



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université des Sciences et de la Technologie d'Oran Mohamed Boudiaf
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Génétique Moléculaire Appliquée



Polycopié de cours de Génotoxicologie

Destiné aux étudiants de la 3^{ème} année Licence

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Génétique

Préparé par :

Dr. DJILALI-DOULA Fatima

Maitre de conférences B

Année universitaire 2022/2023

On fait la science avec des faits comme une maison avec des pierres :

Mais une accumulation de faits n'est pas plus une science

Qu'un tas de pierres n'est une maison.

Henri Poincaré.

DEDICACES

A Mon mari ;

Et mes enfants ;

A toi Pr MEROUFEL DJABARIA NAIMA.

Avant-propos

Ce polycopié est le support de cours de la matière Génotoxicologie destiné aux étudiants de la troisième année licence académique en Génétique (unité d'enseignement méthodologie, Coefficient : 2, Crédits : 4). Ce cours présente un volume horaire semestriel de 55 heures pour 15 semaines d'enseignements et un volume horaire hebdomadaire de 1 heure 30 minutes de cours et 1 heure 30 minutes de travaux dirigés.

Pour bien assimiler cet enseignement, certaines connaissances préalables sont recommandées telles que certaines notions de biologie cellulaire, de biologie moléculaire et de génétique (programme de la 2^{ème} année Licence). Le mode d'évaluation de cette matière est par contrôles continus ainsi que des exposés présentés oralement par les étudiants et examen semestriel.

Ce cours de génotoxicologie traite les effets des xénobiotiques sur la molécule d'ADN, les perturbations causés sur l'organisme et les différentes pathologies engendrées. Dans le cadre de cet enseignement, nous proposons aux étudiants une méthodologie de transfert de la génotoxicologie à une forme particulière de biosurveillance consistant à évaluer la mutagénicité de substances biologiques, d'une part, et d'autre part à rechercher des lésions primaires de l'ADN, voire des mutations géniques ou chromosomique en relation avec une exposition professionnelle.

Résumé

Il est bien établi que l'ADN représente le support moléculaire biologique porteur de l'information génétique de la plupart des êtres vivants, à l'exception notable des virus à ARN. La génotoxicité, appelée également toxicité génétique, représente la capacité de certains agents physiques, chimiques, ou biologiques, à provoquer l'apparition de dommages à l'ADN pouvant conduire à des mutations irréversibles du matériel génétique si ces lésions ne sont pas réparées. Le présent document a pour but de traiter les effets des xénobiotiques sur l'ADN, les perturbations causés sur l'organisme et les différentes pathologies engendrées ; essentiellement la cancérogénèse et la tératogénèse. L'étudiant sera capable par la suite de décrire les mécanismes de restauration de l'intégrité du génome. L'étude des altérations du patrimoine génétique nous rend capables de détecter les interactions de l'ADN avec divers agents génotoxiques, et de caractériser les lésions induites sur l'ADN. Ce polycopié présente les principaux aspects de la génotoxicologie, des notions de pharmacogénétique, les mécanismes de formation des lésions de l'ADN ainsi les systèmes de réparation de l'ADN. Les relations entre génotoxicité et cancérogénicité sont également examinées. Ce polycopié de cours de génotoxicologie est structuré en 9 chapitres. Le premier chapitre donne des notions sur la toxicologie, il s'articule autour de 3 volets : le premier volet présente les molécules xénobiotiques, le deuxième explique les étapes de transformation des molécules xénobiotiques tandis que le troisième volet présente les méthodes expérimentales d'évaluation de la toxicité. Les chapitres suivants traitent successivement la Pharmacogénétique, les Mutagènes, les Systèmes de réparation de l'ADN, les Conséquences et effets génétiques des mutagènes et de la réparation, la Reprogrammation de l'information génétique sous l'effet de la production de lésions de l'ADN, la Cancérogénèse et Tératogénèse et se terminent par des Notions sur la stratégie, la législation des produits mutagènes et la sécurité au laboratoire suivie par les références bibliographiques.

Mots clés : pharmacogénétique, cancérogénèse, tératogénèse, systèmes de réparation de l'ADN.

Abréviations

ADME :	Absorption, Distribution, Métabolisation, Excrétion.	hMSH2 :	human MutS protein Homolog 2.
ADN :	Acide Désoxyribonucléique	hMSH6 :	human MutS protein Homolog 6
ARN :	Acide désoxyribonucléique	IM :	Indice de Métabolisation
Art. :	Article	l :	litre
AT :	Ataxia Telangiectasia	m³ :	mètre cube
ATM :	Ataxia Telangiectasia mutataed	mg :	milligramme
ATP :	Adénosine triphosphate	min :	minute
BER :	Base Excision Repair	MMR :	Mismatch Repair
BET :	Bromure d'éthidium	MSI :	Instabilité des microsatellites.
BET :	Bromure d'éthidium	NER :	Nucleotide Excision Repair
BRCA1 :	Brest cancer susceptibility gene 1	NHEJ :	Non-Homologous End Joining
BRCA2 :	Brest cancer susceptibility gene 2	Rh :	Rhésus
CHEK2 :	Checkpoint kinase 2	ROS :	Reactive Oxygen Species
CDB :	cassure double brins	RX :	Rayonnement X
CETH :	concentration équivalente en toxicité humaine	SNP :	Single Nucleotide Polymorphisms
CL50 :	concentration létale 50	TCR :	Transcription-Coupled repair
CYP450s :	cytochromes P450	TMPT :	Thiopurine S-MéthylTransférase
DL100 :	Dose Létale 100	UV :	Rayonnement ultraviolet
DL50 :	Dose Létale 50	OR :	Odds ratio
DSB :	Double Strand Break	P53 :	Protéine 53
EMTX :	Enzymes du métabolisme et des transporteurs des xénobiotiques.	PMS2 :	Postmeiotic Segregation increased 2
ex :	Exemple	pRb :	Protéine du Rétinoblastome.
FGF 1 :	Fibroblast Growth Factor 1	RH :	Recombinaison Homologue
GGR :	Global Genome Repair	% :	pourcentage
His :	histidine	5-BU :	5-bromouracile
hMLH1 :	human MutL Homolog 1		

Liste des figures

Figure 1 : Illustration de la génotoxicité induite par les xénobiotiques (PHARMACOMédicale.org) .	6
Figure 2 : Illustration du mode d'action des toxiques : Principales phases.	13
Figure 3 : Les trois principales voies de pénétrations des toxiques dans l'organisme (CHAVERON, 1999).	14
Figure 4 : Les différentes étapes de la toxicocinétique (CHAVERON, 1999).	15
Figure 5 : Filtration à travers les pores membranaires (CHAVERON, 1999).	18
Figure 6 : Les phases de la biotransformation des xénobiotiques (PHARMACOMédicale.org).	20
Figure 7 : Illustration des 2 phases de la biotransformation des xénobiotiques	21
Figure 8 : Réaction de phase I par les cyp450 (PHARMACOMédicale.org).	22
Figure 9 : Variations en fonction du temps des concentrations sanguines de molécules facilement excrétables et de molécules subissant une forte rétention (CHAVERON, 1999).	24
Figure 10 : Excrétion rénale par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire active (PHARMACOMédicale.org).	25
Figure 11 : Le cycle entéro-hépatique (PHARMACOMédicale.org).	26
Figure 12 : La phase toxicodynamie (PHARMACOMédicale.org).	27
Figure 13 : Test de la mesure de l'activité cancérogénique (CHAVERON, 1999).	30
Figure 14 : Variabilité des concentrations d'un médicament chez des sujets sains (MELET, 2004).	40
Figure 15 : Présentation classique des enzymes de phase I et de phase II du métabolisme (KALOW, 1992).	42
Figure 16 : Exemples d'enzymes métabolisant les médicaments (KALOW, 1992).	42
Figure 17 : Structure primaire du cytochrome P450 3A4 (WILLIAMS et al., 2004 ; YANO et al., 2004). L'hème est représenté par des bâtons rouges.	44
Figure 18 : Gène de la TPMT. Allèle sauvage et principales mutations (THERVET, 2000).	50
Figure 19 : Représentation schématique des voies métaboliques de l'Aza et de la MP (THERVET, 2000).	51
Figure 20 : La mesure de l'activité enzymatique de la TPMT (WEINSHILBOUM, 2003).	52
Figure 21 : Effet du génotype CYP2C19 sur la pharmacocinétique de l'oméprazole (PHARMACOMédicale.org).	52
Figure 22 : Effet du génotype CYP2C19 et réponse à un traitement par oméprazole (guérison de l'ulcère gastro duodénal) (PHARMACOMédicale.org).	53
Figure 23 : Un photon UV provoque une mutation dans l'ADN.	57
Figure 24 : (a) La thymine et son analogue structural ; (b) Schéma de substitution de base par le 5-bromoUracile. (Traduit de l'anglais) (CUMMINGS, 2006).	59
Figure 25 : Intercalation de l'acridine orange dans de l'ADN (traduit de l'anglais) (GRIFFITH et al., 2012).	59
Figure 26 : Effets des dommages causés par les ROS sur la cellule (traduit de l'anglais) (MATES et al., 1999).	60
Figure 27 : Différents types de lésions de l'ADN selon la source du dommage et principaux mécanismes de réparation correspondants (KHALIFA et al., 2012).	68
Figure 28 : Les formes tautomères des bases azotées de l'ADN et l'apparition des mésappariements (HOUSSET & RAISONNIER, 2010).	71
Figure 29 : Les différentes étapes de réparation pour le mécanisme du MMR (HOEIJMARKERS, 2001).	72
Figure 30 : Les différentes étapes de réparation de l'ADN par le système NER (HOUSSET & RAISONNIER, 2010).	73
Figure 31 : Réparation de l'ADN par excision de base (HOUSSET & RAISONNIER, 2010).	74

Figure 32 : Les voies de réparation des cassures double-brin de l'ADN. Modifiée de (JASIN and ROTHSTEIN, 2013) (PAUTY, 2015)	75
Figure 33 : La formation des cassures doubles brin de l'ADN (PAUTY, 2015)	76
Figure 34 : Réponse SOS (DA Re & PLOY, 2012)	77
Figure 35 : Représentation de la déficience à l'état hétérozygote (formation d'une boucle).	83
Figure 36 : Hématies d'un individu atteint de drépanocytose.	84
Figure 37 : Les deux voies principales de l'apoptose (DELMAS, 2014)	91
Figure 38 : Le cycle de division (MEIJER, 2003)	93
Figure 39 : Les phases et les événements majeurs du cycle de division cellulaire (MEIJER, 2003) . ..	93
Figure 40 : Les CDKs contrôlent le cycle cellulaire (MEIJER, 2003)	94
Figure 41 : Le contrôle de l'état de l'ADN et blocage en G1 ou en G2 (MEIJER, 2003)	95
Figure 42 : Fonctions de p53 dans la réponse à l'endommagement de l'ADN (MEIJER, 2003)	96
Figure 43 : Représentation schématique du processus du maintien de l'intégrité du génome (https://www.fondation-arc.org/cancer/quest-ce-quun-cancer)	102
Figure 44 : Illustration du déséquilibre entre les 2 familles de gènes contrôlant le cycle cellulaire (Proto-oncogènes et Suppresseurs de tumeurs)	105
Figure 45 : Illustration du processus multi-étapes de la transformation néoplasique.	106
Figure 46 : Illustration de l'évolution de la cellule cancéreuse vers des métastases.	106
Figure 47 : Les caractéristiques principales du cancer (HANAHAN et WEINBERG, 2000)	107
Figure 48 : Bébé de thalidomide (Source : Internet : https://www.alamyimages.fr/photos-images/bébé-thalidomide.html?sortBy=relevant)	112
Figure 49 : Exemple d'affiche informative.	113
Figure 50 : Périodes critiques du développement embryonnaire et fœtal (Source : Intérêt de la consultation préconceptionnelle, 2008)	116
Figure 51 : Les 9 pictogrammes du danger.	126

Liste des tableaux

Tableau 1: Les différentes classe de toxicité: (Echelle de HODGE et STENER, 1943).....	32
Tableau 2: Schémas des aberrations chromosomiques et chromatidiques (LEONARD, 1990).....	58

Sommaire

Avant-propos

Résumé

Abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

I. Introduction Générale.....	1
CHAPITRE I : Notion sur la toxicologie.....	2
VOLET 1 : Molécules xénobiotiques.....	3
I. Introduction :	4
II. Modes d'action des toxiques :	5
III. Molécules xénobiotiques :	7
III.1. Les organes cibles :	8
IV. L'effet toxique :	8
IV.1. Facteurs influençant les effets toxiques :	8
V. Nature des produits chimiques : (Un produit peut avoir plusieurs effets à la fois)	9
VI. Les différentes formes de toxicité :	9
VI. 1. La réversibilité et l'irréversibilité :	9
VI. 2. Toxicité directe et indirecte :	10
VI.3. La toxicité peut avoir également un effet aiguë, sub-aiguë ou à long terme :	10
VII. Toxicité aiguë et DL50/DL100 :	12
CHAPITRE I : Notion sur la toxicologie.....	13
VOLET 2 : Les étapes de transformation des molécules xénobiotiques.....	13
I. Généralités :	13
II. Etapes de transformation des molécules xénobiotiques :	14
II.1. La phase d'exposition au toxique :	14
II.2. La phase toxicocinétique :	14
II.III. La phase toxicodynamique :	26
II.III.1. Les cibles des entités toxicodisponibles :	27
CHAPITRE I : Notion sur la toxicologie.....	28
VOLET 3 : Méthodes expérimentales d'évaluation de la toxicité.....	28
I. Généralités :	28
II. Objectif des études toxicologiques :	28
III. Evaluation de la toxicité :	28
III. 1. Evaluation des effets des substances toxiques en laboratoire :	29
IV. Méthodes expérimentales d'évaluation de la toxicité :	29
V. Interprétation des résultats des tests :	31
V.1.2. Intérêt de calcul de la dl50 :	32

V1.3. Limites de la DL50 :	32
V.1.4. Exploitation des resultats :	32
V.1.4. Problèmes d'extrapolation :	33
V.2. Toxicité et innocuité :	33
V.3. Limites des tests toxicologiques :	33
VI. Les alternatives aux tests de toxicité sur animaux :	33
VI.1. Les études <i>in-vitro</i> :	33
VI.1.1 Les avantages des cultures de cellules humaines pour prévoir la toxicité :	33
VI.2. Les alternatives aux tests d'irritabilité :	34
CHAPITRE II : Pharmacogénétique.....	35
I. Problématique :	36
II. Généralités :	36
III. La Pharmacogénétique :	36
III.1. Différents facteurs expliquent en partie cette variabilité interindividuelle :	37
III.2. But de la pharmacogénétique :	38
III.3. Etapes nécessaires à une étude pharmacogénétique :	38
IV. Influence de la variabilité d'origine génétique du métabolisme des médicaments :	38
V. Variations interindividuelles aux réponses aux médicaments associées aux polymorphismes génétiques :	39
V.1. Polymorphisme génétique :	39
V.2. Conséquences cliniques du polymorphisme génétique :	40
VI. Distribution tri-modale des individus :	41
VI.1. Les enzymes métabolisant les xénobiotiques ou les médicaments :	41
VII. Les cytochromes p450 :	42
VII.1. Un bref historique :	43
VII.3. Fonctions des cytochromes P450 :	44
VII.4. Nomenclature des cytochromes P450 :	45
VII.5. Polymorphisme génétique des CYP450 :	45
VII.8. Les polymorphismes autres que le P450 :	45
VIII. Moyens d'investigation du polymorphisme génétique :	46
VIII.1. Méthodes de détermination du phénotype :	46
IX. Mécanismes moléculaires du polymorphisme génétique :	47
X. Conséquences cliniques du polymorphisme génétique du métabolisme d'oxydation :	47
X1. Métaboliseurs lents :	47
X.2. Métaboliseurs ultra rapides :	48
XI. Quelques exemples de polymorphismes des cytochromes P450 :	48
XI.1. Exemple de l'isoniazide :	49
XI.2. Exemple de la Thiopurine S-MéthylTransférase (TMPT) :	49

XI.2.1. Conséquences du polymorphisme :	51
XI.2.2. Toxicité clinique :	51
XI.3. Exemple de l'oméprazole métabolisé par le CYP2C19 :	52
XII. P450, réponse individuelle aux xénobiotique et thérapie personnalisée :	53
CHAPITRE III : Les Mutagènes.....	54
I. Intorduction :	56
II. Mutations et mutagènes :	56
III. Aberrations chromosomiques et chromatidiques :	57
IV. Les mutations geniques :	58
IV.1. Remplacement d'une base par un analogue structural :	58
IV.2. Agents intercalants :	59
IV.3. Rayons ultraviolets :	60
IV.4. Agents alkylants :	61
V. Tests d'évaluation de la génotoxicité :	61
V.1. Test de Ames :	62
V.2. Test des comètes :	62
V.3. Test des aberrations chromosomiques :	62
VI. Types d'agents mutagènes :	63
CHAPITRE IV : Systèmes de réparation de l'ADN.....	64
I. Généralités :	67
II. Les facteurs de risque :	68
III. Conséquences des lésios de l'ADN :	68
IV. Les systèmes de réparation de l'ADN :	69
IV.1. Voie de réparation par réversion : réparation des lésions ponctuelles :	70
IV.2. Voie de réparation des bases mal appariées (MMR, Mismatch Repair) :	70
IV.3. Voie de réparation des nucléotides modifiés (NER, Nucleotide Excision Repair) :	72
IV.3.1 Global Genome repair ou GGR :	73
IV.3.2 Transcription-Coupled Repair ou TCR :	73
V. Voie de réparation des bases modifiées (BER, Base Excision Repair) :	73
V. Voie de réparation des cassures des deux brins de l'ADN, (DSB, Double Strand Break) :	74
VI. Système SOS :	76
CHAPITRE V : Conséquences et effets génétiques des mutagènes et de la réparation : effets sur les chromosomes et sur les gènes.....	77
I. Introduction :	79
II. Conséquences et effets génétiques des mutagènes sur les chromosomes et sur les gènes :	79
II.1. Les effets des mutations sur la régulation des gènes : les mutations des séquences régulatrices.	79
II.2. Les effets des Déficiences ou délétions :	82

II.3. Les effets des mutations sur le phénotype :.....	83
III. Conséquences et effets génétiques des déficits de la réparation de l'ADN sur les chromosomes et sur les gènes :.....	85
III.1. Les conséquences d'un défaut de réparation des CDBs :	85
III.2. Les conséquences d'un défaut de réparation du NER :	87
III.3. Les conséquences d'un défaut de réparation de BER :	87
III.4. Les conséquences d'un défaut de réparation de MMR :.....	88
CHAPITRE VI : Reprogrammation de l'information génétique sous l'effet de la production de lésions de l'ADN, apoptose et cycle cellulaire.....	89
I. Introduction :	90
II. . Apoptose et dommage à l'ADN :.....	90
II.1. L'implication de l'apoptose dans le contrôle du processus néoplasique :	91
II.2. p53 et l'apoptose :	92
III. . Cycle cellulaire :	93
III.1 Point de contrôle du cycle cellulaire :	94
III.2. La réponse cellulaire suite à un dommage à l'ADN :.....	95
III.3. La gardienne du génome p53 et régulation du cycle cellulaire :.....	95
III.4. Activités oncosuppressives de la protéine p53 :.....	96
III.5. p53 et la réparation de l'ADN :.....	97
III. 6. Réversion génétique suite à un dommage à l'ADN :	97
III.7. Variation allélique dans les gènes de la DDR (DNA damage response) :.....	97
CHAPITRE VII : Cancérogénèse.....	98
I. Introduction :	100
II. La cellule cancéreuse :	100
III. Relation mutation – cancer	101
IV. Théories du développement du Cancer :	102
V. Oncogènes, gènes suppresseurs de tumeur et cancers :.....	104
V.1. Proto-oncogenes/oncogenes :.....	104
V.2. Les gènes suppresseurs de tumeurs :	104
VI. Le processus multi-étapes des cancers :	105
VII. Les évènements cellulaires impliqués dans le développement tumoral :.....	106
VIII. Instabilité génomique et cancers :	107
CHAPITRE VIII : Tératogénèse.....	123
I. Définition.....	110
II. Fréquence des malformations congénitales :	110
III. Les facteurs tératogènes :	110
III.1. Les facteurs tératogènes externes :.....	111
III.1.2. Facteurs physiques :	111

III.1.3. Les facteurs biologiques :	111
III.1.4. Médicaments :	111
III.1.5. Facteurs toxiques :	112
III.1.6. Dose tératogène :	113
III.2. les facteurs internes, endogènes ou génomiques :	114
III.2.1. Sensibilité génétique :	114
III.2.2. Sensibilité spécifique de l'embryon :	114
III.2.3. Facteurs immunologiques :	114
III.2.4. Facteurs génétiques :	114
IV. Les périodes de sensibilité aux agents tératogènes :	115
IV.1. La période dite d'insensibilité tératogénique : (période du tout ou rien)	115
IV.2. La période de grande sensibilité tératogénique :	115
IV.3. La période de sensibilité tératogénique modérée :	116
V. L'effet tératogène dépend étroitement de plusieurs facteurs :	116
VI. Relation mutagenèse et tératogenèse :	117
VI.1. Les types de mutations :	117
VI.2. Origine des mutations :	118
CHAPITRE IX : Notions sur la stratégie, la législation des produits mutagènes et la sécurité au laboratoire (étude de cas).....	119
I. Généralités :	120
II. Travail en laboratoire et risques pour la sante :	120
III. Accidents et effets aigus sur la santé :	121
IV. Travail en laboratoire et effets chroniques sur la santé :	122
V. Travail en laboratoire et risque cancérologène :	122
V.1. Cancers cérébraux :	123
V.2. Cancers du sein :	123
V.3. Cancers cutanés :	123
V.4. Cancers hématopoïétiques :	124
VI. Travail en laboratoire et fonction de reproduction :	124
VII. Classification des substances mutagènes :	125
VII.1. Etiquetage des substances mutagènes :	126
VII.2. Les bonnes pratiques de laboratoire :	126
VII.3. Analyse des risques :	127
VII.4. Mesures de prévention :	127
VIII. Législation :	127
VIII.1. Les textes réglementaires :	128
IX. Etude de cas : le BET	129
Références bibliographiques :	131

Contenu de la matière selon le canevas de mise en conformité :

I-Notion sur la toxicologie :

- Molécules xénobiotiques.
- Etapes de transformation des molécules xénobiotiques.

II- Pharmacogénétique :

- Définition.
- Variations interindividuelles aux réponses aux médicaments associées aux polymorphismes génétiques.

II- Mutagènes.

III- Systèmes de réparation de l'ADN :

- Par réversion : réparation des lésions ponctuelles.
- Voie de réparation des bases mal appariées (MMR, Mismatch Repair).
- Voie de réparation des nucléotides modifiés (NER, Nucleotide Excision Repair).
- Voie de réparation des bases modifiées (BER, Base Excision Repair).
- Voie de réparation des cassures des deux brins de l'ADN, (DSB, Double Strand Break).
- Système SOS.

V- Conséquences et effets génétiques des mutagènes et de la réparation : effets sur les chromosomes et sur les gènes.

VI- Reprogrammation de l'information génétique sous l'effet de la production de lésions de l'ADN, apoptose et cycle cellulaire.

VII- Cancérogénèse :

- Relation mutation – cancer.
- Théories du développement du Cancer.

VIII- Tératogénèse

- Définition.
- Différentes types de malformations observés pendant la vie fœtale.

IX- Notions sur la stratégie, la législation des produits mutagènes et la sécurité au laboratoire (étude de cas).

Mode d'évaluation :

Contrôle continu, exposés et Examen semestriel.

I. Introduction Générale

Il est bien établi que l'ADN représente le support moléculaire biologique porteur de l'information génétique de la plupart des êtres vivants, à l'exception notable des virus à ARN. Cette macromolécule doit donc être extraordinairement stable afin que soit maintenu le haut degré de fidélité du patrimoine génétique.

Cependant, la structure primaire de la molécule d'ADN, c'est-à-dire la séquence des bases nucléotidiques, est une structure dynamique sujette à de constants changements. Par exemple, la transposition de gènes, l'altération de bases ou de nucléotides sont des phénomènes bien connus au niveau des cellules procaryotes et eucaryotes. Ces variations sont consécutives, d'une part à des erreurs spontanées, d'autre part à des lésions de l'ADN induites par des agents physiques ou chimiques qualifiés de génotoxiques.

Il est également apparu que la survenue de mutations au niveau des cellules somatiques induit l'initiation d'un processus carcinogénique. Au niveau germinale, les mutations peuvent induire des infertilités ou se transmettre à la descendance. Dès lors, le domaine de la toxicologie génétique s'est révélé être essentiel puisque la détermination des facteurs environnementaux susceptibles d'interagir, directement ou non, avec le patrimoine génétique des cellules est devenue nécessaire dans le cadre de la prévention des risques cancérogènes et de la toxicité vis-à-vis de la reproduction.

La génotoxicologie consiste en la mise en évidence du potentiel toxique des agents physiques ou chimiques vis-à-vis de l'ADN et à identifier les mécanismes mis en jeu en distinguant notamment les lésions primaires de l'ADN, les actions mutagènes, clastogènes et aneugènes. La caractérisation de ces dangers permet alors une évaluation du risque selon les caractéristiques de l'exposition (traitement médicamenteux, exposition accidentelle, ...) et les tissus cibles concernés. Elle est avant tout destinée à prévenir les risques de cancers, d'altérations génétiques transmissibles, voire d'infertilité.

Ainsi, la Génotoxicologie a pour objectifs : la détermination et l'application des notions de biosécurité au laboratoire, l'identification des agents génotoxiques et la détermination des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les phases de bioactivation, d'interaction avec l'ADN, de réparation des lésions primaires, et l'évaluation des conséquences initiales de ces lésions.

L'étude de la Génotoxicologie permet de proposer un certain nombre de tests de génotoxicité permettant de déceler les lésions primaires de l'ADN (tests des comètes, détection des adduits...), les mutations géniques (test d'Ames), chromosomiques et génomiques (test des micronoyaux). La toxico-génétique permet par ailleurs la surveillance biologique des expositions professionnelles à des environnements potentiellement cancérigènes en appliquant des stratégies incluant des tests de génotoxicité et par conséquent elle permet d'initier à certaines actions de prévention des cancers professionnels afin d'optimiser les actions de prévention

CHAPITRE I : Notion sur la toxicologie

CHAPITRE I : Notion sur la toxicologie.

VOLET 1 : Molécules xénobiotiques.

« **Tout est poison et rien n'est sans poison ; la dose seule fait que quelque chose n'est pas un poison.** » *Paracelse*, (1493-1541)

I. Introduction :

La toxicologie est depuis longtemps reconnue comme étant la science des poisons. Elle étudie les effets nocifs des substances chimiques sur les organismes vivants. Elle fait appel à une multitude de connaissances scientifiques :

- **Biologiques** : Pour mettre en évidence les désordres et les modifications de chimisme de l'organisme ;
- **Pharmacodynamiques** : pour expliquer les processus intimes des modes d'action des différents toxiques ;
- **Chimiques analytiques et physiques** : pour la mise en évidence des toxiques.

L'objectif essentiel des études toxicologiques est la recherche qualitative et/ou quantitative des toxiques, principalement dans les milieux biologiques, l'environnement, les denrées alimentaires, dans des produits susceptibles d'entrer en contact avec les êtres vivants (par exemple : les médicaments, les cosmétiques, les pesticides, les émanations gazeuses de déchets organiques ou industriels, les suspensions radio-actives, les eaux polluées, etc ...

D'une manière globale, la **toxicologie** s'intéresse particulièrement à l'identification du danger et à l'analyse du risque lié à l'exposition des organismes vivants aux xénobiotiques. Elle développe et utilise des modèles expérimentaux moléculaires, cellulaires et intégrés ainsi que des modèles bio-informatiques. Son but ultime est de définir la sécurité sanitaire des populations.

La **toxicité** est la capacité intrinsèque des substances chimiques à provoquer un dysfonctionnement au niveau cellulaire, moléculaire, organique. C'est la capacité d'un agent à

avoir un effet nocif sur un organisme. La toxicité peut se manifester de façon cancéreuse, agir sur les voies sanguines, dégrader le système immunitaire ou les fonctions reproductrices.

II. Modes d'action des toxiques :

Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la toxicité des xénobiotiques. Certains de ces mécanismes se rapportent au métabolisme ; en effet, l'organisme est capable de former un composé plus toxique que le produit ingéré, le métabolite formé pouvant être à l'origine d'altérations, nécrose ou cancer. Le composé toxique peut aussi intervenir sur des protéines essentielles, comme l'hémoglobine, inhibant sa fonction normale, le transport de l'oxygène, ou inhiber un certain nombre d'enzymes essentielles à la dégradation de composés endogènes. Au contraire, des substances comme l'alcool, peuvent induire des réactions enzymatiques, augmentant la quantité de composés toxiques formés, il en est de même des composés du tabac.

Les mécanismes de toxicité sont souvent dépendants du mode d'exposition (exposition élevée de type accidentel, exposition répétée à faible dose). La toxicité peut s'exprimer à différents niveaux d'organisation biologique. La lésion peut être évaluée à l'échelle :

- de l'individu (une plante, un animal, une personne) ;
- de l'organe ;
- de la cellule ou de la molécule.

