ou (ii) The QSAR Toolbox développé conjointement par l'OCDE et l'European Chemical Agency (ECHA).

Le tableau IV présente pour les études de cancérogenèse, en distinguant pour chacune des trois grandes étapes, différents descripteurs mis en lien avec un effet expérimental.

Tableau IV : Descripteurs et QSAR pour les différentes étapes de cancérogenèse (Woo, 2015)

	Initiation	Promotion	Progression
Main event(s)	Direct DNA binding Indirect DNA damage	Clonal expansion Cell proliferation Apoptosis Differentiation	Overcoming suppressions (e.g., p53, immune, Angiogenesis)
Key mechanistic consideration	Electrophile, resonance stabilization, nature of DNA adduct	Receptor, cytotoxicity, gene expression Signal transduction, homeostasis	Free radical, receptor, gene suppression
SAR/QSAR mechanistic descriptors	Electrophilicity, HOMO/LUMO ¹⁷ , delocalization energies, ..	2D, 3D, docking, biopersistence, methylation, ...	Reduction potential, 2D, 3D, ...

Le développement de méthodes (Q)SAR pour prédire le potentiel cancérigène est complexe au regard du grand nombre de mécanismes d'action possibles (Serafimova *et al.*, 2010). Des isomères peuvent avoir des propriétés très similaires et cependant peuvent avoir un potentiel cancérigène différent (beta-naphtylamine et alpha-naphtylamine par exemple) (Woo, 2015). Pour Serafimova *et al.* (2010), les méthodes (Q)SAR seraient plus fiables dans la prédiction d'un effet mutagène qui serait observé au cours du test d'Ames (typiquement entre 70 et 75 %), tandis que pour la cancérogénicité la capacité prédictive est généralement comprise entre 50 et 75 % (selon la méthode et la base de données utilisées). Ce type de modèles peut néanmoins donner des informations sur la nature des interactions entre ligands et récepteurs, mais ne permet pas de quantifier ni la force de la liaison ni les atomes impliqués dans celles-ci (INSERM).

1.4.1.2. La modélisation moléculaire

Ce type de méthode est utilisé pour décrire le comportement des molécules de manière atomistique, en étudiant les relations inter et intramoléculaires (Jacob, 2012). La modélisation atomique permet de déterminer la structure tridimensionnelle, l'énergie ainsi que d'autres propriétés physico-chimiques de molécules et/ou systèmes biologiques à partir de leur composition atomique (INSERM).

Différentes approches peuvent être envisagées :

- La mécanique moléculaire, qui est économique en terme de temps de calcul, et permet de traiter des systèmes moléculaires de grande taille. Elle permet également de donner des informations sur la structure tridimensionnelle des récepteurs, sur leurs conformations et sur les interactions chimiques avec le récepteur. Cette approche est à la base de méthodes de « docking » moléculaire, spécifiquement développées pour étudier les interactions entre protéine et substrat, ainsi qu'à la base du criblage *in silico*. Cette méthode permet également d'identifier la structure tridimensionnelle d'une protéine à partir de sa seule séquence en

¹⁷ HOMO : Highest Occupied Molecular Orbital (orbitale moléculaire la plus haute en énergie occupée par au moins un électron) ; LUMO : Lowest Occupied Molecular Orbital (orbitale la plus basse en énergie non occupée par un électron). Ces deux orbitales jouent un rôle dans les mécanismes réactionnels.

acides aminés, la présence de plusieurs conformations énergétiquement stables pouvant complexifier la recherche (INSERM) ;

- La méthode quantique permet de calculer les propriétés électroniques des systèmes. Cette méthode s'appuie sur la résolution approchée de l'équation de Schrödinger¹⁸ et permet de déterminer la configuration électronique de la molécule, sa structure tridimensionnelle, son énergie et ses propriétés physico-chimiques. Elle permet de traiter des systèmes dont la taille s'élève à la centaine d'atomes (INSERM).

Le choix d'une méthode ou d'une autre dépend du problème étudié mais également des ressources de calcul (*i.e.* de la puissance de calcul) mises à disposition.

1.4.2. Les méthodes analytiques

Ces méthodes alternatives, comparées aux modèles *in vivo* sont significativement plus rapides et moins chères. Néanmoins, celles-ci ne sont pas encore considérées comme suffisantes pour complètement remplacer l'expérimentation animale. Les tests de génotoxicité (Ohmori, 2008) mais également les modèles transgéniques peuvent être considérés comme des méthodes alternatives aux études de cancérogenèse dans le sens où elles se substituent partiellement à l'expérimentation animale (d'un point de vue quantitatif). En revanche, les mécanismes épigénétiques (non génotoxiques) et indépendants de dommages à l'ADN qui peuvent jouer un rôle dans la cancérogenèse ne sont pas mis en évidence dans ces tests de génotoxicité. Plusieurs tests *in vitro* ont donc été développés pour mettre en évidence ces effets « promoteurs ». Ils peuvent par exemple mesurer l'inhibition des communications intercellulaires par les gap-jonctions, la promotion ou l'inhibition de la différenciation cellulaire, l'expression de l'antigène du virus d'Epstein-Barr ou l'induction de la transformation cellulaire.

1.4.2.1. Gap Junction Intercellular communication (GJIC)

Les gap-jonctions sont des structures de la membrane permettant la diffusion de petites molécules hydrophiles entre cellules adjacentes et sont considérées comme ayant un rôle important dans la régulation de la croissance cellulaire et de la différenciation (Ohmori, 2008). Les GJIC peuvent être régulées par différents facteurs, tels que les facteurs de croissance, les oncogènes, les ions calcium Ca²⁺, le pH et les hormones (Nishimura *et al.*, 2003). Depuis presque 40 ans, la perte de cette fonctionnalité a été décrite dans des cellules cancéreuses et a conduit à l'hypothèse que ce type de communication est impliqué dans les mécanismes de la cancérogenèse (Mesnil *et al.*, 2005), et notamment sur la phase de promotion (Ohmori, 2008). Les connexines sont les protéines structurelles des gap-jonctions, et une méthylation ou une hyperméthylation des gènes codant pour ces protéines jouent un rôle important dans la régulation de l'expression des gènes, la méthylation étant associée à l'inactivation des gènes concernés. Cette inactivation entraîne une perturbation des échanges intercellulaires de molécules de faibles poids moléculaires, celle-ci pouvant être observée dans des cellules ayant une croissance et un comportement anormal. Ce paramètre semble être un bon candidat pour réaliser un screening des cancérogènes non génotoxiques et des promoteurs de tumeurs en particulier (Jansen & Jongen, 1996), mais les tests réalisés sur différentes lignées cellulaires doivent toujours être standardisés et validés. L'avantage de cette méthode est qu'elle est rapide (sept jours) et que les techniques de détection sont simples. Cependant la toxicité des composés peut affecter les communications intercellulaires (Ohmori, 2008).

¹⁸ Le comportement d'une molécule peut être décrit par cette équation

1.4.2.2. Test de transformation cellulaire

La transformation cellulaire est basée sur des altérations structurales et un changement dans l'expression des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, la prolifération et la différenciation. Des changements génomiques peuvent résulter d'interactions directes, indirectes ou encore de mécanismes non-génotoxiques. Les mécanismes indirects incluent le stress oxydant, des altérations des mécanismes de réparation de l'ADN, des changements dans la méthylation de l'ADN. Les mécanismes non-génotoxiques impliquent une dérégulation du cycle cellulaire, une altération des voies de transduction du signal, une inhibition des communications intercellulaires, avec comme résultante une prolifération de cellules altérées, une différenciation et finalement une transformation néoplasique (OCDE, 2007).

Comme le caractère multi-étapes de la cancérogenèse, la transformation cellulaire est un processus à étape, et LeBoeuf *et al.* (1999) en ont identifié quatre :

- Blocage dans la différenciation (représentée par la transformation morphologique dans le test de transformation cellulaire sur cellules souches embryonnaires de hamster syrien) ;
- Acquisition d'une durée de vie illimitée ;
- Acquisition de tumorigénicité ;
- Malignité (quand les cellules sont injectées à un hôte approprié).

Cette méthode alternative a fait l'objet d'une validation par l'European Commission for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) et est utilisé pour évaluer le potentiel cancérogène mais également pour l'étude des mécanismes de cancérogenèse (ECVAM). Le test de transformation cellulaire est basé sur la détection de changements phénotypiques induits par des substances chimiques dans des cultures cellulaires de mammifères (Schechtman, 2012) et a été développé il y a plusieurs années pour étudier le potentiel cancérogène de substances chimiques (DiPaolo *et al.*, 1969). Ces tests sont largement utilisés à travers le monde, aussi bien dans le monde universitaire qu'industriel depuis plus de cinq décennies (Schechtman, 2012).

Le test de transformation cellulaire est plus rapide et efficace que les tests *in vivo* sur rongeurs. Il est considéré comme apportant une information supplémentaire par rapport aux tests utilisés en routine pour évaluer la cancérogénicité et est listé dans différentes récentes lignes directrices, même si un besoin de standardisation existe encore. L'OCDE a produit un « Detailed Review Paper (DRP) » pour la détection des agents chimiques cancérogènes par le test de transformation cellulaire, en comparant différentes lignées cellulaires pouvant être utilisées dans le cadre de ce test, et les plus couramment utilisées sont :

- Les cellules embryonnaires de souris, cellules C3H10T1/2 ;
- Les cellules souches embryonnaires de hamster syrien, cellules SHE ;
- Les cellules de fibroblastes de souris, cellules Balb/c 3T3.

En raison des performances suffisantes de certaines lignées (SHE et Balb/c 3T3 notamment), l'OCDE a conclu que des lignes directrices officielles devraient être développées.

1.4.2.2.1. Transformation cellulaire sur C3H10T1/2

L'utilisation de cette lignée cellulaire est considérée comme utile dans l'élucidation de mécanismes moléculaires de transformation cellulaire à un niveau génomique et transcriptomique avec une possible prédiction de quelques mécanismes cancérogènes tels que la prolifération cellulaire *via* l'induction d'ornithine décarboxylase ou une prolifération des peroxyosomes (Landkocz *et al.*, 2011 *in* OCDE, 2015a ; Vasseur & Lasne, 2012). Cependant en raison de problème de reproductibilité, une ligne directrice pour ce test n'est pas encore recommandée (Vasseur & Lasne, 2012).

1.4.2.2.2. Transformation cellulaire sur Syrian Hamster Embryo (SHE)

Ce protocole est utilisé dans des études mécanistiques de transformation depuis Berwald & Sachs (1963, 1965). Les lignées cellulaires SHE sont quelques-uns des modèles *in vitro* bien établis mimant les processus de transformation *in vivo*. Sous l'effet d'un traitement avec un cancérigène, ces cellules peuvent suivre un processus de transformation au travers de changements morphologiques distincts qui peuvent être suivis et quantifiés comme « end-point » spécifique de transformation.

L'utilisation du test de transformation cellulaire sur SHE a potentiellement la possibilité de conduire à un remplacement partiel ainsi qu'à une réduction de l'utilisation des animaux dans un contexte réglementaire ou non (EURL ECVAM 2011). Ce test est actuellement utilisé dans différents buts :

- Pour fournir des informations secondaires utiles quand la signification biologique de résultats des bio-essais est incertaine, notamment pour l'industrie pharmaceutique ;
- Pour clarifier des résultats positifs dans des tests de génotoxicité ;
- Pour évaluer certaines classes de substances chimiques pour lesquelles les tests *in vitro* de génotoxicité traditionnels auraient une faible prédictivité (*e.g.* amines aromatiques) (EURL ECVAM, 2010 ; Creton *et al.*, 2012).

Un essai de transformation cellulaire peut être réalisé sur la lignée SHE lorsqu'une alerte structurelle de cancérogenèse existe ou que les tests de mutagenèse *in vitro* présentent des résultats positifs (Crestey, 2011).

Les cellules sont traitées 24 heures après ensemencement jusqu'au jour 7. Ce test permet de détecter les premières étapes de la cancérogenèse par la formation de colonies morphologiquement transformées (Poburski & Thierbach, 2016). Cependant, la procédure standard initiale sur la lignée SHE a évolué face à certains problèmes. Les principales difficultés rencontrées avec le protocole initial sont (i) une faible fréquence de transformation suite à l'exposition à des substances cancérigènes, et (ii) une difficulté à dénombrer et identifier les colonies de cellules transformées (Ohmori, 2008). Un pH plus acide (6,7 au lieu de 7,1-7,3) modifie le métabolisme cellulaire et réduit la communication intercellulaire ce qui se traduit par une augmentation de la sensibilité de la lignée SHE aux transformations morphologiques (OCDE, 2007). Ce pH plus bas permet donc (i) d'observer une augmentation de la fréquence de transformation, (ii) de diminuer la susceptibilité aux fluctuations de qualité du sérum et (iii) d'avoir moins d'ambiguïté sur la cotation des phénotypes transformés. Néanmoins, la cotation et l'identification des cellules transformées dans cet essai est plus difficile que pour les autres essais de transformation. De plus, le test sur lignée SHE est coûteux en raison de l'utilisation de cellules primaires dérivées d'embryons de hamster (Ohmori, 2008).

1.4.2.2.3. Transformation cellulaire sur Balb/c 3T3 et Bhas 42

Le test de transformation cellulaire sur Balb/c 3T3 représente un des modèles les mieux connus et est considéré comme un outil pouvant être utilisé dans le screening de substances chimiques simples mais également pour des mélanges complexes, et notamment pour prédire d'effets cancérigènes (Mascolo *et al.*, 2010). L'utilisation de cancérigènes bien connus a permis de conclure que le test de transformation cellulaire sur Balb/c 3T3 était reproductible et efficace (Poburski & Thierbach, 2016). Ce test utilise des fibroblastes d'embryons de souris, sur le sous-clone A31-1-1 et copie les étapes de la cancérogenèse *in vivo*. Au cours du protocole standard, les cellules sont traitées avec un initiateur de tumeur connu pendant 72h un jour après l'ensemencement (test d'initiation) ou avec un promoteur connu entre le jour 8 à 20 (test de promotion). La période totale de l'essai est de 42 jours, afin d'obtenir un nombre suffisant de colonies.

Le Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) a coordonné la validation du test de transformation cellulaire sur les cellules Bhas 42, un système dérivé de BALB/c 3T3 (ECVAM). La lignée cellulaire Bhas 42 a été établie par transfection de l'oncogène viral contenant l'oncogène humain *ras* (*v-Ha-ras*) dans la lignée cellulaire A31-1-1 de souris Balb/c 3T3. Il a été démontré que l'intégration du gène *v-Ha-ras* était stable et que, comme pour la lignée parentale Balb/c 3T3, elle conservait ses propriétés morphologiques non transformées, y compris celle de l'inhibition dépendante de la croissance cellulaire (inhibition de contact). Après isolement des clones contenant le gène *ras*, les clones non transformés mais néanmoins sensibles au 12-O-TétradécanoylPhorbol-13-Acétate (TPA) ont été sélectionnés (Sasaki *et al.*, 1988). La transfection par l'oncogène viral *v-Ha-ras* permet de sauter l'étape d'initiation dans l'induction de tumeurs cutanées à des souris, ce qui souligne le rôle de cet oncogène dans la cancérogenèse (Bailleul *et al.*, 1989). La lignée Bhas 42 est considérée comme initiée, c'est-à-dire qu'elle est considérée comme ayant progressée au-delà d'un état « normal », vers un processus de cancérogenèse multi-étapes. Ces cellules sont dès lors hautement sensibles à des stimuli induits par des substances cancérogènes, qu'ils soient génotoxiques ou non génotoxiques, et permet une courte période de latence pour l'expression du phénotype transformé (OCDE, 2015b). Comme pour le test de transformation cellulaire réalisé sur Balb/c 3T3, le test sur les cellules Bhas 42 se réalise également en deux étapes, afin de tester l'activité d'initiation et/ou de promotion des substances sur une période de 21 jours. Toutefois, en raison de cet état initié, les cellules Bhas 42 peuvent spontanément se transformer si les conditions de culture sont inappropriées.

Il est à noter que la transformation spontanée est un phénomène commun, mais que les fréquences de transformation sont différentes selon les systèmes cellulaires étudiés. Par un contrôle rigoureux de la qualité des cellules, des réactifs, des conditions de tests, du passage des cellules et du maintien d'une densité de population proche de la sous-confluence (≤ 70 % de confluence) lors de la culture cellulaire, cette fréquence de transformation spontanée reste modérée.

1.5. Conclusion du contexte scientifique

La complexité des processus de cancérogenèse rend difficile le développement de méthodes alternatives *in vitro* qui miment l'ensemble des processus, et particulièrement pour les substances non génotoxiques (van Benthem *et al.*, 2010). Cette complexité est également renforcée par le nombre d'organes cibles potentiels.

Cependant pour répondre (i) aux exigences réglementaires et (ii) aux besoins des industriels en termes de dépistage de substances, des méthodes alternatives ont été développées et depuis leur mise au point ces méthodes ont été amenées à évoluer. Les tests de transformation cellulaire, en particulier sur les cellules souches embryonnaires de hamster syrien (SHE) et sur les cellules Bhas 42, sont utilisés aussi bien pour prédire le potentiel cancérogène de substances chimiques que pour des études mécanistiques (OCDE, 2015b). Des essais de transformation cellulaire ont également été réalisés pour tester divers agents physiques et chimiques, incluant les particules et les nanomatériaux (Sasaki *et al.*, 2014).

Toutefois, les cellules Bhas 42 présentent des avantages comparés aux cellules Balb/c 3T3 et autres cellules utilisées dans les tests de transformation cellulaire. En effet, le protocole sur les cellules Bhas 42 est plus simple et bénéficie d'une plus grande sensibilité. De plus, les essais sont réalisés sur des temps plus courts par rapport au protocole sur les cellules Balb/c 3T3, et permet une plus grande performance et robustesse (Sasaki *et al.*, 2014). Pour Sakai *et al.* (2010), les résultats de ce test seraient équivalents voire supérieurs aux essais conventionnels pour prédire d'un effet cancérogène génotoxique, et Creton *et al.* (2011) conviennent que ce test est d'une grande valeur dans l'identification des cancérogènes non génotoxiques mais également pour la caractérisation des

composés génotoxiques à faibles doses. Dans le cadre du règlement européen n'autorisant plus le recours à l'expérimentation animale pour les produits cosmétiques, c'est donc le test de transformation cellulaire sur les cellules Bhas 42 qui a été choisi afin de répondre au besoin de caractérisation de substances potentiellement cancérigènes, par un mode d'action génotoxique ou épigénétique.

2. Matériel et méthode

Dans la littérature, deux méthodes d'essai pour le test de transformation cellulaire sur les cellules Bhas 42 sont décrites. La méthode a initialement été développée en plaque 6 puits et par la suite elle a été adaptée pour des plaques 96 puits afin de permettre des analyses à haut débit (Sakai *et al.*, 2011a-b ; Hayashi *et al.*, 2012 ; Tanaka *et al.*, 2009 ; EURL ECVAM). Toutefois, seul le protocole pour plaque 6 puits est développé dans ce matériel et méthode, le protocole en plaque 96 puits est quant à lui présenté en annexe 1. Les différences principales entre ces deux protocoles concernent les quantités de matériel utilisées, le nombre de cellulesensemencées et notamment la détermination de la fréquence de transformation. Toutefois, en dépit de ces différences, les deux méthodes sont interchangeables et les résultats sont similaires (Arai *et al.*, 2013).

2.1. Les bonnes pratiques de laboratoire

Les Bonnes pratiques de Laboratoire (BPL) ont été mises au point pour promouvoir la qualité et la validité des données d'essai servant à établir la pureté des produits chimiques. Il s'agit d'un concept de gestion qui recouvre tout le processus de l'organisation, mais également les conditions dans lesquelles les études de laboratoire sont planifiées, mises en œuvre, vérifiées, enregistrées puis rapportées. Ces principes doivent être respectés par les installations d'essai effectuant des études destinées à être soumises à des autorités nationales, aux fins d'évaluation de produits chimiques et autres usages relatifs à la protection de l'Homme et de l'environnement (OCDE, 1998). Différentes législations encadrent ces pratiques :

- Au niveau international : la décision ENV/MC/CHEM(98)17 de l'OCDE ;
- Au niveau européen : la Directive 2004/10/CE du 11 Février 2004 qui garantit la qualité des essais et la Directive 2004/9/CE pour le contrôle des laboratoires déclarant appliquer les BPL ;
- Au niveau français : les principes de la Directive 2004/10/CE ont été transposés par l'Annexe II à l'article D.523-8 du Code de l'Environnement du 16 Octobre 2007.

En France, il existe trois autorités de contrôle pour la vérification de la conformité aux BPL :

- L'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM), pour les produits mentionnés à l'article L.5311-1 du Code de la Santé Publique (médicaments, cosmétiques) ;
- L'agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES), et l'agence nationale du médicament vétérinaire (ANSES-ANMV) pour les médicaments vétérinaires mentionnés à l'article L.5141-1 du Code de la Santé publique ;
- Le Groupe Interministériel des Produits Chimiques (GIPC) pour tous les autres produits chimiques autres que les médicaments et les produits chimiques. Cette autorité a confié au Comité français d'accréditation (COFRAC) l'instruction des demandes et la surveillance des dossiers de toute installation d'essai déclarant appliquer les principes des BPL.

De plus, d'après le document consensus sur les principes de BPL et la vérification du respect de ces principes (document 10, OCDE/GD(95)115), tous les systèmes informatiques utilisés pour produire, mesurer ou évaluer des données à des fins réglementaires doivent être conçus, validés, exploités et gérés dans le respect des principes de BPL. Dans le cadre de la validation du test de transformation

cellulaire au sein du laboratoire, les différents essais (préliminaires et de transformation cellulaire) ont été réalisés selon les principes de BPL afin de pouvoir valider la méthode selon les recommandations de l'OCDE.

2.2. Le matériel

2.2.1. Les cellules Bhas 42

Ces cellules ont été obtenues auprès du Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank, National Institute of Biomedical Innovation (NIBIO, Osaka, Japon). Ces cellules devant être exemptes de mycoplasme (bactérie ubiquitaire, caractérisée par l'absence de paroi), la recherche d'éventuels mycoplasmes a été réalisée à l'aide du kit « Mycoalert Mycoplasma Detection Kit » avant l'utilisation d'un nouveau lot de cellules. Cette procédure est détaillée en annexe 2.

Les stocks de cellules et les cultures de travail doivent être à sous-confluence, sans dépasser 70 % avant une utilisation dans les essais, afin qu'elles conservent leur propriété d'inhibition de contact. Cela permet de garantir que la perte d'inhibition de contact est bien le résultat du traitement avec des agents cancérogènes, et non un échec du maintien des conditions optimales de culture. Les cellules Bhas 42 peuvent être repiquées deux ou trois fois sans perdre leur propriété d'inhibition de contact dans les essais de transformation. Les cellules ayant subi un plus grand nombre de passages (jusque dix) peuvent toutefois être utilisées, mais uniquement pour le choix des concentrations à tester.

2.2.2. Les milieux

2.2.2.1. Le milieu MEM de base pour Bhas 42

Ce milieu est utilisé pour la préparation du M10F. Pour un volume final d'un litre, il est composé de :

- Eau stérile : 846 mL ;
- Milieu essentiel de Eagle 10 x concentré : 100 mL ;
- Solution stérile de bicarbonate de sodium à 7,5 % : 30 mL ;
- Solution stérile de L-glutamine 200 mM : 10 mL ;
- Solution d'acides aminés non essentiels 100 x : 10 mL ;
- Solution de Pénicilline (25 000 UI) et de Streptomycine (25 000 µg/mL) : 4 mL

Le pH est vérifié et ajusté à 7,3 si besoin. Le milieu est ensuite filtré à l'aide d'une pompe à vide pour stérilisation. Il peut se conserver à 4 °C pendant six mois.

2.2.2.2. Le M10F

Ce milieu est utilisé pour l'expansion de la culture cellulaire, le stockage ainsi que pour la première culture après décongélation et a une période de validité de six mois à 4 °C. Il est composé de :

- Milieu MEM de base pour Bhas 42 ;
- 10 % de sérum de veau fœtal ;
- 1 % de pénicilline G/ Sodium (10 000 unités/mL) et sulfate de streptomycine (10 mg/mL).

2.2.2.3. Le DF5F

Ce milieu est utilisé pour les sous-cultures cellulaires, l'essai préliminaire de croissance cellulaire et les essais de transformation, et a une période de validité d'un mois à 4 °C. Il est composé de :

- DMEM/F12 : Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 contenant 1,2 g/L de NaHCO₃ ;
- 5 % de sérum de veau fœtal ;
- 1 % de pénicilline G/ Sodium (10 000 unités/mL) et sulfate de streptomycine (10 mg/mL) ;
- Amphotéricine B 1 %.

2.2.3. Les solutions

2.2.3.1. La trypsine TrypLE™ Express

La trypsine TrypLE™ Express est une enzyme recombinante sans composé d'origine animale. Elle est utilisée pour dissocier les cellules Bhas 42 qui sont adhérentes. Elle remplace la trypsine en raison (i) de sa plus grande pureté ce qui augmente sa spécificité (action d'une seule enzyme), mais également (ii) parce qu'elle réduit les dommages aux cellules, ces dommages pouvant être causés par d'autres enzymes présentes dans certains extraits de trypsine. De plus, cette trypsine TrypLE™ Express est désactivée par la dilution ce qui évite le recours à des inhibiteurs de trypsine.

2.2.3.2. La solution de cristal violet (CV)

Cette solution est utilisée pour la coloration des cellules dans l'essai de croissance cellulaire, préliminaire ou concomitant à l'essai de transformation. Elle est obtenue par pesée de 1 g de cristal violet dissout dans 50 mL d'éthanol absolu, le volume étant par la suite ajusté à 1 L avec de l'eau stérile et doit être conservée à l'abri de la lumière.

2.2.3.3. La solution d'extraction

Cette solution est utilisée pour l'extraction du cristal violet lors des essais de croissance cellulaire, préliminaire ou concomitant au test de transformation. Elle est obtenue par mélange de 480 mL d'eau stérile, de 500 mL d'éthanol absolu et de 20 mL d'acide chlorhydrique 1M.

2.2.3.4. La solution de Giemsa

Le Giemsa est un colorant spécifique de l'ADN, constitué d'un mélange de deux colorants : l'azur de méthylène et l'éosine. La solution de Giemsa est utilisée pour la coloration des cellules à l'issue de l'essai de transformation. Elle est préparée à 5 % dans l'eau minérale.

2.3. Les substances testées

Six substances sont recommandées dans le projet de ligne directrice pour la validation de la méthode au sein d'un laboratoire. Ces substances sont présentées dans le tableau V, avec leurs numéros CAS (Chemical Abstract Society), leurs fournisseurs et leurs puretés respectives.

Tableau V : Liste des substances à tester

Substance	N° CAS	Fournisseur	Pureté
Produits positifs pour l'essai d'initiation			
3-Méthylcholanthrène (MCA)	56-49-5	Sigma Aldrich	98 %
N-Méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)	70-25-7	TCI	98 %
Produits positifs pour l'essai de promotion			
12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA)	16561-29-8	Sigma Aldrich	99 %
Méthapyrilène	135-23-9	Sigma Aldrich	99,9 %
Produits négatifs pour les essais d'initiation et de promotion			
Caféine	58-08-2	Sigma Aldrich	99 %
D-mannitol	69-65-8	Sigma Aldrich	98 %

Comme le montre le tableau V, deux substances par catégorie (positif en initiation, positif en promotion, négatifs dans les deux systèmes d'essai) sont à tester. Il est à noter cependant que le projet de ligne directrice recommande de tester la mézéréine à la place du méthapyrilène. Les différentes substances testées doivent avoir des mécanismes d'action différents. Le MCA étant le témoin positif de référence pour l'initiation et le TPA pour la promotion, ces produits n'ont été testés que dans les

tests pour lesquels ils sont utilisés comme témoins positifs de référence. D'autres substances que celles recommandées par le projet de ligne directrice ont par ailleurs été testées : le Benzo[a]Pyrène (BaP), le Cyclophosphamide (CPA), la quercétine et la mitomycine C. Les résultats des tests de transformation cellulaire sur ces substances sont présentés en annexes 3, 4, 5 et 6. Enfin, les résultats pour le D-mannitol n'étant pas encore disponibles dans leur intégralité, ils ne sont donc pas détaillés dans ce mémoire.

