

Un test sensible et relativement rapide de cancérisation du poumon de la souris¹

Christiane Yerly et Serge Neukomm

De l'institut universitaire de Médecine sociale et préventive (Dir.: Prof. A. Delachaux), Laboratoires de recherches expérimentales (Méd. Chef: Dr S. Neukomm, P.D.), Lausanne

Résumé

La cancérisation du poumon de la souris, par injection directe de 3,4-benzopyrène dans le parenchyme pulmonaire, méthode utilisée par Happert et coll. pour la fumée du tabac, permet de dire que cette technique constitue un test simple (1 injection hebdomadaire), sensible (10^{-3} g de 3,4-benzopyrène) et de durée relativement courte (10 mois) pour les substances cancérogènes de la catégorie des HAP et, par conséquent, pour une grande partie des polluants atmosphériques.

La détection, l'identification et le dosage des substances cancérogènes et/ou co-cancérogènes des polluants atmosphériques impliquent impérativement l'utilisation de tests biologiques. Il en va de même d'ailleurs en ce qui concerne l'estimation concrète du risque global de cancer dans des situations où l'épidémiologie humaine est impossible en raison de l'insuffisance des données statistiques (nombre de cas d'exposition trop faible, durée d'exposition limitée, combinaison indéterminée de facteurs cancérogènes chimiques, par exemple: hydrocarbures aromatiques polycycliques, nitrosamines, etc.). On peut citer à cet égard et à titre d'exemple les conclusions de Wynder et Hoffmann [1] concernant le pouvoir cancérogène et co-cancérogène de la fumée du tabac selon lesquelles cette fumée — «cancérogène complet» capable de provoquer des tumeurs dans une grande variété de tissus et d'animaux sans adjonction d'aucun complément — présente un pouvoir promoteur plus grand que son pouvoir initiateur. Dans cet ordre d'idée, les observations de Gellhorn [2] sont particulièrement démonstratives (tableau 1). Cette expérience met bien en évidence l'impossibilité d'apprécier le pouvoir cancérogène du «goudron» en déterminant seulement la quantité globale de benzopyrène qu'il contient.

¹ Basé sur une présentation lors de la Journée d'exposés scientifiques de la Société suisse de médecine sociale et préventive, Berne, 27 juin 1973.

Tableau 1 Effets cancérogènes et co-cancérogènes du condensat de fumée de cigarettes

Produit	Nombre animaux (souris R III)	Nombre animaux avec	
		papilomes	carcinomes
Benzopyrène (Bp) ¹	529	20	5
Bp + «goudron» ²	581	61	35
«goudron»	595	3	2
«goudron» + huile de croton	200	10	0

¹ 200 µg en solution à 1 % appliquée 2 jours de suite au début de l'expérience

² «goudron» et huile de croton appliqués 5-6 fois par semaine durant 6 semaines

Par ailleurs, comme l'a très bien montré Schmähl [3] dans ses études sur la «syncarcinogénèse», il y a addition des effets cancérogènes lorsque diverses substances cancérogènes, ayant la même organotropie, agissent en même temps, même si la structure chimique de ces substances est entièrement différente. Par contre, on n'observe pas de syncarcinogénèse entre une substance chimique et un agent physique (par exemple rayons X) ayant une organotropie différente. Ces études mettent donc bien en évidence la nécessité de tests biologiques à effectuer sur des modèles animaux représentant le mieux possible les conditions d'une éventuelle intoxication de l'homme.

Concernant les causes des cancers du système respiratoire chez l'homme, Hueper [4] en a dressé une liste exhaustive en même temps que décrit la forme et l'évolution anatomo-clinique des lésions provoquées par les divers agents chimiques et physiques susceptibles de se trouver dans l'environnement professionnel ou général, de même que les techniques de production expérimentales des tumeurs en question. Par ailleurs, Donatenwill [5], Weisburger et Weisburger [6] et plus récemment encore Saffiotti [7] ont pas-

sé en revue l'ensemble des méthodes expérimentales utilisées pour l'étude du cancer pulmonaire. Il semble qu'aucun de ces auteurs n'ait eu connaissance des travaux que *Happert et coll.* [8, 9, 10] ont consacré à l'étude comparative des cancers broncho-pulmonaires murins et humains et aux effets du goudron de tabac injecté directement dans le parenchyme pulmonaire de 3 races différentes de souris (fig. 1).

