

MODE D'ACTION DES MYCOTOXINES

Yvonne Moulé

Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer, 94800-Villejuif, France

Abstract - The present paper is an attempt to review the hypothesis concerning the mechanism of the physiopathological effects induced by mycotoxins, in particular by the aflatoxins and PR toxin. We shall first examine to what extent the alterations produced on some metabolic pathways can explain the short term toxic effects. The problem of the long effects of aflatoxin B₁, i.e. the hepatocarcinogenic effects, will be discussed taking into account the results concerning the action of the mycotoxin on DNA and DNA repair.

INTRODUCTION

L'extraordinaire activité biologique de certaines mycotoxines, la diversité des effets physiopathologiques qu'elles déclenchent et la gravité des accidents qu'elles provoquent, suscitent un intérêt à double face. Sur le plan de la connaissance fondamentale, l'étude de leurs propriétés et de leur mécanisme d'action répond à une curiosité naturelle de l'esprit. Au niveau des problèmes pratiques, les recherches entreprises tendent à trouver des moyens pour remédier aux accidents dont elles sont la cause. En fait, les deux démarches sont assez souvent imbriquées.

Le but de cet exposé est d'examiner dans quelle mesure les résultats recueillis jusqu'ici permettent d'approcher le mode d'action des mycotoxines et de proposer, sinon une explication formelle, du moins des hypothèses qui rendent compte de leurs effets.

Nous limiterons cette mise au point à deux mycotoxines (aflatoxine B₁, PR toxine), d'une part pour éviter la dispersion, d'autre part parce que les informations dont on dispose à leur sujet autorise une telle tentative.

On distingue couramment les troubles pathologiques induits à court terme chez l'animal des effets à long terme. La première catégorie correspond essentiellement à des manifestations de toxicité aiguë ; en ce qui concerne ceux de la seconde catégorie, nous ne considérerons ici que la potentialité cancérogène. Nous adopterons cette distinction, arbitraire *a priori*, mais qui peut en fait recouvrir des lésions procédant de mécanismes différents. Elle permet de définir clairement les deux aspects du problème que nous examinerons successivement.

1. Parmi les lésions induites *in vivo* par les mycotoxines, quelles sont celles qui sont directement responsables de la mort de l'animal dans un délai relativement court ?
2. Peut-on mettre en évidence chez ces mycotoxines une propriété susceptible d'expliquer leur pouvoir cancérogène ?

MECANISME DE L'ACTION TOXIQUE DE L'AFLATOXINE B₁ ET DE LA PR TOXINE

Le premier stade de cette recherche consiste à observer les symptômes présentés par l'animal traité à la toxine et à pratiquer son autopsie. Un tel examen peut suggérer des hypothèses mais conduit rarement à la formulation d'un mécanisme.

La recherche de ce mécanisme utilise maintenant une méthodologie biochimique très élaborée qui permet l'étude des altérations induites par la mycotoxine au niveau de certains métabolismes. C'est un travail qui a été poussé très loin avec les aflatoxines (Réf. 1, 2 & 3). L'aflatoxine B₁ est un puissant inhibiteur de synthèse qui bloque *in vivo* la replication, la transcription et la traduction. Ces inhibitions sont rapides

et intenses ; elles sont encore décelables pour des doses correspondant au 1/20 de la DL₅₀ (Réf. 4). Ces perturbations se traduisent par des altérations de l'ultrastructure cellulaire : ségrégation nucléaire, polysomes en hélices, agrégation des grains interchromatiniens (Réf. 5 & 6).

Les investigations *in vivo* ont été complétées par la pratique de systèmes *in vitro* qui ont permis de définir le mécanisme moléculaire de ces inhibitions (Réf. 7 & 8).

Un nombre important d'informations ont été recueillies ; permettent-elles de définir le mécanisme du pouvoir toxique de l'aflatoxine B₁ ?

