

## Effets cellulaires et moléculaires de l'amiante

Marie-Claude Jaurand  
Françoise Lévy

L'interaction entre les fibres d'amiante et différents types cellulaires est suivie, *in vitro* et *in vivo*, d'une phagocytose. Parallèlement, on observe une activation de certains facteurs de transcription, ainsi que de la voie de signalisation impliquant la PKC pour certains types cellulaires. Sur des cellules en division, l'amiante provoque des anomalies mitotiques (ségrégation anormale des chromosomes, aneuploïdie, micronoyaux, bi/multinucléation), du fait d'interférences au cours de la ségrégation chromosomique. De plus, les fibres provoquent une activation de points de contrôle du cycle cellulaire compatible avec l'existence de lésions sur l'ADN, et un arrêt du cycle cellulaire. L'amiante est capable d'induire des lésions de l'ADN et des mutations. La cause de ces altérations semble être en partie la production d'espèces actives dérivées de l'oxygène (EADO). L'origine de ces molécules peut être double : production directe par certains types de fibres et/ou réponse cellulaire aux fibres (phagocytose, réaction inflammatoire). Compte tenu de l'utilisation actuelle de fibres minérales artificielles, notamment pour remplacer l'amiante, la connaissance plus approfondie de ces mécanismes d'action moléculaire reste une priorité en toxicologie de l'environnement.

L'épidémiologie a clairement démontré que des sujets exposés professionnellement à des fibres d'amiante développaient des maladies spécifiques. Au début du siècle, l'asbestose (fibrose pulmonaire) a été le premier type de maladie pulmonaire associé à l'exposition à l'amiante. Le terme d'asbestose vient du mot « asbeste », autre nom de l'amiante. Le risque de cancer broncho-pulmonaire a été mis en évidence ultérieurement, en raison de la latence de cette maladie [1] et la relation entre

mésothéliome et exposition aux fibres d'amiante a été démontrée encore plus tardivement. C'est un article de Wagner *et al.*, en 1960, [2] qui a rendu cette relation évidente chez des travailleurs et des habitants de villes minières d'Afrique du Sud. Les fibres d'amiante sont donc apparues comme une nouvelle substance fibrosante et carcinogène pour le poumon, susceptible de provoquer un type rare de cancer de la plèvre : le mésothéliome. En effet, bien que des cas isolés de mésothéliome aient été décrits, l'incidence de cette

### ADRESSES

M.C. Jaurand, F. Lévy : Inserm E 99.09, EA 2345 Paris XII, Faculté de Médecine, 8, rue du Général-Sarrail, 94010 Créteil Cedex, France.

tumeur, en augmentation dans les pays industrialisés, reste très faible dans la population générale, de l'ordre de quelques cas par million. Un accroissement majeur du risque a été observé chez les sujets exposés professionnellement [1] et les projections pour les années à venir suggèrent un doublement de la mortalité par mésothéliome au cours des 20 prochaines années, en raison du délai entre exposition et survenue de la maladie [3].

Les observations épidémiologiques ont conduit à des recherches expérimentales qui ont débuté dès les années 1960, afin de déterminer si les fibres d'amiante constituaient l'agent causal des maladies observées et/ou si des cofacteurs contaminants, naturels ou acquis au cours des différentes manipulations réalisées jusqu'au produit commercialisé, pouvaient être aussi mis en cause. Des recherches chez l'animal ont été développées pour étudier le potentiel fibrosant et carcinogène de l'amiante ainsi que le mécanisme d'action des fibres [4]. Jusque-là, en effet, on connaissait essentiellement la carcinogenèse induite par des agents physiques (radiations) ou chimiques (hydrocarbures polycycliques par exemple). D'autres particules, telle la silice cristalline, s'étaient révélées fibrosantes, mais leur potentiel carcinogène n'a été discuté que plus tardivement [5].

Les expérimentations animales ont démontré qu'il était possible de reproduire les maladies observées chez l'homme [4]. Des modèles cellulaires ont ultérieurement été utilisés et ont connu un essor particulier avec le développement des outils pour la culture cellulaire [6]. Ils ont permis d'étudier les réponses cellulaires et moléculaires des cellules exposées *in vitro* ou *ex vivo* aux fibres d'amiante. Dans ce domaine, c'est essentiellement vers le mécanisme de carcinogenèse et la réponse inflammatoire que ce sont orientées les recherches; elles ont abouti à poser plusieurs hypothèses quant au mécanisme d'action des fibres [7]. Bien que présentées parfois comme concurrentes, ces hypothèses ne sont pas antinomiques mais complémentaires, et permettent aujourd'hui d'envisager un mécanisme spécifique d'action des fibres. Le remplacement

de l'amiante par d'autres types de fibres de substitution nécessite qu'un effort important soit porté sur l'élucidation du mécanisme par lequel les fibres d'amiante ont produit ces effets délétères. En effet, certaines d'entre elles se sont révélées, chez l'animal, fibrosantes et carcinogènes et, dans des essais *in vitro*, capables de produire, tout comme l'amiante, des radicaux libres [8].

## **Génétique du mésothéliome**

En raison de la spécificité des fibres d'amiante comme facteur de risque du mésothéliome, l'étude cytogénétique et moléculaire du mésothéliome est particulièrement intéressante. De plus, le mésothéliome n'est pas, contrairement au cancer du poumon, associé à la consommation de tabac [1]. L'absence de synergie entre amiante et tabac a été en effet clairement démontrée pour le mésothéliome, alors que le tabac est un facteur de risque multiplicatif pour le cancer broncho-pulmonaire. On peut donc considérer avec une certaine confiance que, pour cette tumeur, certaines altérations moléculaires résultent de l'effet de l'amiante, sans toutefois pouvoir déterminer si elles sont une cause ou une conséquence de la transformation néoplasique.

Le mésothéliome pleural malin est un cancer qui apparaît dans les tissus dérivés du mésoderme de la plèvre viscérale et pariétale. Les études visant à préciser les caractéristiques biologiques et moléculaires du mésothéliome ont été entreprises à partir de fragments de tumeurs et de lignées cellulaires (pour revue, voir [9]). Les mésothéliomes ont un caryotype complexe présentant de nombreuses modifications chromosomiques, numériques et structurales. En revanche, peu de mutations ponctuelles ont été mises en évidence dans des gènes critiques, à la différence de ce qui est trouvé dans d'autres cancers. Concernant les gènes suppresseurs de tumeurs, plusieurs travaux ont montré que des mutations sur le gène *P53* ne semblaient pas être impliquées dans le mésothéliome. Parallèlement, aucune amplification du gène *MDM2* n'a été détectée. L'étude de 32 cas de mésothéliome,

en association avec une exposition à l'amiante n'a pas révélé de modification du gène *WT-1*, en dépit d'un cas de mutation dans un mésothéliome péritonéal. De même, des anomalies du gène *Rb* ne semblent pas associées au mésothéliome. Cependant, des observations récentes démontrent que certains gènes suppresseurs de tumeurs tels *P15* et *P16* présentent des délétions ou des mutations dans la majorité des mésothéliomes. Une mutation fréquente semble intéresser le gène suppresseur de tumeurs *NF2*, avec notamment une perte d'hétérozygotie dans 50 % des cas, qui semble spécifique et impliquerait l'inactivation de la protéine dans le mésothéliome (*m/s* 1996, n° 8/9, p. 1035) [10]. L'amiante semble avoir un effet spécifique sur l'épithélium mésothélial mais seulement un petit nombre d'individus exposés développent un mésothéliome, peut-être en raison de facteurs génétiques. La translocation des fibres vers la plèvre est très vraisemblablement nécessaire pour conduire à une transformation néoplasique des cellules mésothéliales. Chez l'homme et dans les études expérimentales animales, on sait que cette translocation existe et les fibres peuvent être alors phagocytées localement par les cellules.