Après avoir étudié la méthode en question dans le laboratoire de l'auteur, nous avons entrepris une étude complémentaire de ses possibilités d'emploi pratique, surtout en raison

- a) de la très faible dose de cancérigène qui paraît nécessaire pour provoquer des tumeurs pulmonaires,
- b) de la relativement courte période de la-

tence entre la première injection et l'apparition d'un nombre suffisant de tumeurs pour les besoins statistiques,
d) de la simplicité technique de la méthode.

Matériel et méthodes

Animaux

Nous avons utilisé quatre lots de souris mâles de la race Swiss E/Nm âgées de six mois au début de l'expérience.

Produits chimiques

- 3,4-benzo(a)pyrène (Koch-Light)
- NaCl physiologique stérile (Hôpital cantonal universitaire de Lausanne)
- Carbowax 1500 (polyéthylène glycol, Union Carbide Corporation)

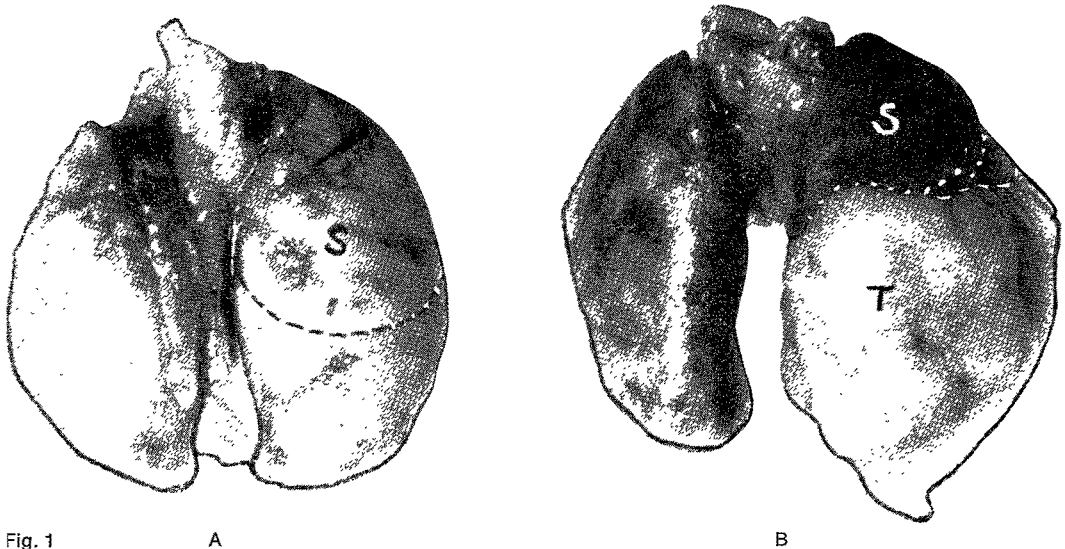


Fig. 1

A

B

A. Poumons normaux; le poumon gauche ne comporte qu'un seul lobe; le poumon droit est formé de 4 lobes: le lobe supérieur (S), le lobe moyen latéral, le lobe moyen médial non visibles sur la photo et le lobe inférieur.

B. Poumons avec tumeur généralisée (T) au lobe inférieur du poumon droit. Tous les autres lobes et le poumon gauche sont congestionnés par bronchopneumonie. Entre le lobe supérieur (S) du poumon droit et la tumeur, on voit une petite partie du lobe moyen latéral.