Il est bien sûr évident que les déviations métaboliques observées contribuent à établir un état pathologique chez l'animal et le fait que l'intensité des inhibitions observées est directement proportionnelle à la DL₅₀ des différentes aflatoxines soutient ce point de vue. Ainsi, il est possible que le pouvoir toxique soit la résultante de toutes ces perturbations, cependant il est tout aussi possible que la lésion qui peut entraîner la mort de l'animal, indépendamment de toutes les autres, reste à découvrir. L'état actuel des connaissances ne permet pas de trancher entre les deux hypothèses et c'est une réponse négative qui, selon nous, doit être donnée à la question posée.

Une telle conclusion s'étend à la PR toxine ; c'est aussi un inhibiteur de synthèse (résultats en cours de publication) qui possède, en outre, d'autres propriétés (propriétés immunodépressives par exemple).

Si les recherches biochimiques effectuées jusqu'ici n'ont pas permis de définir le mode d'action des deux mycotoxines, elles ont apporté des informations importantes concernant leur forme active et les variations de leur activité en fonction de différents facteurs.

On a ainsi montré que l'aflatoxine B₁ n'est pas active *per se* ; une transformation préalable de la molécule est indispensable pour obtenir le dérivé biologiquement actif (Réf. 9, 10 & 11). Cette transformation est accomplie par les enzymes qui métabolisent les drogues (terme pris dans le sens de "substances étrangères au métabolisme normal") en vue de leur élimination. Il y a là une situation quelque peu paradoxale : des processus dont la finalité est la détoxification de l'organisme, produisent au cours de réactions intermédiaires, le métabolite directement actif, doué de toxicité (et de cancérogénicité). L'existence de la double liaison en 2-3 du cycle bifurannique conditionne la toxicité (et le pouvoir cancérogène) ; ainsi les aflatoxines B₁ et G₁ sont toxiques et cancérogènes alors que B₂ et G₂ sont pratiquement dépourvus d'action (Réf. 12). Le métabolite actif n'a pas pu être isolé mais certains arguments laissent à penser qu'il s'agirait du 2-3 époxyaflatoxine (Réf. 13 & 14).

La PR toxine est directement active ; la métabolisation n'augmente pas sa capacité d'inhiber la transcription et la traduction (résultats non publiés). Des résultats récents obtenus dans notre laboratoire ont mis en évidence la sensibilité de l'activité de la PR toxine à l'action des sels en particulier aux sels d'ammonium. C'est ainsi qu'une concentration de 8 mM en sulfate d'ammonium supprime le pouvoir d'inhiber la transcription (Réf. 15), la traduction et la toxicité de la PR toxine pour la souris (résultats en cours de publication). Ceci montre que les trois propriétés sont gouvernées par une même structure chimique et que la capacité d'inhiber la synthèse des RNA ou des protéines est un indicateur valable de la toxicité. Sur un plan pratique, de tels résultats peuvent inspirer ceux qui recherchent des techniques de détoxification. L'autre point concerne le problème des sites actifs de la PR toxine. On peut isoler à partir des milieux de culture de *Penicillium roqueforti* des métabolites ayant la structure chimique éréthrophilane de la PR toxine mais présentant des variations au niveau des autres radicaux (Réf. 16). Nous avons observé au sein de cette série de composés de grandes variations d'activité biologique permettant de formuler les conclusions suivantes :

- il y a, ici encore, un parallélisme entre le pouvoir toxique et la capacité d'induire des altérations métaboliques
- la toxicité de la PR toxine semble exiger la présence du groupe aldéhyde.

MYCOTOXINES ET CANCEROGENICITE

Alors que l'on ignore encore la lésion cellulaire spécifiquement responsable de la cancérisation d'une cellule, on ne peut pas espérer définir le mécanisme du pouvoir cancérogène d'une mycotoxine. Nous poserons le problème en d'autres termes. Nous tenterons de voir si les mycotoxines cancérogènes possèdent une propriété pouvant rendre compte de leur cancérogénicité, ceci en fonction des hypothèses formulées actuellement. Cette analyse sera faite avec l'aflatoxine B₁ qui correspond au plus puissant des hépatocancérogènes connus à ce jour (on ne sait rien encore des effets à long terme de la PR toxine).

