



Université Claude Bernard



DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **30 novembre 2017**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **ZHIVAGUI Maria**

Titre de la thèse : « Modélisation à l'échelle du génome des spectres de mutations des agents de risque de cancer humain employant des systèmes expérimentaux »



Résumé

Le cancer étant l'une des causes principales de mortalité dans le monde entier, il est devenu indispensable de mieux comprendre la biologie de cette maladie afin de pouvoir la prévenir et la traiter.

Les génomes du cancer humain abritent des types de mutations complexes reflétant l'hétérogénéité des tumeurs qui peuvent résulter d'expositions à de multiples agents cancérogènes. La cause de ces mutations peut être attribuée à l'exposition aux agents cancérogènes présents dans l'environnement et dans l'alimentation, ainsi qu'aux agents endogènes comme les enzymes de polymérase et de réparations. L'âge est l'une des causes primaires pour le développement du cancer. Certains cancérogènes mutagènes laissent des empreintes de mutations ponctuelles spécifiques sur l'ADN, appelées signatures mutationnelles, illustrées par les agents cancérogènes de la fumée du tabac et la lumière ultraviolette (UV), provoquant des motifs de mutations similaires à ceux observés dans le cancer de poumons (G > T) et la peau (C > T), respectivement.

L'identification de signatures de mutations spécifiques de cancérogène peut donc aider à démêler l'étiologie du cancer. Parmi les trente signatures mutationnelles observées dans les tumeurs primaires humaines, 40 % restent d'origine inconnue et seulement 23 % ont été attribuées à des expositions externes spécifiques, comme la lumière UV, les agents d'alkylation, les contaminants alimentaires et la fumée du tabac. Ainsi, il est devenu indispensable de déchiffrer les signatures mutationnelles des centaines d'agents cancérogènes pour les humains (IARC Group 1) ainsi que ceux probablement / peut-être cancérogènes pour les humains (Groupe IARC 2A et B). Pour accomplir cette tâche, des systèmes expérimentaux bien contrôlés sont nécessaires afin d'identifier les causes de ces signatures mutationnelles orphelines.

L'objectif général de ma thèse a été d'assister à une analyse intégrative à travers différents systèmes expérimentaux et primaires, comprenant l'exposition in vitro de cellules de mammifères à un certain nombre d'agents de risque cancéreux ; la validation croisée des signatures mutationnelles résultantes avec ceux générés : 1) par le séquençage simultané des tumeurs des rongeurs développées durant les

bioassays chimiques au Programme National de Toxicologie (NTP) aux États-Unis ; 2) par le séquençage de tumeurs humaines primaires ; et enfin, 3) par les données de mutations sur le cancer humain dans les domaines publics.

Au cours de mon travail de doctorat, j'ai caractérisé et utilisé des modèles *in vitro* et *in vivo* d'exposition aux cancérogènes.

Premièrement, j'ai employé les cellules de Hupki MEF (Human TP53 knock-in Mouse Embryonic Fibroblast) caractérisées par une barrière biologique (sénescence), que les cellules peuvent contourner de manière clonale et générer des clones de cellules immortelles. L'immortalisation des cellules Hupki MEF a duré entre 2 à 3 mois.

Deuxièmement, j'ai utilisé les cellules de HepaRG, d'origine de cancer de foie humain. Ces cellules pourront être menées vers une expansion clonale soit par sous-clonage d'une seule cellule (single-cell subcloning) soit après avoir surmonté une barrière biologique, appelée la crise des cellules progénitrices, ou la sénescence des hépatocytes dérivant de la différenciation des cellules HepaRG. Différents scénarios pour l'exposition des HepaRG ont été testés.

Finalement, des lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL) ont été exploitées pour l'analyse des signatures mutationnelles des composés liés aux cancers du sang. Ce modèle cellulaire est utilisé pour une exposition chronique.

Ensuite, les conditions de cytotoxicité et genotoxicité pour chaque composé ont été établies et la formation d'adduits d'ADN a été évaluée pour des cas sélectifs. Par conséquent, les cellules de Hupki MEF ont été exposées à l'acrylamide (ACR), au glycidamide (GA), à l'ochratoxin A (OTA), au chrome (VI) et au N-nitroso-méthyl-urea (MNU). Les cellules de HepaRG ont été exposées à l'état progénitrices, différenciées en deux populations de cellules, biliaires et hépatocytes, et après isolation des hépatocytes, à l'agent carcinogène, l'acide aristolochique (AA). Tandis que les LCL ont été exposées au pesticide, le glyphosate ainsi qu'à son dérivé le N-nitroso-glyphosate.

Suite au séquençage du gène TP53, un séquençage a été effectué au niveau du génome des clones MEF immortalisés dérivés de l'exposition à l'acrylamide, au glycidamide et à l'ochratoxin A.

Le travail suggère une nouvelle signature mutationnelle unique pour l'acrylamide et médiée par son métabolite actif, le glycidamide. En fait, le profil de cette signature mutationnelle est caractérisé par une prédominance des mutations T:A>A:T, T:A>C:G et C:G>A:T. En comparant cette signature aux autres signatures riches en mutations T:A>A:T, les résultats ont démontré que la signature mutationnelle de glycidamide est nouvelle et unique. En effet, l'analyse des adduits d'ADN a identifié une augmentation des adduits N7-GA-Gua et N3-GA-Ade dans les échantillons exposés au glycidamide récapitulant l'origine des types de mutations dans la signature mutationnelle.

En outre, une analyse intégrée utilisant un modèle cellulaire, les Hupki MEF, et tumoral, des tumeurs rénales de rat, suggère un manque de mutagénicité directe pour l'OTA avec une contribution potentielle d'un mode d'action lié à la production des radicaux libres à la signature mutationnelle OTA dans les MEF.

En conclusion, ce travail de doctorat a fourni une preuve sur l'applicabilité de

différents modèles expérimentaux pour l'identification de signatures mutationnelles induites par des composés exogènes. La caractérisation de nouvelles signatures mutationnelles spécifiques aux agents cancérigènes, comme celle identifiée pour le probable agent cancérigène acrylamide/glycidamide, peut éventuellement contribuer à la mission globale et interdisciplinaire de recherche pour la prévention du cancer.