## **Propriétés et caractéristiques des fibres d'amiante**

Les principales fibres d'amiante qui ont été utilisées dans l'industrie appartiennent à deux groupes de minéraux de structure cristalline différente: serpentine et amphibole, dont les principaux représentants sont indiqués dans le *Tableau I*. Ces minéraux sont des silicates qui diffèrent par leur composition chimique, en particulier par la nature des cations qui entrent dans leur composition.

Certaines propriétés physiques et physico-chimiques sont importantes pour rendre compte du potentiel toxique des fibres.

### **Forme et dimensions**

En raison de leur forme, des fibres de plusieurs dizaines de micromètres de longueur peuvent pénétrer dans les voies aériennes par inhalation. Il

Tableau I	
PRINCIPALES VARIÉTÉS D'AMIANTE [1]	
Amiante	Composition
<b>Serpentine</b>	
Chrysotile	3MgO, 2SiO <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O
<b>Amphibole</b>	
Actinolite	2CaO, 4MgO, FeO, 8SiO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O
Amosite	11FeO, 3MgO, 16SiO <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O
Anthophyllite	7MgO, 8SiO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O
Crocidolite	Na <sub>2</sub> O, Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> , 3FeO, 8SiO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O
Trémolite	2CaO, 5MgO, 8SiO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O

n'en est pas de même pour d'autres particules, puisque les mécanismes d'épuration ne permettent pas la pénétration de particules d'un diamètre aérodynamique moyen\* supérieur à 5 µm. Ainsi, des fibres de plusieurs dizaines de micromètres de longueur et de petit diamètre peuvent être retrouvées dans le poumon. Différents travaux effectués *in vivo*, par inoculation de fibres dans la cavité pleurale ou péritonéale, et *in vitro*, ont montré que les fibres les plus longues étaient plus toxiques que les fibres plus courtes [1]. Outre des raisons mécaniques indirectes (épuration préférentielle des fibres courtes par les macrophages, translocation), ces fibres ont un potentiel toxique intrinsèque plus élevé que les fibres courtes, comme cela sera discuté plus loin.

### Réactivité de surface

C'est essentiellement par leur capacité de produire des espèces actives dérivées de l'oxygène (EADO), dans des systèmes acellulaires, que les propriétés de surface des fibres sont apparues comme un paramètre à prendre en considération dans les mécanismes d'action des fibres d'amiante. Le rôle du fer présent dans la structure de certains types de fibres (Tableau I) a été plus particulièrement étudié [11]. Les propriétés d'adsorption des fibres sont un autre aspect de leur réactivité de surface. Les fibres peuvent en effet adsorber des protéines, des phospholipides ou l'ADN, et donc interagir avec les

macromolécules biologiques présentes dans leur environnement [12]. On conçoit alors que des réactions chimiques diverses peuvent se produire à la surface des fibres. Dans les poumons de sujets asbestosiques, la formation de « corps asbestosiques » (figure 1), structures constituées d'une fibre centrale entourée

de protéines contenant du fer, rend bien compte des réactions complexes qui se déroulent à la surface des fibres au contact du milieu biologique. Les propriétés d'adsorption des fibres pourraient aussi permettre la rétention de molécules chimiques carcinogènes ou de composés de la fumée de cigarettes.

## Réponses cellulaires et moléculaires aux fibres d'amiante

### Réponse inflammatoire

Plusieurs travaux réalisés *in vivo*, chez l'animal, ont montré que l'exposition à des fibres d'amiante était associée à une stimulation de la prolifération de cellules épithéliales bronchiques, interstitielles pulmonaires et mésothéliales. Le mécanisme qui stimule la prolifération cellulaire peut avoir plusieurs origines. Le dépôt de fibres

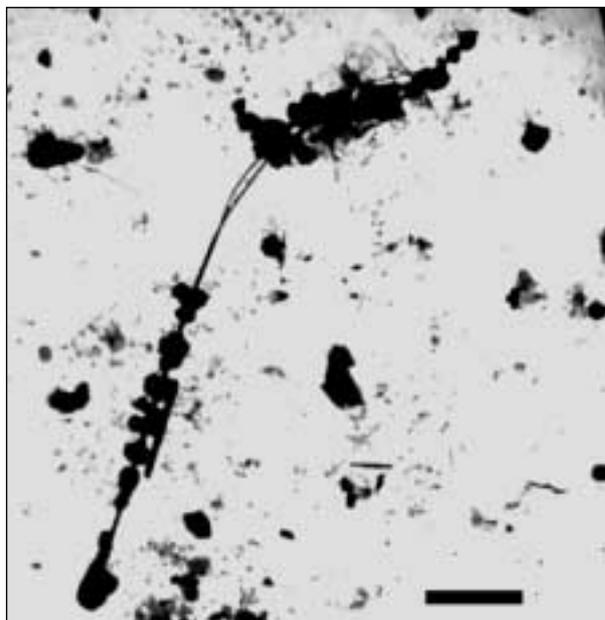


Figure 1. **Corps asbestosique détecté dans un poumon humain.** Ces structures sont composées d'une fibre centrale entourée d'une enveloppe complexe constituée de différentes molécules: mucopolysaccharides, ferritine ou hémossidéridine et, éventuellement, de cristallisation d'apatite. Le procédé de formation intracellulaire de ces structures n'est pas connu, mais la solubilisation de certains éléments chimiques de la fibre et des processus de dégradation ou d'adsorption de protéines contenant du fer ont été suggérés [51]. La barre représente 10 µm. Les auteurs remercient M.A. Billon-Galland (Laboratoire d'Étude des Particules Inhalées) pour leur avoir transmis cette photographie.

\* Ce diamètre définit le diamètre théorique d'une particule sphérique de densité 1 sédimentant à la même vitesse que la particule considérée.

dans le poumon s'accompagne d'une activation de la réponse inflammatoire caractérisée par la libération de facteurs chimiotactiques ou pro-inflammatoires, et le recrutement de cellules inflammatoires. Il en est de même au niveau de la plèvre [13-15]. Certains effets ne sont pas spécifiques des fibres d'amiante; ils peuvent également être observés à des degrés divers avec des particules non fibreuses [16].