Par système, la toxicité peut affecter les systèmes ou appareils immunitaire, respiratoire, cardio-vasculaire, rénal, endocrinien, digestif, musculo-squelettique, sanguin, reproducteur et nerveux central. Les principaux organes sont le foie, les reins, les poumons, le cerveau, la peau, les yeux, le cœur, les testicules et les ovaires. Au niveau **cellulaire** ou biochimique, les effets nocifs peuvent perturber le métabolisme protéique normal ou les récepteurs endocriniens, inhiber le métabolisme énergétique ou encore entraver ou favoriser l'induction enzymatique des xénobiotiques (substances étrangères). Au niveau **moléculaire**, ils peuvent perturber la transcription ADN-ARN ou la liaison à des récepteurs spécifiques cytoplasmiques et nucléaires, ou encore causer des lésions au niveau des gènes ou de leurs produits. Finalement, le dysfonctionnement d'un organe essentiel a de fortes chances d'être la conséquence d'une lésion moléculaire dans une cellule cible particulière de cet organe.

Le mode d'action défini par **RAND et ses collaborateurs (1995)** comme une série commune d'effets physiologiques et de comportement peut caractériser un type de réponse biologique néfaste. Il se réfère donc aux effets pathologiques qui peuvent être observés au

niveau de l'organisme entier. Plusieurs définitions ont été proposées pour le mécanisme d'action, toutefois, pour plusieurs applications, il se réfère à une cible biochimique ou une voie biochimique affectée. Il fait donc référence à l'interaction moléculaire qu'une molécule subira et qui sera le point de départ clé de la voie des effets indésirables pour cette substance, c'est-à-dire l'événement d'initiation moléculaire.

Les toxiques provoquent chez les êtres vivants des altérations que l'on peut regrouper en :

- 1) **Effets somatiques** (altération des fonctions végétatives) telles que :
 - **Neurotoxicité** : c'est le cas de nombreux insecticides qui agissent au niveau des zones de contact entre cellules nerveuses (synapses) ;
 - **La fonction respiratoire** : l'arsenic, les cyanures sont des inhibiteurs d'enzymes de la respiration cellulaire ;
 - **Les fonctions détoxifiantes** : les organes touchés sont le foie, les reins... (en liaison avec l'activité des cytochromes P450).
- 2) **Effets germinaux** (altération des fonctions reproductrices ou de la descendance) :
 - Stérilisation ;
 - Effets tératogènes (déformations congénitales).
- 3) **Effets cancérogènes** (syn. : cancérigènes, carcinogènes, oncogènes) : qui provoquent ou favorisent l'apparition d'un cancer.
- 4) **Génotoxicité** : Les effets **tératogènes** et **cancérogènes** sont souvent liés à une action du toxique sur le matériel génétique (génotoxicité), c'est-à-dire sur l'ADN des chromosomes (**Figure 1**). On parle alors de **mutation** et d'**effet mutagène**.

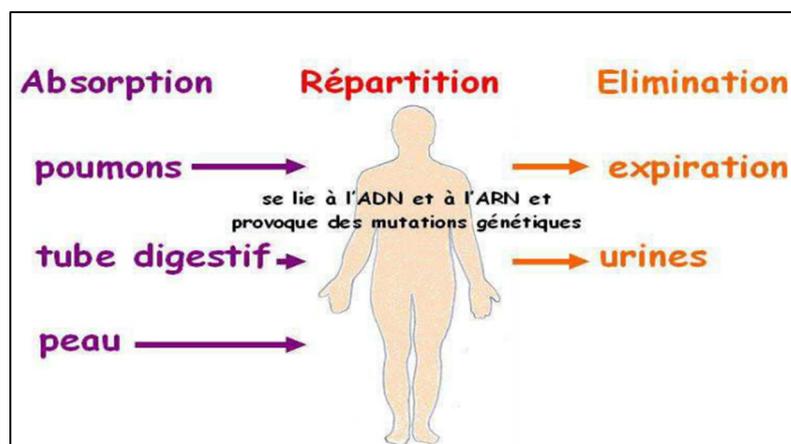


Figure 1: Illustration de la génotoxicité induite par les xénobiotiques (PHARMACOMédicale.org).

III. Molécules xénobiotiques :

L'homme est constamment exposé à des molécules présentes dans l'environnement désignées sous le terme général de **xénobiotiques**, regroupant contaminants alimentaires, composés synthétiques, polluants environnementaux et médicaments. L'accumulation de ces substances dans l'organisme est néfaste. Le métabolisme des xénobiotiques, par l'intermédiaire des enzymes du métabolisme et des transporteurs des xénobiotiques (EMTX), permet leur élimination, en convertissant ces composés lipophiles en composés hydrophiles, qui peuvent alors être excrétés dans les fluides biologiques.

Les variations interindividuelles dans l'activité des EMTX sont très importantes et dépendent de plusieurs facteurs : génétiques, épigénétiques, environnementaux ou physiopathologiques (jeûne, diabète, hépatites, cirrhoses, cancers, etc.).

Les xénobiotiques sont des substances étrangères présentes dans le corps ou les tissus d'un organisme vivant. Toxiques, ces molécules n'existent pas dans la nature et sont surtout utilisées dans les domaines agricoles et industriels. Les médicaments, les pesticides et les additifs alimentaires sont les xénobiotiques les plus répandus. Les xénobiotiques sont des molécules étrangères à la biosphère : on ne les retrouve pas à l'état naturel. Ils résistent à la biodégradation et s'accumulent dans les sols, l'eau et les organismes. Ce sont donc d'importants polluants et contaminants.

Le xénobiotique en lui-même n'est pas dangereux. La toxicité vient de la réaction complexe entre le corps étranger et la structure moléculaire de l'organisme sur laquelle il vient se fixer. L'action des antibiotiques sur le corps humain est basée sur le principe des xénobiotiques. Les pesticides, de la même manière, protègent les végétaux tout en modifiant leurs propriétés : perte de goût, ralentissement de la croissance, couleurs plus ternes, etc. Dans le secteur alimentaire, de nombreuses substances étrangères entrent en contact avec la nourriture. Ces xénobiotiques voyagent à travers les emballages ou peuvent apparaître à l'issue de la cuisson. Les phtalates, par exemple, sont des résidus de plastique très toxiques responsables de la contamination de nombreux aliments. L'inhalation ou l'ingurgitation de xénobiotiques, même en petites quantités, sont très dangereuses pour la santé à moyen et long termes.

Un Xénobiotique est toxique lorsque, après pénétration dans l'organisme, quelle que soit la voie, à une certaine dose unique ou répétée, elle provoque, immédiatement ou à terme

de façon passagère ou durable, des troubles d'une ou plusieurs fonctions de l'organisme pouvant aller jusqu'à l'arrêt complet de ces fonctions et amener la mort.

III.1. Les organes cibles :

- Système nerveux : asthénie, vertiges etc...
- Peau : brûlures, irritation, lésions.
- Poumons : pneumonies chroniques.
- Reins : insuffisance rénale.
- Foie : hépatites.
- Yeux : conjonctivite.
- Os et tissu adipeux : stockage.

IV. L'effet toxique :

Lorsqu'un individu absorbe des produits chimiques, divers effets biologiques peuvent se produire et se révéler bénéfiques (ex. : l'amélioration de la santé après l'administration d'un médicament) ou néfastes (ex. : une atteinte pulmonaire suivant l'inhalation d'un gaz corrosif). La notion d'effet toxique suppose des conséquences nocives pour l'organisme.

La toxicité englobe l'ensemble des effets néfastes d'un toxique sur un organisme vivant. Autrement dit, il s'agit de la capacité inhérente à une substance chimique de produire des effets nocifs chez un organisme vivant et qui en font une substance dangereuse. L'effet néfaste est lié à la dose, à la voie d'absorption, au type et à la gravité des lésions ainsi qu'au temps nécessaire à l'apparition d'une lésion.

Les organismes fonctionnent dans des conditions relativement constantes (pH, oxygène, autres). C'est ce que l'on appelle l'homéostasie ou la constance du milieu intérieur. Les organismes vivants cherchent à maintenir cet équilibre afin de conserver un degré optimal de fonctionnement. Le corps humain est un ensemble de systèmes finement rodés qui peut s'adapter à de nombreuses situations d'agression, tant biologiques que physiques ou chimiques. Les processus d'adaptation de l'organisme fonctionnent continuellement pour veiller à maintenir cet équilibre. Quand cet équilibre est perturbé, cela entraîne un dysfonctionnement, c'est l'**effet toxique**.

IV.1. Facteurs influençant les effets toxiques :

Les toxiques ne présentent pas tous le même degré de toxicité. Certains ont une faible toxicité, même si on les absorbe en grande quantité, par exemple le sel de table, tandis que

d'autres ont une forte toxicité, même si on en absorbe de faibles quantités, notamment les dioxines. On peut expliquer de telles variations par les différences qui existent entre la structure chimique des substances. Ces différences peuvent affecter la capacité des substances à perturber le fonctionnement de l'organisme.

V. Nature des produits chimiques : (Un produit peut avoir plusieurs effets à la fois)

- 1- **Les produits corrosifs** : Ils exercent une action destructrice des tissus vivants. Ils brûlent la peau et les muqueuses et peuvent provoquer parfois des lésions très graves.
- 2- **Les produits irritants** : Ils provoquent des démangeaisons avec rougeur et inflammation des téguments et notamment de la muqueuse respiratoire.
- 3- **Les produits sensibilisants ou allergisants** : Ces produits ne provoquent de réaction que chez certains individus prédisposés : (antécédents d'allergie, terrain atopique).
- 4- **Les produits cancérigènes** : Ils peuvent provoquer des cancers ou en augmenter la fréquence.
- 5- **Les produits mutagènes** : Ils provoquent des mutations génétiques pouvant provoquer des cancers.
- 6- **Les produits tératogènes** : Ils peuvent produire des malformations chez l'embryon.

VI. Les différentes formes de toxicité :

Les êtres vivants peuvent présenter des troubles physiologiques variés selon les quantités absorbées et la durée de l'exposition pour une même substance.

VI. 1. La réversibilité et l'irréversibilité :

A. Effet réversible :

Certains effets toxiques sont réversibles ; ils disparaissent plus ou moins rapidement après l'arrêt de l'exposition. Les systèmes enzymatiques sont donc rarement saturés et leur activité reste pratiquement égale à la concentration du toxique. La plupart du temps les effets sont aigus et à court terme. Ex : organophosphorés avec cholinestérases.

B. Effet irréversible :

D'autres effets toxiques sont irréversibles, ils persistent ou s'aggravent après l'arrêt de l'exposition par sommation totale des dommages. Ex : RX (la mutagénèse, la cancérogénèse, la tératogénèse, la sensibilisation allergique, les nécroses et les agressions cellulaires).

VI. 2. Toxicité directe et indirecte :

L'effet toxique peut être direct ou indirect.

A. Toxicité directe :

Le toxique produit ses effets sous la forme dans laquelle il a été absorbé, c'est le cas de la plupart des toxines. Il s'agit de produits doués d'une grande réactivité chimique qui agissent directement sur l'organisme (organes cibles) sans aucune transformation tel que le sulfate de méthyle, le diazométhane et le Formaldéhyde etc. Par exemple, les agents alkylants attaquent les protéines et les acides nucléiques, ce qui transforme ces constituants cellulaires en dérivés substitués qui sont modifiés et ne peuvent plus assurer normalement leurs fonctions

B. Toxicité indirecte :

La substance engendre dans l'organisme des intermédiaires toxiques et peut être qualifiée de substance protoxique. Il s'agit de la métabolisation enzymatique préalable dans l'organisme. Souvent, apparition d'intermédiaires au cours de la métabolisation bénéfique des toxiques dans le foie (centre anti-poisons) :

- Interaction des toxiques avec les protéines : nécrose, atteintes immunitaires ...
- Interaction des toxiques avec les acides nucléiques (ADN) : apparition d'une mutation suivie éventuellement d'un processus tumoral.

VI.3. La toxicité peut avoir également un effet aiguë, subaiguë ou à long terme :

Un effet aigu se fait sentir dans un temps relativement court (minutes, heures, jours), tandis qu'un effet chronique ne se manifeste qu'après un temps d'exposition relativement long et de façon permanente (semaines, mois, années).

A) La toxicité aiguë :

Elle représente la manifestation la plus spectaculaire de la toxicité. Chez les vertébrés, certains poisons neurotoxiques peuvent provoquer à fortes doses une mortalité quasi immédiate (en quelques minutes) dans les cas extrêmes. C'est bien entendu le cas de certaines armes chimiques dénommées vulgairement «gaz innervants». Ce fait, qui conduit à considérer comme vénéneuse toute substance qui tue violemment, se traduit par une mort rapide de l'individu ou de la population.

La toxicité aiguë résulte d'une exposition de courte durée avec absorption massive du toxique, sur une période ne dépassant pas les 24 heures. Les manifestations d'intoxication se

développent rapidement. L'évolution se fait soit vers la mort soit vers la guérison souvent sans séquelles.

Ainsi, l'inhalation par un vertébré terrestre d'oxyde de carbone, l'absorption d'un insecticide organophosphoré, le parathion, ou de cyanure à de très faibles concentrations en valeur absolue (une dizaine de ppm), ou encore l'exposition d'une plante à quelques fractions de ppm d'ozone, illustrent bien l'aspect spectaculaire de cette forme de toxicité.

B) La toxicité subaiguë :

Elle diffère de la précédente par le fait qu'une proportion significative de la population voire la totalité peut survivre à l'intoxication, bien que tous les individus aient présenté des signes cliniques découlant de l'exposition au toxique. Elle correspond pour une substance donnée à une contamination par des concentrations plus faibles que celles qui induisent une intoxication aiguë tout en étant suffisantes pour provoquer éventuellement la mort de certains des individus exposés.

C) La toxicité à long terme :

En règle générale, les êtres vivants ne sont pas exposés dans les biotopes qui leur sont propres à des concentrations en polluants toxiques provoquant des intoxications aiguës ou subaiguës. En effet, les risques toxicologiques qui résultent de l'exposition de populations humaines à des substances toxiques dans leur cadre de vie, voire en milieu professionnel, sont essentiellement une conséquence de leur exposition permanente via la contamination de l'atmosphère, des eaux et/ou des sols à de très faibles concentrations de polluants. Ces dernières sont parfois même si infimes qu'elles ont trop longtemps été considérées hélas à tort, comme dépourvues de conséquences pour l'hygiène publique, et a fortiori d'effets écotoxicologiques.

Les effets néfastes ne se feront sentir que quelques mois à quelques années voire dizaines d'années plus tard. Survient suite à des expositions répétées à de petites doses pendant une longue période de temps, les manifestations d'intoxication surviennent :

a) Soit parce que le toxique s'accumule dans l'organisme, c'est-à-dire qu'à chaque exposition la quantité éliminée est inférieure à la quantité absorbée. La concentration du toxique dans l'organisme augmente progressivement pour atteindre une dose seuil susceptible d'engendrer des manifestations toxiques. On parle « d'effet cumulatif » ;

b) Soit que les effets engendrés par les expositions répétées s'additionnent sans que le toxique ne s'accumule dans l'organisme, on parle « d'effet de sommation » ;

c) Il peut aussi arriver que le toxique s'accumule dans l'organisme, mais qu'une action toxique ne survienne que lorsqu'il est mobilisé des tissus dans lesquels il était déposé.

VII. Toxicité aiguë et DL50/DL100 :

La dose létale 50 ou DL50 est un indicateur quantitatif de la toxicité d'une substance. Cet indicateur mesure la dose de substance causant la mort de 50 % d'une population animale donnée (souvent des souris ou des rats) dans des conditions d'expérimentation précises. Elle s'exprime en milligrammes de matière active par kilogramme de poids de l'animal. Alors que la dose létale 100 ou DL100 est la dose de substance causant la mort de 100 % d'une population animale donnée. Plus ce chiffre est petit, plus la substance est toxique.

S'il s'agit d'une substance inhalée, on parle de concentration létale 50 (CL50 ou CLt50) pour exprimer la concentration du toxique dans l'air inspiré et causant la mort de 50 % des animaux, la CL50 est exprimée en $\text{mg} \cdot \text{min}/\text{m}^3$.

CHAPITRE I : Notion sur la toxicologie

VOLET 2 : Les étapes de transformation des molécules xénobiotiques

I. Généralités :

L'homme est constamment exposé à des molécules présentes dans l'environnement désignées sous le terme général de xénobiotiques, regroupant contaminants alimentaires, composés synthétiques, polluants environnementaux et médicaments. L'accumulation de ces substances dans l'organisme est néfaste. Le métabolisme des xénobiotiques, par l'intermédiaire des enzymes du métabolisme et des transporteurs des xénobiotiques, permet leur élimination, en convertissant ces composés lipophiles en composés hydrophiles, qui peuvent alors être excrétés dans les fluides biologiques (**Figure 2**). La détoxification comprend 3 phases :

1. **La phase d'exposition au toxique** : libération du toxique dans le tube digestif.
2. **La phase toxicocinétique** : l'étude du devenir des substances exogènes ou endogènes toxiques, dans les organismes vivants depuis leur pénétration jusqu'à leur élimination.
3. **La phase toxicodynamique** : l'étude du mécanisme d'action d'un xénobiotique sur une cible biologique et la production d'un effet.

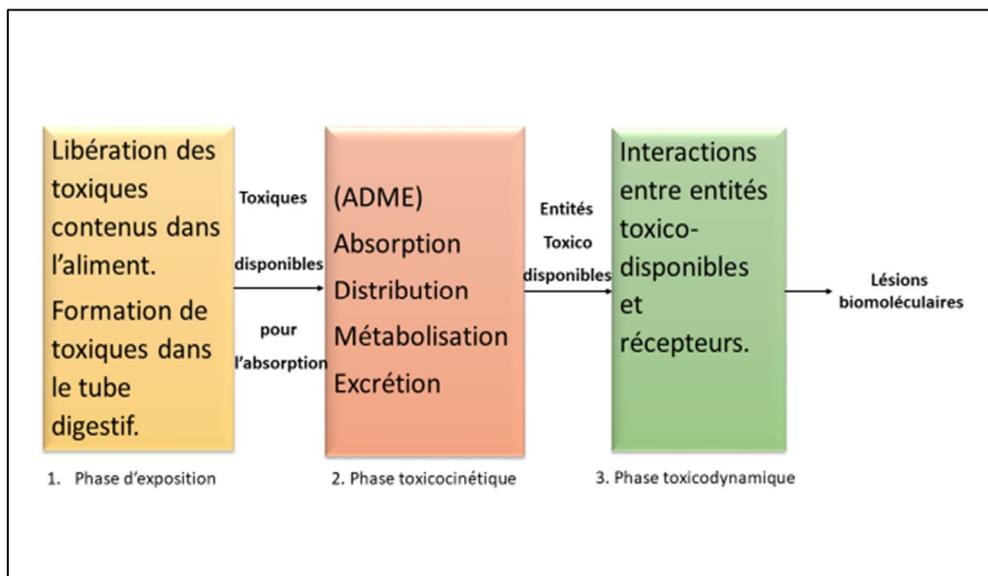


Figure 2 : Illustration du mode d'action des toxiques : Principales phases.

II. Etapes de transformation des molécules xénobiotiques :

II.1. La phase d'exposition au toxique :

La peau, les poumons et le tube digestif sont des barrières entre les organismes supérieurs et l'environnement, donc les produits chimiques. Ceux-ci ont donc, suivant leur site d'action, une ou plusieurs barrières à franchir avant d'exercer leur action délétère (**Figure 3**).

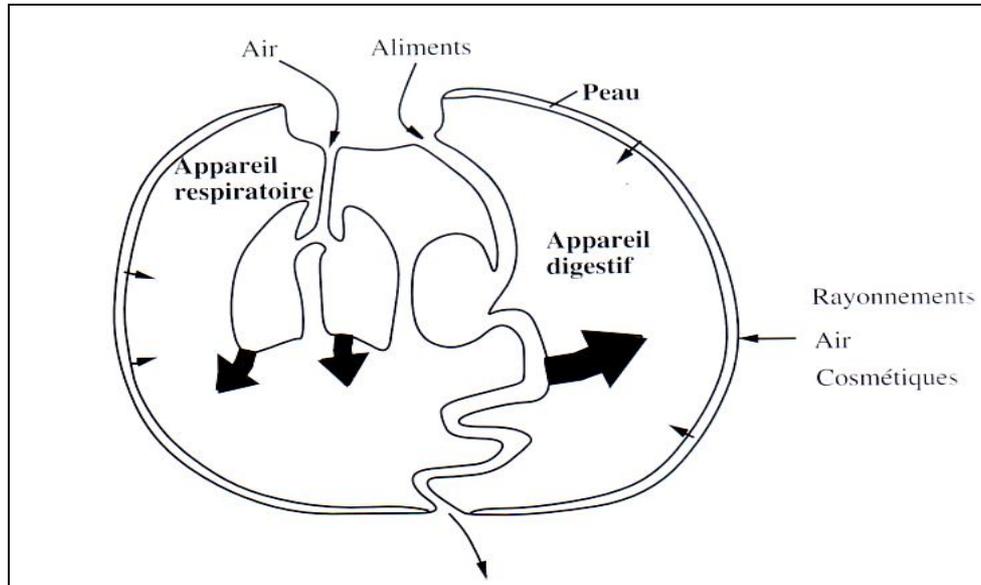


Figure 3 : Les trois principales voies de pénétrations des toxiques dans l'organisme (CHAVERON, 1999).

II.2. La phase toxicocinétique :

La toxicocinétique est une étude descriptive chargée d'enregistrer de manière quantitative le sort d'un toxique dans l'organisme depuis sa pénétration jusqu'à son élimination. La toxicocinétique permet de répondre à la question : **comment les xénobiotiques se comportent-ils dans l'organisme et à quelle vitesse se diffusent-ils ?** La quantification et la détermination de la cinétique d'absorption, de distribution, de métabolisme et d'excrétion (**Figure 4**) sont essentielles pour comprendre la toxicité d'un produit. Elle est principalement utilisée pour établir des relations entre les expositions dans les expériences de toxicologie chez les animaux et les expositions correspondantes chez l'homme. Elle permet de décrire et prédire le comportement d'un toxique dans un corps animal, par exemple, quelles parties du corps un produit chimique peut avoir tendance à y pénétrer (graisse, foie, rate, etc.), et si oui ou non le produit chimique est supposé être métabolisé ou excrété et à quel rythme. Deux facteurs interviennent de façon importante dans la détermination de la toxicocinétique : le **passage transmembranaire** des substances et leur **biotransformation**.

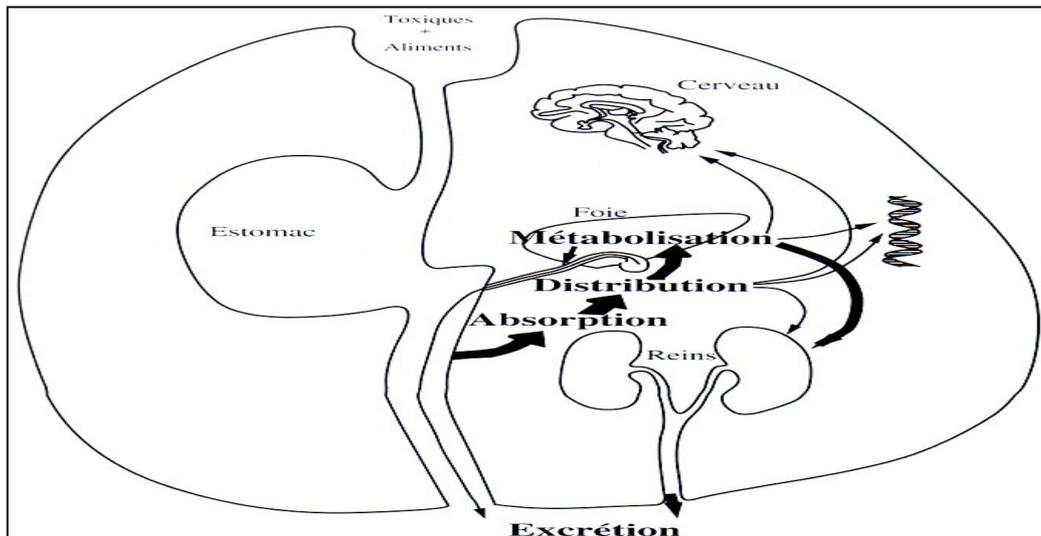


Figure 4 : Les différentes étapes de la toxicocinétique (CHAVERON, 1999).

Après sa pénétration dans l'organisme, toute substance toxique se distribue dans différents compartiments de l'organisme. Elle subit de nombreuses transformations métaboliques qui ont lieu surtout au niveau du foie mais aussi au niveau d'autres organes (rein, intestin, peau...) pour aboutir à des dérivés plus hydrosolubles et donc plus facilement excrétés. La substance chimique ou ses métabolites peuvent se fixer de manière réversible ou irréversible sur les molécules cibles. Elle peut parfois être éliminée sous forme inchangée dans l'urine ou dans l'air expiré.

A. L'Absorption :

C'est le processus par lequel le toxique passe de son site d'administration à la circulation générale. Ce processus est influencé par différentes propriétés physicochimiques à savoir : l'hydrosolubilité ou la liposolubilité du toxique, son état d'ionisation et sa masse molaire.

La voie d'absorption exerce une action déterminante sur la fraction de dose (externe) qui pénètre dans la circulation systémique et ainsi atteint l'organe cible, telle la perméabilité des différentes barrières (peau, muqueuse gastro-intestinales, épithélium alvéolaire) qui peut varier considérablement pour une même substance. La membrane maintient des concentrations différentes d'ions et de protéines entre le milieu intra et extra cellulaire.

A.1. Les voies de pénétration des toxines : (modes d'absorption)

a. La voie respiratoire :

C'est la principale voie d'intoxication professionnelle, par inhalation des vapeurs et de poussières. La quantité absorbée dépend de :

- La concentration du toxique dans l'air ;
- La durée d'exposition ;
- La forme physico-chimique de la substance inhalée.

b. La voie cutanée :

L'absorption percutanée varie avec :

- Le degré d'hydratation de la peau ;
- Le PH de la peau ;
- La densité des glandes sébacées ;
- L'intégrité surtout, de la couche superficielle de l'épiderme (stratum cornéum),

c. La voie digestive :

Elle est souvent accidentelle ou volontaire. L'absorption se fait à différents étages (bouche, estomac, intestin grêle).

Contrairement aux substances absorbées par les voies pulmonaires et cutanées, les molécules absorbées par voie digestive doivent généralement passer par le foie avant d'être éventuellement diluées dans la circulation.

Le degré d'absorption d'une substance étrangère par le tractus gastro-intestinal, est lui-même soumis à diverses influences comme :

- La motilité et le contenu du tractus gastro-intestinal ;
- Le débit sanguin dans l'aire splanchnique ;
- L'état nutritif. Exp : un régime déficient en calcium, augmente l'absorption intestinale du plomb.

d. La voie oculaire :

Elle concerne surtout les projections dans l'œil ou la survenue d'un phénomène irritatif dû à l'action d'un toxique au niveau de la muqueuse oculaire.

D'autres voies accessoires existent également : **la voie intraveineuse et intramusculaire.**

A.2. Les modes d'absorption des toxines :

L'absorption est le processus par lequel le toxique passe de son site d'administration à la circulation générale. Ce processus est influencé par différentes propriétés physicochimiques à savoir :

- L'hydrosolubilité ou la liposolubilité du toxique ;

- Son état d'ionisation ;
- Sa masse molaire.

L'absorption et l'excrétion des substances chimiques, requièrent le transfert de ces molécules à travers diverses membranes biologiques telles que l'épithélium gastro-intestinal, le parenchyme hépatique, la peau, le placenta, des structures membranaires intracellulaires...etc. La filtration à travers des pores de la membrane joue un rôle dans le transfert de petites molécules lipophiles et est fonction du gradient de concentration de part et d'autre de la membrane. Grâce à la structure membranaire en **mosaïque fluide**, les toxiques pénètrent dans la cellule à travers cette matrice par les **cinq mécanismes** suivants :

- a. Diffusion passive :** Seuls les toxiques **lipophiles** (soluble dans la membrane phospholipidique) sous forme non ionisée traversent la bicouche lipidique dans le sens du **gradient de concentration** (dans le sens des concentrations fortes vers les concentrations faibles, jusqu'à l'équilibre des concentrations de part et d'autre de la membrane). Elle ne **consomme pas d'énergie**, elle ne nécessite l'intervention d'aucune protéine (n'implique pas des **transporteurs** membranaires) et elle n'est pas saturable tant que l'équilibre n'est pas atteint.
- b. Diffusion facilitée :** Elle se fait dans le sens du gradient de concentration et implique des transporteurs membranaires. Ce mécanisme est donc spécifique pour les substances qui peuvent se fixer aux protéines porteuses et est donc saturable. La diffusion facilitée intéresse les molécules non liposolubles et sont donc incapables de traverser la membrane phospholipidique (exp : glucose). Elle ne nécessite pas l'apport d'énergie, car elle respecte le gradient de concentration. Elle est plus rapide et plus efficace que la diffusion simple.
- c. Transport actif :** Il peut se faire même contre le gradient de concentration, il implique des transporteurs membranaires et est donc saturable. Ce processus nécessite donc une source d'énergie fournie principalement par la dégradation de l'ATP.
- d. Endocytose :** **Phagocytose** (particules solides) ou **pinocytoses** (liquide). L'endocytose résulte de la formation d'invaginations de la membrane plasmique qui englobe soit des gouttelettes de fluides extracellulaires, soit des molécules qui se sont fixées sur des récepteurs membranaires (pinocytose), soit des particules comme les fibres d'asbeste (phagocytose). Ce dernier mécanisme concerne surtout les macrophages.

e. **Filtration** : Elle se fait dans le sens du gradient de pression à travers des pores. Pas d'énergie consommée, pas de transporteurs membranaires et donc pas de saturation (**Figure 5**).