2.4. Protocole expérimental « Essai préliminaire de croissance cellulaire »

Au cours de cette étape d'essai préliminaire, une gamme de concentrations est étudiée afin de déterminer celles qui seront sélectionnées pour les essais de transformation. La publication de Sakai *et al.*, (2010) présentant le résultat de tests de transformation cellulaire sur les cellules Bhas 42 pour 98 substances chimiques a servi de référence pour la détermination des concentrations à tester lors des essais préliminaires. Au moins cinq concentrations ont été sélectionnées, et trois puits sont préparés par dose ; la figure 7 présente le schéma de plaque utilisé pour l'essai préliminaire.

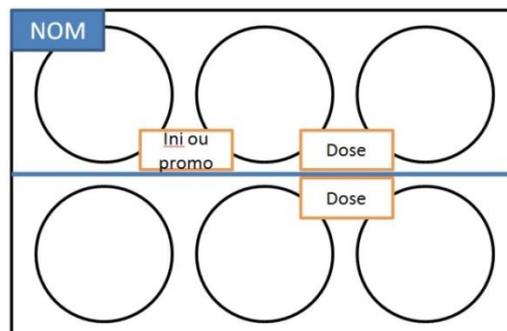


Figure 7 : Schéma de plaque pour l'essai préliminaire de croissance cellulaire

2.4.1. Essai d'initiation

Les cellules cultivées en flasque dans du milieu DF5F (à confluence proche de 70 %) sont trypsinées puis 4 000 cellules sontensemencées dans chaque puits d'une plaque 6 puits avec 2 mL de DF5F. Une représentation schématique des différentes étapes de l'essai préliminaire d'initiation est proposée dans la figure 8.

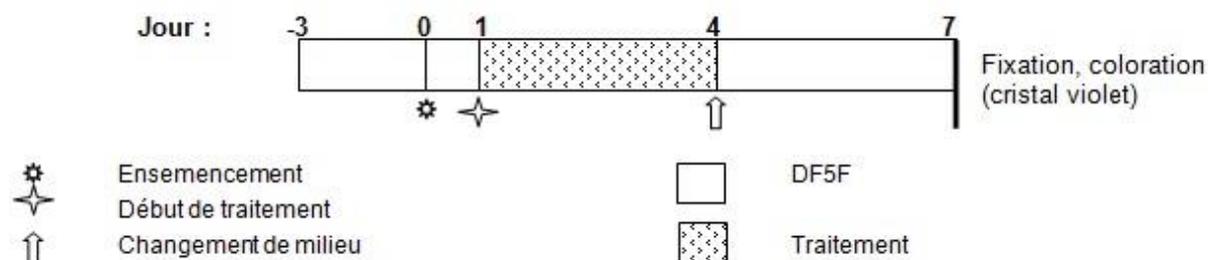


Figure 8 : Représentation schématique de l'essai préliminaire de croissance - essai d'initiation (inspiré de Sakai *et al.*, 2011b)

Comme le montre la figure 8, au jour 1 après la mise en plaque, la pesée du produit à tester est réalisée et les dilutions sont effectuées dans le DiMéthylSulfOxyde (DMSO) ou le DF5F (à 37 °C) selon la solubilité du produit :

- Si le produit est soluble dans le DMSO : le traitement est effectué directement dans le DF5F avec 10 µL de la dilution préparée. Il est nécessaire de prendre en compte ce facteur de dilution pour les calculs des dilutions initiales à réaliser ;
- Si le produit est hydrosoluble (et donc soluble dans le DF5F) : le milieu est aspiré à la pompe à vide et est remplacé par les dilutions directement préparées dans le milieu (2 mL par puits contenant la solution de traitement) ;
- Des puits contenant uniquement du milieu sont préparés pour constituer les témoins lors de l'analyse colorimétrique.

Le contenu des plaques est délicatement homogénéisé de gauche à droite et d'avant en arrière puis les plaques sont remises à l'étuve 37 °C, 5% CO₂. Au jour 4, le milieu dans les puits contenant les substances à tester ainsi que le témoin solvant est remplacé par du milieu frais après un rinçage au PBS. Les plaques sont ensuite remises à l'étuve à 37 °C, 5% CO₂.

Au jour 7, les 2 mL de milieu sont aspirés puis un rinçage avec 2 mL de tampon Phosphate Buffered Saline (PBS) par puits est de nouveau effectué. Les plaques sont alors prêtes pour la fixation à l'éthanol 96 %, la coloration au cristal violet, l'extraction puis la lecture des absorbances. Ces étapes étant identiques en initiation et promotion, celles-ci sont détaillées au paragraphe **2.4.3 (Lecture des absorbances)**.

2.4.2. Essai de promotion

Dans l'essai de promotion, le nombre de cellules à ensemercer est différent : 14 000 cellules pour 2 mL de DF5F. Une représentation schématique des différentes étapes de l'essai préliminaire de promotion est proposée dans la figure 9.

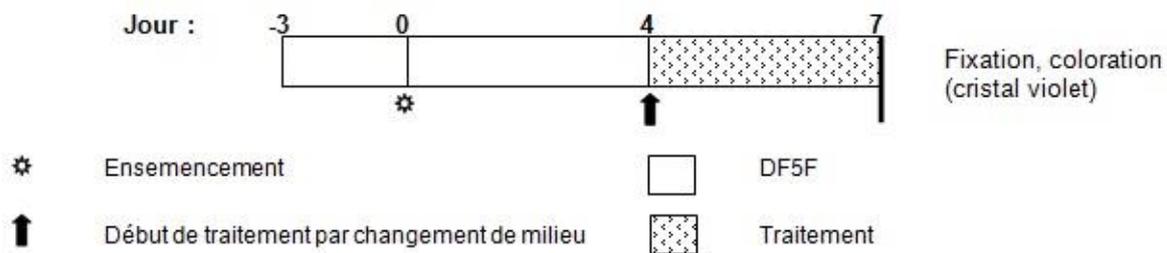


Figure 9 : Représentation schématique de l'essai préliminaire de croissance - essai de promotion (inspiré de Sakai et al., 2011b)

Comme le montre la figure 9, le schéma de traitement pour la promotion est différent de celui pour l'initiation : le traitement démarre à J4 après l'ensemencement. La pesée du produit à tester est réalisée et les dilutions sont effectuées dans le DMSO ou le DF5F (à 37 °C) selon la solubilité du produit. Le traitement s'effectue comme décrit précédemment au paragraphe **2.4.1**. Le contenu des plaques est délicatement homogénéisé de gauche à droite et d'avant en arrière puis les plaques sont remises à l'étuve 37 °C, 5% CO₂.

Au jour 7, les 2 mL de milieu sont aspirés puis un rinçage avec 2 mL de PBS par puits est de nouveau effectué. Les plaques sont alors prêtes pour la fixation à l'éthanol 96 %, la coloration au cristal violet, l'extraction puis la lecture des absorbances.

2.4.3. Lecture des absorbances

Au jour 7, les cultures sont fixées avec 2 mL d'éthanol 96 % (mis préalablement au frais) pendant environ 10 minutes. A l'issue de ces 10 minutes, l'éthanol est aspiré à la pompe à vide puis les cellules sont colorées à l'aide de 2 mL par puits de cristal violet (CV). La solution de CV devant être conservée dans des flacons teintés ou à l'abri de la lumière, la coloration est effectuée avec la lumière du PSM (Poste de Sécurité Microbiologique) éteinte, puis les plaques sont couvertes. Après 15 minutes, le colorant est éliminé et les plaques sont abondamment rincées à l'eau distillée puis mises à sécher sous le PSM (lumière éteinte). Le CV est ensuite extrait avec la solution d'extraction (toujours avec la lumière éteinte) pendant 10 minutes à l'aide de 2 mL par puits. Après dix minutes, 200 µL de chaque puits de la plaque 6 puits sont placés dans trois puits de la plaque 96 puits, la figure 10 présente le schéma de plaque pour la lecture des absorbances.

Comme le montre la figure 10, les puits contenant les témoins sont mis en bas à droite (puits 1 dans H10, H11, H12 ; puits 2 dans G10, G11, G12 ; puits 3 dans F10, F11, F12). Le « blank » correspond à la solution d'extraction seule utilisée pour le test ; la dose 1 étant la plus faible concentration testée.

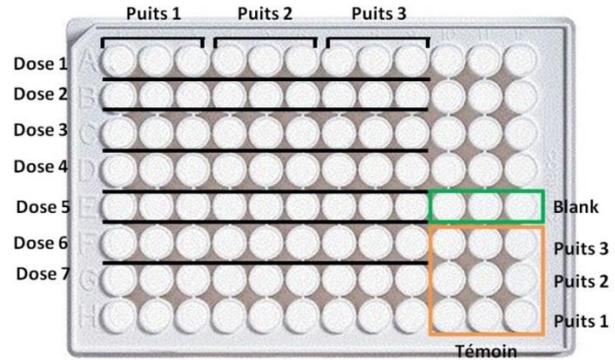


Figure 10 : Schéma de plaque - essai préliminaire de croissance cellulaire

Les absorbances sont ensuite mesurées au spectrophotomètre à une longueur d'onde comprise entre 540 et 570 nm afin de déterminer la croissance cellulaire relative. Celle-ci est déterminée à l'aide la formule suivante :

$$\text{Croissance cellulaire relative (\%)} = \frac{(\text{Dose} - \text{Blank}) * 100}{(\text{Témoin} - \text{Blank})}$$

Les résultats de croissance cellulaire ainsi obtenus vont permettre de sélectionner les concentrations à tester dans les essais de transformation cellulaire, dont le protocole est détaillé ci-dessous.

2.5. Protocole expérimental « Essai de transformation cellulaire »

Dans le cadre du protocole de transformation cellulaire, pour les témoins solvants et positifs et pour chacune des doses testées, neuf puits sont préparés : trois pour l'évaluation définitive de la croissance cellulaire et six pour l'essai de transformation.

Le schéma de plaque pour l'essai de croissance cellulaire concomitant à l'essai de transformation cellulaire est identique à celui présenté dans la figure 7 (page 30), celui pour l'essai de transformation est présenté dans la figure 11.

De plus, si la solution est soluble dans le DF5F, il faudra ajouter neuf puits pour le DMSO, qui représente le témoin solvant des témoins positifs en initiation et promotion, le MCA et le TPA étant solubles dans le DMSO.

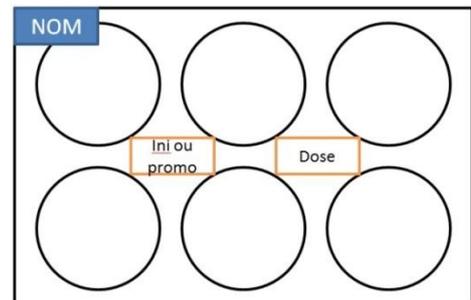


Figure 11 : Schéma de plaque pour l'essai de transformation

2.5.1. Essai d'initiation

2.5.1.1. Choix des concentrations à tester

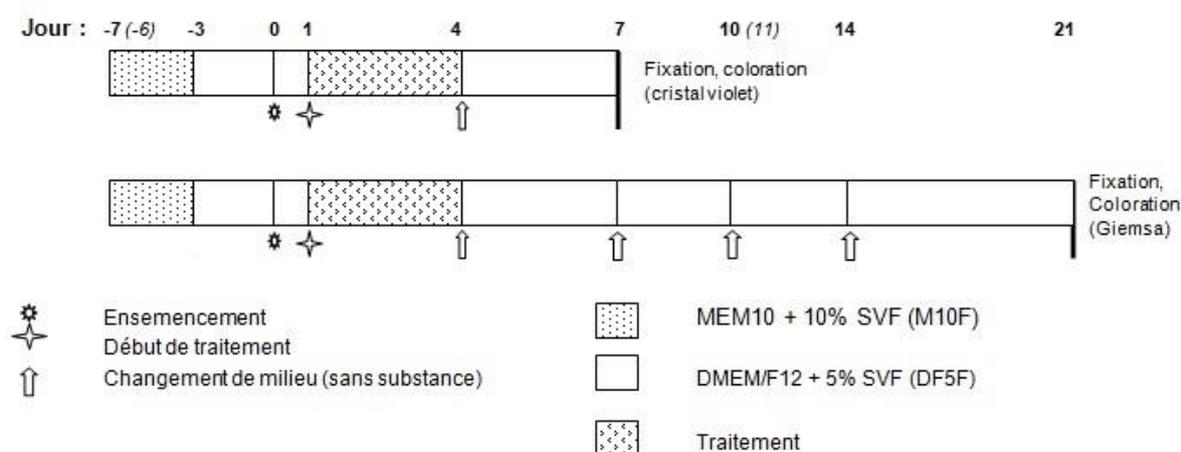
Les concentrations de la solution à tester sont déterminées en fonction des résultats de l'essai préliminaire de croissance cellulaire. Cinq à neuf concentrations sont choisies sur une plage allant de l'absence de cytotoxicité jusqu'au niveau maximal acceptable de cytotoxicité (*i.e.* entre 10 et 20 % de survie par rapport au témoin négatif). Idéalement les concentrations à retenir sont les suivantes :

- Au moins une concentration entre 80 et 120 % de la croissance cellulaire ;
- Deux concentrations entre le niveau non toxique (80 %) et la concentration inhibitrice 50 % (Cl₅₀) ;
- Deux concentrations entre la Cl₅₀ et la Cl₉₀.

Pour les substances présentant une courbe dose-réponse abrupte, les intervalles de doses peuvent être étroits. De plus, il peut être nécessaire d'inclure une ou deux concentrations supplémentaires au-delà de la plage de concentrations prévue pour pallier d'éventuelles fluctuations de cytotoxicité entre les essais.

2.5.1.2. Réalisation de l'essai

Au premier jour, 4 000 cellules dans 2 mL de DF5F sont ensemencées dans chaque puits. Le contrôle positif pour l'essai d'initiation est le 3-MéthylCholAnthrène (MCA) à une concentration de 1 µg/mL et des témoins négatifs sont également inclus dans l'essai de transformation cellulaire. La figure 12 présente une description schématique des différentes étapes de l'essai de transformation pour l'initiation.



Comme le montre la figure 12, 20-24 heures (Jour 1) après la mise en plaque, les dilutions souhaitées sont effectuées dans le DMSO ou le DF5F à 37 °C selon la solubilité de la substance. Le traitement s'effectue comme décrit précédemment au paragraphe 2.4.1. Le MCA étant soluble dans le DMSO, le traitement s'effectue directement dans les puits contenant les 2 mL de DF5F avec 10 µL de solution de témoin positif. Le contenu des plaques est ensuite délicatement homogénéisé de gauche à droite et d'avant en arrière puis les plaques sont remises à l'étuve 37 °C, 5 % CO₂.

Au Jour 4, le contenu des puits est aspiré à la pipette et mis dans une poubelle à déchet. Un rinçage à l'aide de 2 mL de PBS est effectué puis 2 mL de DF5F à 37 °C sont remis dans chaque puits. Les plaques sont alors remises à l'étuve à 37 °C, 5 % CO₂.

Au Jour 7 pour l'essai de croissance cellulaire réalisé sur 3 puits, le milieu est aspiré à la pompe à vide. Les puits sont ensuite rincés au PBS. La lecture des absorbances pour les concentrations testées s'effectue de la même manière que lors de l'essai préliminaire et qui est décrite au paragraphe 2.4.3. L'étape de lecture des absorbances pour les témoins positifs est détaillée au paragraphe 2.5.3. (**Lecture des absorbances pour les témoins positifs**).

Aux Jours 7, 10, 14, 18 pour les 6 puits dédiés à l'essai de transformation, le milieu est aspiré à la pompe à vide, puis est remplacé par 2 mL de DF5F à 37 °C, puis les plaques sont remises à l'étuve à 37 °C, 5 % CO₂.

Au Jour 21, l'essai de transformation se termine. Le milieu est aspiré à la pompe à vide, 2 mL de PBS à 37 °C sont ajoutés dans les puits afin d'effectuer un rinçage, puis ces 2 mL sont aspirés à la pompe à

vide. Les étapes de fixation à l'éthanol absolu et de coloration au GIEMSA étant identiques en initiation et promotion, celles-ci sont détaillées au paragraphe 2.5.4. (**Fixation – Coloration au Giemsa**).

2.5.2. Essai de promotion

2.5.2.1. Choix des concentrations à tester

Il existe deux types de substance présentant une activité de promotion différente, (i) celles qui favorisent la croissance cellulaire de plus de 20 % par rapport au témoin solvant, et (ii) celles qui inhibent la croissance cellulaire.

Pour les substances favorisant la croissance cellulaire, les concentrations sont choisies pour couvrir la gamme de concentrations qui augmentent peu ou pas la croissance cellulaire jusqu'à des concentrations augmentant la croissance cellulaire :

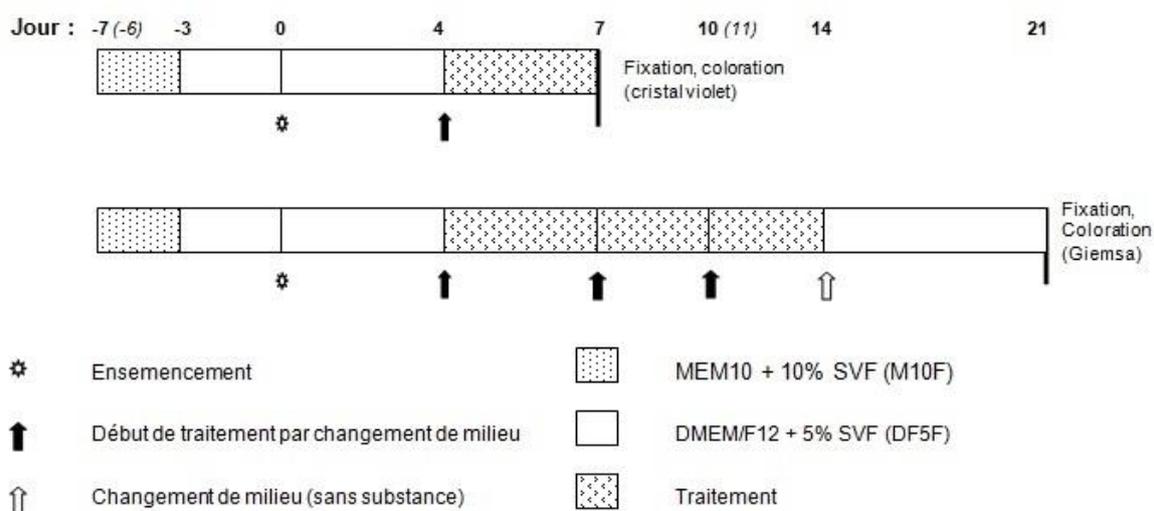
- Une concentration inférieure au niveau non-toxique (entre 80 et 120 %) ;
- Trois concentrations dans la gamme de la croissance cellulaire ;
- Une concentration augmentant faiblement la croissance.

Pour le groupe des substances inhibant la croissance cellulaire, les concentrations à retenir pour l'essai définitif de croissance cellulaire concomitant au test de transformation sont les suivantes :

- Au moins deux concentrations inférieures au niveau non-toxique ;
- Deux concentrations entre le niveau non toxique et la Cl_{50} ;
- Une concentration comprise entre la Cl_{50} et la Cl_{90} .

2.5.2.2. Réalisation de l'essai

Au premier jour, 14 000 cellules dans 2 mL de DF5F sont ensemencées dans chaque puits. Dans cet essai, le contrôle positif est le 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate (TPA), également appelé phorbol-12-myristate-13-acétate, à une concentration de 75 ng/mL et des témoins négatifs sont également inclus dans l'essai de transformation cellulaire. La figure 13 présente une description schématique des différentes étapes de l'essai de transformation cellulaire pour la promotion.



Comme le montre la figure 13, le traitement de promotion démarre au jour 4 après l'ensemencement et dure dix jours. Les dilutions souhaitées sont réalisées dans le DMSO ou le DF5F (à 37 °C) selon la solubilité du produit. Le traitement s'effectue comme décrit précédemment au paragraphe 2.4.1. Le

TPA étant soluble dans le DMSO, le traitement s'effectue directement dans les puits contenant les 2 mL de DF5F avec 10 µL de solution de témoin positif. Le contenu des plaques est délicatement homogénéisé de gauche à droite et d'avant en arrière puis les plaques sont remises à l'étuve 37 °C, 5 % CO₂.

Au Jour 7 pour l'essai de croissance cellulaire réalisé sur 3 puits, le milieu est aspiré à la pipette et les puits sont ensuite rincés au PBS. La lecture des densités optiques pour les concentrations testées s'effectue selon le même protocole que lors de l'essai préliminaire et qui est décrit au paragraphe 2.4.3. L'étape de lecture des densités optiques pour les témoins positifs est quant à elle détaillée au paragraphe 2.5.3. (**Lecture des absorbances pour les témoins positifs**).

Aux Jours 7 et 10 (ou 11) pour les six puits dédiés à l'essai de transformation, le traitement de promotion est réitéré selon la même procédure qu'au Jour 4, et il n'est pas nécessaire de rincer au PBS entre les traitements de promotion.

Au Jour 14, le milieu contenant le traitement de promotion est aspiré à la pipette et les puits sont rincés au PBS. 2 mL de DF5F à 37 °C sont placés dans chaque puits, et les plaques sont ensuite remises à l'étuve à 37 °C, 5 % CO₂. Au Jour 18, le milieu est aspiré à la pompe à vide puis remplacé par du DF5F à 37 °C, et les plaques sont remises à l'étuve à 37 °C, 5 % CO₂.

Au Jour 21, l'essai de transformation se termine. Le milieu est aspiré à la pompe à vide, 2 mL de PBS à 37 °C sont ajoutés dans les puits afin de rincer, puis ces 2 mL sont aspirés à la pompe à vide. Les étapes de fixation à l'éthanol absolu et de coloration au GIEMSA sont détaillées au paragraphe 2.5.4.

2.5.3. Lecture des absorbances pour les témoins positifs (essai de croissance cellulaire)

Le protocole de préparation à lecture des densités optiques pour l'essai de croissance cellulaire concomitant à l'essai de transformation cellulaire s'effectue de la même manière que lors de l'essai préliminaire pour les étapes de fixation à l'éthanol 96 %, coloration au cristal violet, extraction, lecture au spectrophotomètre et calcul de la croissance cellulaire (paragraphe 2.4.3). Cependant, des témoins positifs pour l'initiation et la promotion pour l'essai de transformation sont ajoutés, la figure 14 présente donc le schéma de cette seconde plaque à préparer.

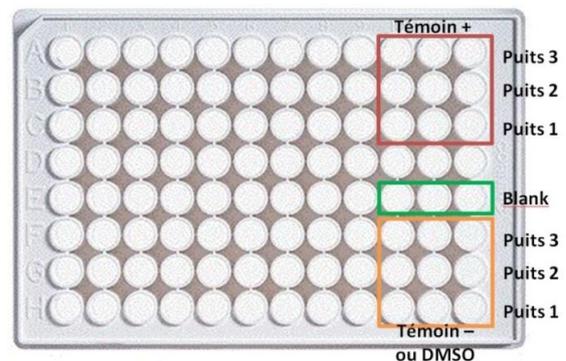


Figure 14 : Schéma de plaque - essai définitif de croissance cellulaire (plaque témoin positif)

Comme le montre la figure 14, cette seconde plaque ne comporte que les solutions d'extraction des témoins négatifs et positifs, qui se répartissent selon la méthode suivante :

- Si la substance testée est soluble dans le DMSO : 200 µL des solutions extraites des puits « témoin négatif », et ayant déjà servi pour la plaque des doses testées, sont placés en bas à droite de la plaque (puits 1 dans H10, H11, H12 ; puits 2 dans G10, G11, G12 ; puits 3 dans F10, F11, F12). Cette seconde lecture sert de référence pour la détermination de la densité optique du témoin positif ;
- Si la substance testée est soluble dans le DF5F : 200 µL des puits dédiés au DMSO sont placés dans les emplacements « témoin négatif » en bas à droite de la plaque (puits 1 dans H10, H11, H12 ; puits 2 dans G10, G11, G12 ; puits 3 dans F10, F11, F12) ;

- Les témoins positifs, que ce soit en initiation (MCA) ou en promotion (TPA), sont placés en haut à droite de la plaque (puits 1 dans A10, A11, A12 ; puits 2 dans B10, B11, B12 ; puits 3 dans C10, C11, C12) ;
- Le « blank » correspond ici aussi à la solution d'extraction seule.

2.5.4. Fixation - Coloration au Giemsa (essai de transformation cellulaire)

Les cellules sont fixées à l'aide de 2 mL d'éthanol absolu préalablement mis à + 4 °C, puis l'ensemble des plaques est mis à + 4 °C pendant dix minutes minimum. Une fois la fixation réalisée, l'éthanol est aspiré à la pompe à vide et les plaques sont mises à sécher. La coloration avec le Giemsa à 5 % dans l'eau minérale est réalisée sous un volume de 2 mL par puits pendant quinze minutes. A l'issue de ces quinze minutes, le colorant est retiré et les plaques sont rincées à l'eau distillée puis mises à sécher (à l'air ou sous le PSM).

2.5.5. Codage des plaques

Le codage est effectué après coloration et avant lecture. La personne réalisant le codage des plaques n'est pas le lecteur. La même personne choisit un jeu de codage parmi différents formulaires, et appose des petites étiquettes autocollantes par-dessus la dose : la figure 15 présente le schéma de la plaque après codage. Ce système de codage a été mis en place après la réalisation des essais sur le MCA et le TPA.

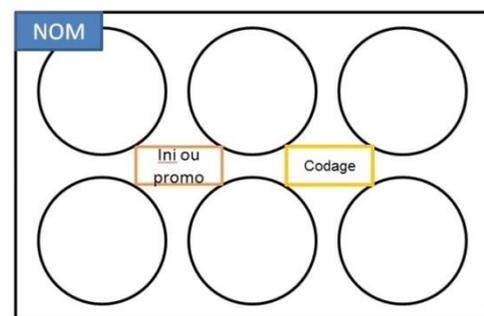


Figure 15 : Schéma de plaque pour codage de l'essai de transformation

2.5.6. Détermination de la fréquence de transformation

D'après Sasaki *et al.* (2012) et le projet de ligne directrice, les foyers transformés sont caractérisés par différentes propriétés morphologiques :

- Ils contiennent plus de 100 cellules ;
- Les cellules sont en forme de fuseau, ce qui les différencie des cellules en monocouche :
→ **Critère fusiforme (S, pour « spindle shaped »)** ;
- Ils ont une coloration basophile intense :
→ **Critère basophile (B)** ;
- Les cellules sont orientées de manière aléatoire, ce fait étant particulièrement visible au bord des foyers ;
→ **Critère aléatoire (R, pour « random oriented »)** ;
- Des multicouches denses de cellules sont observables :
→ **Critère multicouche (M)** ;
- La croissance est invasive dans la monocouche de cellules confluentes :
→ **Critère invasion (I)**.