*In vitro*, les macrophages exposés aux fibres produisent des facteurs chimiotactiques et des médiateurs tels que IL-1, TNF- $\alpha$  et PDGF (interleukine-1, *tumor necrosis factor*  $\alpha$ , *platelet-derived growth factor*) [17]. Certains de ces facteurs peuvent stimuler la prolifération de différents types cellulaires. Les cellules épithéliales alvéolaires et les cellules mésothéliales produisent également des facteurs tels que l'IL-1 ou l'IL-8 [15] [17]. En présence d'IL-1 $\beta$ , l'amiante provoque une augmentation de l'expression de la forme inducible de NO synthase dans des cellules mésothéliales pleurales de rat [18]. La régénération tissulaire qui accompagne la cicatrisation, selon le degré de réponse inflammatoire et le niveau d'endommagement tissulaire, est un autre mécanisme par lequel la prolifération cellulaire peut être stimulée. Ce processus est vraisemblablement mis en jeu avec les fibres d'amiante, connues pour avoir une activité cytotoxique et produisant des foyers de nécrose expérimentalement, en particulier lors d'expositions à de fortes doses.

Le mécanisme qui permet la stimulation par les fibres d'une production de facteurs inflammatoires reste à élucider; les propriétés physico-chimiques intrinsèques des fibres peuvent intervenir dans ce processus. Par exemple, l'amiante chrysotile est capable d'activer la voie alterne du complément et la production du facteur C5a, puissant agent pro-inflammatoire [19]. Des souris C5<sup>-/-</sup> montrent une réponse inflammatoire et une fibrose réduite par rapport aux souris sauvages exposées aux fibres de chrysotile par inhalation [20]. La libération locale d'EADO par les fibres et/ou par les cellules interagissant avec les fibres, joue également un rôle dans le développement de la réponse inflammatoire et le niveau d'endommagement tissulaire.

### Effets de l'amiante sur la mitose

Lorsque des fibres se trouvent au contact de cellules, il en résulte dans la plupart des cas une phagocytose des fibres. Pour les cellules mésothéliales pleurales, une dégranulation des lysosomes a pu être mise en évidence, laissant les fibres localisées dans des vacuoles de phagocytose [21]. Une caractéristique importante des fibres d'amiante est leur capacité d'induire des anomalies mitotiques et post-mitotiques. L'exposition de différents types cellulaires aux fibres d'amiante, *in vitro*, conduit à la formation de cellules aneuploïdes, polyploïdes et binucléées (pour revue, voir [22]). Dans un travail rapportant l'étude de la transformation des cellules SHE (*Syrian Hamster Embryo*) par des fibres de chrysotile, Oshimura *et al.* [23] ont observé que la trisomie du chromosome 11 était une étape de la transformation de ces cellules. Dans les cellules mésothéliales pleurales de rat une trisomie 1 a été détectée [24]. L'existence de micronoyaux détectée par la méthode FISH (hybridation *in situ* en fluorescence) (*m/s* 1997, n° 11, p. 1294), à l'aide d'anticorps anti-kinétochores, a permis de montrer la ségrégation anormale de chromosomes isolés [25]. Les études de différentes

phases de la mitose ont révélé que l'amiante provoquait la formation de chromatine retardée (*lagging chromatin*) et de ponts interchromosomiques, dans des cellules en anaphase/télophase. Ces anomalies ont été observées notamment dans des cellules mésothéliales humaines et de rat (pour revue, voir [22]). Ces résultats témoignent d'une ségrégation anormale des chromosomes au cours de la mitose. L'altération de la mitose est confirmée, dans le cas de cellules mésothéliales de rat, par l'étude, en cytométrie de flux, du cycle cellulaire. On observe, en effet, une accumulation des cellules ayant un contenu en ADN correspondant à la phase G<sub>2</sub>, qui sont en fait des cellules binucléées [26]. Pour de nombreux types cellulaires, la mitose ne s'achève pas par une cytotélerèse.

Il est logique d'attribuer à l'internalisation des fibres par les cellules les anomalies mitotiques observées. Au cours de la mitose, les mouvements d'organites subcellulaires sont plus importants que dans des cellules en interphase; la présence de fibres d'amiante peut entraver le déplacement des organites intracellulaires, plus particulièrement des chromosomes, d'autant plus que les fibres se concentrent dans la zone périnucléaire des cellules interphasiques,

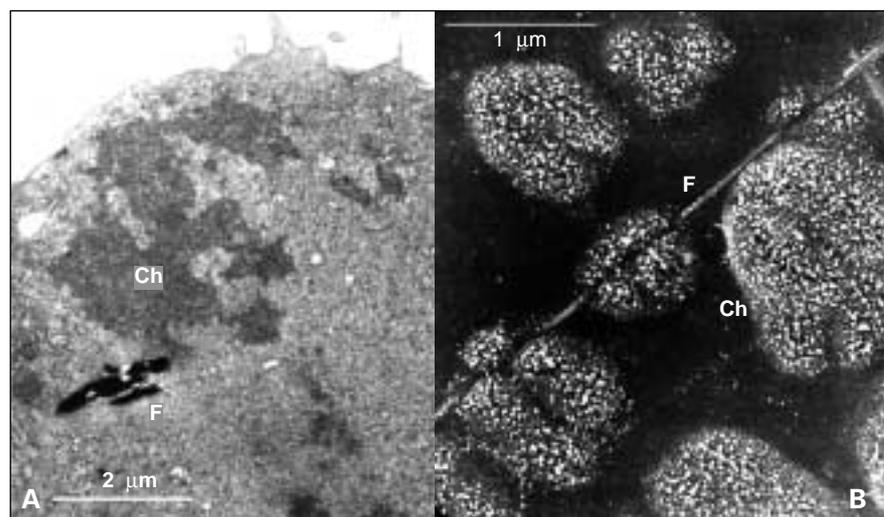


Figure 2. **Cellules mésothéliales pleurales de rat traitées, *in vitro*, par des fibres de chrysotile.** Ces préparations *in situ* ont permis de visualiser les fibres dans les cellules en mitose. **A.** Coupe ultrafine observée en microscopie électronique à transmission. Dans cette cellule, les fibres (F) se trouvent à proximité de chromosomes (Ch). **B.** Métaphase observée en microscopie électronique à balayage [28]. Dans cette métaphase, une fibre (F) traverse plusieurs chromosomes (Ch).

comme cela a été démontré dans plusieurs travaux [27]. Grâce à des observations ultrastructurales, Wang *et al.* [28] ont mis en évidence que les fibres longues et fines se trouvaient fréquemment au contact des chromosomes dans des cultures de cellules mésothéliales pleurales de rat (figure 2). Des études dynamiques de la mitose de cellules pulmonaires d'amphibiens ont démontré que les fibres longues d'amiante interagissaient avec la cage de kératine périnucléaire des cellules épithéliales, empêchant parfois la migration des chromosomes [29]. Les fibres les plus petites étaient entraînées par les mouvements de la cellule, sans provoquer de perturbations notables du déplacement des organites. L'importance de la longueur des fibres a été mise en évidence par l'étude des anomalies anaphasiques dans les cellules mésothéliales pleurales de rat traitées par différents types de fibres [30]. Dans cette étude, des anaphases anormales n'étaient observées que si l'échantillon contenait des fibres longues ( $> 8 \mu\text{m}$ ) et fines ( $\leq 0,25 \mu\text{m}$ ). Il est intéressant de noter qu'une corrélation a été observée entre la capacité d'un échantillon de produire une ségrégation anormale des chromosomes *in vitro* et des mésothéliomes expérimentaux chez le rat [30].