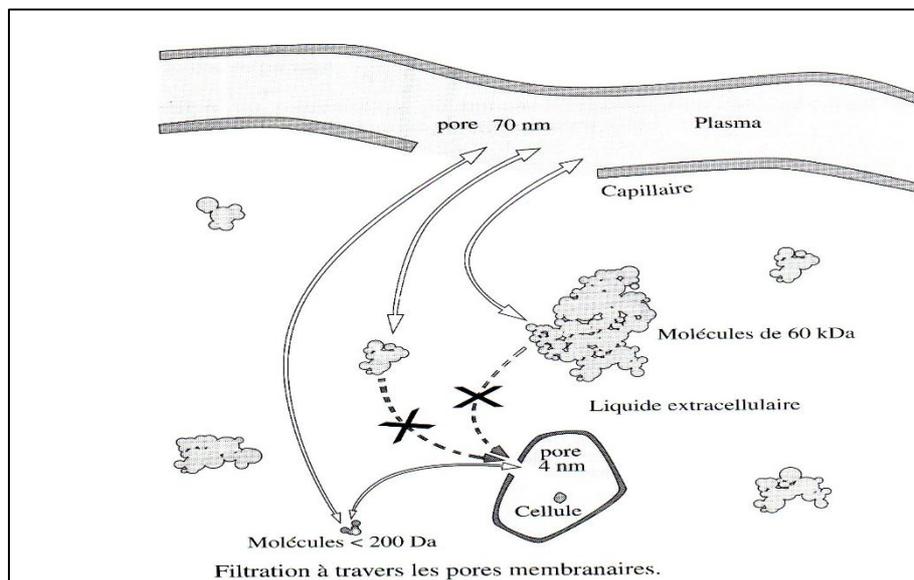


Figure 5 : Filtration à travers les pores membranaires (**CHAVERON, 1999**).

B. La distribution :

C'est le processus de répartition du toxique dans l'organisme. Depuis son passage à la circulation générale jusqu'à sa diffusion dans les tissus. Il comprend : le **transport sanguin** (phase plasmatique) et la **diffusion tissulaire** (phase tissulaire).

1. **Transport sanguin** : Il se fait soit par fixation aux protéines plasmatiques par des liaisons réversibles, exemple les anti-vitamines K (AVK) (anticoagulants oraux) en tant qu'acides faibles sur l'albumine, soit par fixation au niveau des éléments figurés : Exemple : Propanolol.
2. **Diffusion tissulaire** : Processus par lequel le toxique se répartit dans l'ensemble des tissus et des organes. Le toxique peut s'affronter à des barrières biologiques à savoir hématoencéphalique et hémato-placentaire.

La **redistribution** est un processus qui s'active suite à une inversion subite du gradient de concentration qui devient plus importante dans les tissus par rapport au plasma suite à une distribution tissulaire rapide et intense dans certains organes à fort débit sanguin. Il y aura par conséquent une redistribution des toxiques dans le plasma. Exemple : les anesthésiques généraux (SNC) redistribution dans les tissus musculaires et adipeux.

Le stockage est le processus d'accumulation de toxiques dans certains tissus et organes tels que le foie, le rein, le tissu adipeux et les Os.

C. La métabolisation (biotransformation) :

La biotransformation est un processus qui mène à la transformation métabolique de composés étrangers (xénobiotiques) dans l'organisme. Ce processus est souvent appelé métabolisme des xénobiotiques. En règle générale, le métabolisme convertit les xénobiotiques liposolubles en métabolites hydrosolubles, de poids moléculaire plus élevé et faciles à éliminer.

Le terme "biotransformation" désigne les diverses modifications chimiques que subissent les médicaments dans l'organisme pour donner naissance à des métabolites. Les biotransformations sont principalement effectuées par réactions enzymatiques. Un médicament peut subir plusieurs biotransformations aboutissant à la formation de plusieurs métabolites.

La principale fonction des biotransformations est de rendre hydrosolubles des molécules lipophiles afin d'en favoriser l'élimination de l'organisme : en effet, les molécules lipophiles passent les membranes pendant les phases d'absorption et de distribution, mais à l'inverse leur liposolubilité ne permet pas leur élimination par voie rénale sous forme inchangée. Elles seront alors soit excrétées directement par voie biliaire, soit biotransformées avant excrétion rénale ou biliaire. Certains médicaments ne subissent pas de biotransformations : on dit qu'ils sont éliminés de l'organisme exclusivement sous forme inchangée.

D'une manière générale, les biotransformations sont des réactions de défense de l'organisme qui conduisent à des molécules moins toxiques et moins actives que la molécule parente. Néanmoins, les métabolites peuvent aussi être plus actifs ou plus toxiques que le médicament administré. Lorsque le principe actif est inactif et que son métabolite est actif, le médicament est appelé « prodrogue ». Par exemple, le valganciclovir est une prodrogue du ganciclovir.

Le foie est le principal site de la biotransformation. Tous les xénobiotiques absorbés au niveau intestinal sont transportés vers le foie par un vaisseau sanguin unique, la veine porte. Si une substance étrangère est absorbée en petites quantités, elle peut être complètement métabolisée par le foie avant d'atteindre la circulation générale et les autres organes (effet de premier passage). Les xénobiotiques inhalés parviennent au foie par la circulation générale. Seule une fraction de la dose est alors métabolisée avant d'atteindre les autres organes.

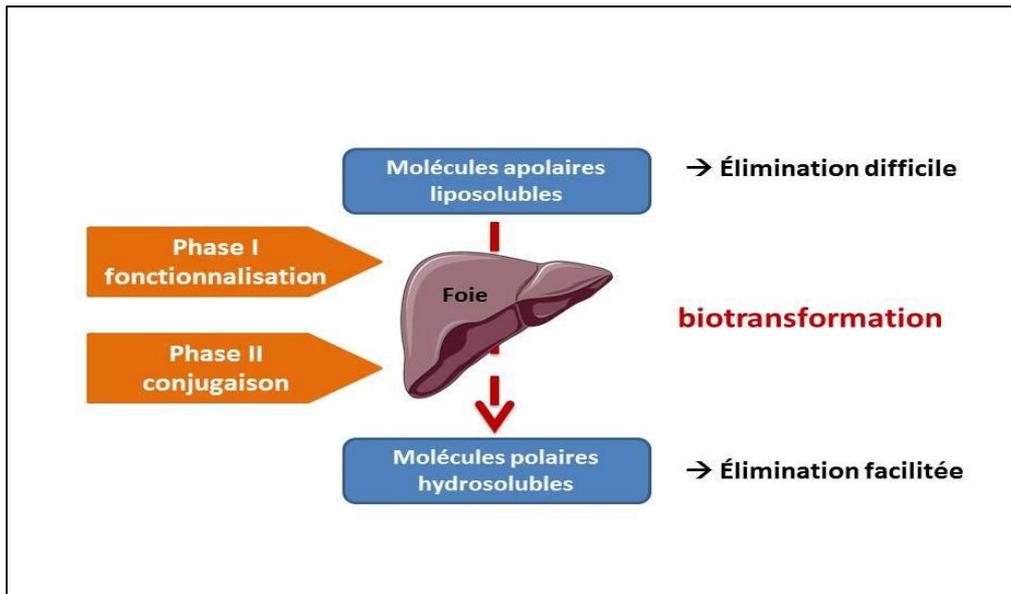


Figure 6 : Les phases de la biotransformation des xénobiotiques (PHARMACOMédicale.org).

Les cellules hépatiques contiennent diverses enzymes qui oxydent les xénobiotiques. Cette oxydation active généralement le composé, qui devient plus réactif que la molécule mère. Dans la plupart des cas, le métabolite oxydé est métabolisé plus complètement par d'autres enzymes lors d'une seconde phase. Ces enzymes conjuguent le métabolite avec une substance endogène, de sorte que la molécule augmente de volume et se polarise, ce qui facilite son élimination.

Les enzymes métabolisant les xénobiotiques sont également présentes dans d'autres organes tels que les poumons et les reins où elles peuvent jouer des rôles spécifiques et qualitativement importants dans le métabolisme de certains xénobiotiques. Les métabolites formés dans un organe peuvent être ensuite métabolisés à nouveau dans un second organe. Les bactéries intestinales peuvent aussi participer à la biotransformation.

La relation entre la biotransformation et la toxicité est complexe. La biotransformation peut être considérée comme un processus nécessaire à la survie. Elle protège l'organisme vis-à-vis d'une toxicité en empêchant les substances nocives de s'accumuler dans l'organisme. Cependant, des métabolites réactifs intermédiaires peuvent se former lors de la biotransformation, métabolites qui sont potentiellement dangereux. Ce phénomène est appelé l'activation métabolique. La biotransformation peut donc induire également une toxicité. S'ils ne sont pas conjugués, les métabolites oxydés intermédiaires peuvent se lier aux structures cellulaires et les endommager. Par exemple, la liaison d'un métabolite de xénobiotique à l'ADN

peut être à l'origine d'une mutation. Si le système de biotransformation est dépassé, il peut se produire une destruction massive de protéines essentielles ou des membranes lipidiques qui peut aboutir à la mort cellulaire.

Les biotransformations des médicaments sont essentiellement hépatiques et intestinales même s'il existe aussi un métabolisme pulmonaire, rénal ou plasmatique. On distingue deux types de biotransformations, classées en phase I et phase II (**Figure 7**).

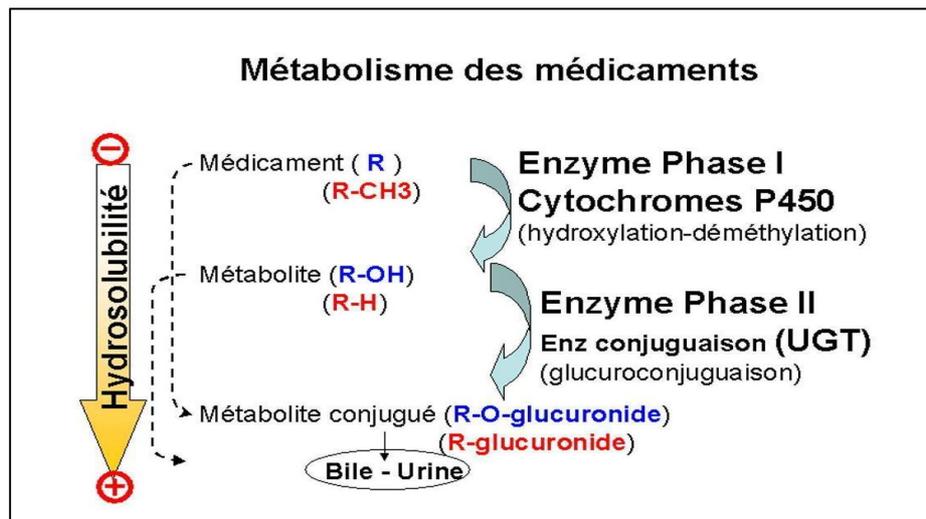


Figure 7 : Illustration des 2 phases de la biotransformation des xénobiotiques (**PHARMACOMédicale.org**).

Le métabolisme des médicaments permet de transformer des molécules liposolubles en hydrosolubles afin de pouvoir les éliminer hors de l'organisme. Les enzymes de phase I, essentiellement représentés par la famille des cytochromes P450, modifient la structure essentiellement par hydroxylation (ajout d'une fonction OH) ou déméthylation (retrait d'un méthyle CH₃). Les enzymes de phase II sont des enzymes de conjugaison qui rajoutent à la molécule un radical hydrosoluble comme l'acide glucuronique pour les enzymes de la famille des glucuronyl-transférases (UGT).

C.1. Métabolisme de phase I : réactions de fonctionnalisation

Le métabolisme hépatique par réaction de phase I est dû à des réactions de fonctionnalisation, consistant à modifier ou adjoindre des groupements fonctionnels par des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse. Une réaction de fonctionnalisation est illustrée sur la

Figure 8, permettant de transformer un médicament lipophile en un métabolite hydrophile, via le cytochrome P450.

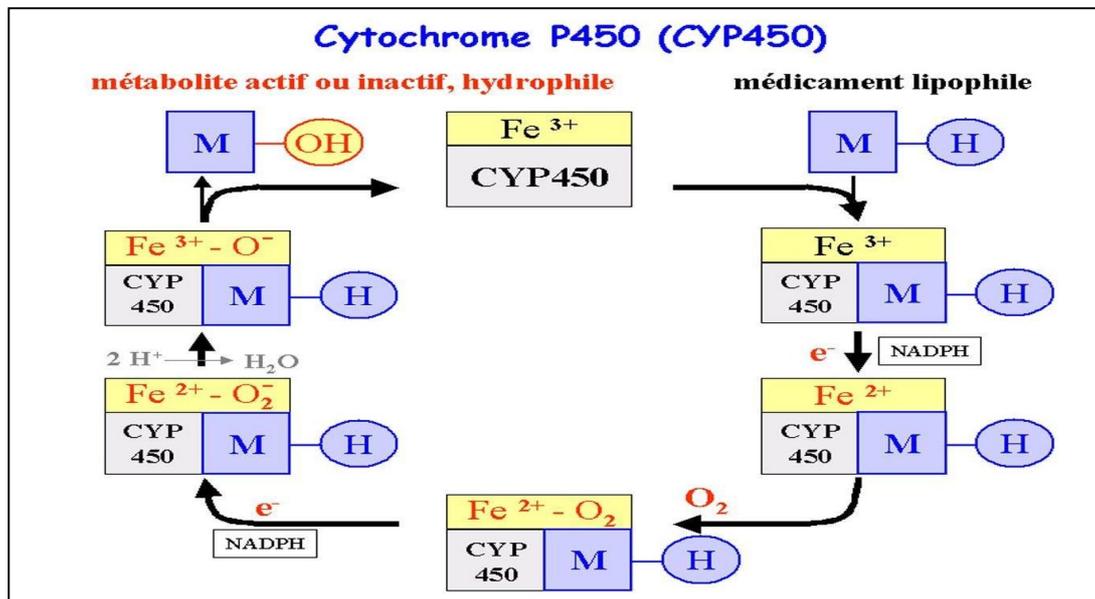


Figure 8 : Réaction de phase I par les cyp450 (PHARMACOMédicale.org).

C.2. Métabolisme de phase II : réactions de conjugaison

Elles représentent la seconde étape dans le métabolisme des xénobiotiques. Le métabolisme de phase II signifie que le composé oxydé est conjugué (couplé) à une molécule endogène. Cette réaction se caractérise par une augmentation de l'hydrosolubilité. Les biotransformations par réaction de conjugaison permettent d'obtenir des métabolites hydrosolubles, donc éliminables par voie rénale.

Les réactions de conjugaison sont principalement dues à des enzymes cytosoliques, exprimées majoritairement dans le foie, mais aussi dans les poumons et le rein. Les réactions de conjugaison résultent en un transfert de groupements polaires sur la molécule par l'acide glucuronique (glucuroconjugaison), la glycine (glycoconjugaison), le sulfate (sulfoconjugaison) ou d'autres radicaux (méthyl, acétyl...). La glucuroconjugaison constitue le mécanisme principal : elle est catalysée par des UDP-glucuronyl-transférases (UGT) qui favorisent la fixation de l'acide glucuronique sur un atome d'oxygène, d'azote ou de soufre d'une molécule. Par exemple, le paracétamol est un médicament métabolisé par glucuroconjugaison.

D'une manière générale, la conjugaison conduit à des métabolites moins actifs que le médicament.

L'inhibition de la biotransformation peut survenir lorsque deux xénobiotiques sont métabolisés par la même enzyme. Les deux substrats entrent en compétition et, généralement, l'un des substrats l'emporte. Dans ce cas, le second substrat n'est pas métabolisé, ou l'est plus lentement. L'inhibition peut donc faire augmenter la toxicité ou la faire diminuer.

L'activation métabolique signifie qu'un composé moins réactif est converti en une molécule plus réactive. Cette conversion se produit lors des réactions de phase I. **L'inactivation métabolique** renvoie au fait qu'une molécule active ou toxique est convertie en un métabolite moins actif. Ce phénomène se produit généralement lors des réactions de phase II. Dans certains cas, un métabolite inactivé peut être réactivé, par suite d'un clivage enzymatique, par exemple.

L'activation de l'oxygène peut être déclenchée par les métabolites de certains xénobiotiques. Ils peuvent s'auto-oxyder en produisant des espèces oxygénées activées. Ces espèces dérivées de l'oxygène, qui incluent le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle, peuvent léser l'ADN, les lipides et les protéines dans les cellules. L'activation de l'oxygène intervient également dans les processus inflammatoires.

D. L'Excrétion :

C'est un processus qui englobe *in-extenso* l'élimination d'une partie des déchets métaboliques par excrétion dans les urines ou dans les excréments (féces, sueur, salive). L'excrétion est la phase qui assure la disparition d'une substance de l'organisme soit parce qu'elle est excrétée, soit parce qu'elle est transformée en d'autres produits qui ne sont plus décelables. La vitesse de disparition peut être exprimée par la constante d'élimination, la demi-vie biologique ou la clairance.

Le processus d'excrétion concerne le xénobiotique sous forme inchangée et ses métabolites. Toute altération du fonctionnement de l'organe responsable de l'élimination se traduit par une diminution de l'élimination et un risque d'accumulation (**Figure 9**). L'élimination des xénobiotiques et de leurs métabolites est principalement réalisée par la voie urinaire et la voie biliaire.

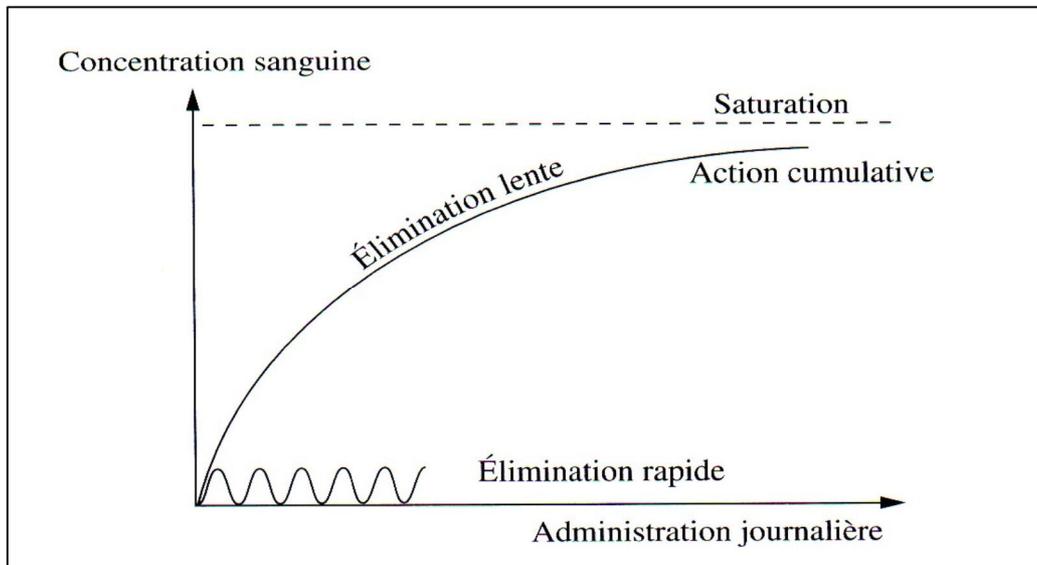


Figure 9 : Variations en fonction du temps des concentrations sanguines de molécules facilement excrétables et de molécules subissant une forte rétention (CHAVERON, 1999).

D.1. L'excrétion rénale :

Les reins sont les organes excréteurs les plus importants. Toutes particules ayant un poids moléculaire inférieur à 65000 daltons passent à travers le filtre glomérulaire. C'est un phénomène passif qui dépend uniquement du gradient de pression de part et d'autre de la paroi glomérulaire, les substances liées aux protéines de transport sont moins filtrées.

L'élimination rénale est la principale voie d'excrétion des médicaments. Le néphron, unité élémentaire du rein, est le lieu des phénomènes de filtration glomérulaire passive (médicaments sous forme libre, non liée aux protéines plasmatiques), et sécrétion tubulaire faisant intervenir des transporteurs d'influx.

D.1.1. Elimination par filtration glomérulaire :

L'excrétion par filtration glomérulaire dépend de la taille des molécules : le glomérule agit comme un filtre laissant passer toutes les substances dont le poids moléculaire est < 65000 Da. Les grosses molécules comme les protéines ne peuvent être éliminées par filtration glomérulaire. Par exemple, l'albumine, ne peut pas être filtrée et de ce fait, seule la fraction libre des médicaments liés à l'albumine peut être filtrée.

Ainsi, la fixation aux protéines plasmatiques est également un facteur limitant de la filtration glomérulaire : plus un médicament est fixé aux protéines plasmatiques, moins il pourra être sujet à la filtration glomérulaire (fraction libre faible) (**Figure 10**)

D.1.2. Elimination par sécrétion tubulaire :

En plus de la filtration glomérulaire, certains médicaments peuvent être éliminés dans l'urine par sécrétion tubulaire au niveau du tube contourné proximal (**Figure 10**).

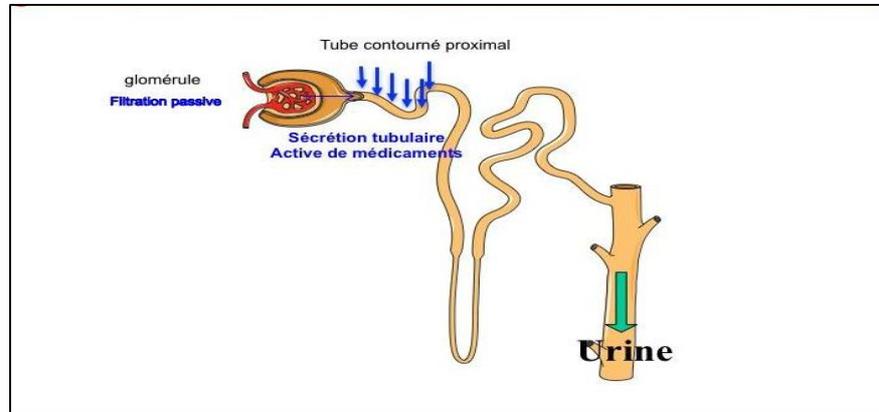


Figure 10 : Excrétion rénale par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire active (PHARMACOMédicale.org).

C'est un phénomène actif car il utilise des transporteurs et de l'énergie, donc saturable et pour lequel une compétition peut s'exercer entre différentes molécules. Cette compétition peut être mise à profit à des fins thérapeutiques : l'élimination de la pénicilline est ainsi retardée par la co-administration de probénécide, qui entre en compétition avec la pénicilline pour la sécrétion tubulaire. La sécrétion tubulaire intéresse par exemple les pénicillines, les antiviraux et la metformine.

D.2. L'excrétion biliaire :

La seconde voie d'élimination importante est la sécrétion biliaire. Les grosses molécules et les molécules non hydrosolubles qui ne peuvent pas être excrétées par le rein sont éliminées par cette voie. Cette sécrétion biliaire permet d'éliminer les molécules métabolisées ou non par les hépatocytes. Ce phénomène d'élimination intestinale peut être contrebalancé par un cycle entéro-hépatique (**Figure 11**).

. La bile contenant la molécule, souvent sous forme d'un dérivé conjugué, est déversée au niveau duodéal. Les substances conjuguées peuvent subir une hydrolyse (déconjugaison) et redonner naissance à la molécule initiale exemple la digoxine qui a un $t_{1/2}$ supérieur à 150 heures. Elle est alors à nouveau résorbée et rejoint en partie la circulation générale. On constate alors un effet rebond au niveau des concentrations plasmatiques (un second pic plasmatique). Ce type d'élimination est peut diminuer en cas d'insuffisance rénale.

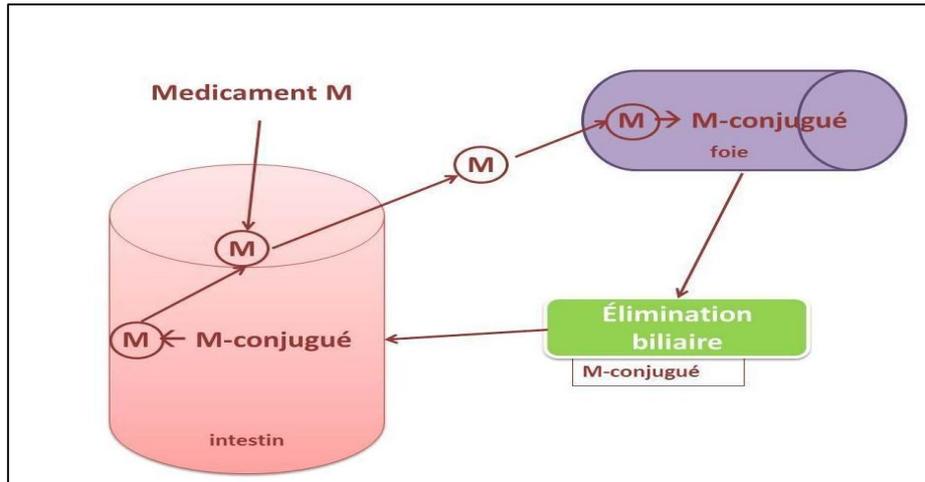


Figure 11 : Le cycle entéro-hépatique (PHARMACOMédicale.org).

D. 3. Autres voies d'excrétion :

Certaines substances, les solvants organiques, des produits de dégradation comme l'acétone, sont suffisamment volatiles pour qu'une fraction importante puisse être éliminée par exhalation après leur inhalation. Les molécules hydrosolubles ou liposolubles de faible poids moléculaire sont facilement sécrétées vers le fœtus par voie placentaire, et dans le lait chez les mammifères. Chez la mère, la lactation peut être une voie d'excrétion importante du point de vue quantitatif pour les produits chimiques liposolubles.

La descendance peut être secondairement exposée par l'intermédiaire de la mère pendant la grossesse et lors de la lactation. La sueur et la salive peuvent aussi servir d'émonctoire, bien que beaucoup moins important, aux composés hydrosolubles. Cependant, étant donné le volume de salive produit et absorbé, l'excrétion salivaire peut contribuer à la réabsorption d'un produit. Certains métaux, comme le mercure, sont excrétés dans les cheveux par suite de leur forte liaison aux groupes sulphydryles de la kératine.

II.III. La phase toxicodynamique :

C'est l'étude du mécanisme d'action d'un xénobiotique sur une cible biologique est la production d'un effet. Les molécules toxiques (celles ayant traversé la barrière intestinale ou celles pouvant apparaître au cours de la bioactivation) ainsi que les entités électrophiles ou radicalaires formés au cours des réactions de détoxication et ayant échappé à l'action des systèmes protecteurs ou aux mécanismes d'excrétion forment l'ensemble **des entités toxicodisponibles** qui vont agir sur les **récepteurs endogènes (Figure 12)**.

La **toxicité** de ces entités (nature et intensité des effets) est fonction de leur **concentration** au niveau de leurs récepteurs endogènes. Cette concentration locale définit la **toxicodisponibilité**.

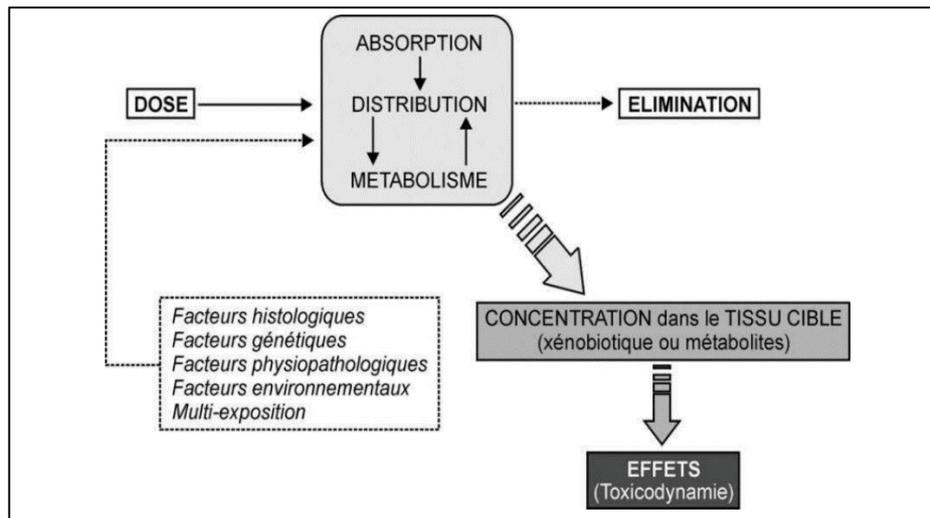


Figure 12 : La phase toxicodynamie (PHARMACOMédicale.org).

II.III.1. Les cibles des entités toxicodisponibles :

Les cibles des entités toxicodisponibles sont les constituants cellulaires :

1. **Au niveau subcellulaire** : toutes les structures cellulaires peuvent être impliquées mais ce sont principalement :

- les membranes (plasmique, nucléaire) ;
- le noyau ;
- le réticulum endoplasmique ;
- les mitochondries (altération de la chaîne respiratoire mitochondriale).

2. **Au niveau moléculaire** : les récepteurs moléculaires sont des biomolécules endogènes porteuses de sites nucléophiles ou susceptibles de générer des radicaux libres qui forment respectivement des liaisons covalentes avec des entités électrophiles ou radicalaires. Il s'agit des :

- Acides nucléiques (ADN, ARN) ;
- Acides gras ;
- Vitamines.

CHAPITRE I : Notion sur la toxicologie.