Trois différentes classes de foyers peuvent être observées lors d'un test de transformation cellulaire en fonction (i) de la présence de certains critères et (ii) de leur intensité. Cette identification est complexe car le développement des foyers de transformation suit un processus continu plutôt qu'un changement distinct à travers différentes étapes. Les différentes catégories de foyers pouvant être observées sont les suivantes :

- Foyers de type I : ils ne sont pas enregistrés comme foyers transformés en raison de leur petite taille et/ou du fait qu'ils sont non invasifs. De plus, ils présentent une faible coloration basophile ;
- Foyers de type II : ils ne sont pas enregistrés comme foyers transformés, même s'ils sont denses et qu'ils présentent le critère multicouche. Ce type de foyer présente toutefois une coloration moins dense et ne sont pas fusiformes ou sur une étendue limitée par rapport aux foyers de type III (des photos de ces foyers extraits de la publication de Sasaki *et al.*, 2012 sont disponibles en annexe 7) ;
- Foyers de type III : ce sont ceux qui sont enregistrés en raison de leur **coloration basophile intense** et de la forme des cellules (**cellule fusiforme**) qui sont morphologiquement différentes de la couche de cellules en arrière-plan. Les critères « aléatoire » et « invasif » peuvent également être observés.

L'étape d'identification et de comptage des foyers transformés pouvant être plus ou moins subjective, une formation du personnel de laboratoire s'avère obligatoire, et notamment dans le cadre de l'essai sur plaque 6 puits où tous les foyers transformés doivent être comptés. Cette formation est principalement nécessaire afin de distinguer les foyers de type II des foyers de type III. Afin d'aider le personnel de laboratoire dans la distinction des différents types de foyers, des photos sont présentées en annexe de la guidance (figure 17). Sasaki *et al.* (2012a) dans leur publication ont établi un catalogue de photos dont un extrait est présenté dans la figure 18. Ce photocatalogue a été établi à partir de test de transformation cellulaire sur les cellules Balb/c 3T3. Toutefois il peut être utilisé pour les cellules Bhas 42, les foyers transformés présentant les mêmes caractéristiques. Tous les foyers transformés ne doivent pas nécessairement présenter toutes les caractéristiques morphologiques, mais quelques-uns doivent présenter des altérations morphologiques claires.

Dans le format 6 puits, le nombre de foyers transformés dans chaque puits est enregistré pour chaque concentration. De plus, il est important de compter les foyers qui peuvent s'être formés sur les parois latérales des puits, comme le montre la figure 16.

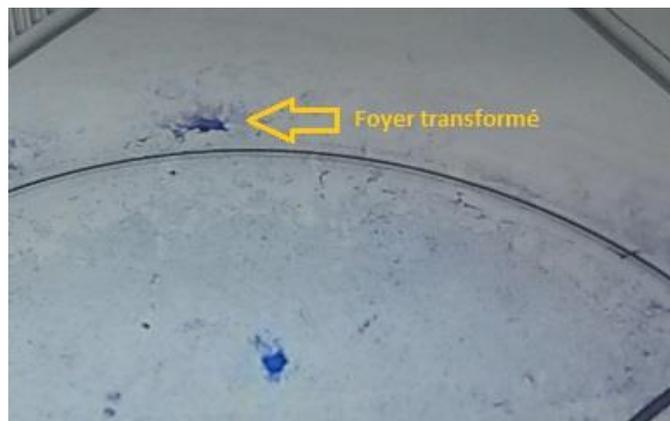
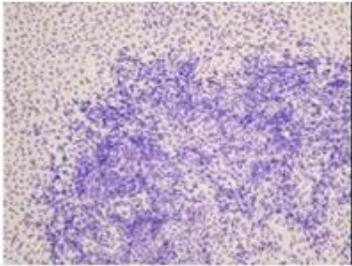
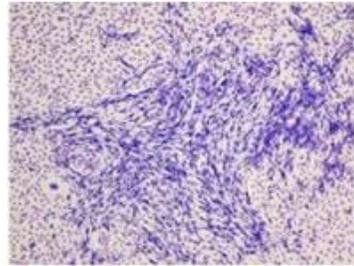


Figure 16 : Exemple de foyer transformé sur la paroi latérale du puits

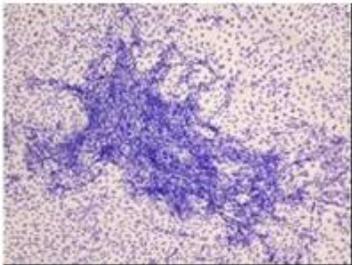
Foyers négatifs (non transformés)



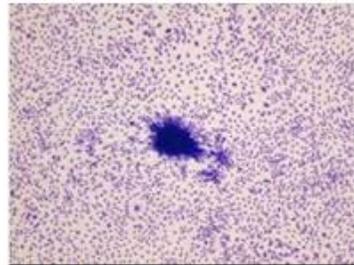
B- S- M- R- I-
Les cellules sont simplement regroupées ensemble (en grappes).



B+/- S+ M- R- I- La morphologie des cellules devient fusiforme. Cependant les autres caractéristiques sont négatives.

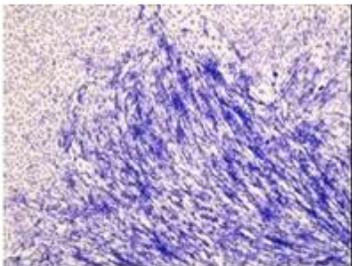


B+/- S+ M+/- R- I+
Regroupement faiblement observé, les autres caractéristiques de positivité sont à peine perceptibles.

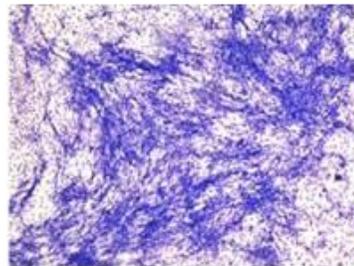


B+ S+ M+ R+ I+
Les caractéristiques morphologiques sont retrouvées mais le foyer de transformation est extrêmement petit.

Foyers positifs (transformés)

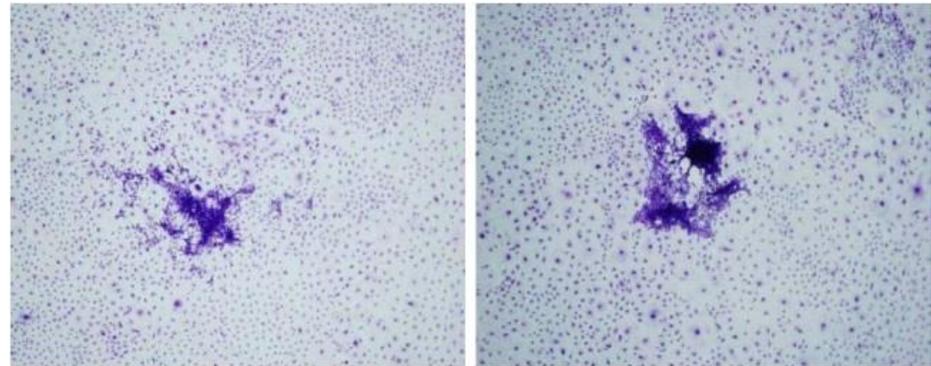


B+ S++ M+/- R+ I+
Regroupement limité mais les cellules du foyer de transformation sont fusiformes (coniques et allongées) affichant un arrangement parallèle et tourbillonnant.

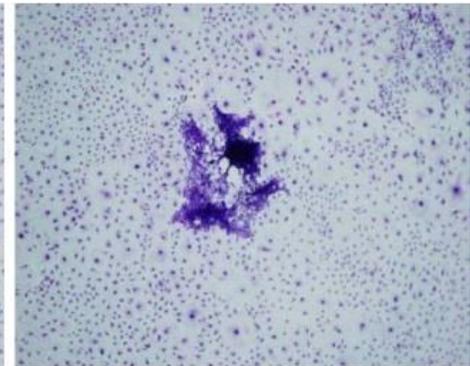


B+ S++ M+ R+ I+
Certaines zones d'empilement sont observées. Les foyers se composent de cellules fusiformes généralement alignées les unes par rapport aux autres.

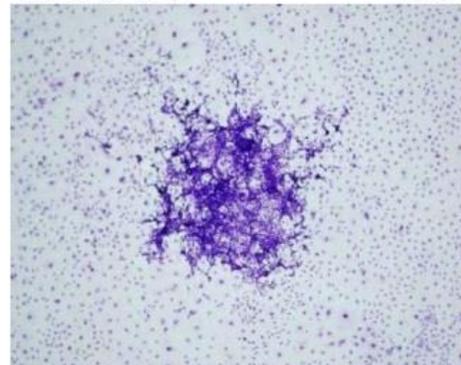
Figure 17 : Extrait du photo catalogue en annexe de lu projet de ligne directrice pour le test de transformation cellulaire sur Bhas 42 (OCDE, 2016)



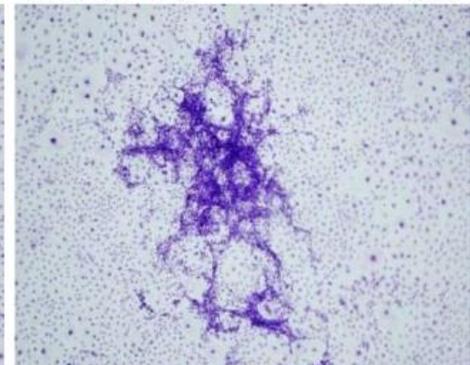
B++ S+ M+ R+ I+ Pic 27



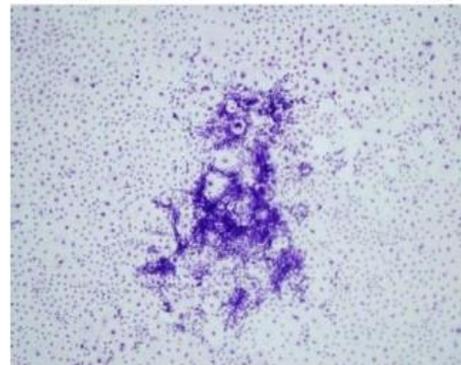
B++ S+ M+ R+/- I+ Pic 28



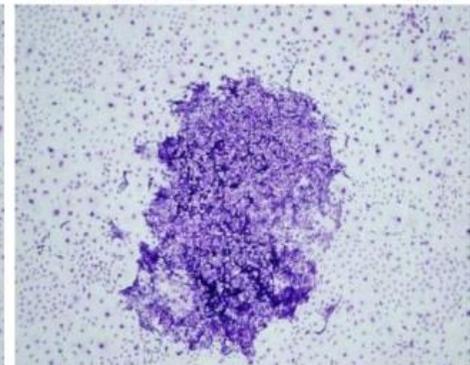
B++ S++ M+ R++ I+ Pic 29



B++ S++ M+ R++ I- Pic 30



B++ S+ M+ R+ I- Pic 31



B++ S+ M+ R+ I- Pic 32

Figure 18 : Extrait du photo catalogue pour la classification des foci sur Balb/c 3T3 de Sasaki et al. (2012a) – foyers positifs pour la transformation (type III)

Il est à noter que si les cellules dans l'essai de transformation ne parviennent pas à confluence à une concentration donnée de la substance en raison de sa cytotoxicité, cette concentration est considérée comme inacceptable pour l'évaluation de la transformation et est exclue du comptage.

2.5.7. Analyse statistique

Dans le format 6 puits, l'unité statistique est le nombre de foyers transformés par puits. La fréquence de transformation est analysée par le test unilatéral de Dunnett ($p < 0,05$) ou test de comparaisons multiples (test paramétrique). Le test de Dunnett fait partie des tests dits *post hoc*, et est utilisé pour déterminer les différences significatives entre la moyenne d'un groupe témoin et les moyennes des groupes traités. Dans l'hypothèse où une seule concentration est statistiquement significative, la tendance est alors analysée par le test de Jonckheere ($p < 0,05$; unilatéral). Enfin, si une courbe en cloche est observée, la ou les valeurs inférieures à celle du témoin solvant correspondant doivent être exclue(s) de l'analyse statistique, dans les gammes de concentration montrant une tendance à la baisse.

La significativité statistique des témoins positifs est évaluée par le test t ou d'Aspin Welch en fonction du résultat du test de Fischer d'homogénéité des variances (homoscédasticité). Le test de Fischer est utilisé lorsqu'il faut comparer deux variances de deux échantillons. Le test d'Aspin Welch est une adaptation du test de t de Student permettant de comparer deux groupes indépendants, lorsque les variances sont différentes. Les analyses statistiques ont été réalisées sur le logiciel R Studio 3.3.2.

2.5.8. Critères de validité de l'essai

Différents critères doivent être remplis pour que l'essai soit considéré comme valide. En ce qui concerne les témoins négatifs, pour qu'un essai soit considéré valide, le nombre de foyers (spontanés) transformés doit être inférieur ou égal à dix par puits dans le test d'initiation et inférieur ou égal à douze par puits dans le test de promotion.

Les critères d'acceptabilité pour la transformation spontanée sont différents entre les essais d'initiation et de promotion. En effet, en raison d'un plus grand nombre de cellulesensemencées dans l'essai de promotion (14 000 vs 4 000 pour l'initiation), la fréquence de transformation cellulaire spontanée est plus importante dans les essais de promotion.

En ce qui concerne le contrôle positif, pour qu'un essai soit considéré comme valide, il doit y avoir une augmentation biologiquement et statistiquement significative de la fréquence de transformation par rapport au témoin négatif correspondant.

Quatre concentrations de la substance doivent être analysables et les conditions suivantes doivent être remplies :

- Dans le test d'initiation, les résultats de l'essai de croissance cellulaire concomitant comprennent au moins une concentration proche du niveau non toxique et trois concentrations dans la gamme comprise entre le niveau non toxique et la CI_{90} ;
- Dans le test de promotion :
 - Avec une substance qui augmente la croissance cellulaire, les résultats de l'essai de croissance cellulaire concomitant doivent comprendre au moins une concentration proche du niveau non toxique et deux concentrations dans la gamme de concentration qui augmente la croissance cellulaire ;
 - Avec une substance qui inhibe la croissance cellulaire, les résultats de l'essai de croissance cellulaire concomitant doivent comprendre au moins deux concentrations inférieures au

niveau non toxique et deux concentrations comprises entre le niveau non toxique et la Cl_{50} .

En cas de contamination ou de problèmes techniques, les conditions suivantes doivent être remplies pour qu'un essai soit considéré valide :

- Un minimum de deux puits intacts par groupe est nécessaire dans l'essai de croissance cellulaire concomitant ;
- Un minimum de cinq puits intacts par groupe est nécessaire dans l'essai de transformation.

De plus, lorsque les propriétés de la substance entraînent des conditions d'essai atypiques telles que la précipitation et / ou une courbe dose-réponse abrupte, l'ensemble des critères d'acceptation du test peut ne pas être rempli. Une explication détaillée ainsi que la justification de l'acceptation ou non de l'essai doivent être fournies.

Enfin, lors des essais d'initiation et de promotion, lorsque la cytotoxicité entraîne une inhibition de la croissance cellulaire à la fin du test de transformation de telle sorte que quatre concentrations ne sont pas disponibles, les critères suivants peuvent être avancés pour décider ou non de répéter l'essai :

- Si un minimum de deux doses consécutives induit une augmentation statistiquement significative de la fréquence de transformation, la répétition de l'essai n'est pas nécessaire et le résultat est jugé positif ;
- Si, par exemple une concentration induit une augmentation statistiquement significative de la fréquence de transformation et qu'il n'y a pas de relation dose-effet, l'essai doit être réitéré avec des concentrations inférieures ;
- D'autres cas de figure peuvent être étudiés au cas par cas afin de définir les modalités de réalisation d'un nouvel essai, par exemple lors d'une évaluation avec un nombre insuffisant de concentrations disponibles.

2.5.9. Critères d'interprétation des résultats

Les résultats des tests d'initiation et de promotion sont jugés comme suit :

- Les résultats sont considérés **positifs** dès lors qu'il existe :
 - Au moins deux concentrations successives induisant une augmentation statistiquement significative de la fréquence de transformation par rapport au témoin solvant ;
 - Une augmentation statistiquement significative de la fréquence de transformation par rapport au témoin solvant à une seule dose, avec une analyse statistique qui indique une relation dose-réponse ;
- Les résultats sont considérés **négatifs** quand il n'y a pas de concentration montrant une augmentation statistiquement significative de la fréquence de transformation ;
- Lorsque l'augmentation statistiquement significative ne se produit qu'à une seule dose et qu'il n'y a pas de relation dose-réponse, le résultat du test est considéré comme **équivoque**. Dans ce cas, le(s) test(s) d'initiation et / ou de promotion doi(ven)t être répété(s).

Sur la base des critères ci-dessus, la substance est considérée comme ayant une activité de transformation dans ce système d'essai lorsque les résultats sont positifs dans le test d'initiation et/ou de promotion. Ces résultats positifs peuvent être considérés comme une indication du potentiel cancérigène *in vivo*. Les résultats négatifs dans les deux tests indiquent que la substance ne possède probablement pas d'activité cancérigène.

3. Résultats

Dans un premier temps, les résultats des produits positifs en initiation (MCA et MNNG) sont détaillés, puis dans un deuxième temps, les résultats des produits positifs en promotion (TPA et méthapyrilène) sont présentés. Enfin, les derniers résultats présentés sont ceux des essais de transformation réalisés sur la caféine devant être négative en initiation et en promotion. Pour les témoins positifs de référence, seuls les tests de transformation dans lequel la substance est positive ont été réalisés. Pour les autres substances, les résultats des essais préliminaires sont d'abord présentés, ceux-ci étant réalisés pour déterminer les concentrations à tester lors des essais de transformation. Enfin, par souci de lisibilité, les résultats des essais de transformation sont présentés sous forme de tableau et de figure.

3.1. 3-Méthylcholanthrène (MCA)

Le tableau VI présente les résultats de l'essai d'initiation pour le MCA, avec le pourcentage de croissance cellulaire mesurée pour ces concentrations, les comptages des foyers de transformation pour les deux lecteurs et la moyenne des lectures, ainsi que la p-value du test de comparaisons multiples (Test de Dunnett). Le MCA étant le témoin positif de référence, il n'a été testé qu'en initiation et pour une gamme de concentrations moins étendue. Ainsi, ce sont donc trois concentrations qui ont été déterminées autour de la concentration recommandée (1 µg/mL).

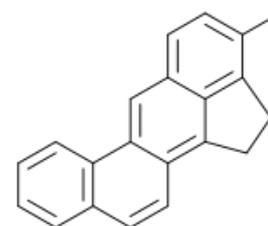


Figure 19 : Molécule de MCA

Tableau VI : Résultats de l'essai d'initiation pour le MCA

Essai d'initiation					
Concentrations testées (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Lecteur 1 (moyenne + sd)	Lecteur 2 (moyenne + sd)	Moyenne + sd	p-value
DMSO (5 nL/mL)	100	2,8 + 1,94	1,7 + 1,21	2,3 + 1,51	-
0,75	70,2	17,3 + 5,05	11,7 + 2,16	14,5 + 3,19	< 1. ^{-10*}
1	71,5	15,3 + 2,73	13,2 + 2,32	14,3 + 2,09	< 1. ^{-10*}
1,25	57,8	20,0 + 9,16	13,0 + 5,42	16,5 + 7,15	< 1. ^{-10*}

*Significativité du test

Comme le montrent les résultats du tableau VI, le MCA inhibe la croissance cellulaire de façon dose dépendante (57,8 % pour 1,25 µg/mL). En ce qui concerne l'essai de transformation, la fréquence de transformation spontanée est inférieure à dix, ce qui correspond aux critères de validité. De plus, une augmentation statistiquement significative du nombre de foyers transformés dans les puits est observée. Ces résultats sont également illustrés dans la figure 20.

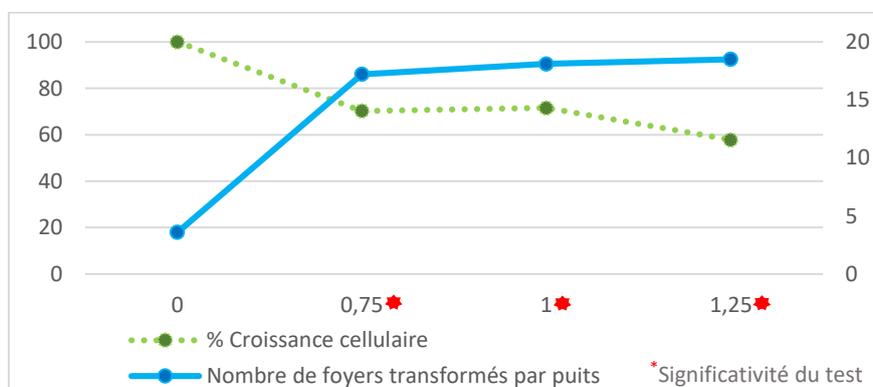


Figure 20 : Résultats - Essai d'initiation pour le MCA

3.2. N-Méthyl-N'-Nitro-N-NitrosoGuanidine (MNNG)

3.2.1. Essai préliminaire de croissance cellulaire

Le tableau VII présente les résultats obtenus lors de l'essai préliminaire de croissance cellulaire réalisé sur le MNNG, pour l'initiation et la promotion. Les pourcentages de croissance cellulaire ont été calculés par rapport au témoin solvant du MNNG (le DMSO).

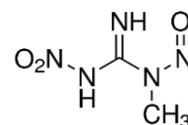


Figure 21 : Molécule de MNNG

Tableau VII : Concentrations testées lors de l'essai préliminaire pour le MNNG et croissances relatives calculées

Essai d'initiation		Essai de promotion	
Concentrations à tester (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Concentrations à tester (µg/mL)	% de croissance cellulaire
DMSO (5 nL/mL)	100	DMSO (5 nL/mL)	100
0,08	89,6	0,08	98,9
0,16	81,0	0,16	92,6
0,3125	47,9	0,3125	83,0
0,625	18,4	0,625	75,6
1,25	13,1	1,25	68,2
2,5	12,8	2,5	58,0
5	12,4	5	11,2

Comme le montrent les résultats du tableau VII, le MNNG inhibe la croissance cellulaire de façon dose dépendante, aussi bien en initiation qu'en promotion. Pour la réalisation du test de transformation cellulaire, les concentrations suivantes ont été sélectionnées :

- Pour l'initiation :
 - Au moins une concentration entre 120 et 80 % de croissance cellulaire : 0,1 µg/mL ;
 - Au moins deux concentrations entre la Cl₂₀ et la Cl₅₀ : 0,256 µg/mL, 0,32 µg/mL et 0,4 µg/mL ;
 - Au moins deux concentrations entre la Cl₅₀ et la Cl₉₀ : 0,5 µg/mL et 1 µg/mL ;
- Pour la promotion :
 - Au moins deux concentrations inférieures au niveau non toxique : 0,125 µg/mL et 0,25 µg/mL ;
 - Au moins deux concentrations entre la Cl₂₀ et la Cl₅₀ : 0,5 µg/mL, 1 µg/mL et 2 µg/mL ;
 - Au moins une concentration entre la Cl₅₀ et la Cl₉₀ : 4 µg/mL.

3.2.2. Essai définitif de transformation

3.2.2.1. Essai d'initiation

Le tableau VIII présente les résultats de l'essai d'initiation pour le MNNG, avec le pourcentage de croissance cellulaire mesurée pour les concentrations choisies, les comptages des foyers de transformation pour les deux lecteurs, la moyenne des lectures, ainsi que la p-value du test de comparaisons multiples (Test de Dunnett) pour les doses testées.

Tableau VIII : Résultats de l'essai d'initiation pour le MNNG

Essai d'initiation					
Concentrations testées (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Lecteur 1 (moyenne + sd)	Lecteur 2 (moyenne + sd)	Moyenne + sd	p-value
DMSO (5 nL/mL)	100	4,3 + 2,25	3,3 + 1,21	3,8 + 1,63	-
0,1	86,9	3,2 + 2,48	4,5 + 2,43	3,8 + 2,29	1
0,256	52,8	<i>Contamination ?</i>			< 0,001*
0,32	39,7	5,2 + 1,47	5,7 + 1,63	5,4 + 1,39	0,0843
0,4	23,8	2,8 + 1,72	2,5 + 1,05	2,7 + 1,37	0,1989
0,5	22,1	2,5 + 1,38	3,5 + 1,52	3,0 + 1,05	0,4921
1	13,0	0,3 + 0,52	0,5 + 0,84	0,4 + 0,49	< 0,001*
p-value test de Aspin-Welch					
MCA (1 µg/mL)	52,3	6,8 + 3,73	9,0 + 4,94	7,9 + 4,34	< 0,001*

*Significativité du test

Comme le montrent les résultats du tableau VIII, la fréquence de transformation spontanée est inférieure à dix et le MNNG inhibe la croissance cellulaire de façon dose dépendante. A l'issue des 21 jours de l'essai de transformation, deux puits des plaques témoin positif (MCA) étaient contaminés, ce qui ne correspond pas aux critères de validité où au moins cinq puits sont nécessaires. Toutefois, le test d'Aspin-Welch a été réalisé et le résultat est statistiquement différent du témoin solvant.

Lors du comptage pour la concentration de 0,256 µg/mL, il a été constaté qu'il n'y avait plus de cellules dans aucun des puits de la plaque (une contamination sur l'ensemble des puits de cette plaque a été suspectée). En dépit de l'exclusion de cette concentration, le nombre de concentrations analysables est respecté et les résultats de l'essai de croissance cellulaire comprennent au moins une concentration proche du niveau non toxique (0,1 µg/mL) et au moins trois concentrations entre la Cl₂₀ et la Cl₉₀. Les résultats de ce tableau sont également présentés dans la figure 22 (la concentration de 0,256 µg/mL étant exclue de la figure). **Au regard des critères d'interprétation des résultats, le MNNG est négatif en initiation.**

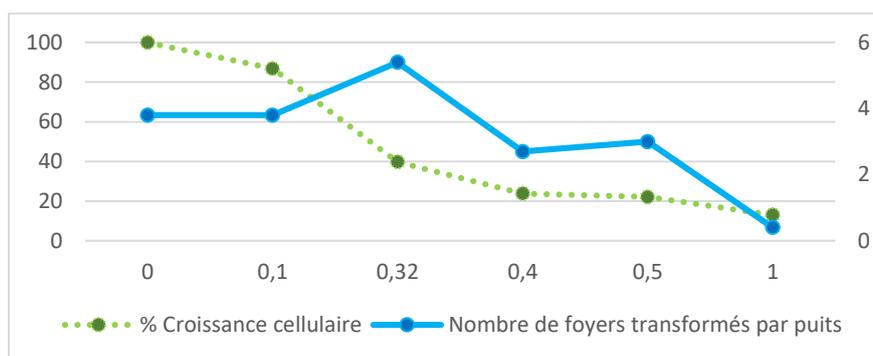


Figure 22 : Résultats - Essai d'initiation pour le MNNG

3.2.2.2. Essai de promotion

Le tableau IX présente les résultats de l'essai de promotion pour le MNNG, avec le pourcentage de croissance cellulaire mesurée pour les concentrations choisies à l'issue de l'essai préliminaire, les comptages des foyers de transformation pour les deux lecteurs et la moyenne des lectures, ainsi que la p-value du test de comparaisons multiples (Test de Dunnett).

Tableau IX : Résultats de l'essai de promotion pour le MNNG

Essai de promotion					
Concentrations testées (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Lecteur 1 (moyenne + sd)	Lecteur 2 (moyenne + sd)	Moyenne + sd	p-value
DMSO (5 nL/mL)	100	2,5 + 2,07	2,5 + 2,07	2,5 + 2,02	-
0,125	96,7	6,0 + 2,10	5,5 + 1,87	5,8 + 1,92	0,0063*
0,25	80,8	4,0 + 2,0	2,8 + 1,60	3,4 + 1,72	0,8838
0,5	86,8	0,2 + 0,41	0,0 + 0,00	0,1 + 0,20	0,0968
1	77,1	0,2 + 0,41	0,0 + 0,00	0,1 + 0,20	0,0705
2	73,1	0,0 + 0,00	0,0 + 0,00	0,0 + 0,00	0,0766
4	22,6	0,0 + 0,00	0,0 + 0,00	0,0 + 0,00	0,1099
p-value test de Student					
TPA (75 ng/mL)	141,2	18,7 + 5,99	18,2 + 5,08	18,4 + 5,32	1,277. ⁻⁰⁷ *

*Significativité du test

Comme le montrent les résultats du tableau IX, la fréquence de transformation spontanée est inférieure à douze et la croissance cellulaire est inhibée de façon dose dépendante. En ce qui concerne le témoin positif, le test de Student qui a été réalisé montre une différence significative entre le témoin solvant et le témoin positif.