Si le mécanisme de la transformation maligne reste à élucider, chacun s'accorde à reconnaître qu'elle implique un événement moléculaire au niveau du DNA, se ralliant ainsi à l'hypothèse de la mutation somatique formulée par Boveri (Réf. 17). Cette position explique que les recherches se soient concentrées dans différents laboratoires sur les interactions entre l'aflatoxine B₁ et le DNA.

In vivo, on retrouve toujours une fraction de l'aflatoxine administrée liée aux macromolécules (DNA, RNA, protéines) de différents organes, en particulier du foie (Réf. 18). Les interactions de la mycotoxine avec le DNA et les nucléosides ont été étudiées *in vitro* : le complexe met en jeu des liaisons de faible énergie, le mécanisme de l'interaction est inconnu (Réf. 19).

Dans la mesure où l'aflatoxine n'est pas directement active, on peut s'interroger sur la signification physiologique de tels résultats. Les expériences où le DNA est mis en contact avec le métabolite actif, capté au moment de sa formation, nous semblent se rapprocher beaucoup plus des conditions réalisées *in vivo* ; de tels systèmes fonctionnent grâce à l'adjonction de microsomes de foie apportant les enzymes de conversion des drogues (Réf. 20). Les aflatoxines métabolisées se fixent au DNA en raison directe de leur indice de cancérogénicité et les sites qu'elles occupent pourraient être communs à d'autres cancérogènes (Réf. 21).

La fixation de l'aflatoxine au DNA provoque des altérations de la capacité de modèle du DNA (Réf. 22). Qui plus est, ces altérations peuvent entraîner ultérieurement l'introduction d'erreurs dues à un mauvais positionnement des bases dans le DNA synthétisé au cours de la replication suivante : il en résulte des modifications de la séquence des nucléotides du DNA, c'est-à-dire l'apparition de mutations. Or, on a démontré l'existence d'une corrélation hautement positive entre le pouvoir cancérogène et le pouvoir mutagène (Réf. 23).

La mutagénicité de l'aflatoxine B₁ a été clairement établie en systèmes *in vitro* et *in vivo* (Réf. 24). On peut penser que le pouvoir mutagène de la mycotoxine rend compte de son pouvoir cancérogène, en admettant qu'une des mutations induites a touché une région du génome responsable de la synthèse d'un facteur lié au contrôle de la division cellulaire. Cette hypothèse correspond à une première représentation des phénomènes.

Des recherches récentes permettent d'envisager une autre version de la suite des événements. On sait maintenant que le DNA lésé peut être réparé ; il existe différents systèmes enzymatiques (les réparases) qui ont comme fonction d'effacer les anomalies présentes et de redonner au DNA son intégrité structurale initiale. Toutefois, si certains de ces systèmes effectuent correctement la réparation (réparation fidèle), d'autres introduisent des erreurs au cours de leur travail (réparation infidèle) ; la mutagénèse qui en résulte n'est donc pas liée directement à l'interaction de la substance chimique avec le DNA mais à un effet secondaire résultant d'une réparation erronée de ce DNA (Réf. 25, 26, 27 & 28).

La mise en évidence de ces activités a été essentiellement faite sur des procaryotes. On a en particulier montré que le traitement de cultures d'*Escherichia coli* par les rayons ultraviolets induit dans la cellule bactérienne la synthèse d'un système de réparation infidèle (donc générateur de mutations) connu sous le nom de système SOS (Réf. 29). C'est ainsi que ce système peut réparer le DNA du phage λ traité par les rayons ultraviolets avant l'infection des cultures et augmenter la survie des phages lésés mais les phages formés dans ces conditions présentent un taux élevé de mutagénèse (Réf. 30 & 31).

Nous avons récemment montré que le traitement des bactéries par les métabolites actifs de l'aflatoxine B₁ étaient eux aussi capables de déclencher le signal de la dérégulation du système SOS dans la bactérie donc d'induire la synthèse d'enzymes de réparation entraînant une mutagénèse au cours de leur travail (Réf. 32).

Ainsi donc, si l'on admet que la cancérisation d'une cellule tient son origine d'une mutation spécifique qui va s'exprimer dans le clone constitué par les générations successives de cellules par l'apparition d'une tumeur maligne, on peut considérer que les propriétés mutagènes de l'aflatoxine B₁ pourraient rendre compte de ses propriétés cancérogènes (Réf. 33).