VOLET 3 : Méthodes expérimentales d'évaluation de la toxicité.

I. Généralités :

La **toxicologie expérimentale** permet l'évaluation de la toxicité des molécules ainsi que la détermination de leurs modes d'actions (fonction, organe, cellules, molécules d'ADN, enzymes) et leurs toxicocinétiques à différents niveaux de l'organisme. Ainsi, un traitement approprié de l'intoxication (**toxico-clinique**) sera mis en place.

II. Objectif des études toxicologiques :

Recherche qualitative et/ou quantitative des toxiques, principalement dans :

- Les milieux biologiques ;
- L'environnement ;
- Les denrées alimentaires ;
- Les produits susceptibles d'entrer en contact avec les êtres vivants (Médicaments, cosmétiques, pesticides, émanations gazeuses de déchets organiques ou industriels, les suspensions radioactives, les eaux polluées, etc. ...).
- **Décrire et prédire le comportement d'un toxique** dans un corps animal, par exemple, **quelles parties du corps** un produit chimique peut avoir tendance à y pénétrer (graisse, foie, rate, etc.), et si oui ou non le produit chimique est supposé être **métabolisé ou excrété** et à quel **rythme**.

III. Evaluation de la toxicité :

La toxicité d'une substance dépend de :

- Sa **nature** ;
- La quantité ingérée = **dose** ;
- La durée ou **fréquence de consommation** ;
- La **sensibilité** de l'individu ;
- **Le temps nécessaire** à l'apparition d'une lésion : un effet **aigu** se fait sentir dans un temps relativement court (**minutes, heures, jours**), un effet **chronique** ne se manifeste

qu'après un temps d'exposition relativement long et de façon permanente (**semaines, mois, années**) ;

- La **voie** de pénétration ;
- L'exposition à **plusieurs toxiques** (addition, synergie, antagonisme) ;
- Les expositions antérieures à la même substance (tolérance ou sensibilisation).

III. 1. Evaluation des effets des substances toxiques en laboratoire :

- A. **Tests *in-vitro*** : ils consistent à évaluer l'effet d'un composé sur des cellules ;
- B. **Tests *in-vivo*** : ils consistent à exposer un organisme vivant à la substance testée. Cette substance peut être **ingérée** (la substance est ajoutée dans la nourriture), **injectée** directement dans l'animal ou **inhalisée** (c'est à dire respirée) ou encore se trouver dans le milieu de vie de l'organisme.

Avant toute étude toxicologique il faut tenir compte des points suivants :

1. Définition précise du composé ;
2. Tenir compte des données biochimiques existantes ;
3. Doses utilisées sont importantes à considérer ;
4. Extrapolation de l'**animal** à l'**Homme** comporte une grande incertitude.

IV. Méthodes expérimentales d'évaluation de la toxicité :

A. Test de toxicité aiguë :

Principe : On administre à 1 lot d'animaux 1 dose **unique** de la substance à tester et on recherche expérimentalement la dose qui tue 50% de la population (DL50). Plus la substance est toxique, moins il en faut pour provoquer la mort, plus la DL50 est faible. Elle s'exprime en mg/kg de poids de l'animal.

B. Le test de toxicité subaiguë ou à court terme :

Principe : On administre à 1 lot d'animaux 1 dose **journalière** de la substance à tester pendant **une durée qui correspond à 10% de sa vie** (soit 90 Jours chez un rat). Pendant cette durée on étudie la croissance, la reproduction et le comportement des animaux. Au terme du traitement on tue les animaux et on examine les tissus pour voir les lésions éventuelles. L'intérêt de cette expérience est d'obtenir des informations sur les risques d'une exposition **répétée** (mais sur une durée courte) à telle substance toxique et sur les **effets cumulatifs** possibles.

C. Le test de toxicité chronique ou à long terme :

Principe : On administre aux animaux des doses de substance connues pendant **toute la vie** voire sur leur descendance. On étudie pendant toute l'expérience la croissance, la reproduction, le comportement et la descendance. L'intérêt de cette expérience est de mettre en évidence si la substance est **tératogène** (entraîne des malformations fœtales), **mutagène** (mutation des gènes) ou **cancérogène** (tumeurs).

D. Méthodes rapides de détermination de l'activité Mutagénique : Test d'Ames

Le **test d'Ames (1975)** est le test de **génotoxicité** le plus répandu. On y utilise des souches de bactéries (*Salmonella typhimurium*) qui ont perdu par mutation la faculté de synthétiser un Acide Aminé, l'histidine (his^-). Ces bactéries sont cultivées sur des milieux sans histidine, en présence de substance à tester (pendant 4 jours). Si la substance n'est **pas mutagène**, le développement des bactéries n'a pas lieu. Par contre, si la substance est **mutagène**, elle provoque une mutation "**réverse**", qui redonne aux bactéries la faculté de synthétiser l'histidine et donc de se développer.

E. Méthodes rapides de détermination de l'activité Cancérogénétique :

C'est un test effectués chez le rat et la souris, long et coûteux, l'interprétation reste toujours délicate malgré la multiplicité des tests mis en évidence (**Figure 13**).

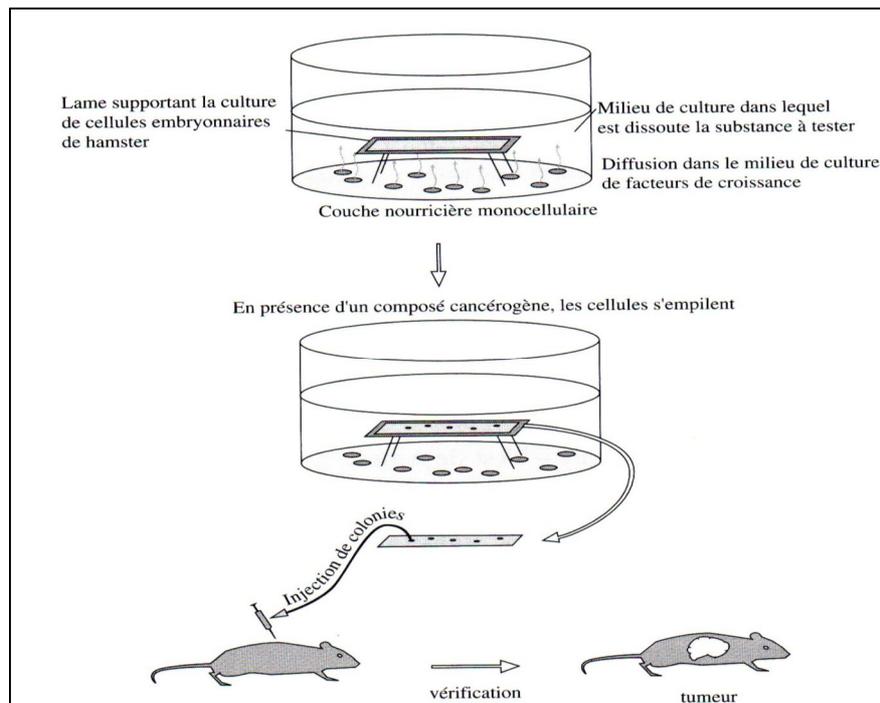


Figure 13 : Test de la mesure de l'activité cancérogénique (CHAVÉRON, 1999).

F. Examens de toxicité fœtale :

C'est l'étude des effets de l'**embryo-toxicité** sur le développement prénatal et postnatal.

L'embryo-toxicité se traduit par :

- L'embryo-létalité : la mort de l'embryon ou du fœtus, elle survient lorsque le produit a pu exercer sa toxicité dans les premiers stades de la multiplication de l'œuf (stade blastula).
- La tératogénicité : survient lorsque le produit exerce son action pendant l'organogénèse.

G. Autres tests prédictifs :

- Etude de la cancérogénicité transplacentaire.
- Etude des aberrations chromosomiques dans différentes lignées cellulaires.
- Etude de la vitesse de synthèse de l'ADN *in-vitro* après injection d'un corps chimique.
- Etude de la capacité de transformation de lignées cellulaires *in-vitro*.

V. Interprétation des résultats des tests :

V.1. DJA (dose journalière admissible) :

Elle correspond au $1/100^{\text{ème}}$ de la dose exprimée en mg/kg de poids vif qui n'occasionne aucun effet indésirable. L'Homme est 10 fois plus sensible que l'animal le plus sensible. La DJA n'a pas de signification dans le cas des substances **cancérogènes**.

V.1.1. Dispositif expérimental :

1. Sélection de l'espèce animale :

Généralement, c'est le rat et la souris, deux espèces de rongeurs qui sont sélectionnés pour déterminer la DL50 pour des raisons de coût (prix de revient acceptable, besoins nutritifs réduits) et de commodité (petite taille, courte durée de gestation). Quelque fois, une espèce autre qu'un rongeur est utilisée lorsque les schémas métaboliques chez le rat et la souris sont différents de celui de l'Homme.

2. Voie d'administration :

La substance est administrée par deux voies, une qui est celle de l'exposition humaine et l'autre qui assure une biodisponibilité totale.

3. Protocol expérimental :

Une gamme de six doses ou plus est sélectionnée pour la détermination de la DL50, les lots sont constitués de 10 animaux identiques sur les plans espèce, souche ou origine, sexe,

âge, et poids. Chaque lot d'animaux recevra une dose de la substance à tester mais la dose diffère d'un lot à un autre afin que le pourcentage de mortalité varie entre 0 et 100.

On construit ensuite la courbe donnant le pourcentage de mortalité en fonction de la dose, On déduit la DL50 par des moyens statistiques.

- **Durée d'observation** : Après administration les animaux sont mis en observation pendant 14 jours. S'il y a apparition des signes de toxicité, la durée d'observation est indéterminée.
- **Examens à faire** : L'heure de la mort doit être notée ainsi que les symptômes, des examens macroscopiques doivent être faits sur tous les animaux morts et au moins sur quelques survivants (ceux qui présentent des signes de morbidité). L'autopsie est en mesure de fournir des informations sur l'organe cible.

V.1.2. Intérêt du calcul de la DL50 :

La détermination de la DL50 permet de classer les produits chimiques d'après leur toxicité selon l'échelle de **HODGE et STERNER** représentée sur le (Tableau 1).

Tableau 1: Les différentes classe de toxicité: (Echelle de HODGE et STENER, 1943).

Classe de toxicité	Terme utilisé	Paramètre toxicologique (DL ₅₀)
1	Extrêmement toxique	DL ₅₀ ≤ 1mg /Kg
2	Hautement toxique	1mg/Kg ≤ DL ₅₀ ≤ 50mg/Kg
3	Modérément toxique	50 mg/Kg ≤ DL ₅₀ ≤ 500mg/Kg
4	Légèrement toxique	500 mg/Kg ≤ DL ₅₀ ≤ 5000mg/Kg
5	Presque toxique	5000 mg/Kg ≤ DL ₅₀ ≤ 15000mg/Kg
6	Relativement inoffensif	DL ₅₀ ≥ .15000mg/Kg

V1.3. Limites de la DL50 :

L'indice DL50 sert fréquemment pour exprimer la toxicité aigue ainsi que pour classer et comparer les toxiques. Il a cependant une valeur très limité, car il ne concerne que la mortalité et ne donne aucune information sur les mécanismes en jeu et la nature des lésions. Il s'agit d'une appréciation grossière et préliminaire, qui peut être très influencée par plusieurs facteurs tels que l'espèce animale, le sexe, l'âge, le moment de la journée.

V.1.4. Exploitation des resultats :

A partir des données obtenues chez l'animal, on détermine une concentration équivalente en toxicité humaine **CETH** exprimée en mg/l de plasma, l'opération extrapolation

reste approximative car le sujet idéal pour des études relatives à l'Homme est l'Homme lui-même.

V.1.4. Problèmes d'extrapolation :

La transposition des résultats obtenus de l'expérimentation animale à l'Homme, présente des obstacles et ceci pour différentes raisons, tel que les différences dans le système ADME entre l'Homme et l'animal, certains effets ne peuvent être mis évidence chez l'animal par ex : Céphalées, vertiges, nausées, Insomnies, fatigue, troubles psychiques etc.

V.2. Toxicité et innocuité :

La Toxicité et l'innocuité n'ont pas de sens que rapportées à la dose : un composé à finalité alimentaire ou thérapeutique dépourvu de toxicité, peut devenir toxique si les quantités ingérées sont anormalement importantes. Une modification du rapport des nutriments de la ration peut entraîner une toxicité de celle-ci.

V.3. Limites des tests toxicologiques :

1. Difficultés des études toxicologiques.
2. Nécessité d'une recherche approfondie incluant la toxicité à long terme et la toxicité métabolique.
3. Coût très élevé (moyens mis à la disposition des toxicologues sont faibles).
4. Impossibilité d'expérimenter sur l'Homme.
5. Les tests toxicologiques ne permettent pas de conclure à l'innocuité d'un composé avec une probabilité suffisamment **sécurisante**.

VI. Les alternatives aux tests de toxicité sur animaux :

VI.1. Les études *in-vitro* :

- Essais de Cytotoxicité *in-vitro* ;
- Tests **de culture de cellules humaines** ;

VI.1.1 Les avantages des cultures de cellules humaines pour prévoir la toxicité :

Les **cultures de cellules humaines** sont plus précises que les DL50 chez les animaux et elles sont capables de prévoir la toxicité chez les humains avec une précision de 90%. En outre, elles sont humaines et permettent d'éviter les différences des espèces. Elles peuvent également être prélevées à partir d'un tissu (peau, foie) susceptibles d'être affectées par une

substance particulière. Par ailleurs, elles permettent au chercheur d'étudier comment une substance endommage les cellules et donc de savoir pourquoi elle est toxique. L'alternative aux tests toxicologiques par les cultures de cellules humaines permet d'éviter de faire **souffrir et de tuer des animaux**.

VI.2. Les alternatives aux tests d'irritabilité :

1. L'Eytex :

C'est un test destiné à mesurer l'irritation oculaire. Il utilise une protéine végétale dont le gel protéinique clair devient vitreux lorsqu'il est en contact avec une substance irritante.

2. L'épiderme humain reconstitué :

Il s'agit de plusieurs couches de peau humaine cultivées en laboratoire et que l'on peut utiliser pour les tests d'irritation cutanés.

VI.3. Les études humaines :

C'est l'utilisation de **volontaires humains** pour tester les nouvelles formulations. C'est le test le plus fiable. On peut évaluer l'irritation chez l'humain grâce à un patch (on place les substances sur des petites zones en haut du dos et on applique le patch pendant 2 jours).

CHAPITRE II : Pharmacogénétique

CHAPITRE II : Pharmacogénétique.

I. Problématique :

De très nombreux exemples de réponses **anormales** aux médicaments, d'origine **génétique** ont été décrits, rendant évident la nécessité de prévoir et de prévenir leur apparition.

II. Généralités :

La **variabilité interindividuelle** dans la réponse aux médicaments pourrait être expliquée par les polymorphismes génétiques (principalement des enzymes de métabolisation comme les **CYP450s**). Le génotypage des **CYP450s** ne permet d'expliquer qu'une partie de la **variabilité interindividuelle**. En effet, dans un même groupe génotypique, les **réponses** aux médicaments restent variables. Outre les **polymorphismes génétiques**, plusieurs facteurs peuvent affecter l'activité des CYP450s : tel que l'âge, le sexe, le statut pathologique, les facteurs environnementaux (cigarette, substances chimiques environnementales) ainsi qu'un traitement médicamenteux concomitant etc.

La **variabilité génétique** entre les individus a été constatée pour de nombreux gènes codant pour des enzymes de phase I et de phase II. Cette variabilité peut expliquer que certains individus soient plus sensibles que d'autres aux effets toxiques des xénobiotiques.

III. La Pharmacogénétique :

L'organisme est exposé en permanence à de nombreux xénobiotiques naturels auxquels s'ajoute un nombre croissant de médicaments. Certains xénobiotiques sont très peu solubles dans l'eau et ne peuvent être excrétés tels quels dans la bile ou dans les urines. Pour tourner cette difficulté, l'organisme dispose de systèmes enzymatiques permettant de transformer ces xénobiotiques liposolubles en métabolites hydrosolubles, facilement éliminés dans les urines ou les fèces. Ces réactions enzymatiques sont effectuées en grande partie dans le foie. Elles comportent des biotransformations de type I, comprenant des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse, et des biotransformations de type II, comprenant diverses réactions de conjugaison. La vitesse de ces réactions métaboliques est très variable

d'un individu à l'autre. Cette variabilité du métabolisme est due, en partie, à divers facteurs physiologiques (âge, sexe), pathologiques (maladies du foie, de la thyroïde, etc.), ou liés à l'environnement (régime alimentaire, tabagisme, consommation d'alcool ou de médicaments). L'influence du contrôle génétique de la biotransformation des médicaments a été reconnue dès 1959 donnant ainsi naissance à une nouvelle discipline : **la pharmacogénétique**.

La pharmacogénétique étudie les **facteurs d'origine génétique** qui influencent **la variabilité interindividuelle** de la réponse aux médicaments. La pharmacogénétique est donc la discipline qui étudie l'effet des **gènes** et de leurs **variants** sur les **médicaments**. Il s'agit d'une thématique **pluridisciplinaire**, qui combine des éléments de pharmacologie, pharmacocinétique, biochimie, génétique et biologie moléculaire. La pharmacogénétique n'intéresse pas seulement le **métabolisme** et le **transport** des médicaments mais tous les gènes impliqués dans la **réponse aux médicaments** (cible des médicaments).

Des exemples déjà anciens de polymorphismes génétiques sont l'hydrolyse de la succinylcholine par la cholinestérase, ou la N-acétylation de certains médicaments comme l'isoniazide ou l'hydralazine. Mais c'est surtout depuis 1977 que la pharmacogénétique a connu un grand développement avec la découverte d'un polymorphisme génétique touchant l'oxydation de certains médicaments par le cytochrome P-450.

Certains patients ont des réponses exacerbées à certains traitements ou ne répondent pas à d'autres, en raison de modifications génétique des processus de métabolismes des médicaments (Pharmacogénétique/Pharmacogénomique). La réponse aux médicaments est extrêmement variable d'un individu à l'autre sur le plan :

- Pharmacologique (efficacité) et ;
- Toxicologique (effets indésirables).

III.1. Différents facteurs expliquent en partie cette variabilité interindividuelle :

1– **Physiologique ou pathologique** : âge, grossesse, sévérité de la maladie, pathologies associées ;

2–**Environnementale** : alimentation, co-administration de médicaments, tabagisme ;

3–**Génétique** : modification des gènes intervenant :

- Cinétique du médicament (ADME) ;
- Cibles pharmacologiques (transporteurs, récepteurs, cibles, enzymes...)

- Processus physiopathologique (mutation oncogénique).

III.2. But de la pharmacogénétique :

1. Identifier les **variations génétiques** déterminées de la réponse aux médicaments et rechercher des bases moléculaires de ces variations.
2. Identifier l'**importance clinique** de ces différences : individualiser la thérapeutique des patients (traitement à la carte).
3. Développer des méthodes simples permettant de reconnaître les individus **sensibles** à un médicament **avant son administration** : optimisation des traitements médicamenteux, tant en termes **d'efficacité** que de **sécurité d'emploi**.

III.3. Etapes nécessaires à une étude pharmacogénétique :

1. Caractérisation des **enzymes** impliqués dans le métabolisme d'une molécule donnée ;
2. Montrer l'existence d'un **polymorphisme** de l'activité de cet enzyme ;
3. Le **caractère génétique** de ce polymorphisme doit être démontré par des études de génétique formelle ou par la mise en évidence de mutations ou de polymorphisme de gènes (**SNP**) (génotypage).

IV. Influence de la variabilité d'origine génétique du métabolisme des médicaments :

Depuis l'achèvement du séquençage du génome humain en 2003, on sait que notre génome comprend moins de 30 000 gènes mais qu'il existe une variabilité physiologique de la séquence de notre ADN génomique. Nous différons les uns des autres de quelques millions de bases : toutes les 2000 bases en moyenne, un nucléotide est remplacé par un autre ; à une position donnée (locus), la base la plus fréquente dans la population est appelée « allèle sauvage » et la base la moins fréquente « variant allélique ». Ces variants alléliques dont la fréquence est observée chez plus de 1% dans une population donnée sont dénommés Single Nucleotide Polymorphisms (**SNP**). Il en résulte la notion que tous nos gènes sont polymorphes.

La plupart de ces SNP sont sans aucune traduction clinique (non fonctionnels) car siégeant dans des zones non codantes ou non régulatrices ou encore dans une zone codante qui n'entraîne pas de modification de la séquence en acide aminé de la protéine codée. Un faible nombre de ces SNP entraîne cependant des conséquences plus ou moins importantes dans la réponse aux traitements, plus connues sous le nom de « **pharmacogénétique** » ; cette dernière se définit comme **l'étude des conséquences de la variabilité de séquence de notre génome sur la réponse à certains traitements**.

V. Variations interindividuelles aux réponses aux médicaments associées aux polymorphismes génétiques :

V.1. Polymorphisme génétique :

Par le passé, les polymorphismes ont bien souvent été mis en évidence à la suite de réponses inattendues à des agents thérapeutiques. Les **polymorphismes pharmacogénétiques** désignent les différences génétiques du métabolisme des médicaments et produits chimiques environnementaux. Ces **polymorphismes** sont associés à des aberrations d'expression ou de fonction enzymatique. Il est l'une des causes principales des variations **interindividuelles** de l'effet des médicaments.

Plus récemment, la technologie de l'ADN recombinant a permis aux scientifiques d'identifier les altérations génétiques précises responsables de certains polymorphismes. Ces polymorphismes sont maintenant caractérisés pour de nombreuses enzymes du métabolisme des xénobiotiques, y compris celles de phase I et de phase II. Au fur et à mesure qu'on découvre de nouveaux polymorphismes, on s'aperçoit que chaque individu possède un effectif distinct d'enzymes métabolisant les xénobiotiques. On peut dire de cette diversité qu'elle constitue son «**empreinte métabolique**» et que la réponse particulière de chaque individu à un produit chimique dépend de l'interaction complexe des superfamilles d'enzymes responsables du métabolisme des xénobiotiques.

En l'absence de toute influence d'origine génétique ou environnementale, le métabolisme représente une source majeure de variabilité de réponse aux médicaments. En effet, la quantité de **CYP3A4** d'un individu sain à l'autre peut varier physiologiquement d'un facteur 10 ! Il en résulte des conséquences immédiates en ce qui concerne les concentrations circulantes de médicament. Comme illustré sur la **Figure 14**, on peut observer que les concentrations plasmatiques d'un médicament métabolisé par le CYP3A4 sont considérablement différentes d'un individu sain à l'autre.

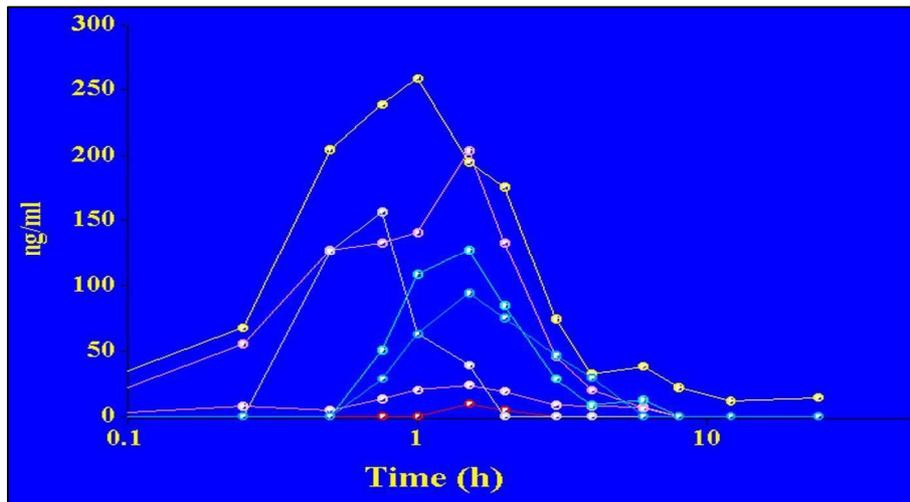


Figure 14 : Variabilité des concentrations d'un médicament chez des sujets sains (MELET, 2004).

V.2. Conséquences cliniques du polymorphisme génétique :

La qualité et la quantité des enzymes qui catalysent les réactions de biotransformation dépendent de leurs gènes codants. Or, ces gènes peuvent présenter des mutations. L'existence des différentes versions alléliques d'un même gène a, par conséquent, des génotypes différents, définissant un polymorphisme génétique.

Les mutations qui caractérisent ces allèles non-fonctionnels sont de nature diverse :

1- Des microlésions :

- Mutations non-sens, faux-sens, par substitution ;
- Décalage du cadre de lecture ou frame shift par petite délétion ou insertion ;
- Mutations affectant les sites consensus d'épissage.

2- Des macrolésions :

- Des délétions complètes du gène, à l'origine d'un déficit complet d'activité enzymatique ;
- Des amplifications géniques (de 2 à 13 copies du gène), responsables d'une sur-expression génique associée au phénotype ultra-rapide.

Ces modifications génétiques génèrent des enzymes absentes ou inactives, des P450 à activité catalytique diminuée ou altérée ou des P450 à activité accrue. Un polymorphisme divise une population en au moins deux phénotypes en fonction de la capacité métabolique des individus envers un médicament donné (métaboliseurs lents ou rapides). Si le médicament est inactivé par le P450, le phénotype métaboliseur lent se traduit par une amplification souvent néfaste de l'effet pharmacologique du médicament et des effets toxiques associés. Chez un

métaboliseur rapide, le médicament est éliminé plus rapidement ce qui diminue son efficacité thérapeutique. Prenons l'exemple du CYP2D6, polymorphe des P450 le mieux étudié du métabolisme de l'antihypertenseur débrisoquine : les métaboliseurs lents (homozygotes mutés), les métaboliseurs rapides (hétérozygotes ou homozygotes sauvages) et les métaboliseurs ultrarapides qui possèdent plusieurs copies fonctionnelles du P450. Chez les métaboliseurs lents, la débrisoquine administrée à dose normale peut créer des accidents d'hypotension.

En effet, cette dose de médicament est calculée d'après la population globale qui est constituée d'acétyleurs lents ou rapides dans une proportion à peu près égale. Par exemple, les acétyleurs rapides ont besoin d'une dose plus élevée d'hydralazine, de dapsone et de phénelzine pour bénéficier d'un même effet thérapeutique.

VI. Distribution tri-modale des individus :

Outre les déterminismes polygéniques donnant lieu à une distribution modale (monophasique) entre les divers individus, on a peu à peu découvert un certain nombre de déterminismes monogéniques qui aboutissent à une distribution bimodale ou trimodale des individus en métaboliseurs rapides, lents ou intermédiaires.

Un polymorphisme génétique divise donc une population en au moins **3 phénotypes** en fonction de la capacité métabolique des individus envers un médicament donné :

Métaboliseurs lents, intermédiaires et rapides.

- Chez un métaboliseur **lent** : la **biodisponibilité** du médicament est **élevée**, il en résulte une amplification souvent néfaste de l'effet pharmacologique du médicament et des effets toxiques associés.
- Chez un métaboliseur **rapide** : le médicament est **éliminé plus rapidement**, il en résulte une diminution de son efficacité thérapeutique.

VI.1. Les enzymes métabolisant les xénobiotiques ou les médicaments :

Comment l'organisme répond-il à la multitude de produits chimiques exogènes auxquels il est exposé ?

Depuis plus de quatre décennies, les processus métaboliques (à médiation enzymatique) dépendant de ces enzymes sont classés en réactions de phase I ou de phase II (**Figure 15**). Les réactions de phase I sont principalement gérées par une superfamille d'enzymes hautement polyvalentes, appelées cytochromes P450, bien que d'autres superfamilles d'enzymes puissent également intervenir (**Figure 16**).

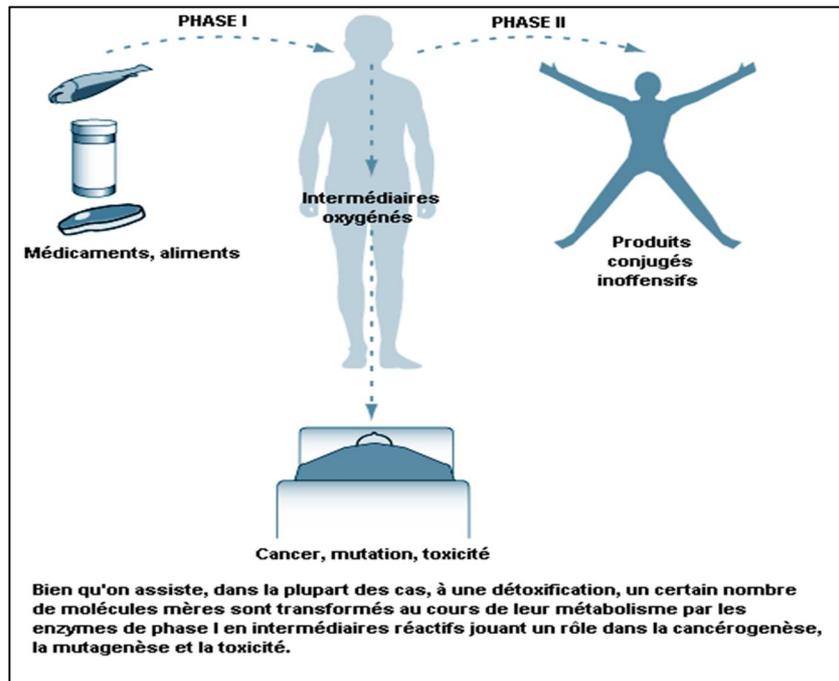


Figure 15 : Présentation classique des enzymes de phase I et de phase II du métabolisme (KALOW, 1992).