Pour les différentes concentrations de MNNG qui ont été testées, au moins deux concentrations sont inférieures au niveau non toxique et au moins deux autres sont comprises entre la Cl_{20} et la Cl_{50} . De plus une concentration présente une augmentation statistiquement significative de la fréquence de transformation. Au regard de ces résultats et des critères de validité et d'interprétation, **le MNNG est équivoque en promotion**. L'ensemble des résultats du tableau IX sont présentés dans la figure 23.

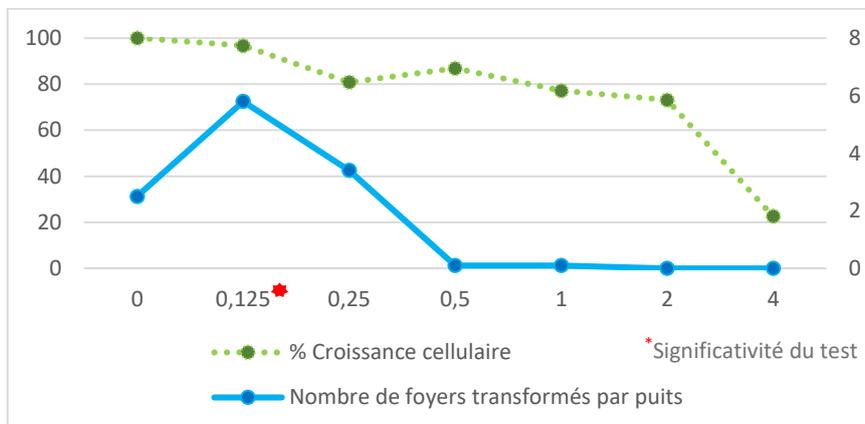


Figure 23 : Résultats - Essai de promotion pour le MNNG

3.3. 12-O-TétraDécanoylphorbol-13-Acétate (TPA)

Le tableau X présente les résultats de l'essai de promotion pour le TPA, avec le pourcentage de croissance cellulaire mesurée pour les trois concentrations testées, les comptages des foyers de transformation pour les deux lecteurs et la moyenne des lectures, ainsi que la p-value du test de comparaisons multiples (Test de Dunnett).

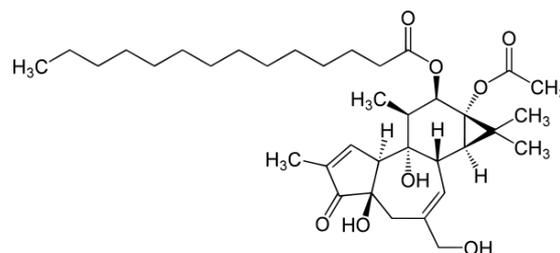


Figure 24 : Molécule de TPA

Tableau X : Résultats de l'essai de promotion pour le TPA

Essai de promotion					
Concentrations testées (ng/mL)	% de croissance cellulaire	Lecteur 1 (moyenne + sd)	Lecteur 2 (moyenne + sd)	Moyenne + sd	p-value
DMSO (5 nL/mL)	100	3,5 + 1,05	2,2 + 1,47	2,8 + 1,17	-
25	125,3	4,2 + 0,98	3,3 + 1,03	3,8 + 0,88	0,183
50	150,0	5,5 + 1,22	4,8 + 1,17	5,2 + 1,13	< 0,001*
75	160,0	9,5 + 1,87	8,0 + 1,10	8,8 + 1,21	< 0,001*

*Significativité du test

Comme le montrent les résultats du tableau X, la fréquence de transformation spontanée est inférieure à douze et le TPA est une substance qui augmente la croissance cellulaire, celle-ci augmentant avec la concentration des doses testées.

Parmi les trois concentrations testées en promotion, les concentrations de 50 et 75 ng/mL présentent une augmentation statistiquement significative du nombre de foyers transformés par rapport au témoin solvant. Au regard des critères d'interprétation, **le TPA est considéré comme positif en promotion**. L'ensemble des résultats du tableau X sont illustrés dans la figure 25.

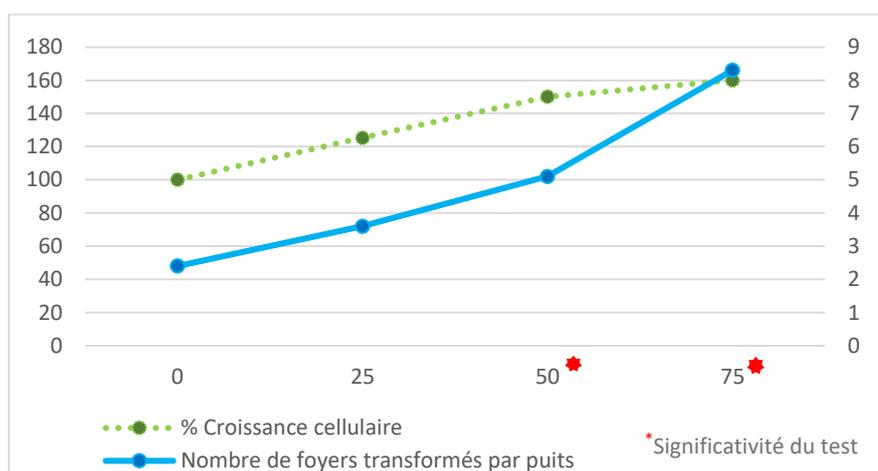


Figure 25 : Résultats -Essai de promotion pour le TPA

3.4. Méthapyrilène

3.4.1. Essai préliminaire de croissance cellulaire

Le tableau XI présente les résultats obtenus lors de l'essai préliminaire de croissance cellulaire réalisé sur le méthapyrilène, pour l'initiation et la promotion. Les pourcentages de croissance cellulaire ont été calculés par rapport au témoin solvant du méthapyrilène (le DF5F).

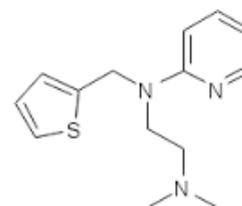


Figure 26 : Molécule de Méthapyrilène

Tableau XI : Concentrations testées lors de l'essai préliminaire pour le méthapyrilène et croissances relatives calculées

Essai d'initiation		Essai de promotion	
Concentrations à tester (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Concentrations à tester (µg/mL)	% de croissance cellulaire
DF5F	100	DF5F	100
100,5	82,8	25	127,0
120,6	81,5	37,5	157,0
144,7	56,5	50	157,5
173,6	46,8	75	206,8
208,3	18,8	100	209,1
250	13,2	150	210,0
300	11,4	300	21,8

Comme le montrent les résultats du tableau XI, le méthapyrilène inhibe la croissance cellulaire en initiation. En revanche, en promotion le méthapyrilène favorise la croissance cellulaire, hormis pour la concentration de 300 µg/mL qui se révèle toxique. Pour la réalisation du test de transformation cellulaire, les concentrations suivantes ont donc été sélectionnées :

- Pour l'initiation :
 - Au moins une concentration entre 120 et 80 % : 97,5 µg/mL et 117,2 µg/mL ;
 - Au moins deux concentrations entre 80 et 50 % : 156,25 µg/mL et 187,5 µg/mL ;
 - Au moins deux concentrations entre 50 et 10 % : 250 µg/mL et 300 µg/mL.
- Pour la promotion :
 - Au moins une concentration entre 120 et 80 % : 18,75 µg/mL ;
 - Au moins trois concentrations dans la gamme de croissance cellulaire : 37,5 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL et 150 µg/mL ;
 - Au moins une concentration inhibitrice : 300 µg/mL.

3.4.2. Essai définitif de transformation

3.4.2.1. Essai d'initiation

Le tableau XII présente les résultats de l'essai de transformation cellulaire réalisé pour le méthapyrilène pour l'initiation, avec le pourcentage de croissance cellulaire mesurée pour ces concentrations, les comptages des foyers de transformation pour les deux lecteurs et la moyenne des lectures, ainsi que la p-value du test de Dunnett. De plus, la viabilité cellulaire, les comptages des foyers de transformation et la significativité du témoin positif (le MCA) figurent également dans ce tableau.

Tableau XII : Résultats de l'essai d'initiation pour le méthapyrilène

Essai d'initiation					
Concentrations testées (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Lecteur 1 (moyenne + sd)	Lecteur 2 (moyenne + sd)	Moyenne + sd	p-value test de Dunnett
DF5F	100	4,5 + 1,52	2,3 + 1,03	3,4 + 1,11	-
97,5	88,2	5,8 + 3,06	5,5 + 2,43	5,7 + 2,71	0,0048*
117,2	87,5	8,0 + 2,19	7,8 + 1,72	7,9 + 1,93	< 0,001*
156,25	55,8	4,7 + 1,97	4,7 + 1,86	4,7 + 1,89	0,2103
187,5	63,8	1,2 + 0,98	1,2 + 0,98	1,2 + 0,98	0,0101*
250	13,6	0,0 + 0,0	0,0 + 0,0	0,0 + 0,0	< 0,001*
300	7,9	2,5 + 1,52	2,7 + 1,03	2,6 + 1,24	0,7474
p-value test d'Aspin-Welch					
MCA (1 µg/mL)	51,6	16,5 + 4,37	13,8 + 3,49	15,2 + 3,83	4,964. ⁻⁰⁷ *
DMSO (5 nL/mL)	100	4,2 + 1,17	3,7 + 1,03	3,9 + 1,07	-

*Significativité du test

Comme le montrent les résultats du tableau XII, la fréquence de transformation spontanée est inférieure à dix. En ce qui concerne le témoin positif, le test d'Aspin-Welch qui a été réalisé montre une différence significative entre le témoin solvant et le témoin positif (MCA).

En ce qui concerne les différentes concentrations testées pour le méthapyrilène, au moins une concentration est proche du niveau non toxique (97,5 µg/mL et 117,2 µg/mL) et trois concentrations sont comprises dans une gamme entre la Cl₂₀ et la Cl₉₀ (156,25 µg/mL, 187,5 µg/mL et 250 µg/mL). Deux concentrations (97,5 et 117,2 µg/mL) présentent une augmentation statistiquement significative de la fréquence de transformation. Par ailleurs, les concentrations de 187,5 et 250 µg/mL sont statistiquement significatives, mais c'est une diminution de la fréquence de transformation qui est mise en évidence, la fréquence de transformation étant inférieure à celle du témoin solvant. Au regard de ces résultats et des critères de validité et d'interprétation, **le méthapyrilène est positif en initiation**. L'ensemble des résultats du tableau XII est représenté dans la figure 27.

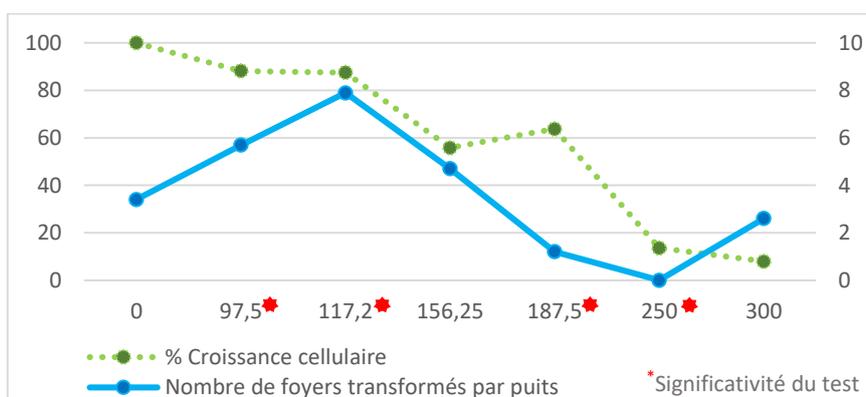


Figure 27 : Résultats de l'essai d'initiation pour le méthapyrilène

3.4.2.2. Essai de promotion

Le tableau XIII présente les résultats de l'essai de transformation cellulaire réalisé pour le méthapyrilène pour la promotion, avec le pourcentage de croissance cellulaire mesurée pour ces concentrations, les comptages des foyers de transformation pour les deux lecteurs et la moyenne des lectures, ainsi que la p-value du test de Dunnett. De plus, la significativité du témoin positif (le TPA) figure également dans ce tableau.

Tableau XIII : Résultats de l'essai de promotion pour le méthapyrilène

Essai de promotion					
Concentrations testées (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Lecteur 1 (moyenne + sd)	Lecteur 2 (moyenne + sd)	Moyenne + sd	p-value test de Dunnett
DF5F	100	4,5 + 2,95	3,3 + 0,52	3,9 + 1,50	-
18,75	117,5	8,8 + 3,54	8,7 + 3,67	8,8 + 3,60	0,0116*
37,5	132,9	28,2 + 5,49	29,2 + 2,86	28,7 + 4,03	< 0,001*
50	156,4	29,0 + 4,47	26,2 + 4,71	27,6 + 4,40	< 0,001*
75	182,5	39,7 + 5,16	37,2 + 7,03	38,4 + 5,86	< 0,001*
150	229,0	9,0 + 3,46	7,3 + 1,51	8,2 + 2,36	0,0335*
300	42,2	0,0 + 0,0	0,0 + 0,0	0,0 + 0,0	0,0581
p-value test d'Aspin-Welch					
TPA (75 ng/mL)	149,5	14,8 + 4,79	13,3 + 2,42	14,1 + 3,48	6,504. ⁻⁰⁶ *
DMSO (5 nL/mL)	100	6,0 + 1,10	5,8 + 0,98	5,9 + 0,86	-

*Significativité du test

Comme le montre le tableau XIII, la fréquence de transformation spontanée est inférieure à douze. En ce qui concerne le témoin positif, le test d'Aspin-Welch qui a été réalisé montre une différence significative entre le témoin solvant et le témoin positif (TPA).

En ce qui concerne les différentes concentrations testées pour le méthapyrilène, au moins une concentration est proche du niveau non toxique (18,75 µg/mL) et trois sont comprises dans la gamme de concentration augmentant la croissance cellulaire (37,5 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL et 150 µg/mL). Comme lors de l'essai préliminaire, la concentration de 300 µg/mL s'avère toxique.

Les quatre plus faibles concentrations (de 18,75 à 150 µg/mL) présentent une augmentation statistiquement significative de la fréquence de transformation. Au regard de ces résultats et des critères de validité et d'interprétation, **le méthapyrilène est positif en promotion**. L'ensemble des résultats du tableau XIII est représenté dans la figure 28.

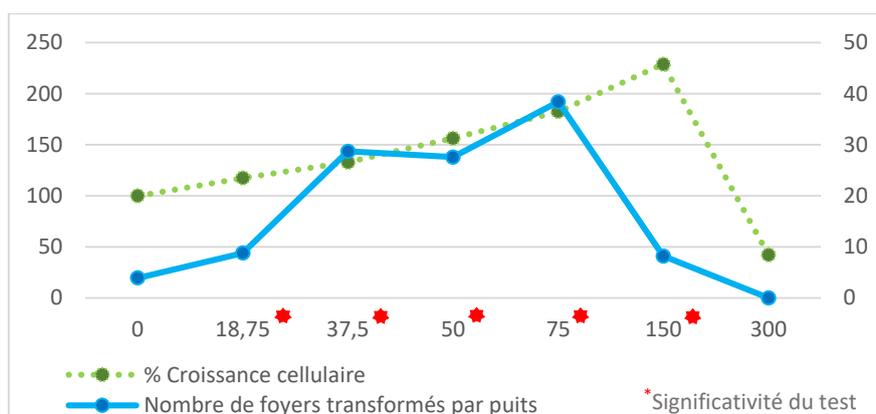


Figure 28 : Résultats de l'essai de promotion pour le méthapyrilène

3.5. Caféine

3.5.1. Essai préliminaire de croissance cellulaire

Le tableau XIV présente les résultats obtenus lors de l'essai préliminaire de croissance cellulaire réalisé sur la caféine, pour l'initiation et la promotion. Les pourcentages de croissance cellulaire ont été calculés par rapport au témoin solvant de la caféine (le DF5F).

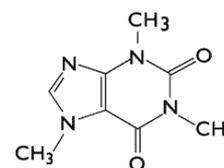


Figure 29 : Molécule de caféine

Tableau XIV : Concentrations testées lors de l'essai préliminaire pour la caféine et croissances relatives calculées

Essai d'initiation		Essai de promotion	
Concentrations à tester (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Concentrations à tester (µg/mL)	% de croissance cellulaire
DF5F	100	DF5F	100
75	83,1	75	68,3
100	103,2	100	72,1
150	63,0	150	50,6
200	100,8	200	59,6
300	55,4	300	46,1
400	41,8	400	48,4
500	15,6	500	39,0

Comme le montre le tableau XIV, la caféine inhibe la croissance cellulaire aussi bien en initiation qu'en promotion ; toutefois, les résultats pour le test préliminaire ne présentent pas une diminution régulière de la croissance cellulaire. Pour la réalisation du test de transformation cellulaire, les concentrations suivantes ont été choisies selon les recommandations :

- Pour l'initiation :
 - Au moins une concentration entre 120 et 80 % : 100 µg/mL ;
 - Au moins deux concentrations entre 80 et 50 % : 150 µg/mL, 200 µg/mL et 300 µg/mL ;
 - Au moins deux concentrations entre 50 et 10 % : 400 µg/mL et 500 µg/mL.
- Pour la promotion :
 - Au moins deux concentrations inférieures au niveau non toxique : 25 µg/mL, 50 µg/mL ;
 - Au moins deux concentrations entre 80 et 50 % : 100 µg/mL, 150 µg/mL et 200 µg/mL ;
 - Au moins une concentration entre 50 et 10 % : 500 µg/mL.

3.5.2. Essai définitif de transformation

3.5.2.1. Essai d'initiation

Le tableau XV présente les résultats de l'essai de transformation cellulaire réalisé pour la caféine pour l'initiation, avec le pourcentage de croissance cellulaire mesurée pour ces concentrations, les comptages des foyers de transformation pour les deux lecteurs et la moyenne des lectures, ainsi que la p-value du test de Dunnett. De plus, la significativité du témoin positif (le MCA) figure également dans ce tableau.

Tableau XV : Résultats de l'essai d'initiation pour la caféine

Essai d'initiation					
Concentrations testées (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Lecteur 1 (moyenne + sd)	Lecteur 2 (moyenne + sd)	Moyenne + sd	p-value test de Dunnett
DF5F	100	5,3 + 4,46	5,0 + 3,90	5,2 + 4,14	-
100	97,0	6,7 + 6,22	5,7 + 5,85	6,2 + 6,02	0,935
150	67,1	5,3 + 2,88	5,2 + 2,48	5,3 + 2,54	1,000
200	52,7	4,7 + 2,07	4,0 + 1,55	4,3 + 1,72	0,971
300	38,1	5,3 + 3,08	5,2 + 3,06	5,3 + 3,03	1,000
400	16,4	3,0 + 1,79	2,5 + 1,05	2,8 + 1,21	0,264
500	11,8	2,7 + 1,03	2,5 + 1,05	2,6 + 1,02	0,208
p-value test de Student					
MCA (1 µg/mL)	43,1	17,8 + 2,93	17,0 + 1,41	17,4 + 1,66	4,293. ^{-13*}
DMSO (5 nL/mL)	100	4,7 + 2,25	3,5 + 1,87	4,1 + 1,91	-

*Significativité du test

Comme le montrent les résultats du tableau XV, la fréquence de transformation spontanée est inférieure à dix. Toutefois, il est à noter que l'écart type pour le témoin solvant est grand en raison du nombre plus élevé de foyers de transformation dans l'un des puits. En ce qui concerne le témoin positif, le test de Student qui a été réalisé montre une différence significative entre le témoin solvant et le témoin positif (MCA).

En ce qui concerne les différentes concentrations testées pour la caféine, au moins une concentration est proche du niveau non toxique (100 µg/mL) et trois concentrations sont comprises dans une gamme entre la Cl₂₀ et la Cl₉₀ (150 µg/mL, 200 µg/mL, 300 µg/mL, 400 µg/mL et 500 µg/mL). Aucune augmentation statistiquement significative n'a été constatée pour aucune des concentrations testées en initiation pour la caféine. Au regard de ces résultats et des critères de validité et d'interprétation,

la caféine est négative en initiation. L'ensemble des résultats du tableau XV est représenté dans la figure 30.

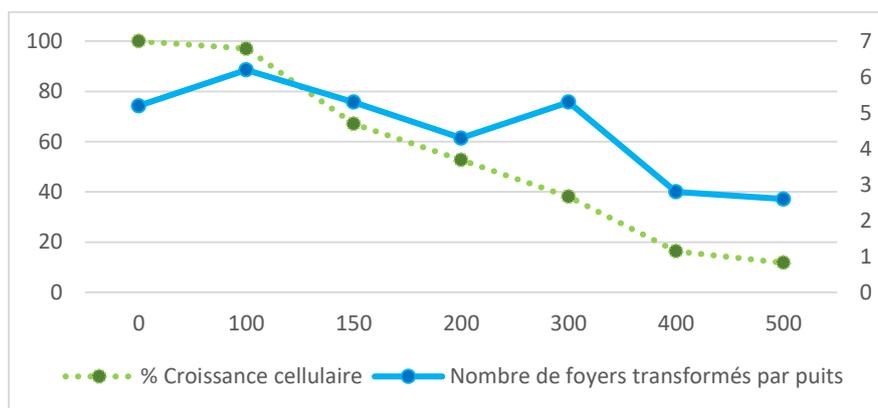


Figure 30 : Résultats de l'essai d'initiation pour la caféine

3.5.2.2. Essai de promotion

Le tableau XVI présente les résultats de l'essai de transformation cellulaire réalisé pour la caféine pour la promotion, avec le pourcentage de croissance cellulaire mesurée pour ces concentrations, les comptages des foyers de transformation pour les deux lecteurs et la moyenne des lectures, ainsi que la p-value du test de Dunnett. De plus, la significativité du témoin positif (le TPA) figure également dans ce tableau.

Tableau XVI : Résultats de l'essai de promotion pour la caféine

Essai de promotion					
Concentrations testées (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Lecteur 1 (moyenne + sd)	Lecteur 2 (moyenne + sd)	Moyenne + sd	p-value test de Dunnett
DF5F	100	4,2 + 1,47	3,5 + 1,64	3,8 + 1,40	-
25	90,1	4,5 + 2,59	3,2 + 1,94	3,8 + 2,23	1,000
50	87,4	7,0 + 3,85	5,5 + 3,39	6,3 + 3,60	0,196
100	81,0	3,5 + 1,97	3,0 + 2,28	3,3 + 2,07	0,996
150	72,7	4,8 + 3,19	3,5 + 2,43	4,2 + 2,68	1,000
200	67,7	3,8 + 2,32	3,7 + 2,07	3,8 + 2,16	1,000
500	32,0	2,7 + 1,51	1,5 + 1,38	2,1 + 0,86	0,514
p-value test de Student					
TPA (75 ng/mL)	162,0	22,5 + 5,05	17,7 + 3,14	20,1 + 3,84	1,601. ^{-08*}
DMSO (5 nL/mL)	100	4,7 + 2,80	4,0 + 2,10	4,3 + 2,44	-

*Significativité du test

Comme le montrent les résultats du tableau XVI, la fréquence de transformation spontanée est inférieure à douze et la croissance cellulaire est inhibée de façon dose dépendante. En ce qui concerne le témoin positif, le test de Student qui a été réalisé montre une différence significative entre le témoin solvant et le témoin positif.

En ce qui concerne les différentes concentrations testées de caféine, au moins deux concentrations sont inférieures au niveau non toxique (25 µg/mL, 50 µg/mL et 100 µg/mL) et au moins deux autres sont comprises entre la Cl_{20} et la Cl_{50} (150 µg/mL et 200 µg/mL). Aucune augmentation statistiquement significative n'a été constatée pour les concentrations testées en promotion pour la caféine. Au regard de ces résultats et des critères de validité et d'interprétation, **la caféine est négative en promotion.** L'ensemble des résultats du tableau XVI sont présentés dans la figure 31.

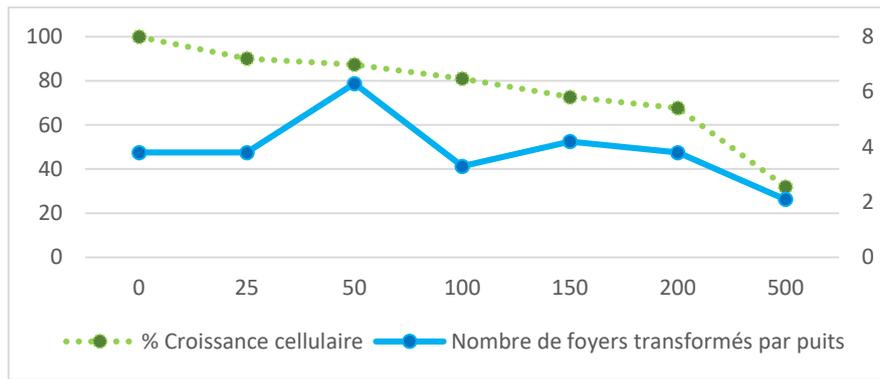


Figure 31 : Résultats de l'essai de promotion pour la caféine

4. Discussion

Afin de répondre au besoin de caractérisation du danger cancérigène par une des méthodes de substitution à l'expérimentation animale, différentes substances ont été testées dans le cadre de la validation du protocole de transformation cellulaire sur les cellules Bhas 42 au sein du laboratoire de Toxicologie de l'Institut Pasteur de Lille. Le MCA et le TPA ont été testés en priorité, ces substances étant les témoins positifs de référence, pour les essais respectivement d'initiation et de promotion. Par la suite, ce sont le benzo-a-pyrène et le cyclophosphamide, puis la mitomycine C et la quercétine qui ont été testés. En effet, en dehors de la quercétine, ce sont des substances de référence classiquement utilisées dans différents systèmes d'essai visant à évaluer la mutagenèse et la génotoxicité. Enfin, les substances de référence proposées par le projet de ligne directrice (MNNG, caféine, D-mannitol) et le méthapyrilène ont également été testées.

4.1. Le protocole

Le protocole qui a été mis en place est celui qui est décrit dans les publications de Sakai *et al.*, (2010 & 2011) et Tanaka *et al.* (2009), et qui a été repris dans le projet de ligne directrice (OCDE, 2016). Au cours des différents tests qui ont été réalisés, quelques contaminations sont venues perturber le bon déroulé des tests de transformation cellulaire en fin de période d'incubation, principalement aux jours 18 et/ou 21. Ces contaminations ont notamment eu lieu lors des tests sur le benzo(a)pyrène et le cyclophosphamide. Dans le cadre du protocole initialement mis en place et reprenant ceux détaillés dans les publications de Sakai *et al.* (2010 & 2011), ou encore dans le projet de ligne directrice pour le test de transformation cellulaire sur les cellules Bhas 42 (OCDE, 2016), les cellules après le changement de milieu au jour 14 restent à l'étuve à 37 °C, 5 % CO₂ jusqu'au jour 21 sans aucun changement de milieu. Pour pallier la problématique d'éventuelles contaminations, il a été décidé d'ajouter au jour 18 un changement de milieu, pour les essais d'initiation et de promotion. Il est à noter que dans l'étude de Asada *et al.* (2005), le milieu de culture des cellules Bhas 42 est changé deux fois par semaine. Cette étape supplémentaire a été ajoutée après les essais sur le benzo(a)pyrène et le cyclophosphamide et avant ceux sur la mitomycine C et la quercétine. Suite à cela, hormis pour une plaque lors de l'essai d'initiation pour le MNNG, plus aucune contamination n'a été constatée ni lors des essais de croissance cellulaire, ni lors des tests de transformation cellulaire. En dehors des critères de validité des résultats mentionnés dans le projet de ligne directrice (OCDE, 2016), il n'a pas été retrouvé dans la littérature (i) ni une quelconque mention rapportant d'éventuels soucis de contamination lors des tests de transformation cellulaire, (ii) ni le nombre de puits ayant servi à calculer la fréquence de transformation.