– Colorants et fixateurs pour l'histologie classique

Solutions injectables

Solution témoin: Carbowax 20 g
NaCl physiologique 100 ml
Solution 1: 3,4-benzo(a)pyrène 0,2 mg
solution témoin 1000 ml
Solution 2: 3,4-benzo(a)pyrène 0,1 mg
solution témoin 1000 ml

La stérilisation a été effectuée sur filtre millipore. Le choix de la dose de 3,4-benzo(a)pyrène a été déterminé par le fait que *Hapert* obtient des tumeurs avec une dose totale de condensat de fumée de cigarette correspondant à $\frac{1}{2}$ cigarette; en se reportant aux valeurs de 3,4-benzo(a)pyrène trouvées par l'un de nous [11] dans le condensat de 500 cigarettes, soit environ 6 μ g, on peut dire qu'une demi-cigarette contient approximativement 0,005 μ g de cette substance (ou 5 nanogrammes).

Méthode

Dans une *première série d'expériences*, on injecte à un lot de 30 souris 0,1 ml de la solution 1 par voie intrathoracique au niveau du quatrième espace intercostal droit, sur la ligne axillaire. Ces injections sont répétées toutes les semaines pendant 25 semaines, soit *au total 25 injections* en 6 mois environ. Chaque animal reçoit donc au total 2,5 ml de la solution 1.

Un deuxième lot de 30 souris reçoit pendant la même période et dans les mêmes conditions la solution témoin.

Dans une *deuxième série d'expériences*, on injecte à un troisième lot de 30 souris 0,1 ml de solution 2 par la même voie que dans la première expérience. On répète ces injections deux fois par semaine pendant 25 semaines. Chaque animal reçoit donc *au total 50 injections* en 6 mois avec la solution 2.

Un quatrième lot d'animaux reçoit pendant

la même période et dans les mêmes conditions la solution témoin (tableau 1).

Les animaux sont pesés par groupe deux fois par semaine (fig. 1). Ils ont été sacrifiés au début avril 1973, soit environ 10 mois après la première injection. Pour chaque souris, on prélève: foie, rate, rein, cœur, poumon et tout autre organe présentant des anomalies macroscopiques. Fixation: 48 heures au Bouin Hollande, deshydratation, inclusion à la paraffine, coupe et coloration à l'hématoxyline-éosine.

Résultats

Nos observations sur la mortalité en cours d'expérience, sur le nombre et le pourcentage global des tumeurs pulmonaires obtenues sont condensées dans le tableau 1.

On notera en complément des indications chiffrées de ce tableau que les animaux morts en cours d'expérience sont tous morts de complications consécutives à l'injection intrapulmonaire; d'une manière générale, la mort s'est manifestée subitement dans les minutes qui suivent l'injection, soit par suffocation (probablement consécutive à un état de choc provoqué par pneumothorax plutôt qu'à la suite d'une inondation alvéolaire), soit un peu plus tardivement par hémorragie.

Le nombre des tumeurs observées et les pourcentages donnés dans le tableau 1 concernent exclusivement les animaux restés vivants jusqu'au moment du sacrifice du collectif. On a donc ainsi exclu les animaux n'ayant pas reçu la dose totale de 3,4-benzo(a)pyrène.

Concernant les types histologiques des 17 tumeurs observées à la fin de l'expérience, ils se répartissent de la manière suivante:

13 épithéliomas alvéolaires,

3 épithéliomas bronchiques,

1 épithélioma à petites cellules.

Ces fréquences correspondent à celles qui

ont été observées par *Kourilsky et Happert* [8]. Il n'est pas sans intérêt de souligner par ailleurs que l'incidence des pneumonies au moment de l'autopsie des animaux injectés (60 avec 3,4-benzo(a)pyrène et 60 témoins) est de 8,3%. Chez les animaux témoins sans traitement, la fréquence des pneumonies est de 8,9%. On peut donc affirmer que l'injection intra-pulmonaire des solutions en question n'a pas aggravé l'incidence spontanée des inflammations bactériennes ou virales de la souche d'animaux durant la période considérée.

Enfin, les courbes de poids (fig. 2) démontrent que le 3,4-benzo(a)pyrène ne modifie pas sensiblement l'état général des animaux

comparativement à ceux qui n'en recevaient pas.