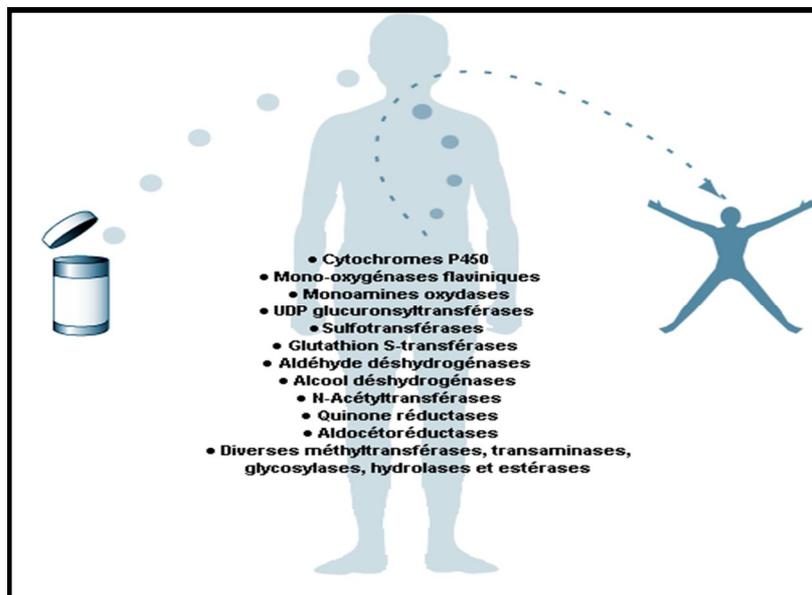


Figure 16 : Exemples d'enzymes métabolisant les médicaments (KALOW, 1992).

VII. Les cytochromes p450 :

Le foie est le principal organe du métabolisme des xénobiotiques, on trouve aussi certaines enzymes participant à leur métabolisme à un taux assez élevé dans le tractus gastro-intestinal, gonades, poumon, cerveau, reins, ainsi qu'en plus ou moins grande quantité dans

toute cellule vivante. Le plus souvent, les produits chimiques **liposolubles** sont transformés en **métabolites hydrosolubles** plus faciles à **excréter**. Cependant, il arrive aussi que ces mêmes enzymes transforment des produits chimiques **inertes** en molécules **intermédiaires hautement réactives**. Ces intermédiaires peuvent réagir avec des macromolécules cellulaires (protéines/ADN). Ainsi, pour chaque produit chimique auquel l'être humain est exposé, 2 voies compétitives potentielles coexistent, celle de **l'activation métabolique** et celle de **la détoxification**.

VII.1. Un bref historique :

La découverte des cytochromes P450 s'inscrit dans la continuité de recherches menées dès le 19^{ème} siècle sur la détoxification de composés exogènes (les xénobiotiques) par l'organisme.

A la fin des années 1940s, une littérature déjà abondante décrit la réponse métabolique des animaux après ingestion de substances chimiques (toxines, médicaments). Les composés ingérés sont retrouvés dans les urines sous forme plus hydrosoluble ; oxydés ou conjugués à des molécules hydrophiles. L'ensemble de ces résultats permet à **WILLIAMS RT** d'énoncer en 1947 les principes fondateurs du métabolisme des xénobiotiques.

Ainsi, les organismes vivants sont exposés en permanence à de nombreux xénobiotiques aux structures chimiques variées (aliments, polluants, médicaments). Ces substances sont fréquemment hydrophobes et peuvent comporter des groupements chimiques réactifs. Afin d'éviter leur accumulation toxique pour l'organisme, un système de détoxification a été mis en place au cours de l'évolution.

VII.2. Définition des cytochromes P450 :

Ce sont des **hémoprotéines** enzymatiques impliquées dans le métabolisme oxydatif (mono-oxygénases), localisées majoritairement au niveau hépatique, mais aussi au niveau intestinal. La localisation cellulaire des CYP450s est au niveau du réticulum endoplasmique (microsomal), bien que sa présence au niveau mitochondrial fût aussi démontrée. Les CYP450s sont une famille d'enzymes du métabolisme structurellement composés d'une **apoprotéine** avec en son **centre** une molécule d'**hème** (**Figure 17**).

Au site actif, tous les CYP450s présentent cette portion hémique puisque le fer est essentiel à la réaction d'oxydation du substrat. L'apoprotéine est une chaîne polypeptidique de masse moléculaire entre 45 et 60 kDa et de séquence très variable. Sa composition en acides

aminés et sa conformation conditionnent la sélection en taille comme en fonctionnalité des substrats acceptés.

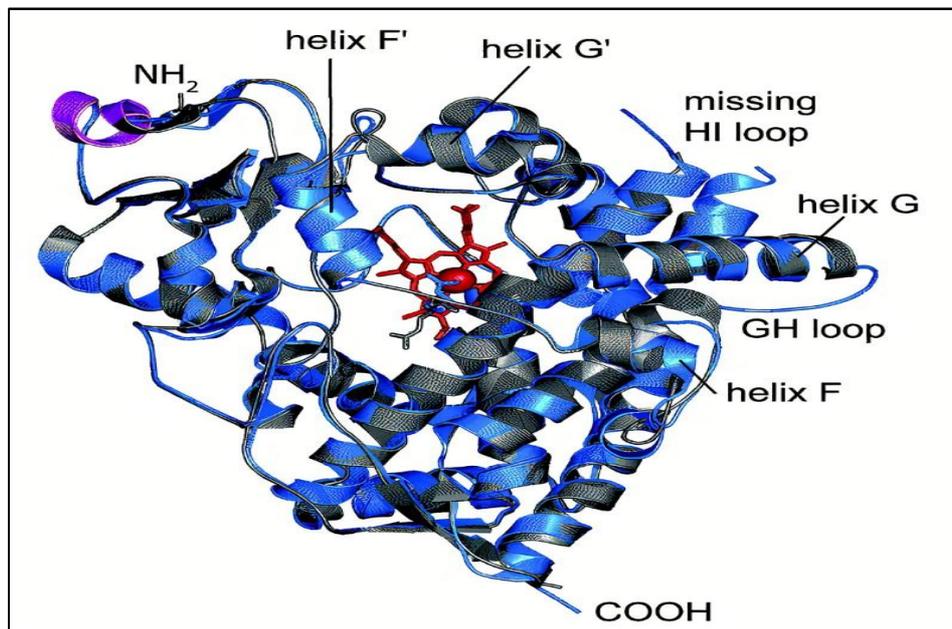


Figure 17 : Structure primaire du cytochrome P450 3A4 (WILLIAMS *et al.*, 2004 ; YANO *et al.*, 2004). L'hème est représenté par des bâtons rouges.

Les CYP450s tiennent leur dénomination du fait que ces cytochromes (CY) comportent en leur centre un pigment (P) rouge qui, lorsque lié à un groupement monoxyde de carbone, absorbe la lumière à une longueur d'onde de 450 nm.

VII.3. Fonctions des cytochromes P450 :

La superfamille des CYP450s est majoritairement responsable du métabolisme des médicaments. Ces enzymes oxydatives seraient impliquées dans la biotransformation d'environ 75% de tous les médicaments prescrits en clinique. Il est toutefois à noter que les CYP450s remplissent aussi un rôle important dans le métabolisme de substances endogènes, notamment en biotransformant des acides gras et le cholestérol (CHO). Les CYP450s effectuent des réactions de phase I qui consistent en l'ajout d'un groupement polaire aux médicaments afin de les rendre plus hydrosolubles et ainsi faciliter leur excrétion.

Récemment, la superfamille des gènes P450 des mammifères a été divisée en trois groupes : ceux qui interviennent surtout dans le métabolisme des xénobiotiques et ceux qui participent à la synthèse de diverses hormones stéroïdes d'une part, et à d'autres fonctions

endogènes importantes, de l'autre. Ce sont les enzymes du P450 métabolisant les xénobiotiques qui sont les plus intéressantes sur le plan de la toxicité.

VII.4. Nomenclature des cytochromes P450 :

De manière générale, les isoformes des CYP450s ont ainsi été classées en familles, puis sous-familles partageant plus de 40% et 55% d'homologie respectivement. Suivant l'abréviation CYP, pour cytochrome et pigment, un premier chiffre désigne la famille (ex : CYP1, CYP2, CYP3 ou CYP4), puis une lettre représente la sous-famille (ex : CYP2B, CYP2C, CYP2D ou CYP2E). Finalement, sous une même sous-famille, un dernier chiffre désignera précisément une isoforme, par exemple CYP2C9 et CYP2C19. À ce jour, 57 gènes des CYP450s divisés en 18 familles et 43 sous-familles ont été identifiés chez l'humain.

De cette superfamille d'enzymes, les familles CYP1, CYP2 et CYP3 sont celles impliquées de façon importante dans le métabolisme des médicaments. En effet, les plus impliqués dans le métabolisme des médicaments (% des réactions métaboliques mineures et majeures effectuées par l'isoforme pour les médicaments sur le marché et en développement) sont les CYP3A4/5 (33%), 2D6 (13%), 2C9 (10%), 2C19 (9%), 1A2 (9%), 1A1 (5%), 2C8 (5%), 2B6 (4%) et 2E1 (3 %).

VII.5. Polymorphisme génétique des CYP450 :

Le métabolisme des médicaments via les **CYP450s** est un déterminant majeur de la réponse pharmacologique. La présence de polymorphismes génétiques des CYP450s est largement étudiée afin d'améliorer l'efficacité d'un traitement ou encore minimiser la survenue d'effets indésirables. Des facteurs **endogènes (polymorphisme génétique)** ou **exogènes (induction, inhibition)** tendent à moduler l'activité et le niveau d'expression des **CYP450**. Les **variations du métabolisme** qui en résultent peuvent avoir des conséquences pharmacotoxicologiques importantes.

A titre d'exemple, le polymorphisme génétique qui affecte CYP2D6 est l'un des mieux connus. À ce jour, on dénombre plus de 90 variant alléliques du gène CYP2D6, dont une vingtaine sont dits non-fonctionnels et responsables d'un déficit d'activité enzymatique.

VII.8. Les polymorphismes autres que le P450 :

De nombreux polymorphismes existent également dans d'autres superfamilles d'enzymes métabolisant les xénobiotiques (glutathion transférases, UDP glucuronosyltransférases, *p*-oxonases, déshydrogénases, N-acétyltransférases ou mono-

oxygénases à flavine, etc.). Etant donné que la toxicité finale d'un intermédiaire généré par le cytochrome P450 dépend de l'efficacité des réactions ultérieures de détoxification lors de la phase II, le rôle combiné des multiples polymorphismes enzymatiques revêt une importance capitale pour la prédisposition aux maladies provoquées par des produits chimiques.

L'équilibre métabolique entre les réactions de phase I et de phase II joue donc selon toute vraisemblance un rôle clé dans la survenue de ce type de pathologies chez l'humain et constitue le facteur génétique déterminant d'une réponse toxique.

VIII. Moyens d'investigation du polymorphisme génétique :

La détermination du **phénotype** (activité réelle des CYP450s) est indispensable afin de réduire les risques d'échec thérapeutique ou de réactions indésirables aux médicaments administrés aux doses usuelles. L'utilisation de **substrats-marqueurs** permet d'évaluer *in-vitro* ou *in-vivo* la capacité métabolique (phénotype) réelle d'une enzyme par la quantification de leur biotransformation.

VIII.1. Méthodes de détermination du phénotype :

1. Par phénotypage :

Les méthodes de phénotypage reposent, sur l'administration d'un médicament-test, suivie d'une mesure des quantités de substrat résiduelles et de leurs métabolites au niveau urinaire. Le rapport métabolique, est le reflet de l'activité enzymatique étudiée, permettant de classer les individus en métaboliseurs extensifs ou limités.

Protocole expérimental :

- 1- Administration d'une molécule test (posologie standardisée) ;
Exemple : la débrisoquine (antihypertenseur) ;
- 2- Recueil urinaire pendant une période définie (selon protocole validé) ;
- 3- Dosage de la débrisoquine et de son métabolite hydroxylé ;
- 4- Calcul d'un indice de métabolisation (**IM**).

2. Par génotypage :

La détermination du phénotype par génotypage demande d'utiliser un grand nombre de test et est par conséquent très coûteuse.

Protocole expérimental :

Les méthodes de génotypage reposent sur la technique de PCR, nécessitant le recueil d'un échantillon biologique (sang total, frottis buccal, racines de cheveux), à partir duquel est extrait et purifié l'ADN génomique.

La délétion complète du gène CYP2D6 (CYP2D6*5) permet la prédiction du phénotype limité.

La prédiction du phénotype ultrarapide repose sur l'identification d'une duplication (deux copies du gène en tandem sur le même chromosome) ou d'une amplification génique (au moins trois allèles fonctionnels) du CYP2D6.

3. Interprétation des résultats : Distribution de fréquence d'allure tri-modale (3 phénotypes) :

- 1) Métaboliseur lent (PM) : $IM > 12,6$
- 2) Métaboliseur intermédiaire (EM) : $0,2 < IM < 12,6$
- 3) Métaboliseur rapide ou ultrarapide (UM) : $IM < 0,2$

IX. Mécanismes moléculaires du polymorphisme génétique :

A. Simple nucléotide :

- Dans une région codante : substitution d'acides aminés.
- Dans une région non codante :

Séquence de régulation : sous ou surproduction de protéines actives.

Intron : ARNm inapproprié, erreurs post traductionnelles, modification de l'activité enzymatique.

B. Délétion partielle ou totale, duplication ou amplification génique.

Exemple de l'allèle *4B du CYP 2D6 :



Enzyme normale : 497 aa Enzyme mutée *4B : 181 aa, inactive

X. Conséquences cliniques du polymorphisme génétique du métabolisme d'oxydation :

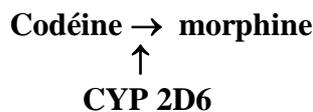
X1. Métaboliseurs lents :

- Après une dose standard de médicament, les métaboliseurs lents vont être exposés à des concentrations élevées de médicament non transformé.

Résultats :

- Divers effets toxiques ;
- Accumulation de la molécule ;
- Plus sujets aux effets indésirables ;
- Pas d'effet thérapeutique des **prodrogues** ;

Exemple : absence d'effet analgésique de la codéine.



X.2. Métaboliseurs ultra rapides :

- Une dose standard du médicament peut être inefficace dans ce cas ;
- Absence de réponse thérapeutique (Pas d'effet thérapeutique **des drogues**) ;
- Les métaboliseurs rapides ont besoin d'une dose plus élevée de médicament pour bénéficier d'un même effet thérapeutique.

XI. Quelques exemples de polymorphismes des cytochromes P450 :

Il faut bien concevoir que pour une même posologie, les concentrations circulantes de nombreux médicaments peuvent être considérablement différentes d'un sujet à l'autre, en dehors de toute influence environnementale (repas, interactions, maladies associées...). Ces disparités « physiologiques » de niveaux de concentrations plasmatiques de médicaments sont fréquemment associées à des modifications de la réponse aux médicaments (effet désiré insuffisant chez les patients métabolisant activement le médicament ou effets indésirables chez les patients métabolisant lentement le médicament). Il est difficile de prédire si un sujet aura spontanément un métabolisme important ou faible car en fonction de l'enzyme impliqué dans l'élimination de tel ou tel médicament, un même sujet peut éliminer rapidement certains médicaments et lentement d'autres.

En revanche, pour certains gènes, une petite partie de la population peut présenter plusieurs copies du même gène du métabolisme. Ces sujets sont dénommés métaboliseurs ultrarapides. Cet exemple est pour l'instant décrit que pour un seul gène, le CYP2D6. Ces

métaboliseurs ultrarapides éliminent beaucoup rapidement les médicaments et nécessitent des posologies bien supérieures pour obtenir un effet thérapeutique.

XI.1. Exemple de l'isoniazide :

Des polymorphismes génétiques des enzymes du métabolisme des médicaments sont décrits pour de nombreux systèmes enzymatiques impliqués dans des réactions de phase I ou de phase II. Cette variabilité d'origine génétique a des conséquences parfois suffisamment importantes pour qu'elle soit recherchée en pratique thérapeutique. L'exemple le plus connu est celui de l'acétylation de l'isoniazide, antituberculeux, pour lequel on distingue :

- Des acétylateurs rapides, avec une demi-vie d'élimination d'environ 1 heure.
- Des acétylateurs lents, avec une demi-vie d'élimination d'environ 3 heures. Du fait de cette demi-vie augmentée, des surdosages peuvent apparaître.

XI.2. Exemple de la Thiopurine S-MéthylTransférase (TMPT) :

Le polymorphisme de l'activité enzymatique de la thiopurine méthyltransférase (TPMT) représente un exemple de l'utilisation clinique de la pharmacogénétique. La TPMT, intervient dans le métabolisme de traitements inhibant la synthèse des bases puriques, l'azathioprine (Aza) ou la mercaptopurine (MP).

La TPMT est une enzyme présente dans différents tissus localisée principalement au niveau hépatique. Elle est également présente dans le cytosol des érythrocytes humains. Il existe un polymorphisme génétique de la TPMT qui explique l'importance de cette voie enzymatique pour la variabilité interindividuelle de l'efficacité et de la toxicité de l'Aza.

Le gène fonctionnel (ou sauvage) qui présente une activité normale a été désigné sous le terme de $TPMT^{+1}$. De nombreuses mutations ponctuelles ou en combinaison portant à la fois sur les introns et les exons ainsi que sur la séquence promotrice ont été rapportées. Certaines d'entre elles ont été associées avec un phénotype déficient, mais d'autres sont associées à un phénotype intermédiaire ou normal de l'activité TPMT (**Figure 18**). Toutes les mutations n'ont pas été décrites. De ce fait, la corrélation entre génotype et phénotype est actuellement de 98%.

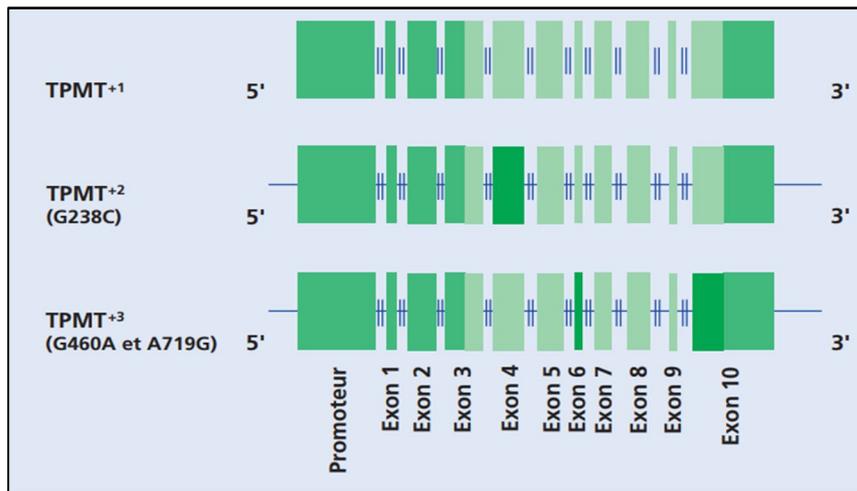


Figure 18 : Gène de la TPMT. Allèle sauvage et principales mutations (THERVET, 2000).

L'AZATHIOPRINE (Aza) est une molécule utilisée pour le traitement préventif des rejets aigus d'allogreffe ainsi que dans de nombreuses pathologies auto-immunes. Après transplantation d'organe. Elle est aussi utilisée pour le traitement de maladies auto-immunes lorsque celles-ci sont résistantes à un traitement par stéroïdes, ou lorsque la dose des corticoïdes à long terme risque d'entraîner de nombreux effets indésirables. Elle est ainsi couramment utilisée en gastro-entérologie, pour les maladies inflammatoires du tube digestif, en dermatologie ou dans le cadre d'une maladie systémique comme le lupus érythémateux disséminé. L'Aza est transformée en 6-mercaptopurine (6-MP). Cette dernière molécule est utilisée directement comme traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques.

L'azathioprine et la 6-MP ont principalement une toxicité hématologique induisant une leucopénie à polynucléaires neutrophiles. Cette leucopénie peut être associée plus rarement à une anémie normocytaire ou macrocytaire, ou encore plus rarement à une thrombopénie.

La 6-MP comporte trois voies métaboliques (**Figure 19**). L'hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT) la transforme en 6-TGN. Ces 6-TGN sont responsables d'une part de l'effet immunosuppresseur, et d'autre part d'une toxicité proportionnelle à leurs concentrations. La xanthine oxydase (XO) inactive la 6-MP en acide thio-urique. La TPMT transforme la 6-MP en 6-méthylmercaptopurine (6-MMP) par méthylation de la fonction thiol.

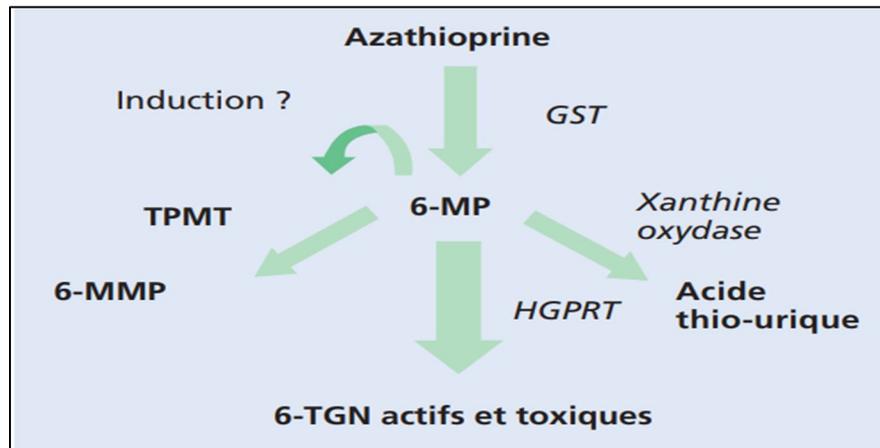


Figure 19 : Représentation schématique des voies métaboliques de l'Aza et de la MP (THERVET, 2000).

XI.2.1. Conséquences du polymorphisme :

Schématiquement, deux circonstances peuvent se présenter. Chez un patient pour lequel l'activité TPMT est constitutionnellement basse, la majeure partie de la 6-MP sera métabolisée par la HGPRT en dérivés 6-TGN. L'effet principal observé sera une hématotoxicité pouvant conduire à une aplasie du fait de l'accumulation de produits du métabolisme toxique. À l'autre extrême, en cas d'activité TPMT supérieure à celle observée dans la population générale, la majorité de la 6-MP sera dégradée en 6-MMP. De ce fait, peu de dérivés de 6-TGN seront produits et le patient encourt le risque de sous-immunosuppression.

Des études cliniques chez l'homme ont prouvé que l'accumulation cellulaire de 6-TGN était bien inversement proportionnelle à l'activité TPMT. Plusieurs études ont également montré que les patients qui présentent un déficit en TPMT accumulent de très fortes concentrations de 6-TGN dans leurs globules rouges et probablement d'autres tissus hématopoïétiques.

XI.2.2. Toxicité clinique :

Chez les patients leucémiques traités par MP, 100 % des patients homozygotes pour la mutation devaient arrêter leur traitement en raison d'une toxicité hématologique, contre 54% chez les patients hétérozygotes et 23% des patients ne présentant pas de mutation. La **Figure 20** montre le niveau de l'activité TPMT dans les érythrocytes. Le génotype présumé pour le gène de la TPMT est également montré. TPMTL et TPMTH sont les allèles qui entraînent respectivement un bas et un haut niveau d'activité.

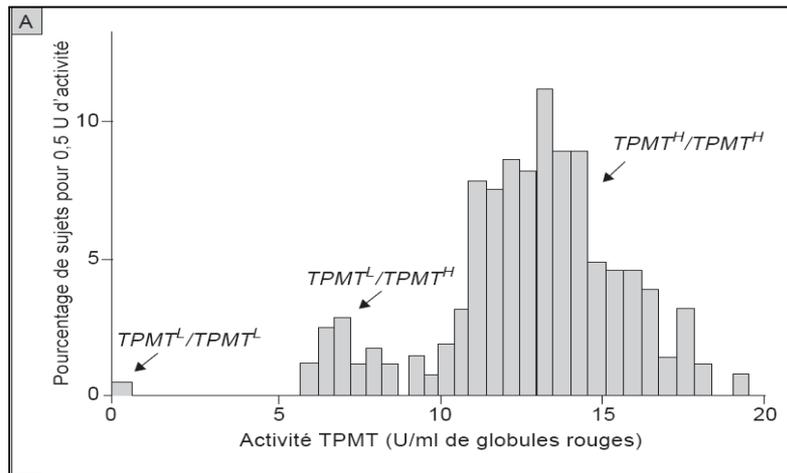


Figure 20 : La mesure de l'activité enzymatique de la TPMT (WEINSHILBOUM, 2003).

XI.3. Exemple de l'oméprazole métabolisé par le CYP2C19 :

La **Figure 21** illustre les conséquences d'un polymorphisme fonctionnel du CYP2C19 qui métabolise l'oméprazole, un antiulcéreux de la famille des inhibiteurs à protons. Les sujets métaboliseurs lents éliminent lentement l'oméprazole, ils ont des concentrations circulantes plus élevées, un pH intragastrique plus élevé et un taux de guérison des ulcères gastroduodénaux de 100% (**Figure 22**).

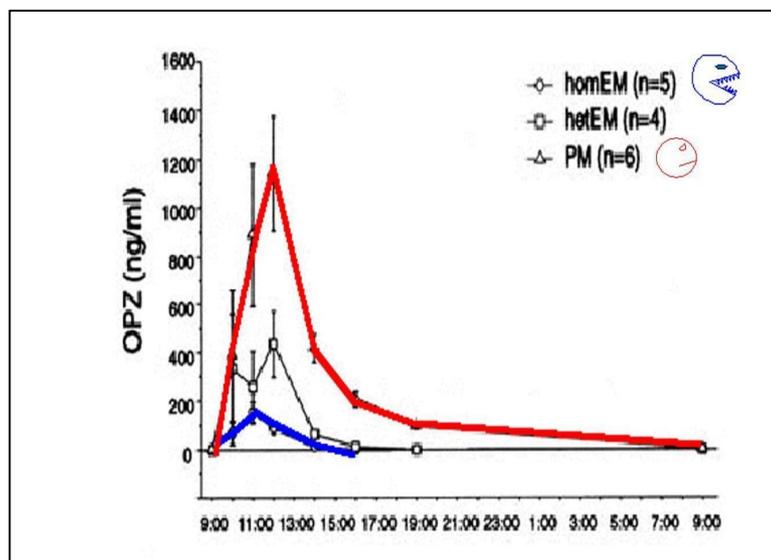


Figure 21: Effet du génotype CYP2C19 sur la pharmacocinétique de l'oméprazole (PHARMACOMédicale.org).

En bleu, concentrations circulantes d'oméprazole chez les métaboliseurs rapides, en rouge chez les métaboliseurs lents, en noir chez les métaboliseurs intermédiaires. homEM=homozygotes sauvages, métaboliseurs rapides ; hetEM=hétérozygotes, métaboliseurs intermédiaires ; PM=homozygotes pour le variant allélique délétère, métaboliseurs lents.

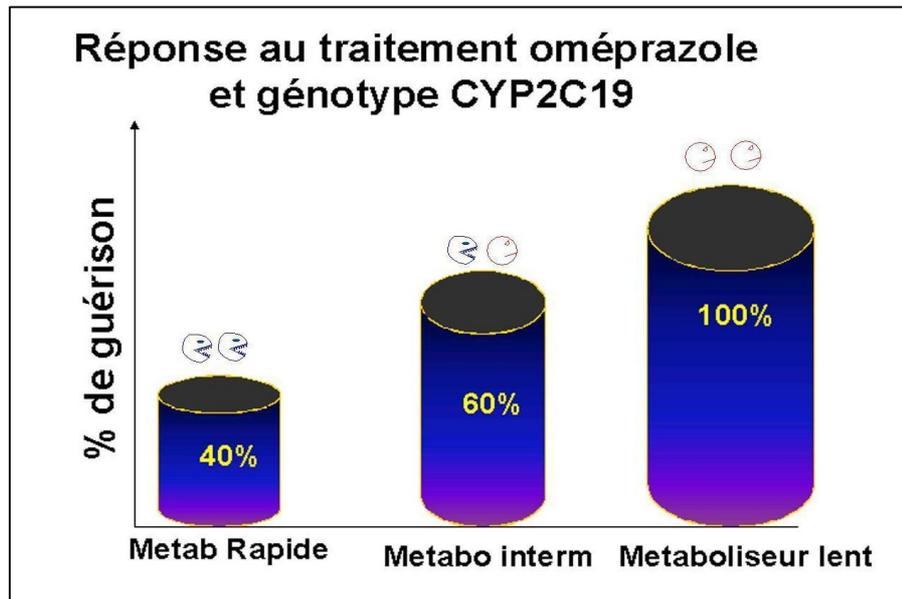


Figure 22 : Effet du génotype CYP2C19 et réponse à un traitement par oméprazole (guérison de l'ulcère gastro duodéal) (PHARMACOMédicale.org).