De plus, dans les protocoles présentés dans les publications de Sakai *et al.* (2010 & 2011) et dans le projet de ligne directrice (OCDE, 2016), il est recommandé d'utiliser du méthanol ou de l'éthanol pour la fixation. Pour l'étape de fixation des cellules c'est le méthanol qui est le plus fréquemment rapporté comme utilisé dans le cadre de l'essai de transformation avant la coloration au Giemsa (Sakai *et al.*, 2010 ; Asada *et al.*, 2005 ; Arai *et al.*, 2013). Dans le cadre de l'essai de croissance cellulaire pour Tanaka *et al.* (2009), les cellules sont fixées avec de la formaline¹⁹ 10 % contenant 0,1 % de cristal violet ; ce cristal violet étant par la suite extrait par une solution d'extraction identique à celle présentée dans le matériel et méthodes. Pour Ohmori (2008), la fixation des cellules lors de l'essai de croissance cellulaire s'effectue à l'aide de formaldéhyde ou de méthanol dans le cadre du test de transformation cellulaire. Pour la validation du protocole au sein du laboratoire, initialement la fixation des cellules s'est effectuée à l'aide d'éthanol 96 %. Toutefois, il a été constaté qu'en dépit de l'ajout précautionneux de l'éthanol 96 % sur le bord des puits, le tapis de cellules avait tendance à se décoller et se replier. Ce fait pouvant complexifier l'étape de lecture lors de la détermination de la fréquence de transformation, l'éthanol absolu a donc été utilisé lors de la fixation avant coloration au Giemsa. Le phénomène de superposition de couche de cellules s'est avéré beaucoup moins important depuis la mise en place de la fixation à l'aide de l'éthanol absolu. En ce qui concerne l'étape de fixation pour la croissance cellulaire, un éventuel décolllement du tapis cellulaire porte moins à conséquence. En effet, la solution d'extraction du cristal violet entraîne la lyse des cellules, l'éthanol 96 % a donc continué à être utilisé dans le cadre de l'essai de croissance cellulaire.

En ce qui concerne le recours à des fibroblastes lors de tests de transformation cellulaire, différentes raisons peuvent être avancées. En effet, les cellules endothéliales et les fibroblastes jouent un rôle prééminent dans la croissance, la progression et la dissémination du cancer. Les fibroblastes sont associés aux cellules cancéreuses à tous les stades de la progression. En effet, leur production de facteurs de croissance et de chimiokines facilite l'angiogenèse (Kalluri & Zeisberg, 2006). Les chimiokines sont indispensables au recrutement des leucocytes circulants vers les sites inflammatoires et participent ainsi à la fois à la migration des globules blancs et à leur activation. En étant impliquées dans la régulation de différents types cellulaires, les chimiokines sont donc impliquées dans le développement de tumeurs malignes, en plus des activités pro-inflammatoires. La capacité des cellules tumorales à induire l'angiogenèse constitue un des facteurs essentiels dans la progression vers la malignité, et les chimiokines avec leurs puissantes capacités à induire l'angiogenèse sont effectivement impliquées dans la progression vers la malignité (Samson *et al.*, 1999).

Les mécanismes de promotion sont encore peu clairs mais néanmoins la prolifération cellulaire, l'inflammation, la dédifférenciation et l'inhibition de l'apoptose apparaissent corrélées à la promotion de tumeur (Sasaki *et al.*, 2015). L'utilisation de la lignée cellulaire Bhas 42 issue de la lignée cellulaire A31-1-1 de souris Balb c/3T3, dans laquelle l'oncogène humain v-Ha-ras a été transfecté, permet en promotion de ne pas avoir recours à un pré-traitement comme cela peut être le cas pour les cellules Balb c/3T3 (Sasaki *et al.*, 2014). Les voies de signalisation impliquant ras font partie des principales voies de transduction et l'activation de ras est un facteur important de croissance cellulaire. Le fait que la lignée Bhas 42 soit considérée comme initiée la rend hautement sensible aux substances cancérigènes, qu'ils soient génotoxiques ou épigénétiques (OCDE, 2015b). De plus, il existe une corrélation forte entre la transformation *in vitro* sur les cellules Bhas 42 et la tumorigénicité *in vivo*. Zarbl *et al.* (1985) ont mis en évidence que le gène ras était activé par des mutations dans des tumeurs *in vivo*, et quand les cellules transformées sont inoculées à des souris, des tumeurs apparaissent (Sasaki *et al.*, 2015). Enfin, trois jours de traitement dans l'essai d'initiation permettent de détecter des

¹⁹ L'appellation « Formaline » est utilisée pour définir une solution de formaldéhyde provenant d'une marque de commerce dont la concentration en formaldéhyde est définie

cancérogènes nécessitant généralement une activation métabolique dans d'autres systèmes d'essai. En effet Sasaki *et al.* (2015) ont mis en évidence que huit des dix HAP testés, principalement métabolisés par le cytochrome CYP1A1, étaient positifs dans les essais de transformation ; ce fait suggère que le protocole d'initiation sur les cellules Bhas 42 permet donc de détecter des cancérogènes nécessitant généralement une activation métabolique (OCDE, 2016). Le nombre de cancérogènes échappant à la détection par un screening *in vitro* pourrait être réduit si le test de transformation cellulaire était inclus dans la batterie de tests *in vitro* destinés à prédire le potentiel cancérogène de substances (Sakai *et al.*, 2010).

4.2. Dénombrement des foyers de transformation

Comme l'ont montré les photos extraites du projet de ligne directrice (OCDE, 2016) et de la publication de Sasaki *et al.* (2012a), l'étape de dénombrement des foyers transformés dans le protocole en plaque 6 puits s'avère quelque peu subjective. En effet, plusieurs critères servent à déterminer un foyer transformé, (i) ils contiennent plus de 100 cellules, (ii) les cellules sont fusiformes, (iii) les foyers présentent une coloration basophile intense, (iv) les cellules sont orientées de manière aléatoire, (v) des multicouches de cellules sont observables et (vi) la croissance est invasive dans la monocouche de cellules confluentes. Toutefois, s'il n'est pas nécessaire que tous ces critères soient remplis, certaines altérations morphologiques doivent être claires pour qu'un foyer soit comptabilisé. De plus, il existe trois différents types de foyers transformés (type I, type II, type III), et seuls les foyers de type III sont à enregistrer car ce sont ceux qui sont responsables de l'apparition de tumeurs lorsqu'ils sont inoculés à des souris. Le photocatalogue disponible dans la publication de Sasaki *et al.* (2012a) a été réalisé à partir de tests de transformation cellulaire réalisés sur les cellules Balb c/3T3. Il peut cependant être utilisé comme support et/ou aide à la décision pour notamment distinguer les foyers de type II et III pour les essais réalisés sur les cellules Bhas 42, les foyers étant similaires pour ces deux types de cellules (Sasaki *et al.*, 2014).

Afin de minimiser la potentielle subjectivité de la lecture, un système de codage des plaques a été mis en place au sein du laboratoire afin d'effectuer le comptage des foyers de transformation sans indication autre que le nom du produit et le système d'essai (initiation ou promotion). Ce codage permet de ne pas être influencé (i) par les concentrations testées et donc par un éventuel effet dose réponse, ou (ii) par le fait d'attendre des résultats spécifiques en présence d'un témoin négatif ou positif. Dans la littérature, seul le projet de ligne directrice (OCDE, 2016) mentionne un codage et un marquage des plaques avant d'évaluer les phénotypes morphologiquement transformés. Comme l'ont montré les résultats des essais réalisés au laboratoire, une différence est généralement observée lors des dénombrements entre les deux lecteurs, ce qui met en évidence l'importance de la formation au dénombrement du personnel de laboratoire.

Cette étape de comptage est un aspect sur lequel plusieurs équipes de recherche continuent de travailler afin d'améliorer l'objectivité du dénombrement des foyers transformés, cette étape constituant en effet la principale limite du test de transformation cellulaire en plaque 6 puits (EURL ECVAM, 2011). Une méthode alternative au protocole en plaque 6 puits a été développée sur des plaques 96 puits afin de permettre des analyses à haut débit (Arai *et al.*, 2013). Les critères de quantification de la fréquence de transformation sont les mêmes qu'en plaque 6 puits (plus de 100 cellules, basophile, fusiforme, orientation aléatoire, multicouche, invasion). Par contre, dans le protocole en plaque 96 puits, il n'est pas nécessaire de compter le nombre de foyers transformés par puits. Dès lors qu'il y a au moins un foyer transformé dans un puits, celui-ci est enregistré comme positif. La fréquence de transformation est alors exprimée par le nombre de puits contenant au moins un foyer transformé par rapport aux 96 puits de la plaque, cette différence permettrait de réduire la potentielle subjectivité. L'augmentation de la proportion de la fréquence de transformation est ensuite

analysée statistiquement par le test du Chi² ($p < 0,05$, unilatéral). La méthode en plaque 96 puits semble comparable à celle en plaque 6 puits au regard des 31 résultats concordants obtenus sur 32 substances testées dans la publication de Arai *et al.* (2013). La seule exception concerne l'arsénite de sodium qui était négatif en initiation et promotion en plaque 96 puits et équivoque en initiation et positif en promotion en plaque 6 puits. Pour Arai *et al.* (2013), la fréquence de transformation est plus facile à déterminer dans le cadre du protocole en plaque 96 puits, cet avantage étant illustré dans la figure 32.

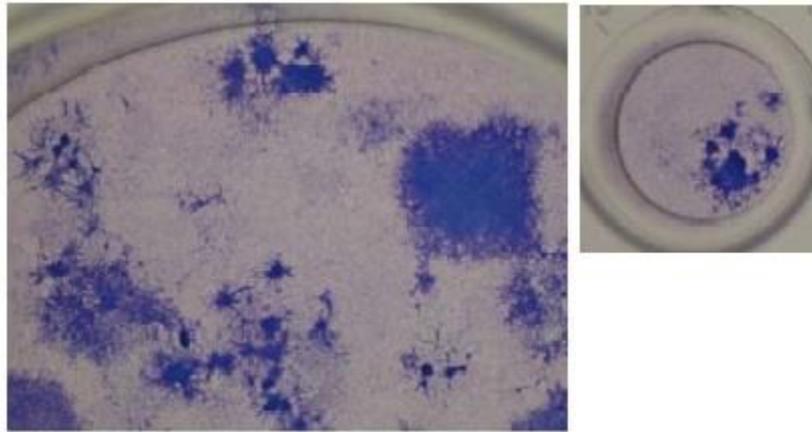


Figure 32 : Comparaison protocole 6 et 96 puits pour le TPA (d'après Arai *et al.*, 2013)

Toutefois, pour Arai *et al.* (2013) des travaux restent nécessaires afin d'améliorer cette étape de lecture en plaque 96 puits. En effet, celle-ci peut s'avérer plus longue, et le développement par exemple de méthodes automatisées permettraient d'optimiser cette étape en distinguant les puits positifs des puits négatifs par une mesure spectroscopique ou une analyse d'image.

Une équipe basée à l'Université de Milan dans le Département des Sciences de la Terre et de l'Environnement, en collaboration avec d'autres équipes en Italie (Département de Statistiques de Florence notamment) travaille sur des descripteurs statistiques. Ainsi, Urani *et al.* (2013) ont travaillé sur l'objectivation du dénombrement des foyers de transformation grâce à un traitement statistique d'images. Pour cela, des descripteurs statistiques ont été développés pour classifier les foyers transformés à partir de tests de transformation cellulaire réalisés sur les cellules Balb/c 3T3. Des photos ont été obtenues à partir d'observations au stéréomicroscope. 407 photos ont donc été analysées par le « Fiji open-source platform », qui est un logiciel utilisé pour l'analyse d'image biologique. Ils ont proposé un descripteur statistique appelé « Equivalent Diameter (ED) » qui aurait servi dans leur base de données d'images. Toutefois, un grand polymorphisme a été observé au sein de cette base de 407 photos ce qui reflète la complexité des processus de la cancérogenèse. Au regard des choix qui ont dû être opérés dans cette étude, les auteurs mentionnent que de futurs descripteurs devraient intégrer des critères comme la croissance en multicouche. Par la suite, Callegaro *et al.* (2015) ont travaillé sur le développement et la mise en place d'un outil d'imagerie automatisé pour aider à l'enregistrement des foyers transformés dans le test de transformation cellulaire sur les cellules Balb c/3T3. Ce système d'analyse d'images est basé sur différentes mesures réalisées sur les foyers transformés, et seuls les foyers de type III ont été utilisés pour les comparaisons statistiques. Les descripteurs d'images utilisés étaient la dimension des foyers, la croissance en multicouche et l'invasivité dans la monocouche de cellules environnantes. Un modèle de régression logistique a ensuite été développé afin d'estimer la probabilité pour chaque foyer d'être transformé selon ces trois descripteurs statistiques d'images. Il est à noter que ces méthodes développées à partir de données issues de test de transformation cellulaire sur les cellules Balb/c 3T3 seraient également applicables aux cellules Bhas 42.

D'autres techniques n'ayant pas recours à ces techniques d'analyse d'images sont en cours d'élaboration et/ou de développement. Sasaki (2012b) propose d'induire une nécrose sélective par un traitement de 24 heures à l'aide de peroxyde d'hydrogène titré à 0,0015 %. Ce traitement serait à effectuer au jour 21, pour une lecture de l'absorbance à 450nm à réaliser au jour 22. L'ajout de peroxyde d'hydrogène se révélerait fortement cytotoxique pour les cellules présentant un phénotype normal, tandis que pour les cellules transformées, cet ajout sur ce court intervalle de temps n'aurait pas d'impact. Selon Sasaki (2012b), cette méthode permettrait d'avoir (i) une lecture objective, mais également (ii) un temps de lecture beaucoup plus court. Une comparaison de cette méthode avec le protocole initial est proposée dans la figure 33.

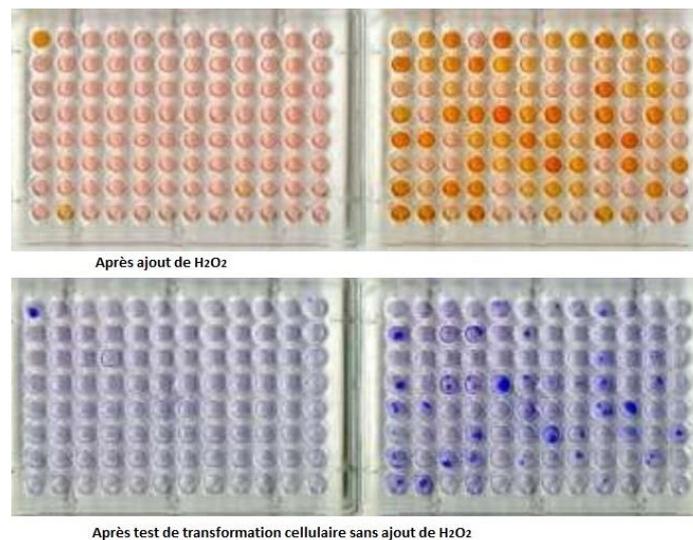


Figure 33 : Comparatif des plaques 96 puits avec ou sans peroxyde d'hydrogène

Par exemple, l'étude de Pu *et al.* (2016) pour déterminer la cancérogénicité de trois extraits de plantes a mis en place le protocole de transformation cellulaire sur les cellules Bhas 42 en plaque 96 puits, en ajoutant 50 μ L de peroxyde d'hydrogène au jour 19. Au jour 20, un volume de 50 μ L de CCK-8 (Cell Counting Kit-8) a été ajouté. La lecture de l'absorbance a été ensuite effectuée à une longueur d'onde de 540 nm. Même si l'ajout de peroxyde d'hydrogène en fin d'essai semble prometteur au regard des résultats comparables à la méthode standard comme le montre la figure 33, le peroxyde d'hydrogène est connu pour ne pas avoir de grandes propriétés de stabilité, et notamment sur des concentrations aussi faibles. Cette instabilité est principalement due à la présence d'ions métalliques (même à l'état de traces) qui catalysent sa décomposition, du pH (les solutions sont moins stables en milieu alcalin, la stabilité maximale se situant à pH 3,5-4,5), les radiations (les UV et les radiations ionisantes activent la décomposition), la température (son augmentation accélère la réaction) et les aspérités de la paroi interne (INRS, 2007).

D'autres méthodes existent encore, ce qui confirme que l'on cherche toujours à simplifier et à objectiver davantage l'étape de lecture de la fréquence de transformation. Poth *et al.* (2007) ont réalisé des dosages d'activités enzymatiques et ont mis en évidence une augmentation de l'activité de la butyrylcholinestérase (BChE) dans les cellules présentant un phénotype transformé, la réponse la plus importante se retrouvant dans les foyers de type III. Poburski & Thierbach (2016), lors de tests de transformation cellulaire sur les cellules Balb/c 3T3 ont effectué des dosages de Proliférating Cell Nuclear Antigen (PCNA)²⁰, de glucose dans le milieu de culture (milieu sans rouge de phénol à partir

²⁰ Fréquemment mesuré dans par détection immunologique pour la détermination de la prolifération cellulaire ; PCNA est une protéine faisant partie du complexe de réplication de l'ADN et est un marqueur des cellules en prolifération, fréquemment utilisé en oncologie.

du jour 11 jusqu'au jour 42) ou encore de la consommation d'oxygène. Les résultats de l'étude ont montré que ces paramètres étaient en lien avec la prolifération cellulaire, l'augmentation de la consommation de glucose et de d'oxygène étant mesurables dès les premières étapes.

4.3. Résultats des essais de croissance cellulaire et de transformation

4.3.1. Les produits positifs en initiation

Le 3-méthylcholanthrène (MCA), qui fait partie de la famille des hydrocarbures polycycliques, est un composé génotoxique qui interagit directement avec l'ADN en tant qu'agent intercalant. Dans l'essai d'initiation, les résultats montrent une augmentation statistiquement significative du nombre de foyers transformés par rapport au témoin solvant des trois concentrations testées (0,75 µg/mL, 1 µg/mL, 1,25 µg/mL). La concentration intermédiaire de 1 µg/mL de MCA est celle qui a été retenue pour la suite des essais d'initiation et correspond à celle qui est utilisée dans la littérature (Arai *et al.*, 2013 ; Sakai *et al.*, 2011 ; Tanaka *et al.*, 2009). De plus, dans tous les essais où il a été intégré comme témoin positif de référence, le nombre de foyers transformés par puits présente une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin solvant et est compris entre 7,9 et 17,4, ces résultats concordant avec les résultats de différentes publications (Asada *et al.*, 2005 ; Sakai *et al.*, 2010 ; Sakai *et al.*, 2011 ; Tanaka *et al.*, 2009). De plus, le MCA se révèle positif dans d'autres tests de transformation cellulaire, aussi bien sur les cellules SHE à pH 6,7 mais également à pH 7,0, sur les cellules Balb c/3T3 et sur les cellules C3H10T1-2 (OCDE, 2007).

Le MNNG appartient à la famille des nitrosamines (dérivés N-nitroso) et est listé à l'annexe XVII du Règlement REACH en tant que substance cancérigène (INERIS, 2014). Cette substance a été classée 2A par l'IARC en 1987²¹ (cancérigène probable) et 1B selon le règlement CLP (substances dont le potentiel cancérigène pour l'être humain est supposé, ce classement ayant été établi à partir de données animales). Il induit des méthylations de l'ADN, et notamment sur la guanine. Les résultats des essais de croissance cellulaire en initiation et en promotion pour le MNNG montrent que cette substance est cytotoxique, quel que soit le profil de traitement. En ce qui concerne la fréquence de transformation en initiation, les résultats montrent qu'à la concentration de 0,256 µg/mL, il n'y avait plus de cellule dans aucun puits de la plaque, ce qui a fait envisager la piste d'une contamination. Cette probable contamination a diminué le nombre de concentrations disponibles pour l'étude statistique pour l'essai d'initiation. De plus, l'essai d'initiation n'a pas mis en évidence d'augmentation statistiquement significative par rapport au témoin. Ces résultats ne sont pas concordants avec ce qui est publié dans la littérature (Sakai *et al.*, 2010 ; Arai *et al.*, 2013 ; Tanaka *et al.*, 2009) où les résultats pour le MNNG étaient positifs en initiation. Dans l'étude de Sakai *et al.* (2010) où 98 substances chimiques ont été testées, les concentrations présentant une augmentation statistiquement significative étaient 0,47 µg/mL et 0,7 µg/mL ($6,0 \pm 1,8$ et $9,7 \pm 4,8$, pour un témoin négatif à $1,7 \pm 1,2$). Dans l'étude collaborative entre plusieurs laboratoires de Tanaka *et al.* (2009), une augmentation statistiquement significative du nombre de foyers transformés a été mise en évidence pour les concentrations de 0,3 µg/mL et de 0,8 µg/mL ; il est à noter toutefois que les résultats d'un laboratoire sur les trois ayant participé à l'étude étaient négatifs pour le MNNG en initiation. Par ailleurs, le MNNG présente des résultats positifs dans le test d'Ames, avec ou sans activation métabolique (mutation par décalage du cadre de lecture sur les souches TA97, TA98, TA1537 et TA1538 ; mutation non-sens avec les souches TA100 et TA1535, Asada *et al.*, 2009) ou avec le test de transformation cellulaire réalisé sur les cellules SHE à pH 7 (Benigni *et al.*, 2013). Au regard de ces résultats, un nouvel essai d'initiation

²¹ http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php

pour le MNNG a été programmé afin de confirmer ou non ces résultats (cet essai 2 intègre également le benzo[a]pyrène et le cyclophosphamide).

Par ailleurs, les résultats pour le MNNG en promotion ont mis en évidence une augmentation statistiquement significative de la fréquence de transformation pour une concentration. Un nouvel essai devra également être réalisé afin de mettre en évidence que le MNNG est négatif en promotion.

4.3.2. Les produits positifs en promotion

Le TPA, l'un des principes actifs de l'huile de croton, appartient à la famille des esters de phorbol qui interagissent avec des récepteurs couplés à des protéines membranaires. Suite à l'activation des protéines ERK1/2 jouant un rôle dans la prolifération cellulaire, une cascade de réactions donne lieu à une prolifération et/ou à une survie cellulaire ou à une différenciation cellulaire (Châtel, 2014). De plus, le TPA inhibe les communications entre les cellules et est un promoteur de tumeur de référence (Ohmori, 2008). Ce rôle de promoteur a également été mis en évidence lors de tests de transformation cellulaire réalisés aussi bien sur les cellules SHE à pH 6,7 mais également à pH 7,0, sur les cellules Balb c/3T3 et sur les cellules C3H10T1-2 (OCDE, 2007). Toutefois, il est à noter qu'en dépit de cette activité promotrice, le TPA ne fait pas l'objet d'un classement par l'IARC. Dans l'essai de promotion réalisé pour trois concentrations différentes, les résultats montrent que les concentrations testées au sein du laboratoire de toxicologie (50 et 75 ng/mL) présentent une augmentation statistiquement significative du nombre de foyers transformés par rapport au témoin solvant. Le TPA à une concentration de 50 ng/mL est utilisé comme témoin positif de référence (Sakai *et al.*, 2010 ; Arai *et al.*, 2013 ; Tanaka *et al.*, 2009 ; OCDE, 2016). Au sein du laboratoire pour les essais de transformation réalisés par la suite, c'est la concentration de 75 ng/mL qui a finalement été retenue au regard du plus faible nombre de foyers transformés pour la concentration de 50 ng/mL. Dans tous les essais où il a été intégré en tant que témoin positif de référence, les résultats de croissance cellulaire montrent que le TPA augmente la croissance cellulaire, celle-ci ayant été mesurée entre 141,1 % et 292,8 % par rapport au témoin solvant. Ces résultats sont supérieurs à ce qui peut se retrouver dans la littérature (Sakai *et al.*, 2010 ; Tanaka *et al.*, 2009), cette différence pouvant s'expliquer par la concentration plus élevée. En ce qui concerne les essais de promotion, les résultats montrent une augmentation statistiquement significative du nombre de foyers transformés (de 8,8 à 20,1) quand les cellules sont traitées avec le TPA.

Le méthapyrilène est un composé qui présente des propriétés antiallergiques, antihistaminiques des récepteurs H1 (type de récepteurs prédominants dans les muscles lisses : bronches, intestins, ...) ainsi qu'hypnotiques et sédatives. Ce médicament a été retiré du marché en raison de son hépatotoxicité en 1979²². Les résultats des essais de croissance cellulaire en initiation pour le méthapyrilène montrent que cette substance est cytotoxique. En revanche, en promotion le méthapyrilène favorise la croissance cellulaire, à l'exception de la concentration de 300 µg/mL qui se révèle cytotoxique (21,8 % et 42,2 %). Lors des essais de transformation cellulaire, une acidification du milieu de culture (coloration plus orangée du DF5F) a été constatée en promotion aux jours 7 et 10 pour la concentration de 300 µg/mL, ainsi que pour la concentration de 150 µg/mL aux jours 10 et 14. Pour ces concentrations, l'observation au stéréomicroscope a montré qu'il ne restait que peu de cellules viables avant l'étape de fixation puis coloration au Giemsa. En ce qui concerne la fréquence de transformation, deux des concentrations testées en initiation présentent une augmentation statistiquement significative par rapport au témoin solvant correspondant (97,5 et 117,2 µg/mL), les autres concentrations présentant un résultat statistiquement différent du témoin mettent en évidence une diminution de la fréquence de transformation. Lors des essais de promotion, cinq concentrations sur

²² <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/methapyrilene#section=Top>

les six testées (18,75 - 37,5 – 50 – 75 et 150 µg/mL) ont présenté une augmentation statistiquement significative du nombre de foyers transformés par rapport au témoin solvant, la concentration de 75 µg/mL présentant une moyenne pour les deux lecteurs de $38,4 \pm 5,86$ foyers de transformation par puits. Ces résultats en promotion viennent confirmer ce qui est retrouvé dans l'étude de Sakai *et al.* (2010) où les concentrations de 25, 50, 75 et 100 µg/mL présentaient une augmentation statistiquement significative de la fréquence de transformation par rapport au témoin solvant, et principalement la concentration de 50 µg/mL avec une fréquence de transformation à $18,5 \pm 6,3$, pour une fréquence de transformation à $2,5 \pm 2,0$ dans le témoin solvant. Le méthapyrilène est donc considéré comme ayant une activité de promotion dans l'essai de transformation cellulaire, cela pouvant être considéré comme une indication du potentiel cancérigène *in vivo*. Pour Laprévotte (2013), il provoque des tumeurs dans le foie chez l'animal et l'étude de Guillouzo & Morel (2004) a montré qu'il induisait des carcinomes hépatocellulaires par un mécanisme non mutagène ainsi qu'une nécrose. Enfin, les résultats de l'étude d'Inoue *et al.* (2015) montrent que le méthapyrilène induit indirectement des micronoyaux (effet clastogène) au niveau des hépatocytes lorsqu'il est administré de manière répétée à de jeunes rats, à la concentration de 100 mg/kg/j (un des acides biliaires, l'acide chénodéoxycholique réduisant la teneur en cholestérol de la bile, induisant des dommages oxydatifs à l'ADN).

Enfin, en ce qui concerne l'essai d'initiation, deux des concentrations testées présentent une augmentation statistiquement significative de la fréquence de transformation, un essai complémentaire est à programmer afin de confirmer que le méthapyrilène est négatif en initiation.

4.3.3. Le produit négatif en initiation et en promotion

La caféine est un alcaloïde de méthylxanthine, qui agit comme un antagoniste des récepteurs de l'adénosine et qui a des activités psychotropes et anti-inflammatoires²³. L'IARC a classé la caféine en catégorie 3 en 1991 (*i.e.* agent inclassable quant à sa cancérogénicité)²⁴. Les résultats des essais de croissance cellulaire en initiation et en promotion ont montré que la caféine inhibait la croissance cellulaire, de façon dose dépendante. En ce qui concerne la fréquence de transformation, aucune augmentation statistiquement significative n'a été mise en évidence, que ce soit en initiation ou en promotion et ces résultats concordent avec ceux de l'étude de Sakai *et al.* (2010).