### Effets de l'amiante sur l'ADN

Longtemps, les fibres d'amiante ont été considérées comme des agents non mutagènes, en raison de l'absence de mutations dans les tests de Ames sur bactéries, ainsi que dans des essais de mutagenèse sur cellules eucaryotes détectant des mutations ponctuelles sur certains gènes (*HGPRT* ou *Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>ATPase*). Plus récemment, l'utilisation de nouvelles souches de bactéries, plus sensibles aux EADO, a permis de mettre en évidence des mutations et l'hydroxylation de bases de l'ADN a été observée aussi bien sur bactéries que sur cellules eucaryotes (pour revue, voir [22]). L'origine de ces altérations peut être reliée à la production d'EADO, en particulier du radical hydroxyle  $\text{OH}^\circ$  ou de produits de peroxydation lipidique plus stables que les radicaux libres. Les EADO peuvent provenir de réactions d'oxydo-réduction se produisant à la surface de l'amiante ou à la

production de ces espèces par les cellules, en relation avec la phagocytose. La mesure directe de cassures de l'ADN n'avait, le plus souvent, pas révélé de dommages (pour revue, voir [22]); cependant, cela pouvait être dû à la limitation des méthodes d'analyse. Récemment, l'existence de cassures double brins a été mise en évidence grâce à l'utilisation de mutants déficients en systèmes de réparation de ce type de lésions. En effet, la cytotoxicité des fibres de chrysotile était augmentée dans les cellules mutées, comparativement aux cellules sauvages [31]. Dans un autre système (figure 3) utilisant des cellules  $A_L$  (hybrides provenant de la fusion de cellules humaines et de hamster), Hei *et al.* [32] avaient montré que des fibres d'amiante produisaient des mutations provoquant des délétions à de multiples locus. De telles mutations ne sont pas détectables dans des systèmes classiques fondés sur la sélection de mutants viables car de larges mutations sont souvent létales.

L'endommagement de l'ADN a été suggéré de manière indirecte par la mise en évidence de l'activation de systèmes de réparation de l'ADN (synthèse non programmée de l'ADN) et de la poly(ADP)ribose polymérase, après traitement *in vitro*, de cellules mésothéliales pleurales de rat par des fibres [33, 34]. Une confirmation vient d'être apportée par l'induction de l'AP-endonucléase qui coupe l'ADN au niveau des sites apuriniques ou apyrimidiques pouvant résulter d'une hydroxylation de bases [35].

### Activation de systèmes de transcription

Sous l'effet de différents stimulus, incluant les radicaux libres, les cellules soumises à des situations de stress répondent par une activation de systèmes de régulation nucléaire qui permet à la cellule de s'organiser et de contrôler son fonctionnement par l'intermédiaire de l'expression de protéines régulatrices. Ainsi, plusieurs facteurs de transcription, connus pour être activés en réponse à un stress, permettent l'expression de gènes contrôlant la prolifération cellulaire et la réparation de l'ADN. L'étude de l'activité de facteurs de transcription (AP-1, NF- $\kappa$ B et p53) a été effectuée sur différents types cellulaires exposés aux fibres d'amiante.

Une induction de *c-Fos* et de *c-Jun* a été observée dans des cellules trachéales épithéliales de hamster et dans des cellules mésothéliales pleurales de rat exposés à l'amiante [36]. Toutefois, les niveaux et la cinétique d'expression varient d'un type cellulaire à l'autre. De même, une activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B a été détectée dans des cellules mésothéliales, ainsi que dans des cellules alvéolaires épithéliales [37]. D'autres travaux ont montré une stabilisation du facteur de transcription p53 associée à un arrêt du cycle cellulaire [38-40].

### Synthèse des hypothèses sur les mécanismes d'action des fibres

On peut aujourd'hui formuler certaines hypothèses et envisager un mécanisme d'action des fibres d'amiante qui rend compte, en partie, de leur toxicité et de leur génotoxicité.

Le mécanisme le plus souvent mis en avant est celui qui passe par la formation d'EADO. Un second mécanisme repose sur l'altération du dosage génique de certaines cellules. Ces deux mécanismes ne s'excluent pas mutuellement. La phagocytose des fibres est vraisemblablement l'une des étapes importantes dans la toxicité et la génotoxicité des fibres. Jusqu'ici, le mécanisme exact de cette phagocytose des fibres par les cellules reste peu étudié mais on sait qu'il passe par des interactions moléculaires avec la membrane plasmique. Il a été observé que les protéines sériques s'adsorbent sur les fibres [41], augmentaient la toxicité [42] et la réponse cellulaire aux fibres (production de TNF $\alpha$  ou de  $\text{O}_2^-$  par les macrophages par exemple [43, 44]). Boylan *et al.* [45] ont montré que l'interaction entre la vitronectine *via* l'intégrine  $\alpha\text{v}\beta\text{5}$  jouait un rôle dans l'internalisation de fibres de crocidolite par des cellules mésothéliales pleurales de lapin. Globalement, les interactions aboutiraient à une activation de la voie de signal de la PKC (protéine kinase C) [46]. La phagocytose est un processus générateur d'EADO; certains auteurs considèrent même que c'est la production d'EADO qui déclenche la phagocytose [47]. La stimulation de la