XII. P450, réponse individuelle aux xénobiotique et thérapie personnalisée :

La dernière décennie a été marquée par des progrès remarquables dans la compréhension des bases génétiques de la réponse individuelle aux produits chimiques présents dans les médicaments, les aliments et les polluants environnementaux. Les enzymes métabolisant les médicaments ont une profonde influence sur la manière dont les individus réagissent aux produits chimiques. Nous sommes chaque jour un peu mieux en mesure d'évaluer le risque toxique de nombreux médicaments et produits chimiques environnementaux. C'est le cas en particulier pour l'isoforme *CYP2D6* du cytochrome P450. A l'aide de techniques ADN relativement simples, il est possible de prévoir la réponse probable à n'importe quel médicament métabolisé par cette enzyme.

Au cours des années à venir, les chercheurs pourront parvenir à identifier une multitude d'autres polymorphismes (phénotypes) impliquant des enzymes du métabolisme des médicaments. Ces informations seront le fruit de la mise en œuvre de techniques ADN améliorées, peu invasives, permettant d'identifier les génotypes dans la population humaine.

De telles études devraient être particulièrement précieuses pour évaluer le rôle des **produits chimiques** dans de nombreuses maladies **environnementales** tel que les **cancers** d'origine encore inconnue. La prise en compte des multiples polymorphismes touchant les

enzymes métabolisant les médicaments, agissant de manière combinée, représente à n'en pas douter un domaine de recherche particulièrement fertile. Au niveau collectif, cette information devrait permettre de prodiguer des conseils personnalisés aux individus afin de leur éviter de s'exposer aux produits chimiques susceptibles d'agir sur eux.

CHAPITRE III : Les Mutagènes

CHAPITRE III : Les Mutagènes.

I. Introduction :

L'information génétique est portée par une macromolécule dont la composition est commune à tous les êtres vivants, c'est l'acide désoxyribonucléique (ADN). C'est une macromolécule composée de deux chaînes sucre-phosphate disposées en hélice l'une autour de l'autre, et qui portent, attachées, des séquences de paires de bases. Les constituants chimiques polarisés de l'ADN font de lui une substance à fortes interactions avec les molécules qui l'entourent. A cet effet, il est très important qu'une cellule soit en mesure de protéger son matériel génétique des différentes interactions pouvant lui être nuisibles.

Par définition, une mutation est un changement permanent dans une séquence nucléotidique d'ADN, causée par une erreur de réparation, ou par une exposition à des agents mutagènes, elle peut se produire au niveau génique ou chromosomique. Les mutations chromosomiques ne représentent que 8% du taux global des mutations, les mutations géniques quant à elles sont les plus fréquentes avec un taux de 92%.

La plupart des recherches faites sur les dommages causés à l'ADN ont été menées via l'utilisation de radiations ionisantes, de rayonnement ultraviolets, et d'agents alkylants, car ces trois facteurs sont en mesure de causer une majorité très complète des différents types de dommages causés par l'ensemble des agents physiques et chimiques susceptibles d'engendrer une génotoxicité.

II. Mutations et mutagènes :

Une **mutation** est un changement qui se produit dans le matériel génétique de la cellule, c'est-à-dire l'ADN. Les conséquences des modifications dépendront du type de cellules modifiées.

Un **mutagène** est un agent physique ou biologique, ou une substance chimique, susceptible de provoquer des mutations, de modifier les informations génétiques (généralement l'ADN) d'un organisme. À l'origine de ces changements, il augmente la fréquence de certaines mutations, souvent avec insertion. Il initie une **mutagenèse**.

Le mutagène augmente la fréquence des mutations au-dessus du niveau naturel. Toutes les mutations ne sont pas causées par des mutagènes. Il existe des "mutations spontanées", appelées ainsi en raison d'erreurs dans la réplication, la réparation et la recombinaison de l'ADN (Figure 23).

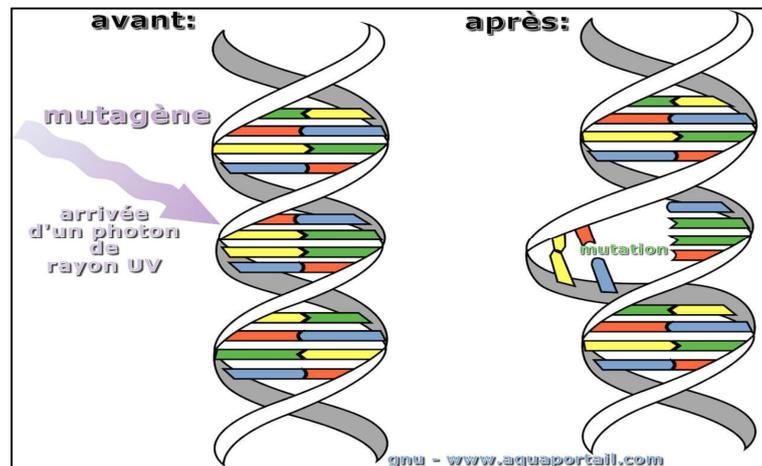


Figure 23: Un photon UV provoque une mutation dans l'ADN.
(<https://www.aquaportail.com/definition-5077-mutagene.html>)

Il existe deux types de cellules susceptibles d'être affectées : la cellule somatique et la cellule germinale. Les cellules somatiques comprennent toutes les cellules du corps (ex. : cellules hépatiques, neurones), sauf les cellules germinales. Les cellules germinales sont les spermatozoïdes et les ovules.

Un agent mutagène est celui qui va induire une mutation. Si la mutation se produit dans une cellule somatique, il pourra en résulter la mort de la cellule, un cancer ou d'autres effets néfastes. Si la mutation se produit dans une cellule germinale, elle pourra avoir des conséquences sur la descendance. Toutefois, si une cellule est transformée par un mutagène, il n'en résultera pas nécessairement une conséquence néfaste, car tous les mutagènes ne causent pas nécessairement d'effet biologique décelable. De plus, l'organisme peut réparer une partie plus ou moins importante des altérations. Il existe des tests permettant de repérer les produits ayant un potentiel mutagène (ex. : aberration chromosomique, dominance létale). Les résultats de ces tests facilitent l'identification et la classification des agents mutagènes de nature chimique (ex. : acrylamide, cyclophosphamide) ou physique (ex. : radiations ionisantes).

III. Aberrations chromosomiques et chromatidiques :

Les aberrations sont définies comme un changement dans la structure normal et le nombre de chromosomes, elles indiquent un dommage stable et persistant (mutation) qui

représente un événement parfois, potentiellement initiateur du processus cancéreux (cancérogénèse) menant à l'apparition de néoplasmes. Selon **LEONARD (1990)**, les aberrations chromosomiques et chromatidiques sont classées comme Illustrées dans le tableau suivant :

Tableau 2: Schémas des aberrations chromosomiques et chromatidiques (**LEONARD, 1990**).

Aberrations	Définition	Schéma
Délétions terminales.	Elles se présentent sous forme de fragments chromatidiques disposés par paires.	
Délétion Interstitielles.	Fragments acentriques plus petits que les délétions terminales, résultent de deux lésions transversales très voisines.	
Anneaux acentriques.	Résultent de deux cassures assez lointaines à l'intérieur d'un chromosome, les extrémités des fragments se ressoldent pour former un anneau.	
Anneaux centriques.	Ce sont des anomalies qui résultent de coupures se produisant de part et d'autre du centromère, suivies de la soudure des extrémités.	
Inversions péricentrique.	Résultent de deux coupures situées de part et d'autre du centromère, suivies de l'inversion du segment contenant le centromère puis de son réassemblage.	
Echanges symétriques.	Ces aberrations résultent de dommages dans deux chromosomes suivis d'un recollement aberrant (transloqué)	
Echanges asymétriques.	Proviennent de dommages produits dans deux ou plusieurs chromosomes suivis d'une soudure entre les parties pourvues de centromère, il en résulte la formation de chromosome polycentrique.	
Lacune (gap)		
Fragment.	Elles sont relativement simples, elles peuvent résulter, soit d'une lacune, d'une cassure, ou d'un échange entre chromatides.	
Echange Chromatides sœurs.		

IV. Les mutations géniques :

IV.1. Remplacement d'une base par un analogue structural :

L'exemple du 5-bromouracile édifie le mieux le mécanisme qui peut conduire à une mutation de l'ADN. Ainsi, le 5-bromouracil est un analogue structural de la thymine comme illustré dans la **Figure 24** (a), lorsqu'il s'incorpore dans son état normal (5-BU_t) dans l'ADN il se lie spécifiquement avec l'adénine, cette liaison ne constitue pas un danger pour l'ADN car les séquences nucléotidiques des brins d'ADN néoformés lors de la réplication seront identiques aux brins matriciels. Ce n'est que lorsque le 5-bromouracile se trouve dans son état rare, c'est-

à-dire se comportant comme une cytosine (5-BUc), qu'il cause une mutation délétère pour l'ADN. En effet, la forme 5-BUc rare se lie spécifiquement avec la guanine et cause une transition $AT \rightarrow GC$ (substitutions de purines par des purines ou de pyrimidines par des pyrimidines) illustré dans la **Figure 24** (b), la séquence nucléotidique est alors mutée et la réplication de l'ADN perpétuera cette mutation génique.

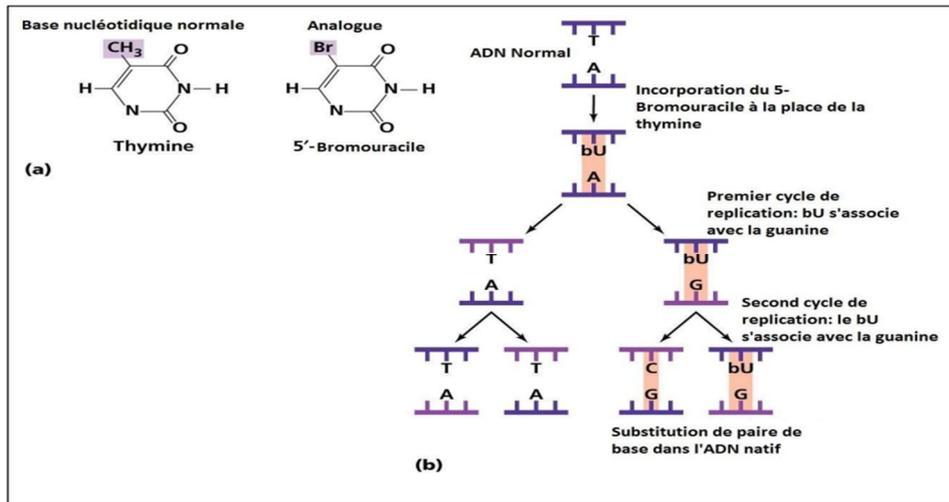


Figure 24 : (a) La thymine et son analogue structural ; (b) Schéma de substitution de base par le 5-bromoUracile. (Traduit de l'anglais) (CUMMINGS, 2006).

IV.2. Agents intercalants :

Un grand nombre d'agents intercalants sont connus pour leur grand potentiel mutagène à l'instar des proflavines, benzopyrenes, psoralènes, et l'acridine orange (**Figure 25**). Toutes ces molécules ont un point commun qui fait d'elles des intercalants de l'ADN, à savoir, une structure plane, avec laquelle elles produisent des dommages fonctionnels en induisant une distorsion de la double hélice et en bloquant le plus souvent la réplication de l'ADN par leur insertion entre deux paires de bases adjacentes.

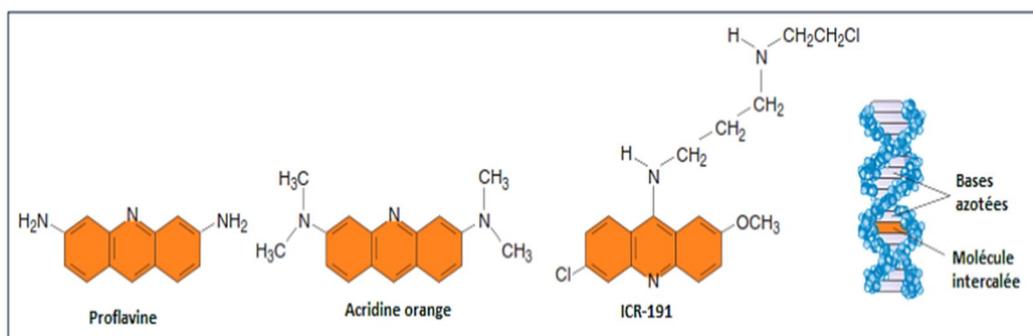


Figure 25 : Intercalation de l'acridine orange dans de l'ADN (traduit de l'anglais) (GRIFFITH *et al.*, 2012).

Il est à noter que, les agents intercalants peuvent produire aussi bien des additions que des délétions au niveau d'un brin néoformé issu de la réplication du brin où l'agent intercalant s'est glissé. L'addition ou la délétion d'une ou plusieurs paires de base aura pour conséquence un décalage du cadre de lecture synonyme de pertes d'informations indispensables si la mutation a lieu dans une partie codante de l'ADN.

IV.3. Rayons ultraviolets :

Les rayonnements ultraviolets sont des rayonnements électromagnétiques dont la longueur d'onde est comprise entre 100 et 400 nanomètres, selon leurs spectres d'absorption, on distingue trois types de rayons UV à savoir, les UVA, les UVB, et les UVC. Cette énergie lumineuse provient principalement des rayonnements solaires auxquels sont soumis les organismes vivants, une exposition prolongée ou aigue à ce type de rayonnement peut provoquer des mutations génétiques même si l'épiderme atténue les rayonnements de grande énergie. Par exemple, l'apparition des mélanomes malins est en étroite corrélation avec l'activité des espèces réactives de l'oxygène, et les risques de développer un cancer chez les individus atteints du Xeroderma pigmentosum, maladie génétique rare caractérisée par une sensibilité accrue de la peau aux rayons du soleil, sont dus à d'éventuelles apparitions de dimères de thymine au niveau de l'ADN causés par les rayons ultraviolets. Notons dans le cas de cette maladie, que les risques sont liés directement au fait que les systèmes de réparations des dommages (principalement le système Nucleotid Excision Repair) sont inactivés.

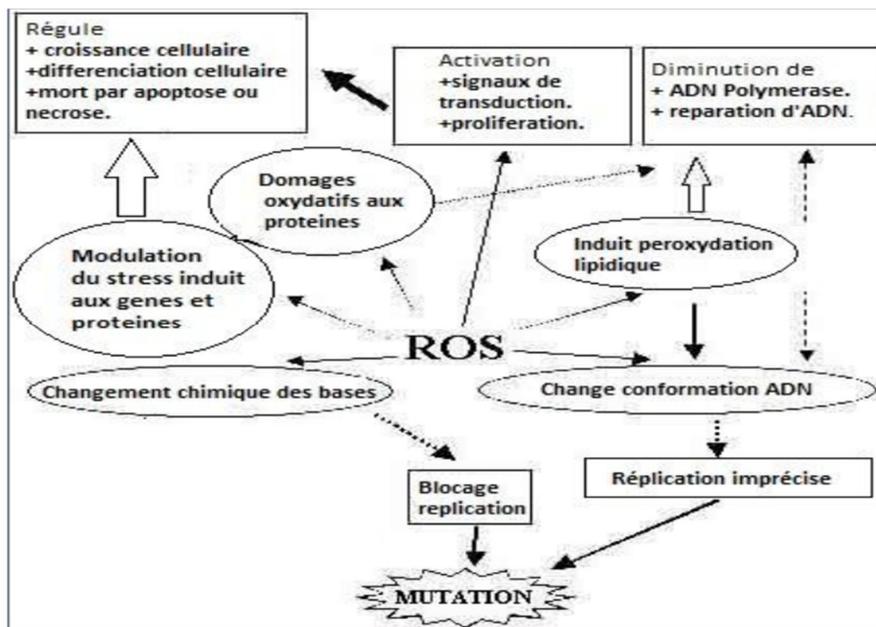


Figure 26 : Effets des dommages causés par les ROS sur la cellule (traduit de l'anglais) (MATES *et al.*, 1999).

IV.4. Agents alkylants :

Les agents alkylants sont des composés organiques capables d'introduire un groupement alkyle sur une molécule d'ADN. Il existe plusieurs familles d'agents alkylants à savoir, les moutardes azotées, les oxazaphosphorines, les éthylène-imines, les alkyls alcanes sulfonates, les triazènes et hydrazines, les nitroso-urées, et les organoplatines.

Les agents alkylants sont classés en deux types selon leur composition et leurs effets sur l'ADN, on distingue ; les agents alkylants mono-fonctionnels ou simples brins, et les agents alkylants bi-fonctionnels ou doubles brins. Les mono-fonctionnels sont composés d'un seul groupement réactif et ne forment qu'une seule liaison avec l'ADN, les bi-fonctionnels par contre, sont formés de deux groupements réactifs et peuvent alors former deux liaisons, souvent dans des régions voisines, sur les deux brins d'ADN.

Les principaux dommages causés par les agents alkylants sur l'ADN sont; l'arrêt de la réplication; due à la formation d'adduits covalents (pontage ADN-protéine), un arrêt de la transcription au niveau du site de fixation de l'agent alkylant, des cassures d'ADN mono et double brins, et des modifications de bases azotées tels que l'alkylation des thymines et guanines par l'éthyle-méthane-sulfonate. Les agents alkylants sont utilisés majoritairement dans les traitements anti-cancéreux puisque les dommages causés par ces agents sur l'ADN aboutissent souvent à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose, ces agents ayant la capacité de bloquer la prolifération (néoplasme) de cellules tumorales d'où leur appellation d'agents alkylants antinéoplasiques.

V. Tests d'évaluation de la génotoxicité :

La génotoxicité, appelée également toxicité génétique, représente la capacité de certains agents physiques, chimiques, ou biologiques, à provoquer l'apparition de dommages à l'ADN pouvant conduire à des mutations irréversibles du matériel génétique, si ces lésions ne sont pas réparées.

Ces agents sont qualifiés de mutagènes. Les tests de génotoxicité visent à évaluer l'impact d'une substance, d'une préparation, ou d'un extrait, potentiellement mutagène, en mesurant l'aptitude de ceux-ci à induire des aberrations géniques ou chromosomiques chez des bactéries ou des cellules eucaryotes.

Les tests les plus utilisés en laboratoire sont : le test de Ames, le test des comètes, le test des micronoyaux et le test des aberrations chromosomiques.

V.1. Test de Ames :

Le test de Ames est un test de toxicologie génétique *in-vitro* qui consiste à examiner si une substance chimique ou un agent physique est capable d'induire des mutations spécifiques chez différentes souches de *Salmonella typhimurium*.

Les souches utilisées sont porteuses d'une mutation dans un des gènes gouvernant la synthèse de l'acide aminé histidine. Cette mutation (His-) rend les souches incapables de pousser sur un milieu sans histidine. Avec une fréquence très faible, ces mutations (His-) réversent spontanément vers (His+) et donc les cellules retrouvent leur capacité à pousser sur un milieu dépourvu d'histidine. Cette fréquence de réversion peut augmenter en exposant les bactéries (His-) à des agents mutagènes. Ainsi, le test d'Ames permet, en quantifiant l'induction de ces mutations réverses (His+), de mesurer le potentiel génotoxique de la substance testée.

V.2. Test des comètes :

Le test des comètes ou Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) est une méthode basée sur la microscopie fluorescente rapide et très sensible pour la détection et la quantification des lésions primaires de l'ADN, notamment les cassures de l'ADN, qui représentent une des lésions à forte probabilité d'apparition après exposition à des agents mutagènes.

Le principe est simple ; après lyse des membranes cellulaires et libération des noyaux, l'ADN des cellules est ensuite soumis à des conditions électrophorétiques. Compte tenu du faible voltage et ampérage, les molécules d'ADN intactes et donc trop lourdes pour avoir été déplacées vont décrire une sphère compacte, tandis que, les fragments endommagés vont migrer vers l'anode, formant une typique «queue de comète».

Les figures ainsi décrites sont alors tout à fait comparables à des comètes. La lecture au microscope à fluorescence et l'analyse d'image permet alors la quantification des effets observés.

V.3. Test des aberrations chromosomiques :

Le test d'aberration chromosomique (CA, chromosomal aberration assay) sur cellules de mammifères a été décrit par **PRESTON et al. (1987)**, est fréquemment utilisé pour évaluer la génotoxicité, en étudiant les dommages de l'ADN induit par divers agents chimiques et de l'environnement, et a été adopté comme indice de génotoxicité. Il identifie les agents qui provoquent des anomalies structurelles (cassures chromosomiques ou chromatidiques), ou encore des anomalies de nombre de chromosomes (aneuploïdie, polyploidie).

Les cellules analysées sont, soit des lymphocytes isolés de sujets humains ou d'animaux (exposés *in-vivo* à des substances chimiques ou préparations), ou des lignées cellulaires (exposées *in-vitro* aux agents génotoxiques). Ce type de test va donc pouvoir être employé pour mesurer le potentiel génotoxique d'un composé *in-vitro* ou *in-vivo*.

Le caryotype est réalisé selon les techniques cytogénétiques habituelles, en bloquant les cellules en métaphase à l'aide de la colchicine ; l'analyse d'un grand nombre de métaphases est souvent requise. Les aberrations chromosomiques indiquent un dommage stable et persistant (mutation), qui représente un événement potentiellement initiateur dans le processus qui mène à la néoplasie ; la présence d'aberrations chromosomiques a d'ailleurs été corrélée avec un risque accru de survenue de cancers.

VI. Types d'agents mutagènes :

Les agents mutagènes peuvent être classés en :

A. Mutagènes chimiques :

Les mutagènes chimiques peuvent être des analogues de base (tautomères), des agents qui réagissent avec l'ADN (sans réplication), des agents intercalaires (molécules plates) ou des réactions oxydantes. On distingue les mutagènes chimiques par leur mode d'action. Certains agissent par des mécanismes semblables aux mécanismes spontanés, d'autres agissent davantage comme les radiations. On en distingue 3 types :

1. Les analogues des bases :

Leur structure chimique rappelle les purines et pyrimidines. Ils peuvent être incorporés à l'ADN lors de la réplication. Le bromo-uracile (BU), semblable à T (Br remplace CH₃), s'apparie à A. Il a une forte tendance à se tautomériser en « enol ». Elle s'apparie alors à G. L'aminopurine, analogue de A s'apparie avec T et cause des transitions de A-T en G-C ou l'inverse.

2. Les substances chimiques altérant la structure et l'appariement des bases :

L'acide nitreux provient de la digestion des nitrites (conservateurs des aliments). Il est à l'origine de déaminations (perte d'un groupe NH₃) (ex : C->U ; meC->T; A-> hypoxanthine). La nitrosoguanidine, le methyl-methanesulfonate, l'ethyl- methanesulfonate réagissent avec les

bases en **ajoutant des groupements méthyl ou éthyl**. La dégradation peut aller jusqu'à la production de sites sans bases ce qui, à la réplication, est générateur de mutations.

3. Les agents intercalants :

Acridine, proflavine, bromure d'éthidium sont des molécules qui s'insèrent entre les bases de l'ADN. Ceci entraîne un étirement de l'ADN. La polymérase insère alors une base surnuméraire en face de la molécule étrangère.

4. Les agents qui altèrent la structure de l'ADN :

Certaines grosses molécules se lient aux bases qui deviennent ainsi « non codantes» (ex : NAAAF). D'autres agents causent des liaisons intra et inter brins (ex : le psoralène trouvé dans les végétaux et utilisé dans les traitements de la peau). Des produits chimiques causent des ruptures dans l'ADN (ex : peroxydes). Ces agents n'induisent sans doute pas directement les mutations mais induisent des processus de réparation qui sont mutagéniques.

B. Mutagènes physiques :

Le rayonnement est un mutagène physique. Il est un processus physique par lequel l'énergie circule dans l'espace. Il existe deux formes principales de cette énergie :

- **Électromagnétique** : décrit comme des ondes d'énergie électrique. Par exemple : rayons gamma, rayons X, rayons ultraviolets.
- **Corpusculaire** : il est formé de particules atomiques et subatomiques qui se déplacent à grande vitesse et causent des dommages lorsqu'elles entrent en collision avec d'autres particules, notamment des molécules biologiques. Par exemple : les particules alpha et les particules bêta.

Les deux sont connus sous le nom de rayonnements ionisants, car ils produisent des ions capables de réagir physiquement et chimiquement lors du contact avec des molécules biologiques. Mais toutes les formes de rayonnement mutagènes ne produisent pas d'ions. La lumière ultraviolette est un puissant mutagène avec moins d'énergie que les rayonnements ionisants. Les longueurs d'onde basses fréquences ont une faible énergie, tandis que les hautes fréquences ont beaucoup d'énergie. Les rayons X produisent de la stérilité chez les plantes et

les animaux. Ils affectent également des tissus tels que les os, les nerfs, les muscles, le foie, les reins, etc.

C. Mutagènes biologiques :

Les sources possibles d'agents mutagènes biologiques peuvent être toutes les préparations de nature biologique utilisées en médecine prophylactique ou thérapeutique, telles que vaccins, antitoxines, sang, sérum et antigènes. Les agents biologiques mutagènes potentiels peuvent être des micro-organismes, en particulier des virus, et certains agents chimiques.

Dans le cas des virus, il a été démontré qu'ils peuvent produire des anomalies chromosomiques, de la simple casse à la pulvérisation des chromosomes, de sorte que la vaccination avec des virus vivants peut impliquer un risque potentiel. La contamination virale résultant de transfusions, telle que l'hépatite, provoque des déchirures chromosomiques dans le sang et la moelle osseuse de patients atteints d'hépatite.

CHAPITRE IV : Systèmes de réparation de l'ADN

CHAPITRE IV : Systèmes de réparation de l'ADN.

I. Généralités :

L'ADN est une macromolécule biologique à laquelle sont attribuées les structures primaire, secondaire et tertiaire. Il apparaît que la séquence en nucléotides (structure primaire), la configuration et la situation des nucléotides au sein de la double hélice (structure secondaire) et l'état sous lequel se trouve la molécule d'ADN (en cours de réplication ou de transcription, sous forme de chromatine ou de chromosome : structure tertiaire) jouent un rôle considérable dans la survenue des lésions puis des mutations.

En effet, l'accessibilité des sites nucléophiles de l'ADN aux attaques électrophiles des agents génotoxiques n'est pas la même et la mise en œuvre des **systèmes de réparation de l'ADN** varie considérablement d'une situation à l'autre (**Figure 27**). Par ailleurs, il existe une très grande variété des degrés d'altération de l'ADN. Il est en effet classique de distinguer les lésions primaires à l'ADN, les mutations géniques, chromosomiques (effets clastogènes) et génomiques (effets aneugènes). Les lésions primaires à l'ADN représentent le premier stade consécutivement à l'action d'un agent génotoxique.

Les composés comportant une partie électrophile ont un pouvoir génotoxique du fait de la formation de mono-adduits sur l'ADN. De la même façon, les composés ayant deux ou plusieurs parties réactives peuvent réagir avec deux centres nucléophiles différents et entraîner ainsi la formation de ponts intra- ou intermoléculaires dans le matériel génétique (**Figure 27**). Les pontages interbrins ADN-ADN et les pontages ADN-protéine sont particulièrement cytotoxiques puisqu'ils peuvent causer un blocage total de la réplication de l'ADN. Les agents génotoxiques peuvent aussi provoquer des cassures de l'épine dorsale phosphodiester, ou entre les bases et les sucres (produisant des sites apuriniques ou apyrimidiques) sur l'ADN. De telles cassures peuvent être le résultat direct de la réactivité chimique sur un site lésionnel, ou se produire lors de la réparation d'un des types de lésions de l'ADN mentionnés ci-dessus.

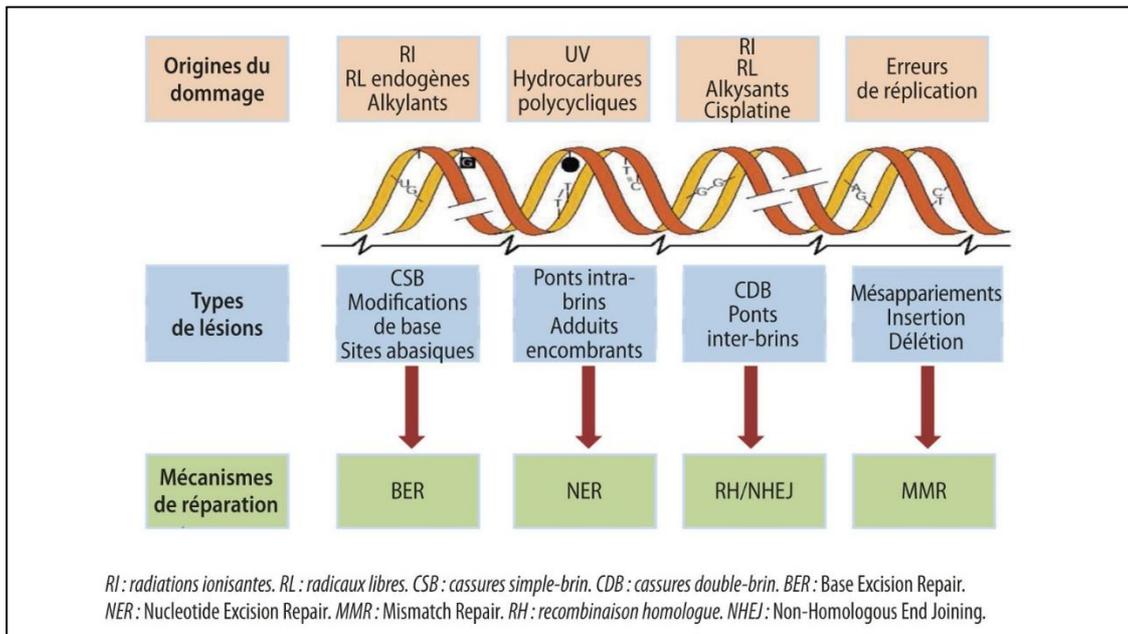


Figure 27 : Différents types de lésions de l'ADN selon la source du dommage et principaux mécanismes de réparation correspondants (KHALIFA *et al.*, 2012).