4.3.4. Bilan des essais sur les substances recommandées par la ligne directrice

Pour conclure sur les six substances à tester dans le cadre de la validation du test de transformation cellulaire au sein du laboratoire :

- ✓ Les résultats pour le MCA confirment que c'est un produit positif dans l'essai d'initiation ; il a par la suite été utilisé comme témoin positif de référence pour les essais d'initiation à la concentration de 1 µg/mL, en concordance avec les résultats de la littérature ;
- ✗ Les résultats pour le MNNG ne confirment pas que cette substance est positive dans l'essai d'initiation ; un essai 2 est programmé afin de confirmer ou non ces résultats. De plus, les résultats étant équivoques en promotion, un essai 2 s'avère également nécessaire pour ce protocole d'essai afin de confirmer que le MNNG est négatif en promotion ;
- ✓ Les résultats pour le TPA et le méthapyrilène confirment que ces substances sont positives dans l'essai de promotion ; le TPA a par la suite été utilisé comme témoin positif de référence pour les essais de promotion à la concentration de 75 ng/mL (concentration légèrement supérieure à celle retrouvée dans la littérature). Toutefois, deux concentrations de méthapyrilène ayant montré une augmentation statistiquement significative de la fréquence de transformation dans l'essai

²³ <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2519#section=Top>

²⁴ http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php

- d'initiation, un essai 2 est à reprogrammer pour vérifier et confirmer l'absence de transformation dans l'essai d'initiation ;
- ✓ Les résultats pour la caféine confirment qu'elle est négative pour la transformation cellulaire, aussi bien dans l'essai d'initiation que de promotion, et qu'elle ne possède probablement pas d'activité cancérogène.

4.4. Transposition des résultats à l'Homme

Les tests *in vitro* sont réalisés dans un environnement contrôlé, en dehors d'un organisme vivant. Les résultats obtenus avec de tels essais peuvent indiquer la présence d'une propriété spécifique ou permettre la compréhension du mode d'action d'une substance. Les tests cellulaires ont cependant des limites. En effet, la biodisponibilité, la toxicocinétique des substances étudiées et le contexte physiologique sont des paramètres qui influencent considérablement la réponse d'un organisme à une substance potentiellement toxique et ne peuvent être considérés dans les études *in vitro* (INSERM, 1999). Toutefois, concernant le potentiel génotoxique, des résultats positifs dans deux systèmes d'essai *in vitro* mettant en œuvre des mécanismes différents peuvent permettre de conclure sur la probabilité d'observer des réponses mutagènes *in vivo*, sans avoir recours à une expérimentation animale supplémentaire.

Des tests *in vivo* peuvent être nécessaires (i) si un des tests *in vitro* recommandés dans l'évaluation de la génotoxicité présente des résultats positifs ou (ii) dans le cadre de réglementation spécifique. Pour les études *in vivo*, les mécanismes d'action d'un facteur ou d'une substance sont étudiés à l'échelle de l'organisme entier. Comme lors de tests *in vitro*, les études chez l'animal permettent de contrôler certains paramètres, comme le choix de la population ou le mode d'exposition. Les groupes étudiés ne diffèrent entre eux que par le fait d'être exposés ou non. Le spectre génétique particulier des cancers humains est, à quelques exceptions près, retrouvé chez le modèle murin. Chez l'Homme et la souris, l'activation des oncogènes ras est par exemple retrouvé dans les adénocarcinomes du poumon et du colon (Balmain & Harris, 2000). Bien que les souris soient de petits animaux avec une plus faible durée de vie, elles développent des tumeurs dans les mêmes tissus, et dans la plupart des cas, selon une évolution histopathologique similaire à celle pouvant être observée chez l'Homme (Balmain & Harris, 2000). De la même manière, des similarités entre les tumeurs du côlon chez les rongeurs et l'Homme ont été mises en évidence (Corpet & Pierre, 2005). Sur l'ensemble des composés testés déterminant une action cancérogène chez une seule espèce, le rat s'est avéré être une espèce plus « sensible » que la souris, les substances à n'avoir réagi que chez une seule de ces deux espèces étant deux fois plus nombreuses pour le rat (Santé Canada, 2000).

Même si la transposition à l'Homme des résultats obtenus en toxicologie réglementaire chez les animaux d'expérimentation est établie dans un grand nombre de cas (GIS, 2010), il n'existe pas de modèle totalement satisfaisant. Cette question de la transposition nécessite donc la plus grande prudence, que ce soit sur l'interprétation des résultats ou sur la sélection de l'espèce la plus pertinente possible. En effet, certaines espèces peuvent être peu sensibles ou, inversement, extrêmement sensibles à certains agents toxiques, comme peut le montrer l'exemple de la thalidomide²⁵ qui tient une place particulière dans l'histoire (Shanks *et al.*, 2009). Des essais ont été réalisés après la survenue des effets sur l'être humain sur environ dix souches de rats, quinze souches de souris, onze races de lapins, deux races de chiens, trois souches de hamsters, huit espèces de primates et autres espèces diverses telles que le chat, le tatou, le cobaye, le porc et le furet. Ces essais n'ont permis de montrer

²⁵ Sédatif anti-nauséeux prescrit aux femmes enceintes à la fin des années 1950 jusque début des années 1960 ; à l'origine d'un scandale sanitaire suite à de graves malformations congénitales. Le nombre de victimes, bien que difficile à estimer, serait de 10 000 à travers le monde

des effets tératogènes que de manière occasionnelle (Schardein, 1976). Ces résultats *a posteriori* ont révélé que les effets tératogènes de la thalidomide n'auraient pas pu être mis en évidence avec la réglementation en vigueur à cette époque.

Les mécanismes biologiques présents chez l'Homme et l'animal peuvent présenter des différences, et le polymorphisme génétique des enzymes de métabolisation ou le déterminisme des réponses immunitaires ne sont pas prévisibles par l'expérimentation animale (GIS, 2010). Dans un premier temps, il convient d'étudier la plausibilité des effets chez l'homme, afin de s'assurer de la cohérence des effets entre l'Homme et l'animal sélectionné pour l'étude. Dans un second temps, les données de toxicocinétique et toxicodynamique chez l'Homme et l'animal doivent être cohérentes (AFSSET, 2006). Le test de transformation cellulaire sur des cellules humaines, en plus de ceux réalisés sur les rongeurs, pourrait être un système idéal dans l'identification des cancérogènes entraînant des transformations cellulaires. Cependant le nombre d'évènements génétiques requis pour la transformation dans les cellules humaines est plus élevé que chez les rongeurs. L'introduction d'allèles oncogéniques du type ras est suffisante pour avoir un impact sur les cellules transformées, mais n'a pas toujours réussi à induire des transformations dans les cellules humaines (Creton *et al.*, 2012).

La problématique de la transposition des données issues de l'expérimentation se pose particulièrement pour les cancérogènes épigénétiques. En effet, les modes d'action de ces substances sont multiples ce qui contribue à la complexité (i) de la caractérisation du danger cancérogène des substances, et (ii) de la transposition. En effet, chez les rongeurs les cancérogènes non génotoxiques présentent des spécificités par rapport à l'espèce, à la souche, aux organes cibles mais également sur les relations dose-réponse (Santé Canada, 2000).

Quelques exemples de mécanismes de cancérogenèse épigénétiques présentant des différences peuvent être cités. Une augmentation de la sécrétion d'hormones trophiques²⁶ suite à l'exposition à un inducteur enzymatique (PCB ou paraffines chlorées) entraîne une augmentation de la glucuronyl-transférase, qui fait diminuer les taux d'hormones thyroïdiennes T3 (triiodothyronine) et T4 (thyroxine). La diminution de ces deux hormones entraîne alors une augmentation la TSH (Thyroid Stimulating Hormone) qui génère la prolifération de cellules folliculaires et le développement de tumeurs chez le rat. Ce mécanisme n'est pas transposable à l'Homme. En effet, chez le rat les hormones T3 et T4 sont fortement présentes en fractions libres et les protéines Thyroxin-Binding Globulin (TBG) ne sont pas retrouvées. Ces protéines TBG participent à des mécanismes de compensation vis-à-vis de l'exposition à ces inducteurs enzymatiques chez l'Homme. En revanche, l'augmentation de la sécrétion des hormones trophiques par l'inhibition de la peroxydase entraîne une diminution des hormones T3 et T4. La thyroïde est alors stimulée, ce qui aboutit également à la prolifération des cellules folliculaires et entraîne la formation de tumeurs chez le rat. Ce mécanisme de cancérogenèse épigénétique est cette fois-ci transposable à l'Homme.

Un autre exemple de mode d'action ne pouvant se transposer à l'Homme concerne les tumeurs du rein induites par la liaison à l' α 2u-globuline chez les rats mâles avec des substances telles que l'acide nitrilotriacétique. Des tests de génotoxicité ont présenté des résultats négatifs. L'US-EPA et l'IARC ont conjointement conclu que ce mécanisme ne pouvait être transposé à l'Homme en l'absence de production d'une protéine analogue chez l'Homme (Doi *et al.*, 2007).

Les PPAR (Peroxisome Proliferator Activating Receptor) sont des récepteurs nucléaires impliqués dans la réponse anti-inflammatoire par la présence de peroxydase et pour lesquels il existe trois isomères différents (α , β , γ). Ils sont notamment présents dans les hépatocytes ou dans les cellules rénales et

²⁶ Sécritées par l'hypothalamus, stimulent ou inhibent la sécrétion d'hormone de l'hypophyse antérieure

peuvent être activés par un grand nombre de xénobiotiques (phtalates, composés perfluorés entre autres). L'activation des PPAR entraîne une prolifération des peroxyosomes et induit des cancers du foie chez les rongeurs. De plus, le récepteur PPAR α peut activer des gènes impliqués dans la croissance et la transformation néoplasique, et des souris dites « knock-out » n'ont pas développé de tumeurs hépatiques même après administration de proliférateur de peroxyosomes. Ce modèle n'est également pas transposable à l'Homme chez qui l'induction de PPAR α n'entraîne pas de tumeur au niveau du foie. Il est à noter que chez l'Homme le niveau d'expression dans le foie de PPAR α est beaucoup plus faible que chez le rongeur (Ratziu *et al.*, 2003).

Enfin, si un mode d'action est clairement démontré comme n'ayant pas lieu chez l'Homme, la réponse de l'expérimentation animale n'est alors pas considérée comme pertinente pour l'évaluation du danger cancérigène (Cohen *et al.*, 2003).

Conclusion

Le test de transformation cellulaire sur les cellules Bhas 42 a été mis en place au sein du laboratoire de toxicologie de l'Institut Pasteur de Lille afin de répondre (i) aux exigences réglementaires et (ii) au besoin des industriels sur la caractérisation de la cancérogenèse des substances. Le protocole en plaque 6 puits en cours de validation est en adéquation avec ce qui est recommandé dans le projet de ligne directrice de l'OCDE. Ainsi, dans le cadre de la validation de la méthode au sein du laboratoire, les différentes substances qui ont été testées sont le 3-méthylcholanthrène (MCA), le N-Méthyl-N'-Nitro-N-NitrosoGuanidine (MNNG), le 12-O-TétradécanoylPhorbol-13-Acétate (TPA), le méthapyrilène, la caféine et le D-mannitol. Lors des tests de transformation cellulaire, des résultats attendus ont été confirmés, tandis que pour d'autres, des essais complémentaires sont en cours ou programmés.

Un des avantages du test de transformation cellulaire est qu'il comporte deux protocoles d'essai (initiation et promotion), ce qui peut permettre de mettre en évidence des modes d'actions génotoxiques ou épigénétiques. De plus, ces deux systèmes d'essai peuvent être mis en œuvre indépendamment. Toutefois, la principale difficulté du protocole en plaque 6 puits porte sur la définition et le dénombrement des foyers de transformation, ce fait ayant été constaté lors de la réalisation des essais au sein du laboratoire. La littérature et le projet de ligne directrice recommandent de former le personnel de laboratoire pour le dénombrement au regard des différents critères de classification des foyers de transformation. De plus, tous les critères ne doivent pas nécessairement être présents mais les foyers de transformation doivent présenter des altérations morphologiques claires, cette étape étant à l'origine de la potentielle subjectivité. De plus, les lecteurs peuvent être influencés par l'attente d'un résultat vis-à-vis (i) de l'augmentation des doses ou (ii) du fait de se trouver en présence d'un témoin solvant et/ou positif. Afin de minimiser ce dernier aspect, un système de codage a donc été mis en place. Ce système de codage n'est en dehors du projet de ligne directrice généralement pas mentionné dans la littérature.

Pour Creton *et al.* (2012), beaucoup de réserves existent encore sur le test de transformation cellulaire, et notamment vis-à-vis de l'objectivité du comptage des foyers transformés. Pour Callegaro *et al.* (2015) et l'OCDE (2013), les résultats du test de transformation cellulaire constituent un outil prometteur dans la prédiction du potentiel cancérogène, et notamment dans le cadre d'une approche « Weight of Evidence ». La réduction du recours à l'expérimentation animale serait d'autant plus possible si le test de transformation cellulaire, et plus particulièrement celui sur les cellules Bhas 42, est utilisé en combinaison d'autres informations telles que (i) des données de génotoxicité, (ii) des analyses de structure/activité ou (iii) des informations de pharmac/toxicocinétiques (OCDE, 2013). Toutefois pour Adler *et al.* (2011), une approche intégrant de multiples modèles *in vitro* nécessiterait au préalable une meilleure compréhension de tous les mécanismes. Enfin, pour Benigni (2012), la combinaison de tests de génotoxicité sur Salmonella et les alertes structurelles pour les cancérogènes interagissant avec l'ADN couplés au test de transformation cellulaire permettrait d'identifier une très large proportion de substances cancérogènes, selon un mode d'action génotoxique ou épigénétique.

BIBLIOGRAPHIE

- Adler, S., Basketter, D., Creton, S., Pelkonen, O., van Benthem, J. *et al.* (2011) Alternative (non-animal) Methods for Cosmetics Testing: Current Status and Future Prospects. *Archives of Toxicology*. May 2011 85:367–485. Doi : 10.1007/s00204-011-0693-2
- AFSSET (2006) Document de Référence pour la Construction d'une Valeur Toxicologique de Référence Fondée sur des Effets Reprotoxiques. Rapport du Groupe d'Experts « VTR Reprotoxiques » Décembre 2006. *Agence Française de Sécurité Sanitaire de l'Environnement et du Travail Auto-saisine 2003/AS03*
- Arai, S., Sakai, A., Hayashi, K., Sasaki, K., Muramatsu, D. *et al.* (2013) A High-throughput Cell Transformation Assay Applicable to Automation for Detecting Potential Chemical Carcinogens using Bhas 42 Cells. *Alternatives to Animals Testing and Experimentation (AATEX)* 18:1-18
- Asada, S., Sasaki, K., Tanaka, N., Takeda, K., Hayashi, M. and Umeda, M. (2005) Detection of Initiating as well as Promoting Activity of Chemicals by a Novel Cell Transformation Assay using v-Ha-ras transfected Balb/c 3T3 cells (Bhas 42). *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* December 2005 588;1:7-21
- Bailleul, B., Brown, K., Ramsden, M., Akhurst, R.J., Fee, F. and Balmain, A. (1989) Chemical Induction of Oncogene Mutations and Growth Factor Activity in Mouse Skin Carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives* 1989 81:23-27
- Ballet, F. and Beaune P. (1999) Cancérogénèse Hépatique Chimique et Modèles Animaux. Cours du Diplôme d'Université Faculté de Médecine Saint Antoine du 7 au 11 Juin 1999 – Mis en ligne le 22 Décembre 1999, http://www.bmlweb.org/du_st_antoine9906.html
- Balls, M. (2007) Alternatives to Animal Experiments: Time to Focus on Replacement – A Review. *Alternatives to Animals Testing and Experimentation (AATEX)* 12;2:145-154
- Balmain, A. and Harris, C.C. (2000) Carcinogenesis In Mouse and Human Cells: Parallels and Paradoxes. *Carcinogenesis* March 2000 21;3:371-377. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.371>
- Benigni, R. (2012) Alternatives to the Carcinogenicity Bioassay for Toxicity Prediction: Are We There Yet? *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* February 2012 8;4:407-417
- Benigni, R., Bossa, C., Battistelli, C.L. and Tcheremenskaia, O. (2013) IARC Classes 1 and 2 Carcinogens are Successfully Identified by An Alternative Strategy that Detects DNA-Reactivity and Cell Transformation Ability of Chemicals. *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2013 December 758;1-2:56-61
- Berenblum, I. and Schubik, P. (1947) A New, Quantitative Approach to the Study of Stages of Chemical Carcinogenesis in the Mouse's Skin. *British Journal of Cancer* December 1947 1:383-391. Doi:10.1038/bjc.1947.36
- Berenblum, I. and Schubik, P. (1949) An Experimental Study of the Initiating Stage of Carcinogenesis, and a Re-examination of the Somatic Cell Mutation. *British Journal of Cancer* March 1949 3:109-118. doi: 10.1038/bjc.1949.13
- Bertram, J.S. (2001) The Molecular Biology of Cancer. A Review. *Molecular Aspects of Medicine* December 2000 21;6:167-223. doi.org/10.1016/S0098-2997(00)00007-8

- Berwald, Y. and Sachs, L. (1963) *In Vitro* Transformation with Chemical Carcinogens. *Nature* 200:1182-1184
- Berwald, Y. and Sachs, L. (1965) *In Vitro* Transformation of Normal Cells to Tumor Cells by Carcinogenic Hydrocarbons. *Journal of National of Cancer Institute* 35:641-661.
- Bourc'his, D. (2015) Epigénétique. Unité Inserm 934/CNRS UMR 3215/Université Pierre et Marie Curie, Institut Curie, Paris – février 2015. Disponible sur le lien suivant : <http://www.inserm.fr/index.php/thematiques/genetique-genomique-et-bioinformatique/dossiers-d-information/epigenetique>
- Boyer, B., Jouanneau, J., Tucker, G., Valles, A.M., Sastre, X., Moens, G., and Thiery, J.P. (1999). La Métastase Cancéreuse. *Medecine Sciences* 6:442
- Callegaro, G., Stefanini, F.M., Colacci, A., Vaccari, M. and Urani, C. (2015) An Improved Classification of Foci for Carcinogenicity Testing by Statistical Descriptors. *Toxicology in vitro* July, 14th 2015 29;7:1839-1850. doi: 10.1016/j.tiv.2015.07.013
- Cancer Environnement. Site édité par le centre Léon Bérard, Centre de lutte contre le cancer, établissement privé à intérêt collectif. Date de la dernière consultation le 07/12/2016. Dernière mise à jour le 26/02/2016. Disponible sur le lien suivant : <http://www.cancer-environnement.fr/370-Infektions-et-cancer.ce.aspx>
- Châtel, A. (2014) Voies de Signalisation des MAP Kinases et Apoptose chez l'Eponge *Suberites domuncula* et la Moule *Mytilus galloprovincialis*. Thèse en vue d'obtenir le grade de Docteur en Écotoxicologie, soutenue le 07 Décembre 2009. Université de Brest. 235 pages.
- Cherkasov, A., Muratov, E.N., Fourches, D. Varnek, A., Baskin, I.I., Cronin, M. *et al.* (2014) QSAR Modeling: where have you been? Where are you going to? *Journal of Medical Chemistry* 2014 June 26;57(12):4977-5010. doi: 10.1021/jm4004285
- CNRS (2009) Comment les Chercheurs Peuvent-ils Répondre aux Enjeux de REACH ? Rapport des Travaux Menés en 2008 et 2009 dans le Cadre de l'Expertise Collective du CNRS et l'Atelier de Réflexion Prospective de l'ANR sur REACH. 136 pp. Disponible sur le lien suivant : <http://www.cnrs.fr/comets/IMG/pdf/07-reach-rapport.pdf>
- Cohen, S.M., Meek, M.E., Klaunig, J.E., Patton, D.E. and Fenner-Crisp, P.A. (2003) The Human Relevance of Information on Carcinogenic Modes of Action: Overview. *CRC Critical Review in Toxicology*. 2003;33:581–589. doi: 10.1080/713608371
- Corpet, D.E. and Pierre, F. (2005) How Good Are Rodent Models of Carcinogenesis in Predicting Efficacy in Humans? A Systematic Review and Meta-analysis of Colon Chemoprevention in Rats, Mice and Men. *European Journal Of Cancer* September 2005 41;13:1911-1922 <http://doi.org.doc-distant.univ-lille2.fr/10.1016/j.ejca.2005.06.006>
- Crestey, L. (2011) Evolutions de la Réglementation des Produits Cosmétiques et Impacts sur l'Evaluation de la Sécurité pour la Santé Humaine. *Thèse en vue de l'obtention du grade de Docteur en Pharmacie*, soutenue le 25 Novembre 2011. Université de Caen. 155 pages.
- Creton, S., Aardema, M.J., Carmichael, P.L., Harvey, J.S., Martin, F.L. *et al.* (2011). Cell Transformation Assays for Prediction of Carcinogenic Potential: State of the Science and Future Research Needs. *Mutagenesis* January 2012 27;1:93-101. Doi:10.1093/mutage/ger053

- Dawson, M.A. and Kouzarides, T. (2012) Cancer Epigenetics: from Mechanism to Therapy. Review. *Cell* July 2012 150;1-12-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>
- Deloménie, C., Grant, D.M., Krishnamoorthy, R. and Dupret, J-M. (1998) Les Arylamine N-Acétyltransférases : du Polymorphisme Génétique à la Susceptibilité aux Xénobiotiques. *Médecine / Sciences* Janvier 1998 1;14:27-36.
- Devi, P.U. (2004) Basics of Carcinogenesis. *Health Administrator* XVII;1:16-24
- DiPaolo, J.A., P. Donovan and R. Nelson (1969) Quantitative Studies of *in Vitro* Transformation by Chemical Carcinogens. *The Journal of the National Cancer Institute*, May 1969 42;5:867-74.
- Doi, A.M., Hill, G., Seely, J., Hailey, J.R., Kissling, G. and Bucher, J.R. (2007) α 2u-Globulin Nephropathy and Renal Tumors in National Toxicology Program Studies. *Toxicology Pathology* 2007 35;4:533-540. doi: 10.1080/01926230701338941
- ECHA (2009) Utilisation réglementaire des R(Q)SA dans le cadre de REACH – Séminaire en ligne sur les exigences d'information. 10 Décembre 2009. 21 pages. <https://echa.europa.eu/chemicals-in-our-life/animal-testing-under-reach>
- El Yamani, M. and Barrillon, A. (2006) Substances Chimiques – Quels sont les Effets sur la Santé ? Afsset 2006. Disponible sur le lien suivant : http://www.sante-environnement-travail.fr/IMG/pdf/13_substances_chimiques_v3.pdf
- EMEA (1998) Note for Guidance on Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals (CPMP/ICH/174/95) European Medicines Agency March 1998. Disponible sur le lien suivant : http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003147.pdf
- EURL ECVAM (2010) Syrian Hamster Embryonic (SHE) cell pH 7.0 Cell Transformation Assay – Prevalidation Study Report. <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/glossary/glossary/alternative-test-methods>, dernière mise à jour : 10/11/2016
- EURL ECVAM (2011) ESAC Working Group Peer Review Consensus Report on an ECVAM-Coordinated Prevalidation Study Concerning Three Protocols of the Cell Transformation Assay (CTA) for *in vitro* carcinogenicity testing.
- Farber, E. (1984) The Multi-Step Nature of Cancer Development. *Cancer Research* Octobre 1984 44;10:4217-4223.
- Faucet-Marquis, V. (2005) L'ochratoxine A, Contaminant Alimentaire, Est-elle un Cancérogène Génotoxique ou Epigénétique ? Recherche des Effets Génotoxiques par la Technique de Post-marquage de l'ADN au ^{32}P en relation avec la Métabolisation de l'Ochratoxine A. *Thèse en vue de l'obtention du grade de Docteur*, Spécialité : qualité et sécurité des aliments. Soutenue le 25 Novembre 2005
- GIS (2010) Etat des Lieux des Méthodes Alternatives dans le Domaine de l'Expérimentation Animale en France. Groupement d'Intérêt Scientifique FRANCOIPA – Plateforme Française pour le Développement des Méthodes Alternatives en Expérimentation Animale. *AFSSAPS et Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche*. 177 pages. Disponible sur le lien suivant : http://www.recherche-animale.org/sites/default/files/rapportgis_0.pdf

- Greim, H. and Albertini, R.J. (2012) Introduction and Conclusion: The Rationale for Thresholds for Genotoxic Carcinogens. Published by The Royal Society of Chemistry, www.rsc.org
- Griner, E.M. and Kazanietz, M.G. (2007) Protein Kinase C and Other Diacylglycerol Effectors in Cancer. *Nature Reviews Cancer* April 2007 7:281-294. doi:10.1038/nrc2110
- Guillouzo, A. and Morel, F. (2004) Approche Transcriptomique de l'Hépatotoxicité. Congrès Société Française de Toxicologie Biomarqueurs de Toxicité. 23/24 Novembre 2004, Paris. Disponible sur le lien suivant : http://www.sftox.com/congres/sft2004/programme/A_Guillouzo_ppt.pdf
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000) The Hallmarks of Cancer - Review. *Cell* January 7, 2000 100;1:57-70.
- Hartwig, A. and Schwerdtle, T. (2002) Interactions by Carcinogenic Metal Compounds with DNA Repair Processes: Toxicological Implications. *Toxicology Letters* February 2002 127;1-3:47-54. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274\(01\)00482-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4274(01)00482-9)
- Hayashi, M., Kojima, H., Covi, R., Stokes, W., Jacobs, A. *et al.* (2012) Bhas 42 Cell Transformation Assay Validation Study Report –EURL ECVAM Recommendations, Ispra Italy
- Hennings, H., Glick, A.B., Greenhalgh, D.A., Morgan, D.L., Strickland, J.E., Tennenbaum, T. and Yuspa, S.H. (1993) Critical Aspects of Initiation, Promotion, and Progression in Multistage Epidermal Carcinogenesis. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Jan 1993 202;1:1-8.
- Hoeijmakers, J.H. (2001) Genome Maintenance Mechanisms for Preventing Cancer. *Nature* 2001 May 17;411(6835):366-74. doi: 10.1038/35077232
- IARC (2009) Rapport Biennal – Groupe Epigénétique (EGE). *International Agency for Research on Cancer*. pp 39-60. Disponible sur le lien suivant : https://www.iarc.fr/fr/publications/pdfs-online/breport/breport0809/breport0809_MCA_fr.pdf
- INERIS (2014) Les Nitrosamines – Données Technico-Economiques sur les Substances Chimiques en France. Dernière mise à jour : 15/09/2014. INERIS – DRC-14-136881-01291A. 69 pages.
- Inoue, K., Ochi, A., Wako, Y., Kawasako, K. and Doi, T. (2015) The 14-Day Repeated Dose Liver Micronucleus Test with Methapyriline Hypochloride Using Young Adult Rats. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2015 March 1780-781:123-127. <http://dx.doi.org.doc-distant.univ-lille2.fr/10.1016/j.mrgentox.2014.04.004>
- INRS (2000) Susceptibilités Génétiques et Expositions Professionnelles – Synthèse. INRS Documents pour le médecin du travail n°83, 3è trimestre 2000. P.249-258
- INRS (2007) Peroxyde d'Hydrogène et Solutions Aqueuses – Fiche Toxicologique FT 123. Fiche établie par les services techniques et médicaux de l'INRS, édition 2007.
- INSERM (2008) Cancer et Environnement. Expertise collective. Les éditions INSERM ISBN 978-2-85598-868-3
- INSERM () Méthodes d'étude *in silico* – Chapitre 19. Reproduction et environnement. Pages 187-191. Disponible sur le lien suivant : <http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/222/?sequence=29>

- INSERM (1999) Ethers de Glycol – Quels Risques pour la Santé ? Expertise Collective Inserm. Les Editions Inserm 1999, ISBN 2-85598-761-X. 366 pages.
- Jacob, A. (2012) Contribution de la Modélisation à l'Etude de la Toxicité et de l'Hydrosolubilité de Molécules Organiques. *Thèse en vue de l'obtention du grade de Docteur*, soutenue le 10 Décembre 2012. Université d'Evry Val d'Essonne. 233 pages.
- Jansen, L.A.M. and Jongen, W.M.F. (1996) The Use of Initiated Cells as a Test System for the Detection of Inhibitors of Gap Junctional Intercellular Communication. *Carcinogenesis* 1996 17;2:333-339
- Janssen, K-P., El Marjou, F., Pinto, D., Sastre, X., Rouillard, D. *et al.* (2002) Targeted Expression of Oncogenic K-ras in Intestinal Epithelium Causes Spontaneous Tumorigenesis in Mice. *Gastroenterology* August 2002 123:492-504
- Jeng, J.H., Chang, M.C. and Hahn, L.J. (2001) Role of Areca Nut in Betel Quid-associated Chemical Carcinogenesis: Current Awareness and Future Perspectives. *Oral Oncology* 37:477-492.
- Kalluri, R. and Zeisberg, M. (2006) Fibroblasts in Cancer. *Nature Reviews Cancer* May 2006 6:392-401. doi:10.1038/nrc1877
- Kim, G.H., Ryan, J.J., Marsboom, G. and Archer, S.L. (2011) Epigenetic Mechanisms of Pulmonary Hypertension. *Pulmonary Circulation* 2011 Jul-Sep 1;3:347-356. doi: 10.4103/2045-8932.87300
- Klaunig, J.E., Kamendulis, L.M. and Xu, Y. (2000) Epigenetic Mechanisms of Chemical Carcinogenesis. *Human & Experimental Toxicology* 19: 543-555.
- Laprêvote, O. (2013) Eléments de Toxicoprotéomique – Laboratoire de toxicologie. Faculté de Pharmacie Paris Descartes. Disponible sur le lien suivant : http://www.biomedicale.parisdescartes.fr/enseignement/toxico/M2THERV_2013_2014/documents/C3/O.%20LAPR%C3%89VOTE%20de%20toxicoprot%C3%A9omique%202013.pdf
- LeBoeuf, R.A., Kerckaert, K.A., Aardema, M.J. and Isfort, R.J. (1999) Use of Syrian Hamster Embryo and BALB/c 3T3 Cell Transformation for Assessing the Carcinogenic Potential of Chemicals. In The Use of Short and Medium-term Tests for Carcinogens and Data on Genetic Effects *in* Carcinogenic Hazard ENV/JM/MONO(2007)18 135 Evaluation. D.B. McGregor, J.M. Rice and S. Venitt, eds. *IARC Scientific Publications* No. 146, Lyon, 409-425.
- Luch, A. (2005) Nature and Nurture - Lessons from Chemical Carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer* 5:113-125.
- Lutz, WK. (2000) A True Threshold Dose in Chemical Carcinogenesis Cannot Be Defined for a Population, Irrespective of the Mode of Action. *Human and Experimental Toxicology* 19: 566-568.
- Mascolo, M.G., Perdichizzi, S., Rotondo, F., Morandi, E. *et al.* (2010) Balbc/3T3 Cell Transformation Assay for the Prediction of Carcinogenic Potential of Chemicals and Environmental Mixtures. *Toxicology in vitro* June 2010 24;4:1292-1300 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2010.03.003>
- MENESR (2014) Utilisation des Animaux à des Fins Scientifiques dans les Etablissements Utilisateurs Français – Enquête Statistique 2014. *Ministère de l'éducation nationale, de l'enseignement supérieur et de la recherche*. 12 pages.