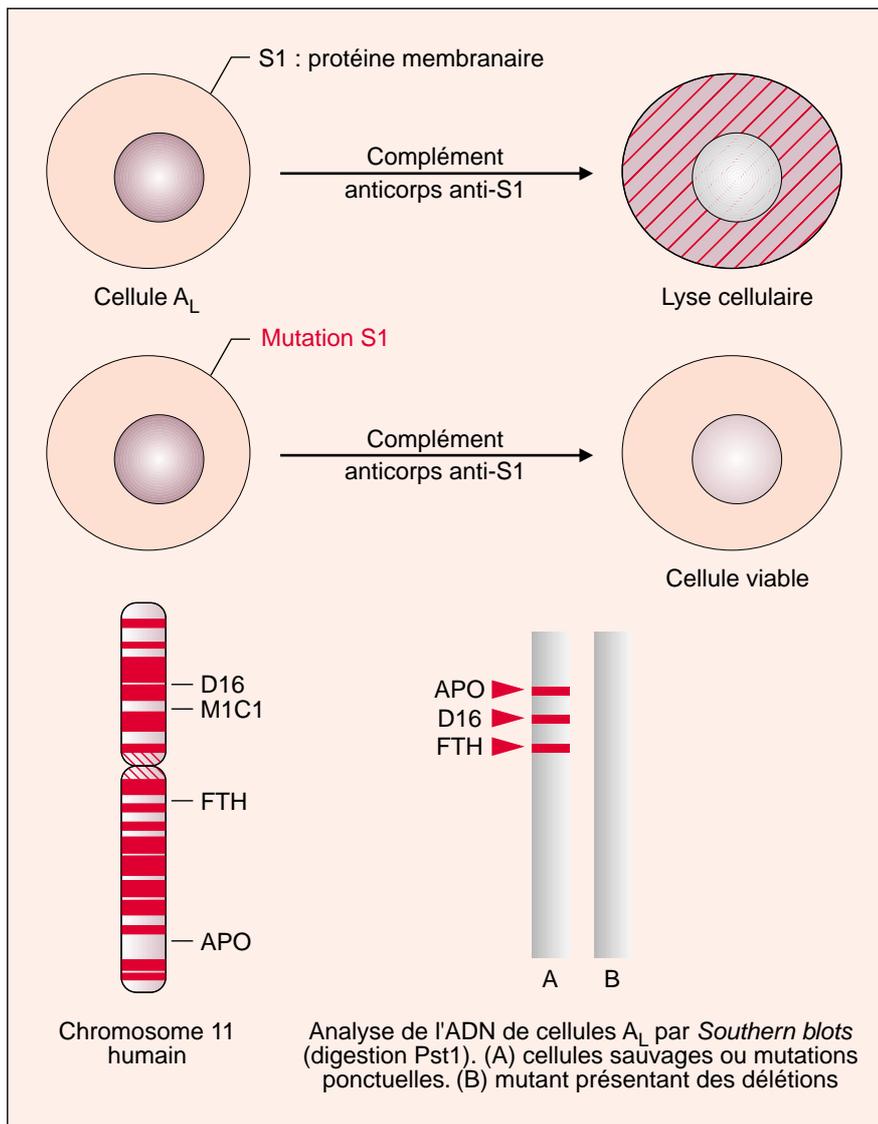


Figure 3. **Représentation schématique des résultats obtenus avec le système de cellules  $A_L$ .** Ces cellules sont des hybrides, homme  $\times$  hamster qui retiennent le chromosome 11 humain sur lequel est localisé le gène M1C1 (aussi appelé CD59) codant pour la protéine S1. Cette protéine est un antigène de surface, ce qui permet, en présence de complément et d'anticorps spécifiques, une lyse cellulaire. Dans l'étude de Hei et al. [32], l'étendue des mutations était évaluée par la technique Southern après digestion par Pst1. Les mutants spontanés produits par des mutations ponctuelles présentaient les bandes attendues après hybridation avec des sondes spécifiques reconnaissant des régions distantes du chromosome 11, alors que les mutants résultant de l'exposition à l'amiante montraient des délétions. La fréquence de délétions des 3 locus atteignait 58% chez les mutants exposés aux fibres de chrysotile (26% chez les mutants spontanés, différence statistiquement significative).

réponse inflammatoire qui est associée au dépôt de particules dans le poumon et dans la plèvre, après migration des fibres, est un autre élément générateur d'EADO. Ces molécules peuvent, de plus, agir à distance par l'intermédiaire de facteurs

plus stables, par exemple dérivés de la peroxydation lipidique. Dans ce cadre, il est intéressant de noter que les cellules mésothéliales produisent *in vitro* des facteurs cassants stables, et que les anomalies chromosomiques structurales ne sont observées

dans des lymphocytes *in vitro* qu'en présence de monocytes, vraisemblablement en raison de la production par les phagocytes de facteurs clastogènes [27]. Les fibres elles-mêmes pourraient être une source de production d'EADO.

Le *stress* qui résulte de l'interaction entre les fibres et les cellules modifie l'activité de facteurs de transcription et stimule la défense anti-oxydante des cellules. La réponse cellulaire va donc être fonction du niveau de *stress* reçu et/ou exprimé en retour par la cellule au cours des processus de phagocytose et de réaction inflammatoire. On sait qu'un grand nombre de facteurs de transcription sont sensibles aux conditions rédox régnant dans la cellule [48]. Il en est ainsi des facteurs NF $\kappa$ -B et AP-1, l'un et l'autre étant activés par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ces facteurs de transcription présentent, dans leur séquence, des résidus cystéine dont l'état réduit ou oxydé module la liaison à l'ADN. En revanche, il a été montré que le facteur de transcription p53 était inactivé par le *stress* oxydant. Cette inactivation doit dépendre de la quantité d'EADO produite au cours de la réaction de *stress*; par ailleurs, elle est compensée par une stabilisation de la protéine (résultant d'une diminution de sa dégradation) qui augmente la quantité de protéine capable d'induire la réponse cellulaire. La protéine p53 joue un rôle capital dans le contrôle des dommages à l'ADN. La stabilisation de p53 et l'activation des gènes qu'elle contrôle, observée après le traitement de cellules par les fibres, pourrait donc représenter un événement plus tardif dans la séquence des étapes mises en jeu en réponse à l'exposition des cellules aux fibres.

L'activation des facteurs de transcription NF $\kappa$ -B et AP-1 représenterait une étape précoce, ce qui est compatible avec le type de réponse produit par les cellules, sous l'effet d'autres stimulus. La PARP semble jouer un rôle important dans les processus mis en œuvre secondairement. Cette enzyme est connue pour détecter les cassures d'ADN (*m/s* 1995, n° 10, p. 1487; 1996, n° 11, p. 1269; 1999, n° 1, p. 124) [49]; elle pourrait recruter des enzymes de réparation et permettre la coordination et l'achèvement de la réparation. Un certain nombre de gènes participent au processus de

réparation, selon la nature des dommages; les produits de ces gènes sont importants en matière de carcinogénèse, tel XRCC1 qui coordonne la réparation de type excision de base. Actuellement, le type de réparation induit par les fibres a été peu étudié; cependant, les réparations par excision de bases et de nucléotides ont été détectées dans les cellules mésothéliales pleurales de rat.

Le second mécanisme suggéré comme capital repose sur des études cytogénétiques qui ont démontré la présence d'anomalies chromosomiques dans les cellules en mitose exposées aux fibres d'amiante. La formation de ponts interchromosomiques peut résulter de cassures chromatidiennes se produisant pendant la phase G1, comme cela a été montré dans l'étude des amplifications géniques [50]. La réparation des cassures double brins fait appel à des recombinaisons entre chromosomes. Les anomalies chromosomiques résultent aussi des interactions entre les organites cellulaires et les fibres. Dans ce mécanisme, la forme fibreuse et les dimensions des particules peuvent être des paramètres importants qui conditionnent le niveau des dommages. L'aneuploïdie et les anomalies chromosomiques, observées dans les cellules exposées aux fibres, ont pour conséquence une différence de dosage génique qui est à la base du dysfonctionnement pouvant conduire la cellule vers un état néoplasique. Les aberrations chromosomiques et les anomalies de mitose peuvent être la conséquence de l'action d'EADO mais peuvent aussi résulter d'autres mécanismes, par exemple une entrave à la dynamique cellulaire, plus particulièrement au cours de la mitose. Jusqu'ici, de nombreux travaux ont porté sur la réponse cellulaire au *stress oxydant*; les études concernant les mécanismes relatifs à la nature physique des fibres (forme, dimensions) sont beaucoup plus rares.