II. Les facteurs de risque :

L'ADN, si important pour la vie cellulaire, est fragile. Il peut être soumis à de nombreux stress naturels au cours de la vie de la cellule, qu'ils soient endogènes ou exogènes.

Le métabolisme cellulaire normal produit entre autre des espèces réactives de l'oxygène, sources de nombreux dommages. D'autre part, l'environnement soumet en permanence un organisme à différentes agressions, tel le rayonnement ultraviolet (UV), les radiations ionisantes ou des agents génotoxiques. Parfois, des molécules toxiques pour l'ADN sont utilisées comme outil thérapeutique, notamment en chimiothérapie. Les lésions ainsi générées sont de natures très diverses : bases altérées ou perdues, liens intra - ou inter-brins, dimères de thymines, cassures simple ou double brin.

Il est intéressant de noter que le métabolisme de l'ADN lui-même est source de dommages. Ainsi, les polymérases, qui réalisent la copie à l'identique de l'ADN lors de la réplication, commettent parfois des erreurs qui rompent la complémentarité entre les deux brins.

III. Conséquences des lésions de l'ADN :

Les erreurs de réplication des «microlésions» telles que les mono-adduits, les sites apuriniques ou apyrimidiques ou les cassures simple brin peuvent conduire finalement à des

substitutions de paires de bases nucléotidiques, ou à l'insertion ou à la délétion de fragments polynucléotidiques courts dans l'ADN chromosomique.

Au contraire, les «macrolésions», telles que les adduits volumineux, les pontages ou les cassures double brin, peuvent déclencher l'acquisition, la perte ou le réarrangement de fragments relativement importants de chromosomes.

Quoi qu'il en soit, les conséquences peuvent être dévastatrices pour l'organisme, chacun de ces événements pouvant conduire à la mort cellulaire, à la perte d'une fonction ou à une transformation cellulaire maligne. On pense actuellement qu'il se produit une activation inappropriée de proto-oncogènes tels que myc et ras, ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur tels que le p53. L'expression anormale de l'un de ces gènes détruit les mécanismes cellulaires normaux assurant le contrôle de la prolifération ou de la différenciation cellulaires.

Ainsi, de nombreux dommages peuvent survenir au niveau de l'ADN. S'ils sont laissés tels quels, les conséquences peuvent être graves pour la cellule et ses descendantes, en fonction de la nature de la lésion. Les lésions nucléotidiques peuvent résulter en des mutations ponctuelles transmises à la descendance, ce qui est à l'origine de nombreuses maladies génétiques. Par exemple, de nombreuses mutations ponctuelles dans le gène de la dyskérine ont été identifiées comme responsables de la dyskératose congénitale, une maladie liée à des problèmes télomériques. Une cassure double brin non réparée peut, quant à elle, résulter en la perte de la portion du chromosome ne comportant pas de centromère lors de la division cellulaire, perte délétère pour la cellule. Elle peut ainsi entraîner une aneuploidie (nombre anormal de chromosomes dans une cellule) ou des translocations entre régions de chromosomes, ce qui peut rapidement affecter la viabilité cellulaire en supprimant ou modifiant une partie de l'information génétique disponible.

IV. Les systèmes de réparation de l'ADN :

Les études expérimentales montrent pour la plupart que le développement d'un cancer après une exposition à des composés électrophiles est un événement relativement rare. Une des explications en est que la cellule est douée de la capacité intrinsèque de reconnaître et de réparer l'ADN endommagé ou que les cellules dont l'ADN est endommagé ne sont pas capables de survivre.

Durant la réparation, la base endommagée, le nucléotide ou la courte séquence de nucléotides autour du site lésé sont supprimés et, grâce au brin opposé qui sert de matrice, une nouvelle séquence d'ADN est synthétisée et mise en place. Pour être efficace, la réparation de l'ADN doit s'effectuer avant la division cellulaire et avoir une grande précision, pour éviter toute possibilité de propager une mutation.

Il existe chez l'Homme de nombreux systèmes enzymatiques pour réparer l'ADN. Ces systèmes sont d'autant plus complexes que la lésion est importante. De nombreuses enzymes appartiennent spécifiquement à ces systèmes de réparation, comme l'ADN polymérase β , par exemple. La réparation d'une hydrolyse accidentelle d'une liaison phosphodiester sur un brin d'ADN fait intervenir l'ADN ligase seule si une des extrémités est 5' phosphatée. Les bases endommagées ou anormales sont enlevées du nucléotide qui les porte, puis le sucre et le phosphate sont retirés avant que le brin ne soit reconstitué par l'ADN polymérase β et l'ADN ligase. Les mésappariements ne peuvent être reconnus puisque les bases sont normales. La séquence du brin nouvellement synthétisée est reconnue puis le nucléotide non complémentaire est remplacé. La réparation d'un dommage portant sur les deux brins d'ADN doit faire appel à une séquence homologue du génome et se fait par recombinaison.

IV.1. Voie de réparation par réversion : réparation des lésions ponctuelles :

Ce type de réparation utilise très peu de protéines et restaure immédiatement les liaisons.

A- Photo-réactivation : les photolyases sont des enzymes activées par l'énergie lumineuse et participent à la réparation de l'ADN par coupure des liaisons covalentes au niveau des **dimères de thymine**.

B- Réversion de coupure simple brin : par une ADN ligase lorsqu'il n'y a pas de pertes de bases.

C- Réversion de dépurination par une purine insertase : restaure la liaison osidique, enzyme spécifique d'une base.

IV.2. Voie de réparation des bases mal appariées (MMR, Mismatch Repair) :

Certaines bases azotées de l'ADN existent sous plusieurs formes tautomères résultant du déplacement inconstant des hydrogènes des fonctions amine ou énoI. Ces formes sont plus rares que les formes habituelles des bases azotées mais dans un ADN modèle en cours de réplication certaines bases peuvent être momentanément sous une forme tautomère. La forme

tautomère de l'adénine est l'imino-adénine, qui ne s'hybride pas avec la thymine mais avec la cytosine. De même l'énol-thymine s'hybride mieux avec la guanine au lieu de l'adénine et l'énol-guanine se lie avec la thymine plutôt qu'avec la cytosine (**Figure 28**). Ainsi l'ADN polymérase va condenser sur l'ADN qu'elle construit des bases azotées différentes de celles attendues. Lorsque la base azotée du brin modèle aura repris sa forme habituelle elle ne pourra plus s'hybrider avec la base du brin nouveau et il en résultera des mésappariements.

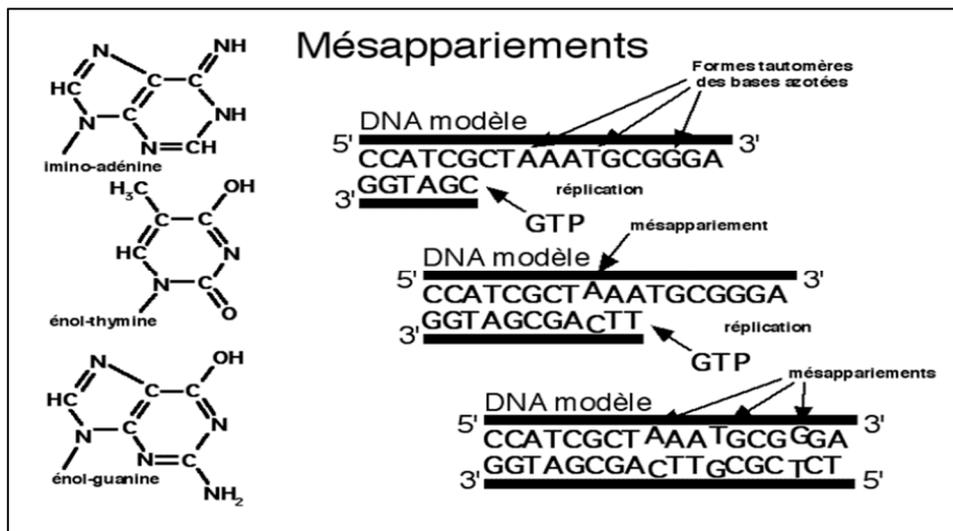


Figure 28 : Les formes tautomères des bases azotées de l'ADN et l'apparition des mésappariements (HOUSSET & RAISONNIER, 2010).

La voie de réparation du MMR permet de corriger les bases mal appariées qui sont le plus souvent dues à une erreur d'incorporation par les ADN polymérase. En effet, une base est erronée toute les 10⁵ bases incorporées et grâce au système de relecture 3'-5' des polymérase et du système MMR, le taux d'erreurs est réduit à 10⁻¹⁰ bases. Ce système reconnaît donc les bases mal appariées mais aussi des courtes insertions ou délétions de nucléotides qui vont former des boucles nucléotidiques. La voie du MMR est très conservée entre les espèces et il existe de fortes similitudes entre le MMR humain et le MMR bactérien qui a été très étudiée chez *Escherichia coli*. Les protéines du MMR ont été largement décrites chez la bactérie, et grâce à des homologies de structures, les protéines du MMR humain ont pu être identifiées. La **Figure 29** répertorie les différentes protéines de ce mécanisme et les fonctions dans les deux modèles. Le MMR se déroule en quatre étapes.

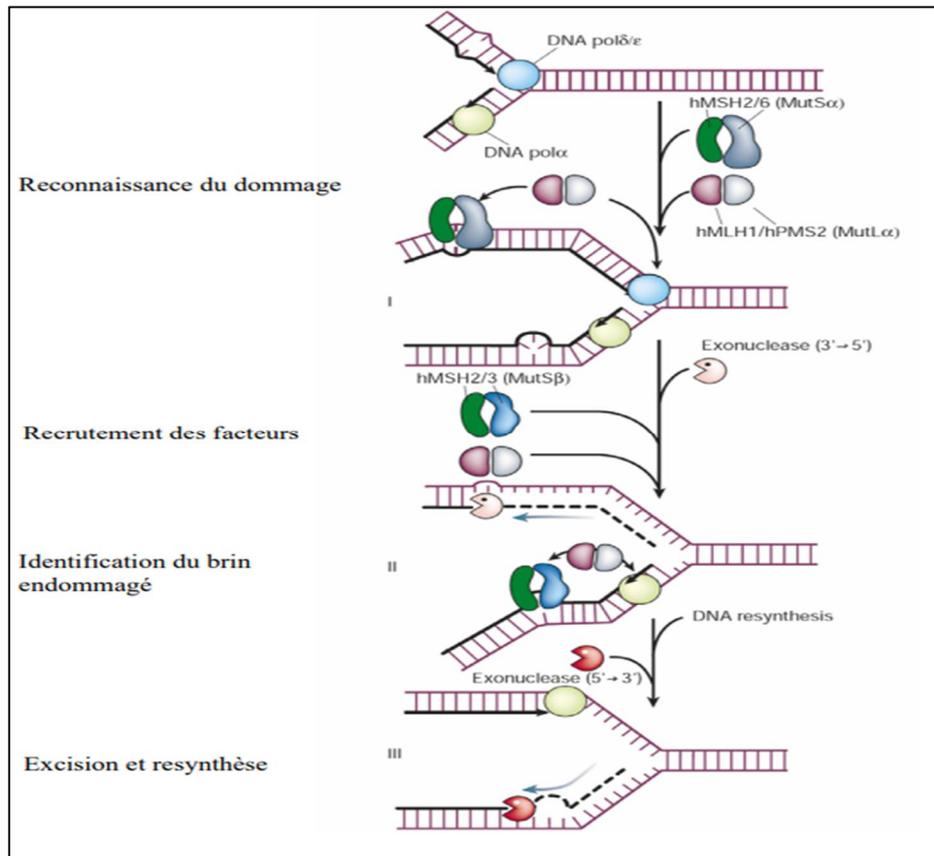


Figure 29 : Les différentes étapes de réparation pour le mécanisme du MMR (HOEIJMARKERS, 2001).

IV.3. Voie de réparation des nucléotides modifiés (NER, Nucleotide Excision Repair) :

Lorsqu'un fragment d'ADN est endommagé, la simple excision de base ne suffit plus à réparer. En particulier les mésappariements qui ne seraient pas réparés par l'ADN polymérase δ au cours de la réplication, sont immédiatement repérés parce que la double hélice ne se forme pas normalement. Une endonucléase coupe alors le brin porteur de la lésion à une distance de cinq nucléotides. Puis sous l'effet d'une topoisomérase (hélicase ou facteur TFIIH) le brin lésé est séparé du brin sain. A partir de l'extrémité 3'OH de la brèche ainsi créée, une ADN polymérase β reconstitue le fragment complémentaire et la dernière liaison sera refermée par l'ADN ligase (**Figure 30**).

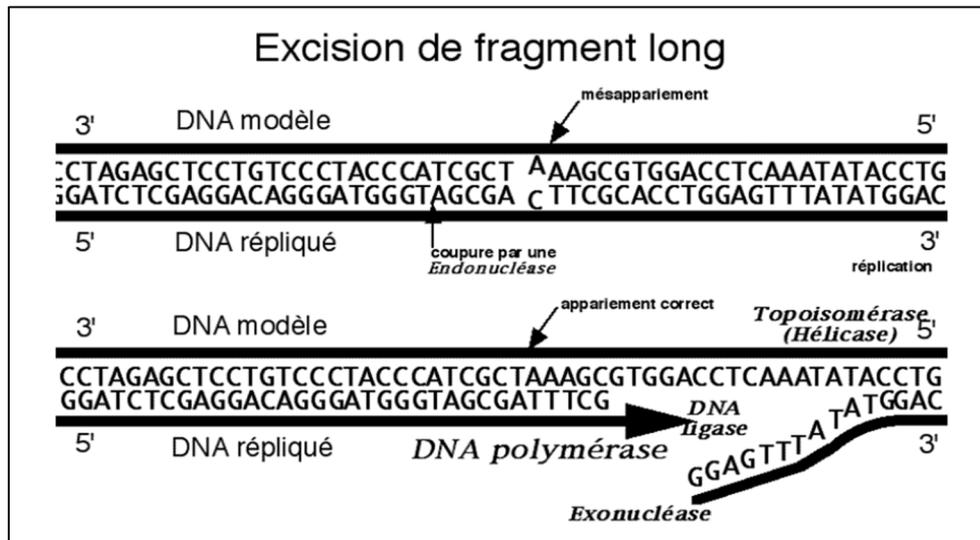


Figure 30 : Les différentes étapes de réparation de l'ADN par le système NER (HOUSSET & RAISONNIER, 2010).

Les lésions les plus connues pour être réparées par le NER, sont les dommages produits par les UV-B qui sont en majorité des dimères de pyrimidine et les photoproduits pyrimidine 6-4 pyrimidone. Il existe deux voies du NER : la réparation globale (**Global Genome Repair, GGR**) qui comme son nom l'indique, opère sur la totalité du génome, et la réparation couplée à la transcription (**Transcription-Coupled repair, TCR**) qui est spécifique des dommages présents sur les brins transcrits. Seule l'étape de la reconnaissance du dommage diffère entre ces deux voies.

IV.3.1 Global Genome repair ou GGR :

Le mécanisme de réparation du NER comporte cinq étapes successives faisant appel à plus d'une vingtaine de protéines dont un certain nombre codent pour les gènes XP responsables du syndrome Xeroderma Pigmentosum (XP).

IV.3.2 Transcription-Coupled Repair ou TCR :

La TCR a été décrite pour la première fois en 1987 dans le laboratoire du professeur HANAWALT. Elle cible préférentiellement les lésions de l'ADN se trouvant sur les gènes activement transcrits, et de ce fait ne répare que le brin transcrit.

V. Voie de réparation des bases modifiées (BER, Base Excision Repair) :

Devant une base endommagée, la réparation peut être faite par une simple excision de base suivie du remplacement de la base par un nucléotide normal. L'excision est faite par une

ADN glycosylase qui ouvre la double hélice, puis hydrolyse la liaison N-glycosidique de la base endommagée et laisse un nucléotide apurinique (dépourvu de base). La réparation sera faite par une des ADN polymérase de réparation : l'ADN polymérase β qui hydrolyse le nucléotide apurinique, puis le remplace par le nucléotide attendu sur l'extrémité 3'OH libre et la brèche sera refermée par l'ADN ligase qui reconstitue la liaison phosphodiester en 3' du nucléotide ajouté (**Figure 31**).

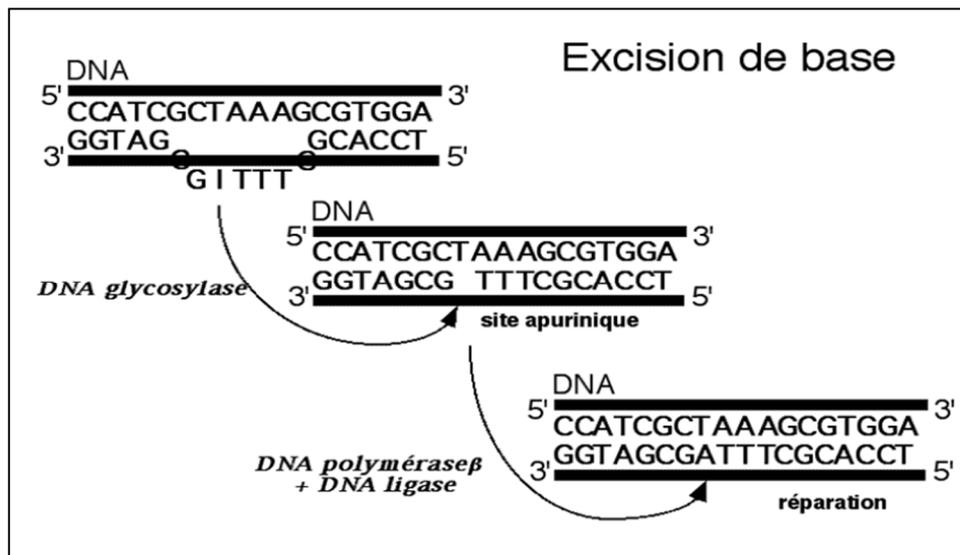


Figure 31 : Réparation de l'ADN par excision de base (HOUSSET & RAISONNIER, 2010).

V. Voie de réparation des cassures des deux brins de l'ADN, (DSB, Double Strand Break) :

Lorsqu'une cassure double brins de l'ADN (CDB) est formée, elle est détectée et signalée pour permettre l'activation du point de contrôle. La cellule stoppe ou ralentit alors sa progression dans le cycle pour permettre de réparer l'ADN. Une fois l'ADN réparé, le point de contrôle est désactivé et la cellule poursuit son cycle.

En revanche, si la réparation n'est pas possible, la cellule peut alors activer sa mort programmée. Les CDB (DSB) peuvent être réparées par plusieurs mécanismes : la jonction d'extrémités non-homologue (ou NHEJ pour "Non-Homologous End Joining"), la recombinaison homologue (RH), et l'appariement des extrémités protubérantes simple brin (ou SSA pour "Single Strand Annealing") (**Figure 32**).

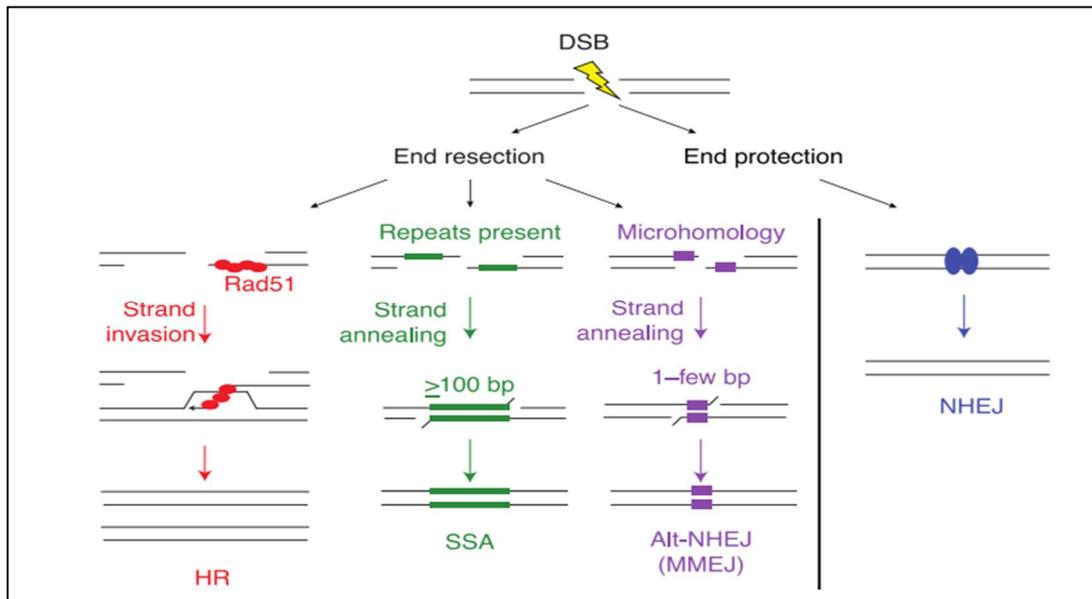


Figure 32 : Les voies de réparation des cassures double-brin de l'ADN. **Modifiée de (JASIN and ROTHSTEIN, 2013) (PAUTY, 2015).**

DSB: cassure double-brin, HR: recombinaison homologue, SSA: appariement des extrémités protubérantes simple-brin, NHEJ: jonction d'extrémités non-homologue, Alt-NHEJ: NHEJ alternatif

La rupture totale de la double hélice (coupure des deux brins), nécessite un mécanisme de réparation grâce à la recombinaison avec un autre brin d'ADN (recombinaison homologue). Les deux extrémités doubles brins sont protégées par des protéines. Seule une 5' exonucléase va digérer les deux brins avec une extrémité 5' phosphate libre. Les extrémités simple brins ainsi dégagées vont trouver à se recombinaison avec une séquence homologue (séquence répétée, dupliquée ou séquence homologue de l'autre chromosome). A partir des extrémités 3'OH libres de l'ADN lésé l'ADN polymérase β va resynthétiser des séquences grâce au modèle que constituent les séquences homologues du brin intact. Après que l'ADN ligase ait fermé les brèches simple brins, il en résulte un «hétéroduplex» avec deux jonctions Holliday. La coupure des jonctions entre les deux brins libère les deux doubles hélices reconstituées. Comme les séquences homologues ne sont pas parfaitement identiques, il reste des mésappariements. La réparation de ces mésappariements aboutit à des doubles hélices normalement hybridées. Toutefois des fragments de ces doubles hélices sont issus du même modèle homologue dans les deux hélices et les séquences qui se trouvent dans ces zones sont maintenant identiques : les gènes qui s'y rencontrent éventuellement, s'ils étaient hétérozygotes, deviennent homozygotes : c'est la perte d'hétérozygotie (**Figure 33**).

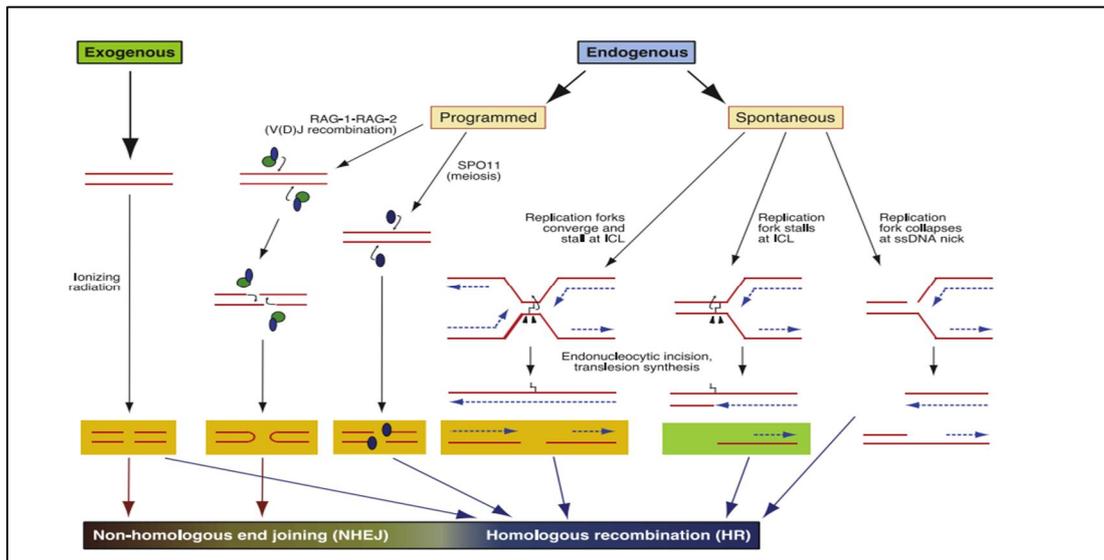


Figure 33 : La formation des cassures doubles brin de l'ADN (PAUTY, 2015).

VI. Système SOS :

Le système SOS regroupe un ensemble de gènes (environ 30) qui est impliqué dans la réplication de l'ADN, dans la réparation de l'ADN et dans la division cellulaire et dont l'expression est contrôlée par une altération de l'ADN (**Figure 34**).

Le système SOS fonctionne comme un système de type opérateur, on se trouve face à deux états, qui utilisent ou non les protéines **Rec A** qui sont les protéines clé de la recombinaison procaryote :

- Un **état non induit**, sans Rec A, durant lequel **Lex A** se lie aux opérateurs en réprimant la synthèse des protéines impliquées dans la réponse SOS de la cellule, les gènes ne sont donc pas exprimés.
- Un **état induit**, avec Rec A qui est toujours présent dans la cellule mais en petites quantités. Lors d'une altération les protéines Rec A activent leurs propres synthèses en clivant les protéines Lex A qui inhibaient jusqu'alors la transcription des gènes du système SOS dont celui de Rec A.

Les différents gènes participant au système SOS forment un **régulon** qui est un groupe de gènes dont l'expression est contrôlée par une même protéine.

Chez les eucaryotes il n'y a pas d'équivalent du système SOS avec augmentation importantes de l'expression des protéines impliquées dans la réparation ; mais plutôt relocalisation et concentration des protéines de réparation dans des complexes sub-nucléaires.

Le système d'opéron n'existe pas chez les eucaryotes, le génome étant trop compliqué, et ainsi il n'y a donc pas de système de réparation de type SOS (donc pas de protéine de type Rec A).

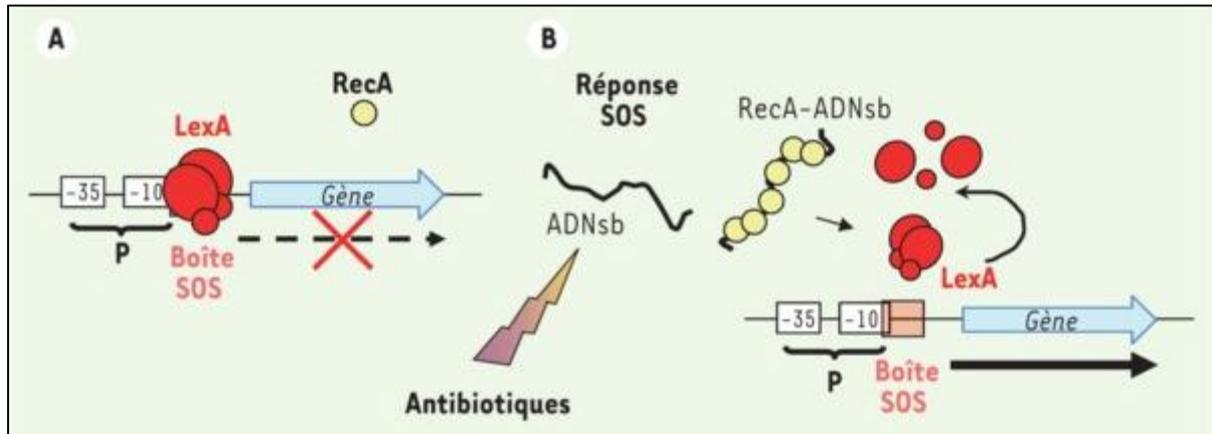


Figure 34: Réponse SOS (DA Re & PLOY, 2012).

A. En l'absence de stress, un dimère de protéines LexA est fixé au niveau de la région promotrice du gène du régulon SOS. Ce gène est totalement inhibé ou exprimé à un niveau basal selon l'affinité de liaison de LexA à son site de fixation.

**CHAPITRE V : Conséquences et effets
génétiques des mutagènes et de la
réparation : effets sur les chromosomes et
sur les gènes**

CHAPITRE V : Conséquences et effets génétiques des mutagènes et de la réparation : effets sur les chromosomes et sur les gènes.

I. Introduction :

Les mutations sont des changements brusques et d'emblée héréditaires de l'information génétique. L'information héréditaire est normalement stable, elle est transmise de génération en génération de manière fidèle. Mais cette fidélité n'est pas absolue. Le système à la base de la transmission de l'information héréditaire est ce qu'on appelle la réplication. La réplication permet de faire à partir d'une molécule ADN une copie conforme (exacte). Cette copie est presque toujours conforme à la molécule originale, de sorte que le génotype reste constant de la fécondation jusqu'à la mort.

Mais il arrive que la réplication soit accompagnée de quelques erreurs très rares aboutissant à des copies qui diffèrent du modèle original : ce sont les mutations géniques. En plus des mutations produites à la suite d'erreurs au niveau de la réplication, il y a différents agents de l'environnement qui peuvent altérer la structure de la molécule d'ADN et qui provoquent donc l'apparition des mutations. Ces agents peuvent être de différentes natures (physique, chimique ou même biologique) ; ce sont les agents mutagènes.