Discussion

La signification statistique des valeurs obtenues a été étudiée par le test de contingence 2×2 [12]. On notera que le test indique une différence non significative, bien que proche de la limite, entre les lots témoins et les lots traités par le 3,4-benzo(a)pyrène. On aurait pu atteindre et dépasser la limite de non-signification en disposant de quelques animaux supplémentaires en fin d'expérience, dans chaque lot, ce qui est démontré par le groupement de tous les témoins et de tous les animaux ayant reçu de la substance cancérigène en deux lots de 44 et 48 animaux respectivement (tableau 1). Ce regroupement des lots témoins et traités est justifié par le fait que tous les animaux considérés ont reçu finalement la même dose de cancérigène. En somme, ceci démontre qu'il est nécessaire de constituer au départ des lots de 50 animaux pour que la réponse du test en fin d'expérience puisse être estimée sur un nombre d'animaux suffisant pour l'analyse statistique.

En comparant nos résultats à ceux de *Happert et Engel* [10] (tableau 2), on constate que pour des doses de cancérigène et des périodes d'incubation sensiblement identiques, l'augmentation des tumeurs pulmonaires chez les animaux traités est également du même ordre de grandeur, ceci indépendamment de l'incidence spontanée différente des races utilisées. A cet égard d'ailleurs, *Happert et Engel* ont fait une démonstration entièrement superposable à celle-ci en étudiant le comportement de souris de race A, C₃H et Swiss R.

Conclusions

Nos recherches sur la cancérisation du poumon de la souris, par injection directe de 3,4-benzo[a]pyrène, dans le parenchyme pul-

Courbes de Poids

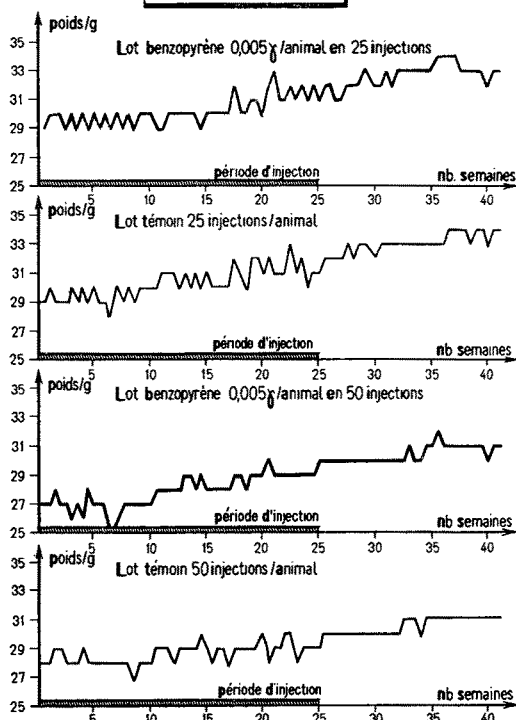


Tableau 1 Incidence des tumeurs pulmonaires chez la souris SWE après un temps d'exposition de 10 mois au 3,4-benzo(a)pyrène.

	nb	nb	mortalité		ca. pulm.		test contingence 2×2; p =
	inj.	anim.	nb	%	nb	%	
Bp 0,2‰	25	30	3	10	8/27	29,6	0,0786 ¹
témoins	25	30	5	17	2/25	8,0	
Bp 0,1‰	50	30	9	30	5/21	23,8	0,1855 ¹
témoins	50	30	11	37	1/19	5,3	
sans traitement	–				8/134	5,9	
Total Benzopyrène		48			13/48	27,1	0,0130 ²
Total témoins		44			3/44	6,8	

¹ Valeur de p pour laquelle la différence entre les deux lots considérés n'est pas significative.

² Valeur de p pour laquelle la différence entre les deux lots considérés est significative.

Tableau 2 Résultats comparatifs obtenus par Happert et nous-mêmes en fonction du temps d'exposition au benzo(a)pyrène et pour des doses sensiblement comparables.