La comparaison des effets produits par des fibres de différentes dimensions et par les fibres *versus* des particules non fibreuses de même nature montre, d'une part, que les fibres longues sont plus actives que les fibres courtes et, d'autre part, que les particules non fibreuses sont généralement peu ou pas actives. La défini-

tion du paramètre longueur n'est pas absolue dans ce contexte. Dans le domaine de l'amiante, la différence de longueur moyenne entre des échantillons de fibres « courtes » et « longues » est souvent faible (quelques micromètres à plusieurs micromètres). Il faut rappeler que le spectre dimensionnel est large dans un échantillon donné, et qu'une augmentation de la longueur moyenne est associée à une augmentation de la proportion des fibres les plus longues, donc les plus actives.

## Conclusions

L'ensemble de ces résultats permet d'envisager une succession d'étapes pour rendre compte du mécanisme d'action des fibres sur les cellules pulmonaires (figure 4). Les fibres qui se déposent dans le poumon sont susceptibles d'interagir localement, et après migration, avec des macromolécules (protéines, phospholipides), et d'être internalisées par les cellules

(macrophages, cellules bronchiques, alvéolaires, mésothéliales). Il en résulte un *stress oxydatif*, associé à une phagocytose par les macrophages et par les cellules épithéliales. Pour certaines cellules, une activation de la PKC déclenche un signal en réponse à l'interaction fibres-cellules. Les oxydants et les facteurs casants susceptibles d'être produits au cours de ces réactions provoquent alors différentes réponses, activation des facteurs de transcription NFκB et AP-1, endommagement de l'ADN. Il résulte de ce dernier effet l'activation des systèmes de réparation et, pour les cellules en cycle, un déclenchement des systèmes activant des points de contrôle du cycle cellulaire. La stimulation de la réparation de l'ADN et l'arrêt du cycle cellulaire seront mis à profit par les cellules pour restaurer l'intégrité de leur matériel génétique, mais le maintien de cette intégrité dépendra de la qualité et de l'efficacité de la réparation. L'émergence de cellules qui ont échappé au

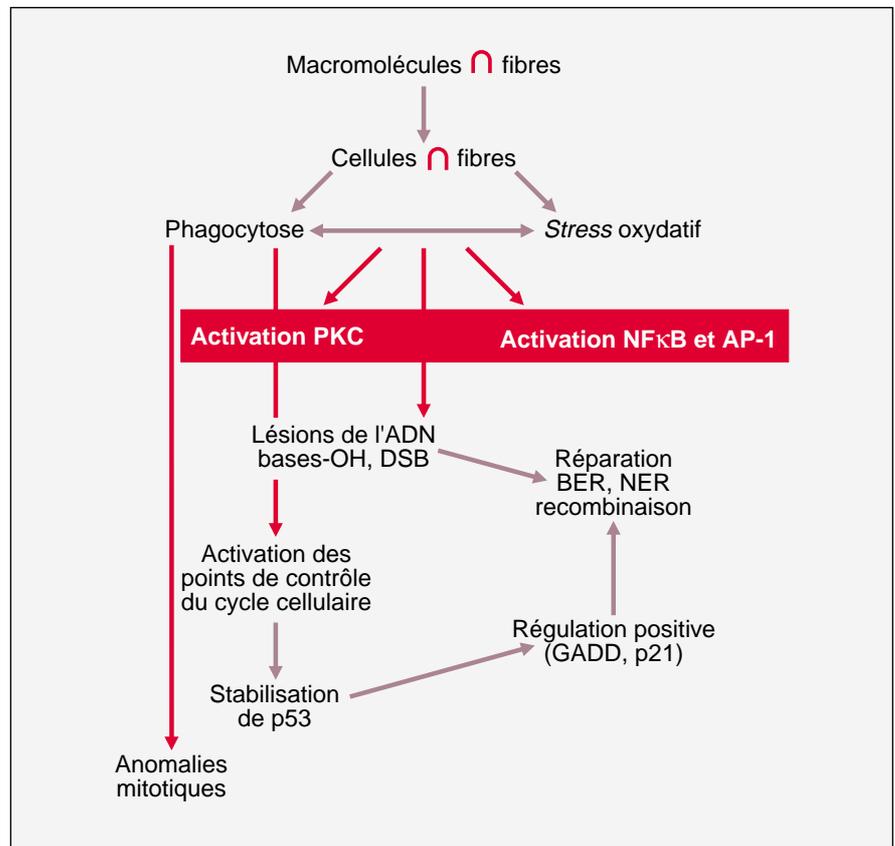


Figure 4. **Modèle du mécanisme d'action de l'amiante au niveau cellulaire.** La séquence des événements est suggérée d'après les résultats de la littérature, obtenus *in vitro* avec des systèmes acellulaires et avec des cellules en culture.

contrôle ou à la réparation sera un élément capital dans la progression néoplasique (figure 5). Dans ce schéma mécanistique, les effets toxiques et génotoxiques des fibres dépendront non seulement des interactions directes fibres-cellules cibles, mais également des facteurs produits au cours de ces processus. Dans ce domaine, les facteurs chimiotactiques pour les cellules inflammatoires, les facteurs de croissance susceptibles de produire un stress oxydatif et d'entretenir la prolifération des cellules cibles sont des éléments à prendre en considération. Aujourd'hui, les fibres d'amianté semblent donc avoir des effets pléiotropiques qui rendent compte de leurs propriétés fibrosantes et carcinogènes ■