- Mesnil, M., Crespin, S., Avanzo, J-L. and Zaidan-Dagli, M-L. (2005) Defective Gap Junctional Intercellular Communication in the Carcinogenic Process. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. December 2005 1719;1-2:125-145.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.11.004>
- Nesslany, F. (2013) Etudes de Génotoxicité. Paris Descartes – Paris Diderot – Paris Sud. Cours Master 2, Mention Toxicologie.
- Nishimura, M., Saito, T., Yamasaki, H. and Kudo, R. (2003) Suppression of Gap Junctional Intercellular Communication *via* 50 CpG Island Methylation in Promoter Region of E-cadherin gene in Endometrial Cancer Cells. *Carcinogenesis* 2003 24;10:1615-1623. Doi: 10.1093/carcin/bgg121
- OCDE (1995) Série OCDE – Les Principes de Bonnes Pratiques de Laboratoire et la Vérification du respect de ces Principes - Numéro 10. Document Consensus sur les BPL. Application des Principes de BPL aux Systèmes Informatiques. Monographie sur l'Environnement n°116. OCDE(95)115
- OCDE (1998) Série sur les Principes de Bonnes Pratiques de Laboratoire et Vérification du Respect de ces Principes. Les principes de l'OCDE de Bonnes Pratiques de Laboratoire (tels que révisés en 1997). *ENV/MC/CHEM(98)17*. 40 pages
- OCDE (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Série sur les Essais et Evaluations N°19, *ENV/JM/MONO(2000)7*, OCDE, Paris.
- OCDE (2007) Detailed Review Paper on Cell Transformation Assays for Detection of Chemical Carcinogenesis. *ENV/JM/MONO(2007)18* 13 August 2007. Series on testing & Assessment N° 31
- OCDE (2009a) Projet de Ligne Directrice de l'OCDE pour les Essais de Produits Chimiques – Etude de Cancérogénèse. LD 451. Adoptée le 07 Septembre 2009. doi:10.1787/9789264071193-fr
- OCDE (2009b) Projet de Ligne Directrice de l'OCDE pour les Essais de Produits Chimiques – Etudes Combinées de Toxicité Chronique et de Cancérogénèse. LD 453. Adoptée le 07 Septembre 2009. doi: 10.1787/20745842-fr
- OCDE (2013) Draft Test Guideline: *In Vitro* Carcinogenicity: Bhas 42 Cell Transformation Assay. HRI draft ver7. September 11/2013. 21 pp. Disponible depuis le lien suivant :
http://www.oecd.org/env/ehs/testing/Bhas_42_CTA_TG_HRI_Draft_Rev_7.pdf
- OCDE (2015a) Guidance Document on the *In Vitro* Syrian Hamster Embryo (SHE) Cell Transformation Assay. Series on Testing & Assessment N°214. *ENV/JM/MONO(2015)18*. 22 May 2015. 24 pp.
- OCDE (2015b) Fundamental And Guiding Principles For (Q)SAR Analysis of Chemical Carcinogens With Mechanistic Considerations Series on Testing and Assessment n°229. *ENV/JM/MONO(2015)46*. 03-Dec-2015.
- OCDE (2016) Guidance Document on the *In Vitro* bhas 42 Cell Transformation Assay. Series on Testing & Assessment N° 231. *ENV/JM/MONO(2016)1*. 08 January 2016. 34 pp.
- Ohmori, K. (2008) *In vitro* Assays for the Prediction of Tumorigenic Potential of Non-genotoxic Carcinogens - Minireview. *Journal of Health Science* October 2008 55;1:20-30.
- Oliveira, P.A. (2016) Chemical carcinogens. Chapter 16. Oxford Textbook of Oncology 3rd edition published in 2016. ISBN: 978-0-19-963610-3

- OMS (2011) Cancers dus à l'environnement et au milieu professionnel – Aide-mémoire n°350. Juillet 2011. Dernière consultation : 10/01/2017. Disponible sur le lien suivant : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs350/fr/>
- OMS (2015) Cancer – Aide-mémoire n°297. Février 2015. Dernière consultation : 10/01/2017. Disponible sur le lien suivant : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/fr/>
- Pairon, J-C. (2015) Génotoxicité et Cancérogénèse. Université Paris Est Créteil. Décembre 2015. Disponible sur le lien suivant : http://www.centres-antipoison.net/paris/DIU_Tox_Med_2015_2016/20151218/DIU_Tox_Med_JC_Pairon_Genotoxicite.pdf
- Perri, F., Longo, F., Giuliano, M., Sabbatino, F., Faviat, G., Ionna, F. *et al.* (2017) Epigenetic Control of Gene Expression: Potential Implications For Cancer Treatment. *Critical Reviews in Oncology / Hematology* March 2017 111;166-172
<http://doi.org.doc-distant.univ-lille2.fr/10.1016/j.critrevonc.2017.01.020>
- Petkov, P.I., Patlewicz, G., Schultz, T.W., Honma, M., Todorov, M. *et al.* (2015) A Feasibility Study: Can Information Collected to Classify for Mutagenicity Be Informative in Predicting Carcinogenicity? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2015 June 72;1:17-25.
doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.03.003
- Pfohl-Leszkowicz, A. (2010) Implication du polymorphisme d'enzymes de métabolisation et/ou de réparation dans le suivi de travailleurs exposés au styrène, à des solvants, des pesticides ou à l'arsenic. *Afsset – Bulletin de veille scientifique en sécurité sanitaire de l'environnement et du travail* – Juin 2010. Pages 177-122
- Poburski, D. and Thierbach, R. (2016) Improvement of the BALB/c-3T3 Cell Transformation Assay: A Tool for Investigating Cancer Mechanisms and Therapies. *Scientific Reports* 6, Article number: 32966. doi:10.1038/srep32966.
<http://www.nature.com/articles/srep32966#ref-link-section-18>
- Portail Santé Environnement Travail. Cancer et environnement. Rédacteurs : Brosselin, P. and El Yamani, M. juillet 2006. Afsset. Disponible sur le lien suivant : http://www.sante-environnement-travail.fr/minisite.php3?id_rubrique=868&id_article=2681
- Poth, A., Heppenheimer, A. and Bohnenberger, S. (2007) Bhas 42 Cell Transformation Assay as a Predictor of Carcinogenicity. *AATEX Special Issue* August 21-25, 2007 14:519-521. Proc. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences
- Prevot, A. (2014) Reach : peut-on utiliser les méthodes prédictives pour évaluer les propriétés dangereuses de substances ? Résultats du projet de recherche PREDIMOL. *INERIS*. 11pages
- Pu, J., Wang, Y., Qi, N., Du, W., Tan, X., Chen, G. *et al.* (2016) A High Throughput Bhas 42 Cell Transformation Assay for the Determination of the Carcinogenicity of Three Herbal Extracts. *Fundamental Toxicological Sciences* April 2016 3;4:157-166.
- Ratziu, V., Le Calvez, S., Bonyhay, L., Taieb, J. and Poynard, T. (2003) Hepatocellular Carcinoma and Non Alcoholic Steatohepatitis: Are We Looking at the Tip of the Iceberg? *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 27;10:869-875. Doi : GCB-10-2003-27-10-0399-8320-101019-ART2

- Ravanat, J-L. and Douki, T. (2016) UV and Ionizing radiations induced DNA Damage, Differences and Similarities. *Radiation Physics and Chemistry of Biomolecules*. Recent developments. November 2016 128:92-102. doi.org/10.1016/j.radphyschem.2016.07.007
- Recherche animale. L'éthique de la recherche : les 3R. Publication du Groupe Interprofessionnel de Réflexion et de Communication sur la Recherche (Gircor) association loi de 1901. Dernière consultation : 30/11/2016. Disponible sur le lien suivant : <http://www.recherche-animale.org/decouvrir-la-recherche-animale/lethique-de-la-recherche/3-r>
- Règlement (CE) n° 1223/2009 du Parlement Européen et du Conseil du 30 novembre 2009 relatif aux Produits Cosmétiques, JO L 342 du 22.12.2009, p. 59
- Russell, W.M.S. and Burch, R.L. (1959) *The Principles of Humane Experimental Technique*. 238p. Methuen, London.
- Sakai, A., Sasaki, K., Hayashi, K., Muramatsu, D., Arai, S., *et al.* (2011a) An International Collaborative Study on a Cell Transformation Assay Using Bhas 42 Cells. *Alternatives to Animals Testing and Experimentation (AATEX)* 14:831-848
- Sakai, A., Sasaki, K., Hayashi, K., Muramatsu, D., Arai, S., Endou, N., *et al.* (2011b) An International Validation Study of a Bhas 42 Cell Transformation Assay for the Prediction of Chemical Carcinogenicity. *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2011 725;1-2:57-77. Doi:10.1016/j.mrgentox.2011.07.006
- Sakai, A., Sasaki, K., Muramatsu, D., Arai, S., Endou, N. *et al.* (2010) A Bhas 42 Cell Transformation Assay on 98 Chemicals: The Characteristics and Performance for the Prediction of Chemical Carcinogenicity. *Mutation Research*. 702:100-122
- Samson, M., Aubry, F. and Parmentier, M. (1999) Que sont les Chimiokines ? Synthèse Médecine / Sciences Août Septembre 1999 8-9;15:966-973.
- Santé Canada (2000) Ligne Directrice à l'Intention de l'Industrie – Evaluation de la Cancérogénicité des Produits Pharmaceutiques ICH Thème S1B. Editeur *Santé Canada, Programme des produits Thérapeutiques* Ottawa ISBN : 978-0-662-84255-3. 18 pp.
- Sasaki, K. (2012b) Bhas 42 Cell (v-Ha-ras-transfected Balb/c 3T3 clone) Transformation Assay to Predict Carcinogens. AXLR8-3 12 June 2012, Berlin. Disponible sur le lien suivant : <http://www.axlr8.eu/workshops/2012-sasaki.pdf>
- Sasaki, K., Bohnenberger, S., Hayashi, K., Kunkelmann, T., Muramatsu, D. *et al.* (2012a) Photo Catalogue For The Classification Of Foci In The BALB/c 3T3 Cell Transformation Assay. *Mutation Research* February 2012 744;42-53. doi:10.1016/j.mrgentox.2012.01.009
- Sasaki, K., Huk, A., El Yamani, N., Tanaka, N. and Dusinska, M. (2014) Bhas 42 Cell Transformation Assay for Genotoxic and Non-Genotoxic Carcinogens. *Genotoxicity and DNA Repair, Part of the series Methods in Pharmacology and Toxicology*. July 2th 2014 pp 343-362. Doi : 10.1007/978-1-4939-1068-7_20
- Sasaki, K., Mizusawa, H. and Ishidate, M. (1988) Isolation and Characterization of *ras*-Transfected BALB/3T3 Clone Showing Morphological Transformation by 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Japanese Journal of Cancer Research* August 1988 79;921-930

- Sasaki, K., Umeda, M., Sakai, A., Yamazaki, S. and Tanaka, N. (2015) Transformation Assay in Bhas 42 Cells: A Model Using Initiated Cells to Study Mechanisms of Carcinogenesis and Predict Carcinogenic Potential of Chemicals. *Journal of Environmental Science and Health. Part C Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews* 33:1-35
- SCCS (2016) The SCCS Notes of Guidance for the Testing of Cosmetic Ingredients and their Safety Evaluation. 9th revision. *SCCS/1564/15*, revised version of April 2016.
- Schardein J.L. (1976) Drugs as Teratogens. Publisher *CRC Press*. Boca Raton. 291 pages. ISBN-10: 0878190996
- Schechtman, L.M. (2012) Rodent Cell Transformation Assays – A Brief Historical Perspective. *Mutation Research* 744;1:3-7. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2011.12.018
- Serafimova, R., Fuart Gatnik, M. & Worth, A. (2010) Review of QSAR Models and Software Tools for Predicting Genotoxicity and Carcinogenicity. *JRC Scientific and Technical Reports*. EUR 24427 EN – 2010
- Shanks, N., Greek, R. and Greek, J. (2009) Are Animal Models Predictive For Humans? *Philosophy, Ethics and Humanities in Medicine* 2009 4:2. DOI: 10.1186/1747-5341-4-2
- Smyth, D. (1978) Alternatives to Animal Experiments. 218p. *Scholar Press*. London
- Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M. et Vogt, P.K. (1976) DNA Related to the Transforming Gene(s) of Avian Sarcoma Viruses is Present in Normal Avian DNA. *Nature* 260:170-173
- Stewart, B. W. and Kleihues, P. (2005) Le Cancer dans le Monde. IARC Press. Lyon 2005. Ouvrage publié dans sa version anglaise sous le titre World Cancer Report. *IARC Press*, Lyon 2003. ISBN 92 832 0416 6
- Tanaka, N., Sasaki, K., Hayashi, K., Sakai, A., Asada, S., Muramatsu, D. *et al.* (2009) An International Collaborative Study on a Cell Transformation Assay Using Bhas 42 Cells. *Alternatives to Animals Testing and Experimentation (AATEX)* 14:831-848
- Tordjman, I. (2009) Cancers et Substances Chimiques – Collection Fiches Repère. Etat des connaissances en date du 06 Mars 2009. *Institut National du Cancer* Réf : FRSUBCHIM0309 4pp.
- Urani, C., Corvi, R., Callegaro, G. and Stefanini, F.M. (2013) Objective Scoring of Transformed *foci* in Balb/c 3T3 Cell Transformation Assay by Statistical Image Descriptors. *Toxicology in vitro* 2013 June 27:1905-1912. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2013.06.011>
- Van Benthem, J., Felter, S., Heinonen, T., Poth, A., Serafimova, R. *et al.* (2010) Draft Report on Alternative (Non-Animal) Methods for Cosmetics Testing: current status and future prospects – 2010. Working Group 3: Carcinogenicity. Draft for Consultation 14/07/10. Chapter 3: Carcinogenicity
- Vasseur, P. and Lasne, C. (2012) OECD Detailed Review Paper (DRP) number 31 on “Cell Transformation Assays for Detection of Chemical Carcinogens”: Main Results and Conclusions. *Mutation Research* 2012 April 11;744(1):8-11. Doi:10.1016/j.mrgentox.2011.11.007
- Virani, S., Colacino, J.A., Kim, J.H. and Rozek, L.S. (2012) Cancer Epigenetics: A brief Review. *Oxford Journal Institute for Laboratory Animal Research ILAR*. 53;3-4:359-369. Doi: 10.1093/ilar.53.3-4.359

- Weisburger, J.H. and Williams, G.M. (2000) The Distinction Between Genotoxic and Epigenetic Carcinogens and Implication for Cancer Risk. *Toxicological Sciences* 57, 4-5.
- Weston, A. and Harris, C.C. (2003) Multistage Carcinogenesis. *Holland-Frei Cancer Medicine* 6th Edition. Kufe, D.W., Pollock, R.E., Weichselbaum, R.R., *et al.*, editors. Hamilton (ON): BC Decker; 2003ID: NBK13982
- Williams, GM. (2001) Mechanisms of Chemical Carcinogenesis and Application to Human Cancer Risk Assessment. *Toxicology* 161: 3-10
- Woo, Y. (2015) Performing a Cancer Hazard Assessment for Sustainable Futures. *US EPA Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, Risk Assessment Division*. 2015 Sept Training Workshop and Presentation for the Sustainable Futures Program.
- Workman, P. Aboagye, E.O., Balkwill, F., Bruder, G., Chaplin, D.J *et al.* (2010) Guidelines for the Welfare and Use of Animals in Cancer Research. *British Journal of Cancer* 2010 March 102;11:1555-1577. doi:10.1038/sj.bjc.6605642
- Yamasaki, H., Ashby, J., Bignami, M, Jongen, W., Linnainmaa, K., Newbold, R.F. *et al.* (1996) Non-genotoxic Carcinogens: Development of Detection Methods Based on Mechanisms: a European Project. *Mutation Research* 353:47-63
- Zarbl, H., Sukumar, S., Arthur, A.V., Martin-Zanca, D. and Barbacid, M. (1985) Direct Mutagenesis of Ha-ras-1 Oncogenes by N-Nitroso-N-Methylurea During Initiation of Mammary Carcinogenesis in Rats. *Nature* 1985 May 315:382-385. doi:10.1038/315382a0
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G.P. and Anderson, TA.T. (2007) MicroRNAs as Oncogenes and Tumor Suppressors. *Developmental Biology* February 302;1:1-12. doi: [10.1016/j.ydbio.2006.08.028](https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.028)

ANNEXES

Table des annexes

Annexe 1 : Protocole en plaque 96 puits.....	i
Annexe 2 : Mode opératoire « Recherche de mycoplasmes ».....	ii
Annexe 3 : Résultats Benzo[a]Pyrène (BaP).....	iii
Annexe 4 : Résultats Cyclophosphamide (CPA).....	iv
Annexe 5 : Résultats Mitomycine C.....	v
Annexe 6 : Résultats Quercétine.....	vi
Annexe 7 : Autres extraits du photocatalogue (Sasaki <i>et al.</i> , 2012).....	viii

Annexe 1 : Protocole en plaque 96 puits (OCDE, 2016)

Les protocoles en plaque 6 et 96 puits ne diffèrent que par le nombre de cellulesensemencées, les volumes des solutions et le dénombrement des foyers de transformation. Toutes les étapes de traitement en initiation ou en promotion, de rinçage au PBS, de changement de milieu, de fixation et de coloration s'effectuent sur la même périodicité que pour le protocole en plaque 6 puits.

Pour l'essai préliminaire de croissance cellulaire, huit puits (une ligne) d'une plaque 96 puits sont utilisés par concentration, que ce soit pour l'initiation ou la promotion :

- En initiation : au jour 0, 200 cellules dans 0,05 mL de DF5F sontensemencées dans chaque puits, et au jour 1, les puits sont traités avec 0,05 mL de la solution contenant la substance d'essai. Le volume total est d'alors 0,1 mL ;
- En promotion : au jour 0, 400 cellules dans 0,1 mL de DF5F sontensemencées dans chaque puits. Les solutions contenant la substance d'essai sont préparées pour un volume final de 0,1 mL (0,5 mL de DF5F et 0,5 mL de solution de traitement) ;
- Les volumes d'éthanol, de PBS, de cristal violet, de solution d'extraction et de Giemsa 5 % sont tous de 0,1 mL.

Pour l'essai de transformation, une plaque 96 puits est utilisée par dose et huit puits sont utilisés pour l'essai de croissance cellulaire concomitant. Les nombre de cellulesensemencées et les volumes utilisés pour les traitements et rinçages sont identiques à ceux de l'essai préliminaire.

Dans le format 96 puits, l'évaluation de la transformation se fait sur les mêmes critères. Un puits ayant au moins un foyer transformé est considéré comme « 1 » ; le nombre de puits ayant des foyers transformés par rapport au nombre de puits observés est enregistré. Cette méthode de comptage élimine l'imprécision qui pourrait résulter de la mauvaise évaluation des foyers dans des puits plus petits.

Pour ce protocole, l'unité statistique est le nombre de puits contenant un ou plusieurs foyers transformés. La fréquence de transformation est statistiquement analysée par le test de Holm ($p < 0,05$, unilatéral). La signification statistique des témoins positifs est analysée par le test du Chi² ($p < 0,05$, unilatéral). Si la significativité statistique n'est obtenue qu'à une concentration, la tendance est analysée par le test de Cochran-Armitage ($p < 0,05$, unilatéral).

Les critères de validité pour ce protocole sont les suivants :

- Fréquence de transformation spontanée inférieure à 15 puits de la plaque 96 puits dans l'essai d'initiation ;
- Fréquence de transformation spontanée inférieure à 20 puits de la plaque 96 puits dans l'essai de promotion ;
- Dans le cas de contamination ou de problèmes techniques, un minimum de quatre puits est nécessaire pour l'essai de croissance cellulaire, et un minimum de 90 puits par plaque est nécessaire dans l'essai de transformation.

Annexe 2 : Mode opératoire « Recherche de mycoplasmes »

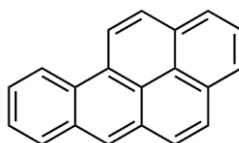
Une ampoule d'un nouveau lot de cellules est décongelée et cultivée pendant dix jours dans un milieu de culture approprié dans les conditions habituelles de culture en étuve à CO₂.

Les différents réactifs (tampon Mycoalert, réactif Mycoalert, substrat Mycoalert) sont ramenés à température ambiante. 2 mL de culture cellulaire sont transférés dans un tube puis sont centrifugés 5 minutes à 1500 tours par minute. Le luminomètre (appareil servant à mesurer une intensité lumineuse) est programmé. 100 µL du surnageant de la culture cellulaire centrifugés sont récupérés et transférés dans un tube à hémolyse et 100 µL du réactif Mycoalert sont ajoutés. Après cinq minutes, le tube est placé dans le luminomètre pour effectuer la première lecture (lecture A). 100 µL du substrat Mycoalert sont ajoutés puis après 10 minutes le tube est placé dans le luminomètre pour effectuer la seconde lecture (lecture B).

Le rapport de ces lectures (Lecture B / Lecture A) est calculé à partir des résultats du luminomètre :

- Si le rapport est inférieur à 1 : le test est négatif ;
- Si le rapport est supérieur à 1 : le test est positif.

Annexe 3 : Résultats Benzo[a]Pyrène (BaP)



Essai d'initiation		Essai de promotion	
Concentrations à tester (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Concentrations à tester (µg/mL)	% de croissance cellulaire
DMSO	100	DMSO	100
0,01	57,0	0,01	67,3
0,025	67,4	0,025	70,7
0,05	37,9	0,05	67,4
0,1	32,6	0,1	62,2
0,25	29,2	0,25	54,3

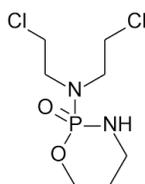
Essai d'initiation					
Concentrations testées (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Lecteur 1 (moyenne + sd)	Lecteur 2 (moyenne + sd)	Moyenne + sd	p-value test de Dunnett
DMSO (5 nL/mL)	100	7,5 + 1,38	4,7 + 0,82	6,1 + 0,74	-
0,0025	22,2	7,3 + 3,88	6 + 3,03	6,7 + 3,40	0,967
0,001	54,4	9,2 + 5,19	7 + 3,22	8,1 + 4,07	0,178
0,025	57,5	6,8 + 1,33	6,7 + 0,82	6,8 + 0,94	0,943
0,05	35,1	5,8 + 0,75	6,3 + 0,82	6,1 + 0,66	1,000
0,25	30,7	4,7 + 1,21	5,8 + 0,98	5,3 + 1,04	0,872
p-value test de Student					
MCA (1 µg/mL)	52,3	6,8 + 3,73	9,0 + 4,94	11,5 + 1,30	6,414. ^{-08*}
Essai de promotion					
Concentrations testées (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Lecteur 1 (moyenne + sd)	Lecteur 2 (moyenne + sd)	Moyenne + sd	p-value test de Dunnett
DMSO (5 nL/mL)	100	2,3 + 1,6	5,3 + 3,08	3,8 + 2,29	-
0,0025	325,0	2,2 + 1,72	5,8 + 3,19	4,0 + 2,35	0,9999
0,005	261,9	2,5 + 1,22	4,3 + 1,03	3,4 + 1,02	0,9891
0,025	247,4	4,3 + 3,31	9,5 + 5,68	6,9 + 4,40	0,0287*
0,1	100,9	0,8 + 0,55	3,5 + 1,97	2,1 + 1,24	0,3525
0,5	119,0	1,5 + 1,10	1,5 + 1,10	1,0 + 0,75	0,0454*
p-value test d'Aspin Welch					
TPA (75 ng/mL)	451,8	3,0 + 1,90	9,4 + 5,19	5,5 + 3,29	0,2088

*Significativité du test

Existence de contamination sur les témoins négatifs (DMSO : trois puits), et sur les concentrations 0,025 0,1 et 0,5 (deux puits).