Résultats de Happert			Nos Résultats	
Traitement	% de Tumeurs Pulmonaires		Traitement	% de Tumeurs Pulmonaires
Temps d'exposition	6 mois	12 mois		10 mois
sans traitement	13,3	–	sans traitement	5,9
témoin NaCl	17,3	–	–	–
A) témoins NaCIPEG	17,6	24,8	A) témoins NaCIPEG	6,8
B) goudron 1/2 cig.	50,7	76,1	B) 0,005 µg de Bp	27,1
rapport B/A	2,88	3,07	rapport B/A	3,99

monaire, selon la méthode utilisée par *Happert* et coll. pour la fumée du tabac, confirment entièrement les observations de ces auteurs. Elles permettent de conclure que cette méthode constitue un test simple (1 injection hebdomadaire) et sensible (10⁻⁹ g de 3,4-benzo(a)pyrène), de durée relativement courte (10 mois) pour les substances cancérigènes de la catégorie des hydrocarbures aromatiques polycycliques et par conséquent

pour une grande partie des polluants atmosphériques.

Zusammenfassung

Die Injektion von 3,4-Benzopyren direkt im Lungenparenchym bestätigt die Ergebnisse von Happert mit Tabakrauchkondensat. Diese Methode erwies sich als eine Testung der karzinogenen Wirkung von Substanzen wie polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen und

daher vielen Luftverunreinigungen. Dieser Test ist einfach (1 Injektion pro Woche), ziemlich kurzfristig (10 Monate) und empfindlich (10^{-9} g 3,4-Benzopyren).

Summary

Carcinogenic test, by direct injection of 3,4-benzopyren in the lung parenchym of mice, confirm Happert's and al. observations and constitute a simple (1 injection per week) and sensitive method (10^{-9} g 3,4-benzopyren). That relatively short term test (10 months) can be applied to carcinogens of the type of aromatic polycyclic hydrocarbons and therefore to a major part of atmospheric pollutants.

Bibliographie

- [1] Wynder E. L. and Hoffmann D.: Tobacco and Tobacco smoke. Academic Press, New York-London 1967.
- [2] Gellhorn A.: Cancer Res. 18, 510 (1958), cité in [1].
- [3] Schmähl D.: Experimentelle Untersuchungen zur «Synkarzinogenese». In: Krebsforschung u. Krebsbekämpfung, Bd. V. Urban & Schwarzenberg, München-Berlin, p. 127, 1964.
- [4] Hueper W. C.: Occupational and environmental cancers of the respiratory system. Recent Results in Cancer Research, vol. 3. Springer Verlag Berlin 1966.
- [5] Dontenwill W.: Experimentelle Untersuchungen zur Lungenkarzinomentstehung. In: Krebsforschung u. Krebsbekämpfung, Bd. V. Urban & Schwarzenberg, München-Berlin, p. 143, 1964.
- [6] Weisburger J. H. and Weisburger E. K.: Tests for chemical carcinogens. In: Methods in Cancer Research. Harris Busch, editor; Academic Press, New York, p. 307—398, 1967.
- [7] Saffiotti U.: Experimental Respiratory Tract Carcinogenesis. In: Progress in Tumor Research. Karger, Basel-New York, vol. 11, p. 302—333, 1969.
- [8] Kourilsky R. et Happert J.-L.: Comparaisons entre le cancer bronchopulmonaire provoqué chez la souris par le goudron de la fumée de cigarettes et le cancer humain. Bulletin du Cancer 51/2, 243—268 (1964).
- [9] Engel J. C.: Anatomie comparée et localisation du cancer bronchopulmonaire primitif chez l'homme et chez la souris. Thèse de la Faculté de médecine Pitié-Salpêtrière, Paris 1970.
- [10] Happert J.-L. et Engel J. C.: Le rôle nocif du tabac vu par l'expérimentateur. Revue de Tuberculose et de Pneumologie 36/2, 209—224 (1972).
- [11] Neukomm S.: Recherches expérimentales sur le pouvoir cancérigène de la fumée du tabac et d'autres polluants de l'atmosphère. Oncologia 10, 137 (1957).
- [12] Lison L.: Statistiques appliquées à la biologie expérimentale. Gauthier et Villars, Paris, p. 291, 1968.

Adresse des auteurs:

P. D. Dr S. Neukomm, Mlle. Ch. Yerly, Institut universitaire de Médecine sociale et préventive, Laboratoires de recherches expérimentales, Le Mont/Lausanne.