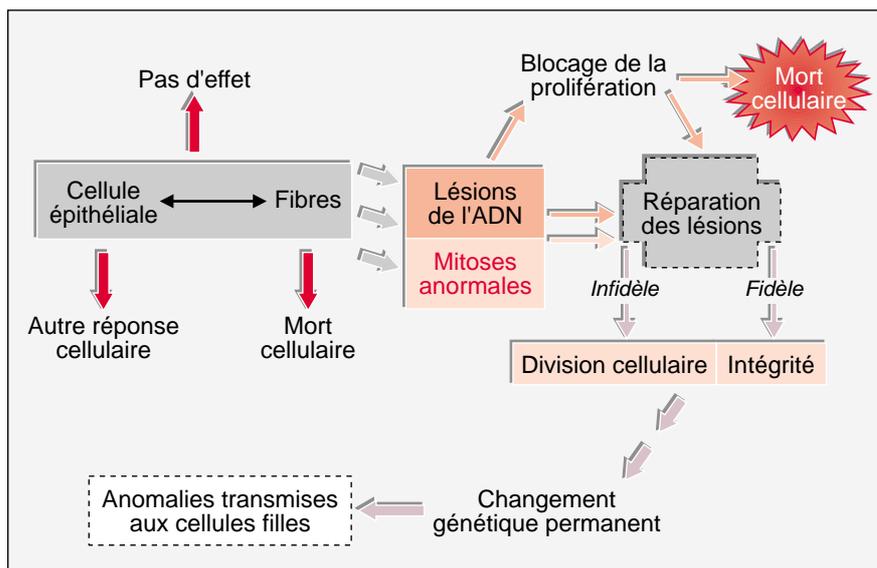


Figure 5. **Schéma rassemblant les principales étapes susceptibles d'être mises en jeu par les fibres et pouvant aboutir, le cas échéant, à la transformation cellulaire.** Les interactions entre les fibres et les cellules n'aboutissent pas toujours à des effets détectables dans les systèmes utilisés. Certaines fibres, les fibres courtes en particulier, sont peu réactives. La mort cellulaire a été étudiée globalement (tests d'exclusion de colorants, détermination d'une activité métabolique) et par l'étude de l'apoptose. Des résultats contradictoires ont été observés, certains auteurs observant un taux élevé d'apoptose [52, 53], d'autres pas [26]. Les raisons de ces différences n'ont pas été analysées mais on peut suggérer que certains facteurs – dimensions des fibres dans les différents échantillons, conditions expérimentales (présence de facteurs de survie en particulier) – peuvent expliquer les résultats obtenus.

## RÉFÉRENCES

1. Expertise Collective. Effets sur la santé des principaux types d'exposition à l'amianté. Paris Éditions INSERM, 1997.
2. Wagner JC, Slaggs CA, Marchand P. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br J Ind Med* 1960; 17: 260-71.
3. Peto J, Decarli A, La Vecchia C, Levi F, Negri E. The European mesothelioma epidemic. *Br J Cancer* 1999; 79: 666-72.
4. Davis JMG. Mineral fibre carcinogenesis: experimental data relating to the importance of fibre type, size, deposition, dissolution and migration. *IARC Sci Pub* 1989; 33-45.
5. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Silica. *Silica and Some Silicates* 1987; 42: 39-143.
6. Jaurand MC, Marano F, Wallaert B, Gosset P, Haddad-Romet S. Toxicité respiratoire *in vitro*. In: Adolphe M, Guillouzo A, Marano F, eds. *Toxicologie cellulaire in vitro. Méthodes et applications*. Éditions Inserm, Paris: 1994; 237-83.
7. Kane AB. Mechanisms of mineral fibre carcinogenesis. Lyon: IARC Scientific Publications, 1996; n° 140: 11-34.
8. Expertise Collective Inserm. *Effets sur la santé des fibres de substitution à l'amianté. Rapport établi à la demande de la Direction Générale de la Santé et de la Direction des Relations du Travail* 1999 (sous presse).
9. Lee WC, Testa JR. Somatic genetic alterations in human malignant mesothelioma. *Int J Cancer* 1999; 14: 181-8.
10. Deguen B, Goutebroze L, Giovannini M, et al. Heterogeneity of mesothelioma cell lines as defined by altered genomic structure and expression of the *NF2* gene. *Int J Cancer* 1998; 77: 554-60.
11. Lund LG, Aust AE. Iron-catalyzed reactions may be responsible for the biochemical and biological effects of asbestos. *Biofactors* 1991; 3: 83-9.
12. Fubini B. Surface reactivity in the pathogenic response to particulates. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 1013-20.
13. Adamson IYR, Bakowska J, Bowden DH. Mesothelial cell proliferation after instillation of long or short asbestos fibers into mouse lung. *Am J Pathol* 1993; 142: 1209-16.
14. Liu JY, Morris GF, Lei WH, Hart CE, Lasky JA, Brody AR. Rapid activation of PDGF-A and -B expression at sites of lung injury in asbestos-exposed rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 129-40.
15. Boylan AM, Ruegg C, Kim KJ, et al. Evidence of a role for mesothelial cell-derived interleukin-8 in the pathogenesis of asbestos-induced pleurisy in rabbits. *J Clin Invest* 1992; 89: 1257-67.
16. Adamson IYR, Bakowska J, Bowden DH. Mesothelial cell proliferation: A nonspecific response to lung injury associated with fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10: 253-8.
17. Driscoll KE. Effects of fibres on cell proliferation, cell activation and gene expression. In: Kane AB, Boffetta P, Sarracci R, Wilbourn JD, eds. *Mechanisms in fibre carcinogenesis*. Lyon: IARC Scientific Publications, 1996; n° 140.
18. Choe N, Tanaka S, Kagan E. Asbestos fibers and interleukin-1 upregulate the formation of reactive nitrogen species in rat pleural mesothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 19: 226-36.
19. Warheit DB, Hill GG, Snyderman R, Brody AR. Inhaled asbestos activates a complement-dependent chemoattractant for macrophages. *Lab Invest* 1985; 52: 505-14.
20. McGavran PD, Butterick CJ, Brody AR. Tritiated thymidine incorporation and the development of an interstitial lesion in the bronchiolar-alveolar regions of the lungs of normal and complement deficient mice after inhalation of chrysotile asbestos. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1989; 9: 377-91.
21. Jaurand MC, Kaplan H, Thiollet J, Pinchon MC, Bernaudin JF, Bignon J. Phagocytosis of chrysotile fibers by pleural mesothelial cells in culture. *Am J Pathol* 1979; 94: 529-38.
22. Jaurand MC. Mechanisms of fiber-induced genotoxicity. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 1073-84.
23. Oshimura M, Hesterberg TW, Barrett JC. An early, nonrandom karyotypic change in immortal Syrian hamster cell lines transformed by asbestos: trisomy of chromosome 11. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 22: 225-37.
24. Jaurand MC, Saint-Etienne L, Van der Meeren A, Endo-Capron S, Renier A, Bignon J. Neoplastic transformation of rodent cells. Cellular and molecular aspects of fiber carcinogenesis. *Curr Comm in Cell and Mol Biol* 1991; 2: 131-47.