- ➔ Réalisation d'un essai complémentaire (essai d'initiation) : démarrage le 20/04/2017.
- ➔ Fin de l'essai le 11/05/2017

Annexe 4 : Résultats Cyclophosphamide (CPA)



Essai d'initiation		Essai de promotion	
Concentrations à tester (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Concentrations à tester (µg/mL)	% de croissance cellulaire
DF5F	100	DF5F	100
100	88,8	100	75,1
500	69,9	500	77,4
1100	85,5	1100	66,7
1300	42,7	1300	59,8
1500	77,8	1500	17,2

Essai d'initiation					
Concentrations testées (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Lecteur 1 (moyenne + sd)	Lecteur 2 (moyenne + sd)	Moyenne + sd	p-value test de Dunnett
DF5F	100	3,7 + 2,66	3,0 + 1,67	3,3 + 2,14	-
50	120,5	4,8 + 3,06	4,5 + 3,15	4,7 + 3,06	0,459
500	88,8	3,2 + 0,98	4,8 + 2,23	4,0 + 1,52	0,923
1000	101,7	5,8 + 1,94	4,0 + 1,90	4,9 + 1,72	0,297
1500	86,3	5,3 + 2,25	4,0 + 2,83	4,7 + 2,52	0,459
2000	54,6	2,3 + 1,38	2,5 + 1,51	2,4 + 1,43	0,735
p-value test de Student					
MCA (1 µg/mL)	48,7	9,0 + 2,37	7,8 + 2,79		2,809. ^{-05*}

*Significativité du test

Existence de contaminations sur la concentration 2000 µg/mL (deux puits)

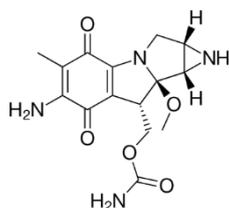
Essai de promotion					
Concentrations testées (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Lecteur 1 (moyenne + sd)	Lecteur 2 (moyenne + sd)	Moyenne + sd	p-value test de Dunnett
DF5F	100	2,5 + 1,60	7,5 + 4,18	5,0 + 2,88	-
44,4	117,1	4,0 + 3,44	6,7 + 4,37	4,6 + 3,83	0,8102
66,6	116,5	5,6 + 2,66	9,2 + 3,98	7,4 + 3,25	0,1951
666,6	146,6	1,2 + 0,41	3,0 + 1,26	2,1 + 0,74	0,0771
1000	91,7	1,0 + 0,82	0,5 + 0,52	0,8 + 0,45	0,0096*
1500	180,8	0,6 + 0,84	1,0 + 1,33	0,8 + 0,45	0,0078*
p-value test de Aspin Welch					
TPA (75 ng/mL)	140,1	8,8 + 3,06	11,5 + 3,78	10,2 + 3,22	0,0605

*Significativité du test

Existence de contamination sur les témoins négatifs (DMSO : 4), et sur les concentrations 44,4 µg/mL (2 puits), 66,6 µg/mL (un puits), 1000 µg/mL (deux puits) et 1500 µg/mL (un puits).

- ➔ Réalisation d'un essai complémentaire (essai d'initiation) : démarrage le 20/04/2017.
- ➔ Fin de l'essai le 11/05/2017

Annexe 5 : Résultats Mitomycine C



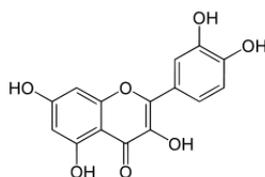
Essai d'initiation		Essai de promotion	
Concentrations à tester (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Concentrations à tester (µg/mL)	% de croissance cellulaire
DMSO	100	DMSO	100
4	59,7	4	107,5
6	88,5	6	124,9
10	61,7	10	98,2
16	69,4	16	115,0
25	23,0	25	101,8
39	19,7	39	114,0

Essai d'initiation					
Concentrations testées (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Lecteur 1 (moyenne + sd)	Lecteur 2 (moyenne + sd)	Moyenne + sd	p-value test de Dunnett
DMSO (5 nL/mL)	100	4,2 + 1,17	4,2 + 1,33	4,2 + 1,21	-
5	78,9	6,5 + 2,35	6,5 + 2,59	6,5 + 2,45	0,0034*
7,5	79,2	7,8 + 1,83	7,5 + 1,38	7,7 + 1,44	< 0,001*
10	70,4	3,3 + 1,37	4,3 + 1,21	3,8 + 1,25	0,9906
15	60,9	7,2 + 0,98	6,7 + 1,51	6,9 + 1,16	< 0,001*
20	49,7	6,7 + 1,51	5,8 + 2,14	6,3 + 1,75	0,0108*
30	34,1	9,2 + 2,04	9,7 + 2,25	9,4 + 2,11	< 0,001*
p-value test de Student					
MCA (1 µg/mL)	58,2	12,5 + 2,66	11,5 + 3,08	12,0 + 2,79	2,325. ^{-07*}
Essai de promotion					
Concentrations testées (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Lecteur 1 (moyenne + sd)	Lecteur 2 (moyenne + sd)	Moyenne + sd	p-value test de Dunnett
DMSO (5 nL/mL)	100	8,0 + 4,80	9,8 + 4,88	8,9 + 4,79	-
2,5	93,6	8,0 + 6,53	8,4 + 7,24	8,2 + 6,88	0,9998
5	108,7	7,3 + 5,20	7,0 + 4,94	7,2 + 5,02	0,6930
10	95,4	5,7 + 1,37	5,5 + 1,38	5,6 + 1,36	0,0923
20	114,3	2,0 + 0,63	2,2 + 0,98	2,1 + 0,80	< 0,0001*
40	86,6	0,3 + 0,52	0,2 + 0,41	0,3 + 0,1	< 0,0001*
60	97,3	0,2 + 0,41	0,0 + 0,00	0,1 + 0,2	< 0,0001*
p-value test de Student					
TPA (75 ng/mL)	206,9	13,7 + 3,72	14,5 + 3,45	14,1 + 3,54	0,0024*

*Significativité du test

- ➔ Transformations spontanées conformes aux critères de validité ; témoin positif présentant une augmentation statistiquement différente du témoin solvant ;
- ➔ La mitomycine C est positive en initiation.

Annexe 6 : Résultats Quercétine



Essai d'initiation		Essai de promotion	
Concentrations à tester (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Concentrations à tester (µg/mL)	% de croissance cellulaire
DMSO	100	DMSO	100
0,5	78,9	0,5	77,6
1	100,4	1	75,5
2	89,1	2	46,9
3	111,3	3	45,8
5	94,8	5	28,7
7	66,9	7	29,6

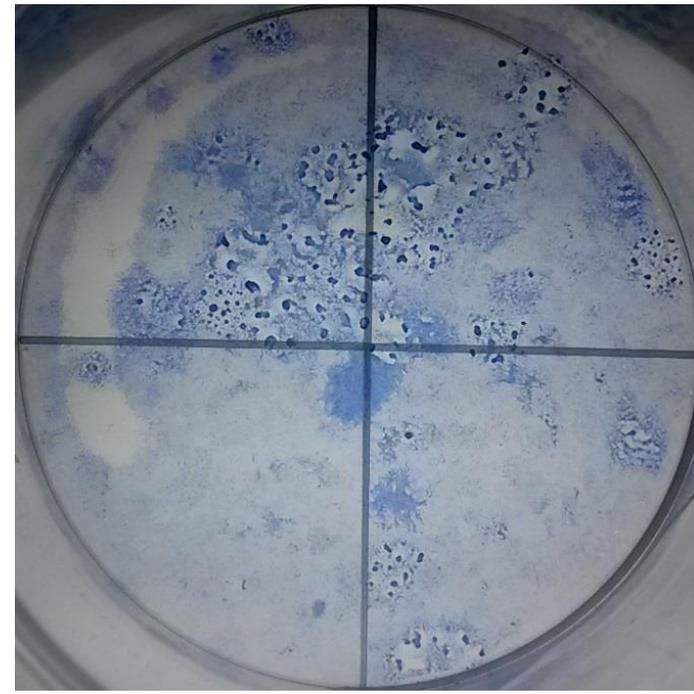
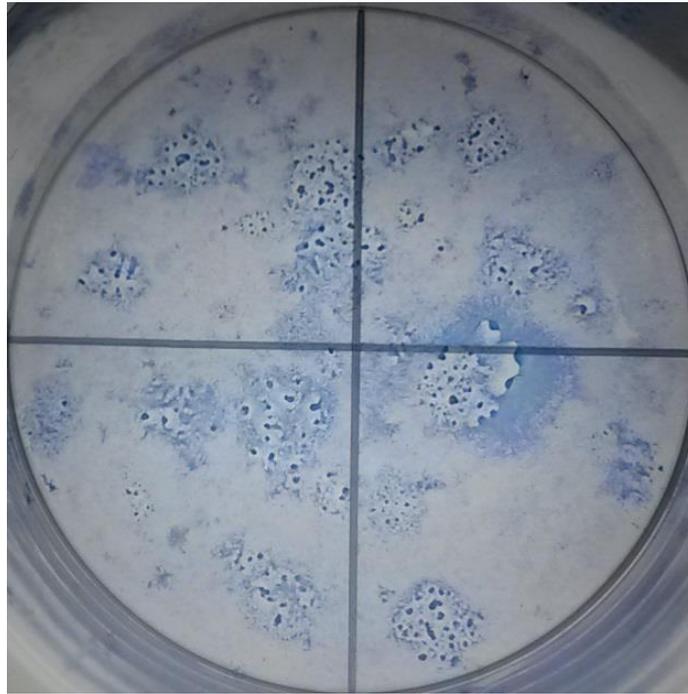
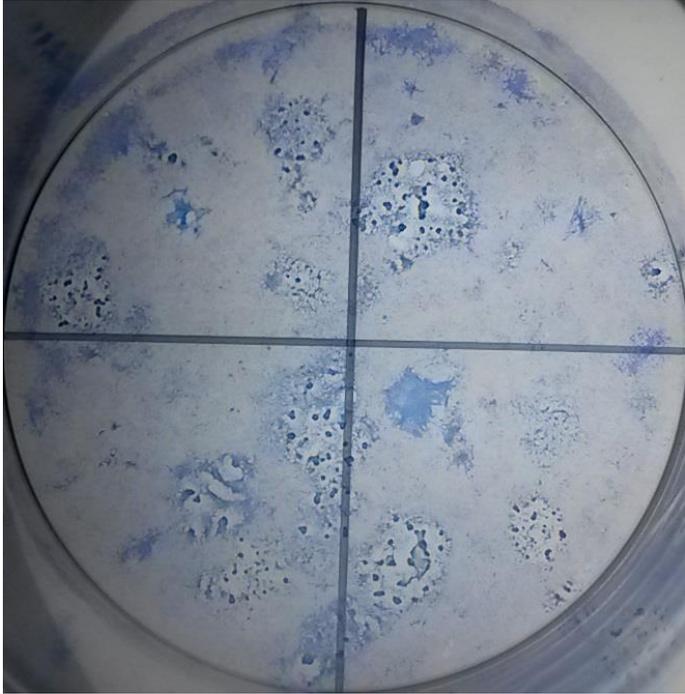
Essai d'initiation					
Concentrations testées (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Lecteur 1 (moyenne + sd)	Lecteur 2 (moyenne + sd)	Moyenne + sd	p-value test de Dunnett
DMSO (5 nL/mL)	100	17,7 + 3,01	13,8 + 4,40	15,8 + 3,50	-
5	17,9	15,3 + 2,34	13,0 + 3,29	14,2 + 2,71	0,7806
6	20,2	16,7 + 3,83	10,2 + 3,37	13,4 + 3,43	0,3920
7	0,1	14,7 + 5,85	11,3 + 5,75	13,0 + 5,78	0,2688
8	4,1	9,8 + 1,94	10,0 + 2,37	9,9 + 2,08	0,0010
9	9,8	7,2 + 1,47	6,0 + 2,28	6,6 + 1,66	< 0,001*
10	27,8	8,2 + 1,17	5,7 + 0,82	6,9 + 0,58	< 0,001*
p-value test de Student					
MCA (1 µg/mL)	50,6	25,0 + 5,62	28,2 + 6,55	26,6 + 5,87	5,635. ^{-05*}

*Significativité du test

➔ Fréquence de transformation trop élevée par rapport aux critères de validité (supérieure à 10).

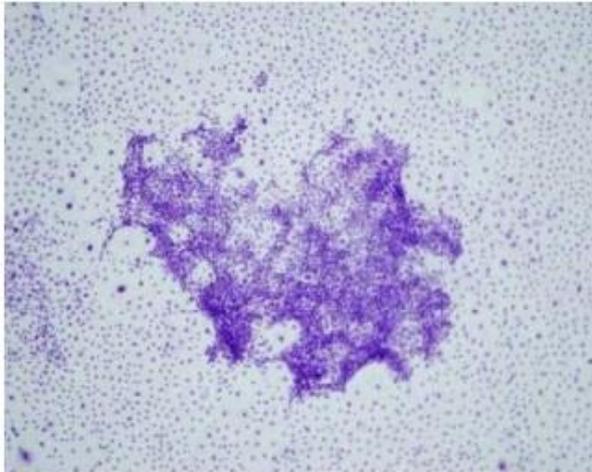
Essai de promotion					
Concentrations testées (µg/mL)	% de croissance cellulaire	Lecteur 1 (moyenne + sd)	Lecteur 2 (moyenne + sd)	Moyenne + sd	p-value test de Dunnett
DMSO (5 nL/mL)	100				-
0,19	68,6				-
0,375	87,8				-
0,75	65,9	Plaques illisibles (voir photos page suivante)			-
1,5	79,1				-
3	77,5				-
6	76,7				-
p-value test de Student					
TPA (75 ng/mL)	159,9				

*Significativité du test



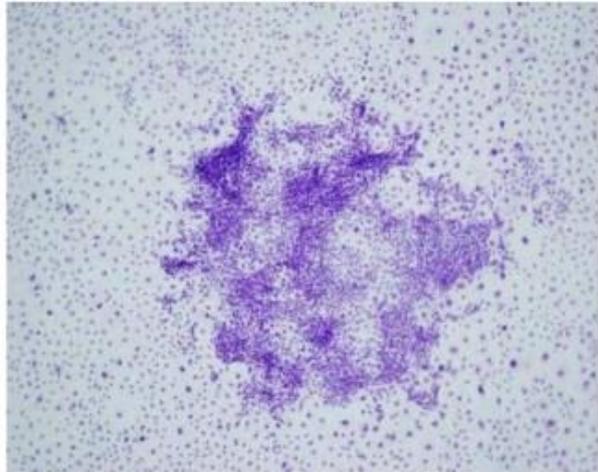
Annexe 7 : Autres extraits du photocatalogue (Sasaki *et al.*, 2012)

Foyers de type II, considérés comme non transformés



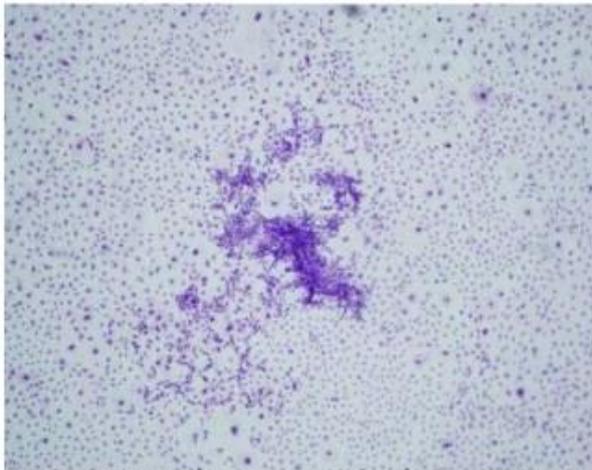
B+ S- M+ R+ I-

Pic 21



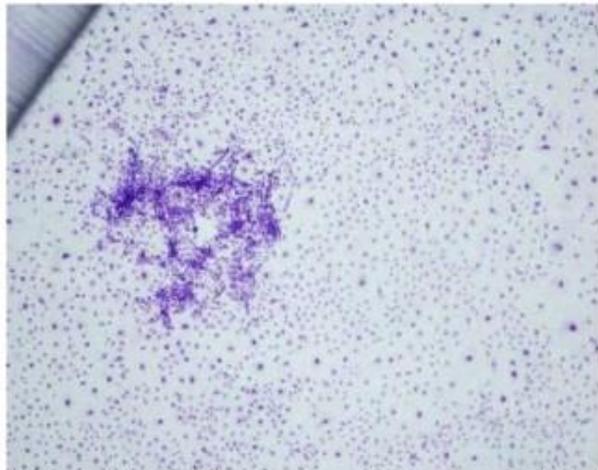
B+ S- M+ R- I-

Pic 22



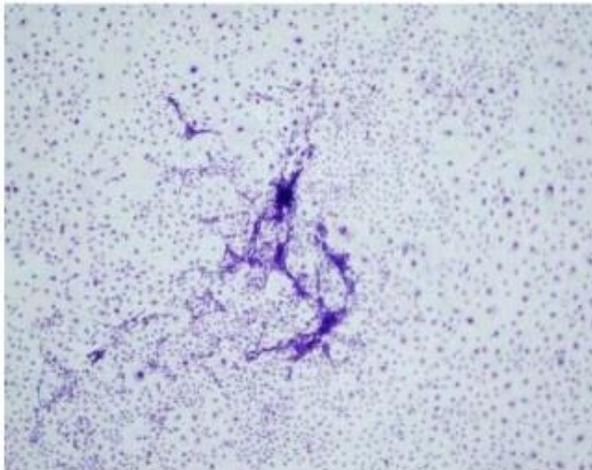
B+ S- M+/- R+ I-

Pic 23



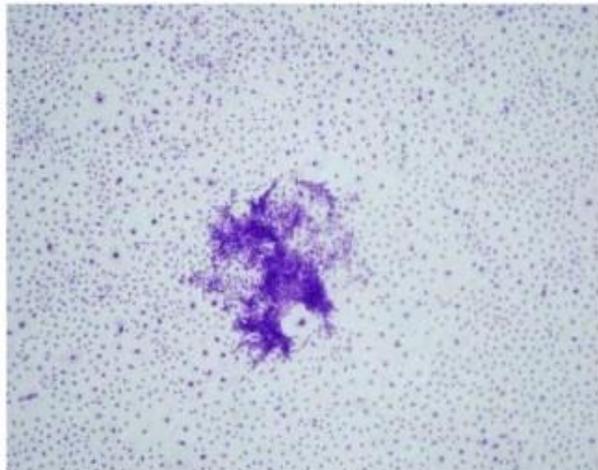
B+ S- M+/- R- I-

Pic 24



B+ S+ M- R+ I-

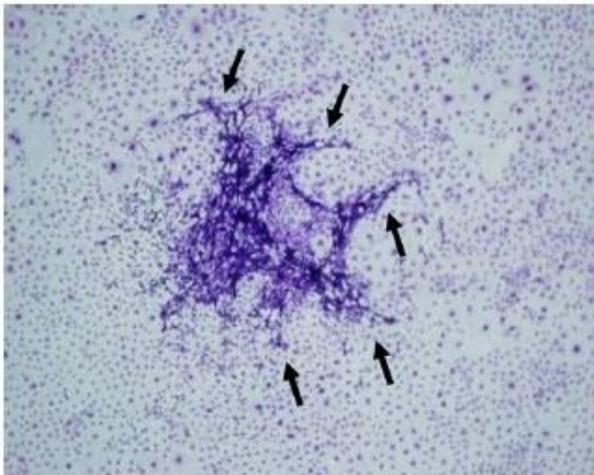
Pic 25



B+ S- M+ R+ I-

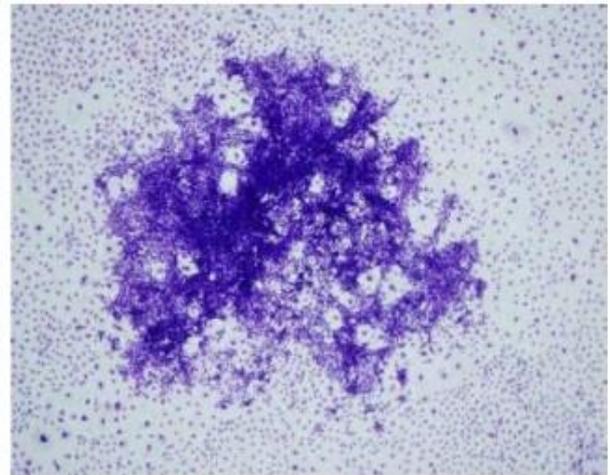
Pic 26

Foyers de type III, considérés comme transformés



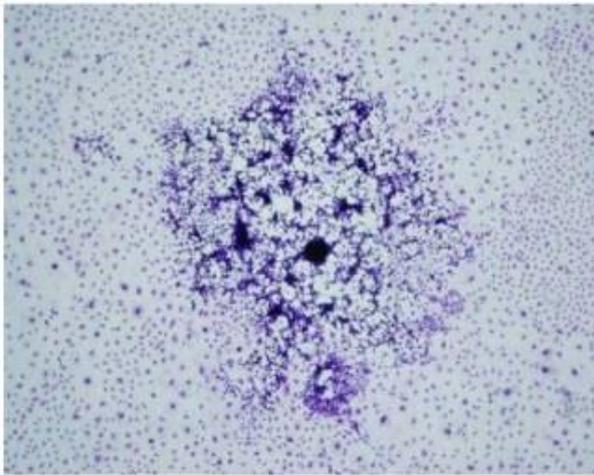
B++ S++ M+ R++ I-

Pic 39



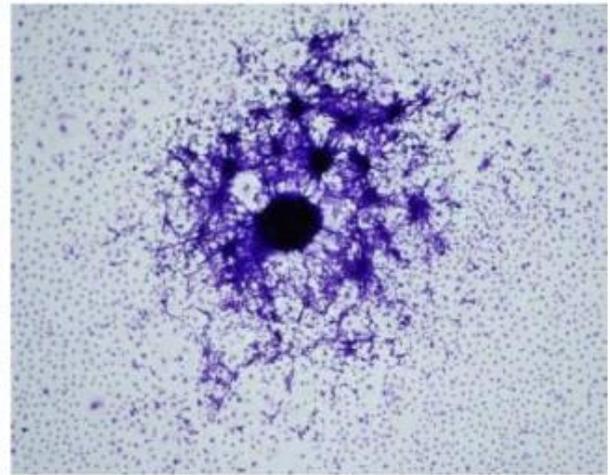
B++ S+ M++ R+ I-/-

Pic 40



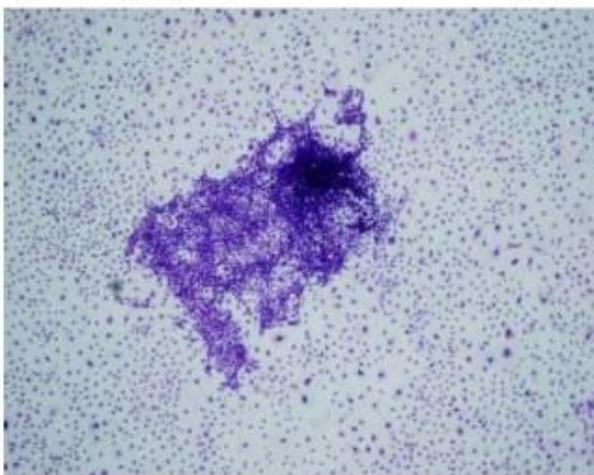
B++ S++ M+ R++ I-

Pic 41



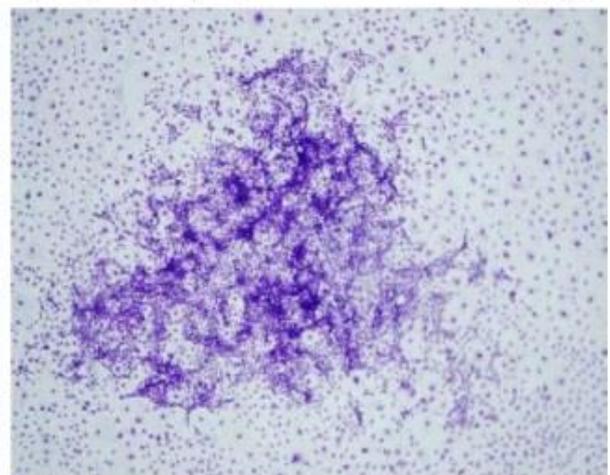
B++ S++ M++ R++ I-

Pic 42



B++ S+ M++ R+ I-

Pic 43



B++ S+ M+ R+ I-

Pic 44

LES METHODES ALTERNATIVES A L'EXPERIMENTATION ANIMALE :
LE CAS DES ETUDES DE CANCEROGENESE

L'évaluation du potentiel cancérigène des substances chimiques fait partie de l'évaluation des risques et les méthodes standards d'évaluation du **danger cancérigène** suivent les recommandations de l'OCDE. Ces méthodes ont recours à l'utilisation d'un grand nombre de rongeurs et ces études de cancérogenèse sont longues et chères. Cependant, au regard des évolutions éthiques et réglementaires mais également de la société sur le bien-être et la place de l'animal, des alternatives doivent être trouvées. Ce terme d'« Alternatives », inventé par David Smyth en 1978, n'est qu'une reformulation de la règle des 3Rs (Raffinement, Réduction, Remplacement) de Russell et Burch (1959).

Dans le cadre de la mise en place au sein du laboratoire du **test de transformation cellulaire**, le **protocole en plaque 6 puits** sur les **cellules Bhas 42** a été choisi. Ce protocole est celui qui est présenté dans le **projet de ligne directrice de l'OCDE**. Dans le but de démontrer l'aptitude du laboratoire pour ce système d'essai, des substances supposées positives en initiation, en promotion, mais également des substances supposées négatives dans les deux systèmes d'essai doivent être testées. Les résultats attendus doivent être confirmés à l'issue des différentes expérimentations. Ainsi, dans le cadre de la mise en place du test de transformation cellulaire au sein du laboratoire, la plupart des résultats attendus ont été confirmés, notamment pour le 3-méthylcholanthrène, le 12-O-tétradécanoylphorbol-13-acétate et la caféine. Pour d'autres substances, des essais complémentaires doivent confirmer les premiers résultats, ces essais étant en cours ou programmés. Le **test de transformation cellulaire**, et plus particulièrement celui sur les **cellules Bhas 42**, pourrait être utilisé pour compléter les tests de génotoxicité *in vitro* afin d'identifier les **cancérogènes épigénétiques** avec l'essai de promotion.

Mots-clés : test de transformation cellulaire ; Cellules Bhas 42 ; protocole en plaque 6 puits ; projet de ligne directrice de l'OCDE ; danger cancérigène ; cancérogènes épigénétiques

ALTERNATIVES METHODS TO ANIMAL TESTING:
THE CASE OF CARCINOGENESIS STUDIES

The evaluation of carcinogenic potential of chemicals is part of the risk assessment. The standard methods to evaluate this **carcinogenic risk** follow the OECD guideline using rodents. Carcinogenicity studies are time-consuming, expensive and use a high number of animals. However, because of ethical and regulatory evolution but also of society on the welfare and the place of animals, alternatives must be found. This term of "Alternatives", invented by David Smyth in 1978, is only a reformulation of the Three Rs' rule (Refinement, Reduction, Replacement) from Russell and Burch (1959).

In order to implement the **cell transformation assay** within the laboratory, the **6-well method** with **Bhas 42 cells** was chosen. This method is consistent with the **OECD guidance document**. In order to demonstrate the laboratory proficiency, chemicals expected to be positive in the initiation assay, and/or in the promotion assay, but also chemicals supposed to be negative in both assays should be tested. The expected results must be confirmed at the end of the various experiments. Therefore, as part of the implementation of the cell transformation assay in the laboratory, most of the expected results have been confirmed, in particular for MCA, TPA and caffeine. For other substances, additional tests must confirm the initial results, these tests are in progress or scheduled. **Cell transformation assay**, and more specifically on **Bhas 42 cells**, could be used to complete *in vitro* genotoxicity tests, in order to identify **epigenetic carcinogens** with the promotion assay.

Keywords: cell transformation Assay, Bhas 42 cells, 6-well method, OECD Guidance Document, carcinogenic risk, epigenetic carcinogens