Qui plus est, pour la première fois, on vient de démontrer qu'un cancérogène chimique peut induire dans la bactérie, la synthèse d'un système de réparation infidèle. Ce fait a d'importantes implications. Si l'on pouvait montrer que d'autres cancérogènes chimiques partagent cette propriété et que les cellules d'eucaryotes possèdent potentiellement l'information pour l'équivalent du système SOS des bactéries, de nouvelles hypothèses sur les mécanismes de la cancérogénèse chimique pourraient être formulées.

REFERENCES

1. L.A. Goldblatt, *Aflatoxin*, Academic Press, New York (1969).
2. G.N. Wogan and R.S. Pong, *Ann. New York Acad. Sci.* 174, 623-635 (1970).
3. T.C. Campbell and J.R. Hayes, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 35, 199-222 (1976).
4. C. Lafarge and C. Frayssinet, *Int. J. Cancer* 6, 74-83 (1970).
5. W. Bernhard, C. Frayssinet, C. Lafarge et E. Le Breton, *C.R. Acad. Sci.* 26, 1785-1788 (1965).
6. A. Monneron, *Lab. Invest.* 20, 178-183 (1969).
7. Y. Moulé and C. Frayssinet, *FEBS Letters* 25, 52-56 (1972).
8. A. Sarasin and Y. Moulé, *Europ. J. Biochem.* 54, 329-340 (1975).
9. A.M.Q. King and B.H. Nicholson, *Biochem. J.* 104, 69-70 P (1969).
10. R.C. Garner, E.C. Miller and J.A. Miller, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 45, 774-780 (1971).
11. Y. Moulé and C. Frayssinet, *Studia Biophysica* 31/32, 45-51 (1972).
12. G.N. Wogan, G.S. Edwards and P.N. Newberne, *Cancer Res.* 31, 1936-1942 (1971).
13. D.H. Swenson, J.A. Miller and E.C. Miller, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 53, 1260-1267 (1973).
14. D.H. Swenson, E.C. Miller and J.A. Miller, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 60, 1036-1043 (1974).
15. Y. Moulé, M. Jemmali and N. Rousseau, *Chem.-Biol. Interactions* sous presse (1976).
16. S. Moreau, A. Gaudemer, A. Lablache-Carubier and J. Bignet, *Tetrahedron Letters* 11, 833-834 (1976).
17. T. Boveri, *The origin of malignant tumors*. Williams and Wilkins, Baltimore (1929).
18. W. Lijinsky, K.Y. Lee and C.H. Gallagher, *Cancer Res.* 30, 2280-2283 (1970).
19. S. Fujimoto and Y. Ohba, *J. Biochem.* 77, 187-195 (1975).
20. R.C. Garner, *Chem.-Biol. Interactions* 6, 125-129 (1973).
21. K. Alexandrov and C. Frayssinet, *Cancer Res.* 34, 3289-3295 (1974).
22. G.S. Edwards and G.N. Wogan, *Biochim. Biophys. Acta* 224, 597-607 (1970).
23. T. Sugimura, *Bull. Cancer UICC* 12, 1-2 (1974).
24. T.M. Ong, *Mutation Res.* 32, 35-53 (1975).
25. P.A. Cerutti, *Life Sciences* 15, 1567-1575 (1975).
26. B.S. Strauss, *Life Sciences* 15, 1665-1693 (1975).
27. A.R. Lehmann, *Life Sciences* 15, 2005-2016 (1975).
28. B.M. Sutherland, *Life Sciences* 16, 1-6 (1975).
29. M. Radman, *Molecular mechanisms for repair of DNA*, 355-367, Plenum Publishing, New York (1975).
30. J.J. Weigle, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 39, 628-636 (1953).
31. J. George, R. Devoret and M. Radman, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 71, 144-147 (1974).
32. A. Sarasin, A. Goze, R. Devoret and Y. Moulé, *Mutation Res.* sous presse (1976).
33. J.E. Trosko and E.H.Y. Chu, *Adv. Cancer Res.* 21, 391-425 (1975).