## RÉFÉRENCES

25. Dopp E, Saedler J, Stopper H, Weiss DG, Schiffmann D. Mitotic disturbances and micronucleus induction in syrian hamster embryo fibroblast cells caused by asbestos fibers. *Environ Health Perspect* 1995; 103: 268-71.
26. Levresse V, Moritz S, Renier A, et al. Effect of simian virus large T antigen expression on cell cycle control and apoptosis in rat pleural mesothelial cells exposed to DNA damaging agents. *Oncogene* 1998; 16: 1041-53.
27. Jaurand MC. Mechanisms of action of fibres in carcinogenesis. *Asbestos-Related Cancer* 1991; 42-60.
28. Wang NS, Jaurand MC, Magne L, Kheuang L, Pinchon MC, Bignon J. The interactions between asbestos fibers and metaphase chromosomes of rat pleural mesothelial cells in culture. A scanning and transmission electron microscopic study. *Am J Pathol* 1987; 126: 343-9.
29. Ault JG, Cole RW, Jensen CG, Jensen LCW, Bachert LA, Rieder CL. Behavior of crocidolite asbestos during mitosis in living vertebrate lung epithelial cells. *Cancer Res* 1995; 55: 792-8.
30. Yegles M, Janson X, Dong HY, Renier A, Jaurand MC. Role of fibre characteristics on cytotoxicity and induction of anaphase/telophase aberrations in rat pleural mesothelial cells *in vitro*. Correlations with *in vivo* animal findings. *Carcinogenesis* 1995; 16: 2751-8.
31. Okayasu R, Takahashi S, Yamada S, Hei TK, Ullrich RL. Asbestos and DNA double strand breaks. *Cancer Res* 1999; 59: 298-300.
32. Hei TK, Piao CQ, He ZY, Vannais D, Waldren CA. Chrysotile fiber is a strong mutagen in mammalian cells. *Cancer Res* 1992; 52: 6305-9.
33. Renier A, Levy F, Pilliere F, Jaurand MC. Uncheduled DNA synthesis in rat pleural mesothelial cells treated with mineral fibres or benzo[a]pyrene. *Mutat Res* 1990; 241: 361-7.
34. Dong HY, Buard A, Levy F, Renier A, Laval F, Jaurand MC. Synthesis of poly(ADP-ribose) in asbestos treated rat pleural mesothelial cells in culture. *Mutat Res* 1995; 331: 197-204.
35. Fung H, Kow YW, Van Houten B, et al. Asbestos increases mammalian AP-endonuclease gene expression, protein levels, and enzyme activity in mesothelial cells. *Cancer Res* 1998; 58: 189-94.
36. Janssen YMW, Heintz NH, Marsh JP, Borm PJA, Mossman BT. Induction of *c-fos* and *c-jun* proto-oncogenes in target cells of the lung and pleura by carcinogenic fibers. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11: 522-30.
37. Janssen YMW, Driscoll KE, Howard B, et al. Asbestos causes translocation of p65 protein and increases NF- $\kappa$ B DNA binding activity in rat lung epithelial and pleural mesothelial cells. *Am J Pathol* 1997; 151: 389-401.
38. Levresse V, Renier A, Fleury-Feith J, et al. Analysis of cell cycle disruptions in cultures of rat pleural mesothelial cells exposed to asbestos fibres. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17: 660-71.
39. Johnson NF, Jaramillo RJ. *p53*, *Cip1*, and *Gadd153* expression following treatment of A549 cells with natural and man-made vitreous fibers. *Environ Health Perspect* 1997; 105: 1143-5.
40. Pääkkö P, Rämetsä K, Vähäkangas K, et al. Crocidolite asbestos causes an induction of p53 and apoptosis in cultured A-549 lung carcinoma cells. *Apoptosis* 1998; 3: 203-11.
41. Jaurand MC, Baillif P, Thomassin JH, Magne L, Touray JC. An XPS and chemical adsorption of biological molecules on the chrysotile asbestos surface. *J Colloid Interface Sci* 1983; 95: 1-9.
42. Kamp DW, Dunne M, Anderson JA, Weitzman SA, Dunn MM. Serum promotes asbestos-induced injury to human pulmonary epithelial cells. *J Lab Clin Med* 1990; 116: 289-97.
43. Donaldson K, Li XY, Dogra S, Miller BG, Brown GM. Asbestos-stimulated tumor necrosis factor release from alveolar macrophages depends on fibre length and opsonization. *J Pathol* 1992; 168: 243-8.
44. Hill IM, Beswick PH, Donaldson K. Differential release of superoxide anions by macrophages treated with long and short fibre amosite asbestos is a consequence of differential affinity for opsonin. *Occup Environ Med* 1995; 52: 92-6.
45. Boylan AM, Sanan DA, Sheppard D, Broaddus VC. Vitronectin enhances internalization of crocidolite asbestos by rabbit pleural mesothelial cells via the integrin  $\alpha 5 \beta 1$ . *J Clin Invest* 1995; 96: 1987-2001.
46. Perderiset M, Marsh JP, Mossman BT. Activation of protein kinase-C by crocidolite asbestos in hamster tracheal epithelial cells. *Carcinogenesis* 1991; 12: 1499-502.
47. Hobson J, Wright JL, Churg A. Active oxygen species mediate asbestos fiber uptake by tracheal cells. *FASEB J* 1990; 4: 3135-9.
48. Morel Y, Barouki R. Influence du stress oxydant sur la régulation des gènes. *Med Sci* 1998; 14: 713-21.
49. Oliver Pozo FJ, de laRubia Sanchez G, Niedergang C, Méñissier-de Murcia J, de Murcia G. La poly(ADP-ribose) polymérase: un facteur de survie. *Med Sci* 1998; 14: 1196-203.
50. Debatisse M, Tolédo F. Amplification génique, plasticité des génomes et oncogénèse. *Med Sci* 1995; 11: 1099-109.
51. Morgan A, Holmes A. The enigmatic asbestos body: its formation and significance in asbestos-related disease. *Environ Res* 1985; 38: 283-92.
52. Bérubé KA, Quinlan TR, Fung H, et al. Apoptosis is observed in mesothelial cells after exposure to crocidolite asbestos. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 15: 141-7.
53. Broaddus VC, Yang L, Scavo LM, Ernst JD, Boylan AM. Asbestos induces apoptosis of human and rabbit pleural mesothelial cells via reactive oxygen species. *J Clin Invest* 1996; 98: 2050-9.

## Summary

### Cellular and molecular effects of asbestos

Elucidating the mechanisms of asbestos-induced toxicity is of paramount interest for scientific and economic reasons. When asbestos fibers interact with a variety of cell types, *in vivo* and *in vitro*, including pleural mesothelial cells that specifically respond to asbestos, phagocytosis ensues. Concomitant with this response is an activation of several transcription factors, and certain cell types also exhibit an activation of a PKC signaling pathway from cell surface receptors. Asbestos in dividing cells causes mitotic abnormalities such as aneuploidy, micronuclei and multinucleated cells by physically interfering with segregating chromosomes. In addition, asbestos fibers activate cell cycle control mechanisms consistent with the development of DNA damage. Asbestos fibers cause DNA lesions and mutations that can lead to cancer, and this damage may be partly related to the production of reactive oxygen species (ROS). ROS can originate from direct production by some fiber types as well as from cellular responses to the fibers during phagocytosis and inflammatory events. These scenarios are postulates that have developed from recent studies showing DNA base hydroxylation and activation of DNA repair pathways in asbestos-exposed cells. The current use of man-made mineral fibers, partly as asbestos substitutes, requires that we develop a thorough knowledge of the mechanisms through which fibers induce genetic abnormalities. This effort is a priority for molecular toxicologists studying environmental insults.

## TIRÉS À PART

M.C. Jaurand.