Le mot mutation est souvent employé dans un sens large pour désigner non seulement les gènes ayant subi une altération interne, mais aussi les variations structurales des chromosomes. On distingue alors les deux catégories de mutations en qualifiant les premières de géniques et les secondes de chromosomiques. En plus de ces deux types de mutations, il existe une troisième catégorie dite mutation génomique où l'altération touche le nombre des chromosomes (variation numérique des chromosomes).

II. Conséquences et effets génétiques des mutagènes sur les chromosomes et sur les gènes :

II.1. Les effets des mutations sur la régulation des gènes : les mutations des séquences régulatrices.

Les séquences régulatrices et les gènes codant pour des facteurs de transcription peuvent subir des **mutations**. À la différence de celles qui touchent directement les séquences

codantes, les mutations des séquences régulatrices n'ont pas d'effet sur la protéine codée, mais uniquement sur la régulation de l'expression de celle-ci. Néanmoins, ces mutations peuvent avoir des conséquences très importantes sur le **phénotype**.

Il existe trois types de conséquences de mutation touchant la régulation des gènes :

- Modification de l'intensité de l'expression ;
- Modification de la localisation de l'expression ;
- Modification de la temporalité de l'expression.

a) Modification de l'intensité de l'expression :

De nombreuses mutations peuvent **modifier l'intensité** de l'expression d'un gène. Par exemple, la modification de la séquence d'un promoteur peut empêcher la liaison avec l'ADN polymérase ou avec un facteur de transcription. Ceci rend le gène **inactif** puisque le gène ne peut plus être transcrit.

Il existe dans le génome un certain nombre de gènes «fossiles» qui ne peuvent plus être transcrits à cause de mutations dans leur promoteur, on les nomme des **pseudo-gènes**. Il est d'ailleurs possible qu'une mutation touchant un pseudo-gène puisse le réactiver.

Les amplificateurs/inactivateurs peuvent également être touchés par des mutations. Généralement, au lieu «d'éteindre» le gène, ces mutations vont plutôt **diminuer** ou **augmenter l'intensité** de l'expression du gène codant. En conséquence, la concentration de la protéine codée dans la cellule sera modifiée.

Cela peut avoir un impact important pour la cellule et l'organisme, car une concentration différente d'une seule protéine peut modifier profondément le **métabolisme** de la cellule.

La modification d'un gène codant pour un **facteur de transcription** peut entraîner l'inactivation de celui-ci, ou au contraire rendre la fixation du facteur de transcription sur l'ADN permanente. Les effets de ces mutations sont similaires aux mutations touchant le promoteur et les amplificateurs/inactivateurs. Par exemple le syndrome de Rett est une maladie génétique qui provoque une affection neurologique grave. Elle est liée à la mutation du gène MECP2 qui code pour un facteur de transcription, la protéine MecP2 (*methyl-CpG-binding protein*). Ce facteur est un **répresseur transcriptionnel** (empêchant la transcription) qui se fixe sur les promoteurs de nombreux gènes différents. La mutation lève cette répression car la

protéine ne peut plus se fixer sur l'ADN. Les cellules ne peuvent plus empêcher la transcription de ces gènes, ce qui provoque un grave dérèglement du métabolisme cellulaire.

b) Modification de la localisation de l'expression :

Chez les organismes pluricellulaires, le développement embryonnaire est sous le contrôle de nombreux facteurs de croissance qui guident la croissance et la formation des organes (cerveau, œil, bras, cœur, etc.). Au cours du développement embryonnaire, les cellules activent ou pas tel ou tel gène selon leur localisation dans l'organisme. Ainsi, les cellules à l'intérieur du crâne se différencient en neurones, les cellules situées à l'extérieur du corps se différencient en cellules de peau, celles situées dans l'abdomen en système digestif, etc.

Des modifications de la **régulation spatiale des gènes** peuvent avoir des conséquences graves sur le développement embryonnaire. De telles modifications expliquent également de grandes différences **morphologiques** entre des espèces différentes qui sont génétiquement relativement proches. Par exemple les chauves-souris (ou chiroptères) sont des mammifères volants. Le taxon des chauves-souris est apparu il y a 50 millions d'années avec les caractéristiques des chauves-souris actuelles, en particulier le développement très important des phalanges des mains formant des ailes membraneuses typiques de ce groupe. On suppose que les chiroptères ont évolué rapidement à partir d'ancêtres quadrupèdes similaires morphologiquement aux rats et aux souris actuels. Des études ont été réalisées sur l'expression de deux gènes, *Prx1* et *Bmp2*, connus pour agir sur la croissance des os longs des membres au cours du développement embryonnaire. L'expression de ces deux gènes au cours du développement embryonnaire a été comparée chez la chauve-souris *Carollia perspicillata* et la souris *Mus musculus*. Il a été démontré que la surexpression des gènes dans les zones de développement des membres antérieurs est corrélée avec l'allongement très important des os de la main observé chez la chauve-souris.

Cet exemple montre que la simple modification locale de l'expression de certains gènes peut entraîner des différences morphologiques très importantes, sans modification majeure du génome.

c) Modification de la temporalité de l'expression

L'expression des gènes est également régulée temporellement. En effet, le métabolisme d'un organisme change au cours du temps et des gènes réprimés durant la jeunesse peuvent être exprimés à un stade ultérieur et inversement.

La modification de la régulation temporelle peut elle aussi avoir des effets très importants et provoquer des maladies graves. Mais c'est aussi un mécanisme à l'origine de l'apparition de **nouvelles espèces**.

Pour chaque acide aminé correspond un ou plusieurs **triplets** (ou codons) de nucléotides. Aussi, les mutations n'affecteront la séquence protéique que lorsque la mutation concerne le premier ou le second nucléotide du triplet. Lorsque la mutation du codon touche le troisième nucléotide, la mutation est le plus souvent silencieuse.

La modification de la séquence de la protéine peut avoir un effet sur sa fonctionnalité et/ou sa structure. Elle peut donc modifier le phénotype cellulaire, engendrant ainsi des modifications du phénotype à l'échelle de l'organisme.

La plupart de ces mutations n'ont pas d'impact sur la survie des individus et sont à l'origine de la **variabilité intraspécifique**. Elles permettent d'expliquer la variabilité des caractères des individus au sein d'une même espèce.

II.2. Les effets des Déficiences ou délétions :

La déficience qui consiste en la perte d'un segment de chromosome implique qu'il y a perte d'au moins quelques gènes (le nombre de gènes dépend de la taille de la déficience et de l'endroit auquel elle s'est produite). Ceci implique que les déficiences soient le plus souvent non viable à l'état homozygote (plus la taille de la déficience est grande plus elle a des chances d'être létale à l'état homozygote). Les déficiences sont souvent à l'état hétérozygote. Lorsqu'elles sont petites et que les parties déficientes (absentes) ne contiennent pas de gènes essentiels à la viabilité.

Il faut noter cependant que des segments relativement longs et même des chromosomes entiers peuvent manquer lorsqu'ils sont inertes (contiennent des gènes inactifs ou presque, exemple de **mâles XO** qui sont viables). Lorsqu'un individu est hétérozygote pour une déficience, le chromosome déficient est plus court que son homologue, si la partie absente est relativement longue. Du fait que l'appariement des chromosomes ne se fait qu'entre parties strictement homologues, lorsque ces deux chromosomes s'apparieront, la partie du chromosome non déficient, qui correspond à la partie absente du chromosome déficient n'aura pas d'homologue dans ce dernier et formera une boucle (**Figure 35**).

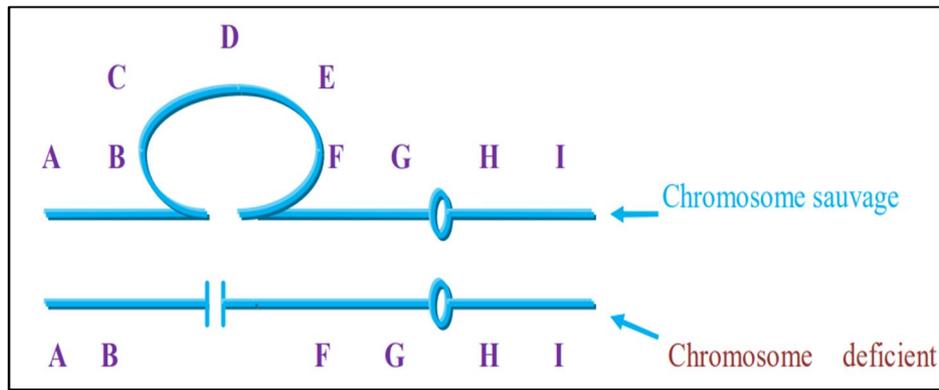


Figure 35 : Représentation de la déficience à l'état hétérozygote (formation d'une boucle).

II.3. Les effets des mutations sur le phénotype :

Tous les caractères héréditaires peuvent être touchés par les mutations. Ainsi, il y a plusieurs sortes de mutations : morphologiques, physiologiques, biochimiques ou même psychologiques. Chez la drosophile par exemple, il existe des mutations qui touchent la pigmentation des yeux ou du corps, les ailes, la répartition des soies, les caractères sexuels, la fertilité, la longévité, les propriétés sérologiques, la réaction à la lumière, le comportement durant l'accouplement... etc.

Les conséquences des mutations sur le phénotype varient des mutations dont l'effet sur le phénotype est imperceptible aux mutations dont l'effet est dramatique (modification radicale du phénotype).

Les mutations peuvent toucher tous les types de cellules d'un organisme. Chez les métazoaires à reproduction sexuée, les mutations peuvent toucher soit des cellules somatiques soit des cellules germinales. Les mutations touchant les cellules somatiques sont transmises aux cellules filles (par suite de mitose), il en résulte qu'une partie des cellules expriment un phénotype mutant, ce qui donne les chimères ou mosaïques. Les mutations somatiques ne vont pas être transmises à la descendance et vont donc disparaître au plus tard avec la mort de l'individu où ils sont apparus. Mais les mutations qui touchent une cellule germinale peuvent être transmises à la descendance. Ces dernières sont les seules à pouvoir changer l'hérédité dans une lignée ou une famille.

Dans les tissus haploïdes les effets des mutations sur le phénotype peuvent être décelés dès l'apparition des mutations. Mais chez les diploïdes les mutations ne peuvent être décelées dans la descendance immédiate de l'individu où elles sont apparues que si elles sont dominantes. Si elles sont récessives, elles ne seront décelées que quelques générations après

leurs productions. Chez les polyploïdes les mutations sont décelées encore plus tardivement que chez les diploïdes.

Dans certains cas, les mutations peuvent **perturber** le fonctionnement d'une protéine ou empêcher son expression correcte dans la cellule. Dans ce cas, l'individu peut souffrir d'une **anomalie** qui peut modifier le bon fonctionnement de ces cellules et être responsables de **symptômes graves**. On parle alors de maladie **monogénique** car elles ne concernent que l'altération d'un seul gène.

- Si l'allèle porteur de la mutation ne s'exprime que lorsqu'il est en **deux copies** dans le génome, on parle de maladie monogénique **récessive**.
- Si un seul exemplaire est suffisant pour que l'anomalie s'exprime on parle de maladie monogénique **dominante** (plus rare).

Exemple : la drépanocytose.

La drépanocytose est une maladie caractérisée par une forte anémie et des douleurs articulaires importantes. Chez les patients, on observe une forme anormale des hématies en faucille (**Figure 36**).

Ces dernières ont du mal à circuler notamment dans les réseaux des capillaires ce qui réduit l'oxygénation des organes. L'origine génétique de cette anomalie est une mutation du gène codant pour l'une des sous-unités de l'hémoglobine qui en modifie la forme. Elle ne peut donc plus assurer correctement son rôle dans le transport du dioxygène et précipite dans le cytoplasme des cellules, rendant les hématies plus rigides.

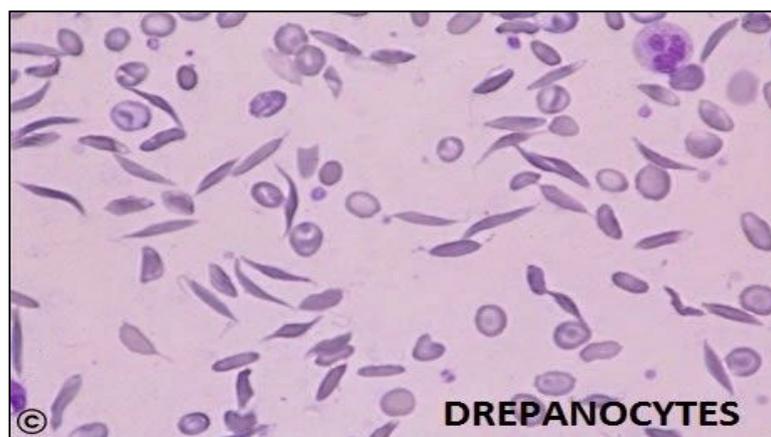


Figure 36 : Hématies d'un individu atteint de drépanocytose.
(Source : <http://www.hematologyatlas.com>)

III. Conséquences et effets génétiques des déficits de la réparation de l'ADN sur les chromosomes et sur les gènes :

Des études cliniques ont montré que les sujets présentant des déficits héréditaires des mécanismes de réparation de l'ADN manifestent fréquemment un cancer ou des anomalies du développement à un âge précoce. De tels exemples soulignent le lien évident entre les lésions de l'ADN et la pathologie humaine. De la même façon, des agents favorisant la prolifération cellulaire (tels que l'acétate de tétradécanoylphorbol) intensifient souvent la cancérogenèse. Pour ces composés, la probabilité élevée de transformation néoplasique est sans doute la conséquence du temps plus court dont dispose la cellule pour effectuer une réparation correcte de son ADN.

III.1. Les conséquences d'un défaut de réparation des CDBs :

Un défaut de ce système de surveillance et de protection du génome contre les cassures doubles brins (CDB), à quelque niveau que ce soit, est souvent associé à un syndrome ou une maladie génétique. Ces maladies sont le plus souvent à transmission autosomique récessive et présentent des symptômes communs. Ainsi, des mutations dans les gènes codant les protéines MRE11 et NBS1 qui font partie du complexe MRN, sont associées respectivement aux syndromes de Nimègue (ou Nijmegen Breakage Syndrome) et ATLD (Ataxia Telangiectasia Like Disorder). Les patients affectés par le syndrome de Nimègue présente une petite taille, une microcéphalie, des difformités du visage et sont sujets à des infections notamment pulmonaires, en plus d'avoir une susceptibilité accrue de développer un cancer. Le syndrome ATLD ressemble, comme son nom l'indique, à l'ataxie télangiectasie, ou syndrome de Louis-Bar ; une maladie neurodégénérative affectant certaines parties du cerveau mais aussi caractérisée par un déficit immunitaire, une sensibilité aux rayons ionisants (radiosensibilité), un développement de télangiectasies (dilatation des vaisseaux sanguins proche de la surface de la peau) et également une augmentation du risque de cancer. L'ataxie télangiectasie est provoquée par des mutations du gène de la kinase ATM. Cette kinase, ainsi que la kinase ATR, sont essentielles à la signalisation des CDB et l'activation des voies de réparation.

Des mutations du gène d'ATR causent d'ailleurs le syndrome de Seckel, caractérisé également par une microcéphalie, un retard mental et certaines difformités du visage. D'autres maladies proviennent de mutations touchant directement les gènes impliqués dans la réparation. C'est le cas du syndrome de Bloom qui est associé à des mutations de BLM. Les patients atteints de ce syndrome présentent également un retard de croissance, des difformités du visage, une

peau sensible aux UVs avec notamment un développement de télangiectasies, une immunodéficience modérée et une prédisposition au cancer. Dans certains cas les patients ont également un retard d'apprentissage ainsi qu'une fertilité diminuée pour les femmes ou une stérilité pour les hommes. Le syndrome de Bloom partage de nombreuses caractéristiques avec l'Anémie de Fanconi (FA).

En effet, cette maladie peut aussi être associée avec un retard de croissance, des difformités du visage, ainsi que des difficultés d'apprentissage ou une fertilité affectée. Les patients atteints de FA peuvent également présenter des anomalies squelettiques, en particulier au niveau des bras et des mains. Toutefois, l'Anémie de Fanconi est caractérisée par le développement de problèmes sanguins, notamment dus à une insuffisance médullaire (Bone Marrow Failure syndrome), et une prédisposition au cancer, dont des leucémies, des cancers gynécologiques ou de la cavité buccale. Cette maladie est due à des mutations dans l'un des 16 gènes impliqués dans la voie de Fanconi, une voie de réparation de l'ADN spécialisée dans la réparation des ponts inter-brin (ou ICL pour Interstrand CrossLink) et qui implique la formation d'une CDB au cours du procédé de réparation. Parmi ces gènes on trouve notamment les gènes BRCA2 (FANCD1) et PALB2 (FANCN) qui sont des médiateurs de la réparation des CDB par recombinaison homologue. D'une manière générale, les mutations dans les gènes impliqués dans la réparation des dommages de l'ADN et en particulier des CDB sont associées à une susceptibilité accrue de développer un cancer.

Les CDBs sont les lésions les plus cytotoxiques pour la cellule, mais la présence de lésions sur un des brins de l'ADN peut avoir des conséquences aussi dangereuses que celle des CDBs. Les dommages touchant un seul brin d'ADN sont de plusieurs natures allant des modifications de bases (oxydation, méthylation), aux pontages intra-brins, aux adduits encombrants ou encore aux cassures simple brin (CSBs).

L'origine des dommages peut être endogène, comme un défaut d'appariement des bases, mais aussi exogène, en effet plusieurs xénobiotiques sont responsables de ces différentes lésions comme la fumée de cigarette, mais aussi les ultraviolets provenant des rayons du soleil, ainsi que certains médicaments anticancéreux tel que le cisplatine.

Pour survivre et garder l'intégrité de son génome, la cellule a mis en place plusieurs systèmes de réparation spécifiques de ces dommages. Comme les CDBs, les modifications de bases, les adduits encombrants et les mésappariements de bases font appel à trois mécanismes conduisant à la réparation du brin endommagé : la réparation par excision de nucléotides (ou

nucleotide excision repair, NER), la réparation par excision de base (ou base excision repair, BER) et la réparation des mésappariements (ou mismatch repair, MMR).

III.2. Les conséquences d'un défaut de réparation du NER :

En accord avec la nature des dommages réparés par le NER, un défaut dans ce système de réparation s'accompagne de conséquences cliniques graves et sont responsables de trois maladies rares autosomales récessives héréditaires dont la caractéristique principale est une forte sensibilité au soleil.

La maladie Xeroderma Pigmentosum (XP), due à une mutation des gènes codants pour les protéines XP, a été décrite en 1863 et nommée en 1882 par le docteur KAPOSÍ. C'est une photodermatose qui se caractérise par une sensibilité excessive de la peau au soleil, des troubles oculaires et un risque multiplié par 1000 de développer un cancer de la peau ou des yeux.

Le syndrome de Cockayne, décrit en 1936 par le docteur COCKAYNE, est caractérisé par un défaut de croissance, un développement anormal du système nerveux et bien sûr d'une hypersensibilité au soleil mais sans une augmentation du risque des cancers de la peau. C'est une mutation des protéines CSA et CSB qui est responsable de ce syndrome.

Il existe également la forme photosensible de la Trichothiodystrophie (TTD), due à une mutation des protéines XPD ou XPB, elle a été décrite en 1979 par le docteur PRICE. Les patients TTD présentent une hypersensibilité à la lumière du soleil, qui s'accompagne d'une dystrophie, d'un retard mental, de cheveux cassants mais ne s'accompagne pas d'une augmentation des risques du cancer de la peau.

III.3. Les conséquences d'un défaut de réparation de BER :

Un défaut de BER n'est pas associé à une pathologie humaine. Récemment, des souris KO pour certains facteurs ont été générées. Les souris KO pour les ADN glycosylases ne présentent pas vraiment de phénotype, ce qui s'explique par une forte redondance entre les différentes ADN glycosylases et par le fait que la TCR peut prendre en charge la réparation du dommage. Mais l'inactivation de protéines essentielles pour le BER conduit à une mort embryonnaire, ce qui montre l'importance vitale de ce processus. En effet, les souris KO pour l'ADN polymérase β , XRCC1 et pour la ligase I ne sont pas viables.

III.4. Les conséquences d'un défaut de réparation de MMR :

Le MMR permet le maintien de l'intégrité du génome en corrigeant les erreurs des ADN polymérase. La perte de ce système entraîne une augmentation de mutations spontanées, le taux d'erreurs lors de la réplication étant augmenté de 100 à 1 000 fois.

Un défaut d'activité du MMR est aussi corrélé à un phénotype d'instabilité des microsatellites (MSI). Les souris KO pour les gènes du MMR présentent un phénotype mutateur, un MSI positif et une prédisposition au cancer du colon et du rectum, de l'endomètre mais aussi de l'estomac, ces tumeurs étant dues à des mutations héréditaires ou sporadiques.

Le cancer le plus connu qui est lié à un défaut du MMR est le syndrome de Lynch ou cancer colorectal héréditaire sans polypose (hereditary non-polyposis colorectal cancer ou HNPCC) qui représente 1 à 3 % des cancers colorectaux. Ces cancers présentent tous un phénotype MSI positif, et les gènes mutés sont principalement hMLH1, hMSH2 et hMSH6. Par exemple, il a été mis en évidence 7 mutations sur le gène hMSH2 qui ne semblent pas affecter sa liaison avec hMSH6 mais son activité ATPase en est diminuée de 1 000 fois.

**CHAPITRE VI : Reprogrammation de
l'information génétique sous l'effet de la
production de lésions de l'ADN, apoptose et
cycle cellulaire**

CHAPITRE VI : Reprogrammation de l'information génétique sous l'effet de la production de lésions de l'ADN, apoptose et cycle cellulaire.

I. Introduction :

Le lien entre défaut de réparation de l'ADN et certaines pathologies humaines est établi depuis plusieurs décennies. C'est le cas par exemple du xeroderma pigmentosum, dermatose rare caractérisée par une hypersensibilité aux rayons ultraviolets (UV) induisant des lésions cutanées et oculaires et des cancers cutanés multiples. Le lien avec un déficit génétique responsable d'une incapacité pour les cellules de ces patients à réparer des lésions de l'ADN induites par les UV a été établi au cours des années 1960. Les déficits d'origine génétique dans les voies de réparation de l'ADN ont des conséquences très variables en termes de symptomatologie clinique. On décrit notamment des pathologies neurologiques, dermatologiques, des susceptibilités aux cancers, des hémopathies et des déficits immunitaires.

Au-delà de l'intérêt clinique et dans la prise en charge thérapeutique de ces patients, l'étude des processus moléculaires impliqués dans ces maladies a permis de considérablement accroître la compréhension des mécanismes de maintien de l'intégrité du génome.

Un contrôle strict de la prolifération cellulaire est indispensable au maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire, ainsi qu'au développement et à l'organogenèse. Cette régulation s'exerce principalement au niveau de la réplication et de la transcription de l'ADN, de la progression du cycle cellulaire, de la transduction des signaux, et de l'apoptose. Elle fait intervenir un très grand nombre de gènes.

II. . Apoptose et dommage à l'ADN :

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmé qui permet d'éliminer les cellules surnuméraires ou dysfonctionnelles dans le cadre du contrôle du nombre de cellules qui composent l'organisme. Il existe deux voies apoptotiques majeures chez les mammifères : la voie interne mitochondriale activée suite à un stress cellulaire (irradiation, drogues cytotoxiques, oncogène) et régulée par les membres de la famille Bcl-2 et la voie externe qui dépend de la liaison d'un ligand extracellulaire à son récepteur de mort comme la liaison FasL/Fas ou TNF/TNFR. Ces deux voies convergent et aboutissent à l'activation des caspases

exécutrices responsables de la protéolyse de nombreux substrats cellulaires, conduisant irrévérablement à la mort cellulaire (**Figure 37**).

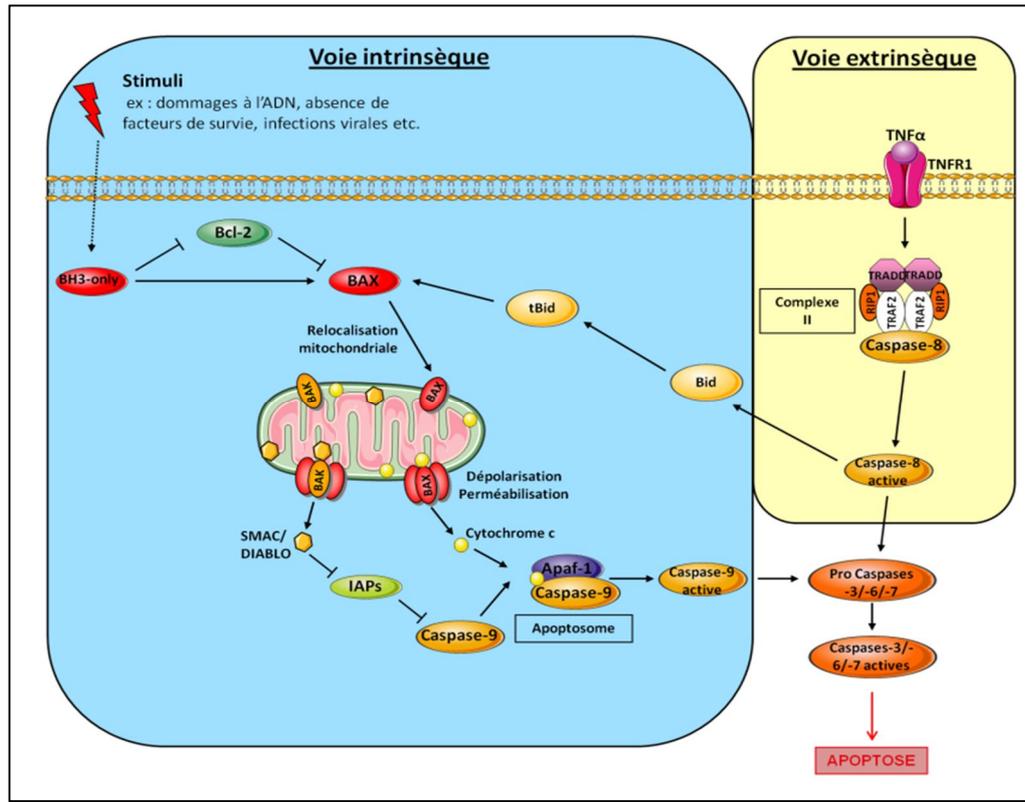


Figure 37 : Les deux voies principales de l'apoptose (DELMAS, 2014).

II.1. L'implication de l'apoptose dans le contrôle du processus néoplasique :

Le concept que l'apoptose est une barrière au cancer et qu'elle est atténuée dans les tumeurs qui réussissent à atteindre un degré élevé de malignité et à résister aux thérapies a été établie par plusieurs études, et c'est la voie interne qui sera plus impliquée dans la lutte contre le cancer.

Afin d'échapper à l'apoptose les cellules tumorales possèdent plusieurs stratégies. La plus commune est la perte de la fonction du gène suppresseur de tumeur TP53. En effet TP53 est le gène le plus fréquemment muté dans les tumeurs humaines et la perte de p53 peut, à la fois, bloquer l'apoptose et accélérer le développement des tumeurs. La tumeur peut aussi bloquer l'apoptose en augmentant l'expression des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL) ou des signaux de survie (Igf1/2) et en diminuant l'expression des protéines pro-apoptotiques (Bax, Bim, Puma).

II.2. p53 et l'apoptose :

L'apoptose est une mort cellulaire programmée essentielle au développement et à la survie des organismes pluricellulaires. La protéine p53 participe à la régulation de l'apoptose soit en interagissant avec différents membres de la famille Bcl-2, soit en régulant l'expression de gènes codant pour des protéines anti- ou pro-apoptotiques intervenant dans les deux voies principales de signalisation de l'apoptose.

a) Activités non transcriptionnelles de p53 :

Il a été montré que la protéine p53 peut être localisée au niveau de la mitochondrie. Là, elle peut interagir, indépendamment de ses activités transcriptionnelles, avec des membres pro-apoptotique de la famille Bcl-2 comme Bak (Bcl-2 antagonist killer), dont elle favorise l'oligomérisation et donc l'activation ou Bad (Bcl-2 antagonist of cell death), participant ainsi à l'apoptose. Elle participe également à l'inhibition des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2.

b) Activités transcriptionnelles de p53 :

La protéine p53 régule la transcription de gènes codant pour différents membres de la famille Bcl-2. D'une part, il a été montré que p53 réprime la transcription des gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques comme les protéines Bcl-2 et Mcl-1. D'autre part, p53 est un activateur transcriptionnel des gènes codant pour des protéines pro-apoptotiques comme les protéines Bax (Bcl-2 associated x protein), Noxa, Bak ou encore Bid (BH3 Interacting domain Death agonist). Les membres de la famille Bcl-2 sont principalement impliqués dans la régulation de la voie mitochondriale de l'apoptose. p53 régule également la transcription de gènes codant pour des récepteurs à domaines de mort. Ces récepteurs membranaires, une fois activés par leurs ligands, induisent la voie extrinsèque de l'apoptose.

Enfin, p53 induit l'expression de protéine pro-apoptotiques comme la caspase effectrice 6, ou la protéine adaptatrice Apaf-1 qui participe à l'activation de la caspase-9. p53 réprime également des protéines connues pour leurs activités anti-apoptotiques comme l'inhibiteur de caspases Survivine, le facteur de croissance FGF1 ou l'IGFR (Insulin-like Growth Factor Receptor). La protéine p53 est donc un régulateur majeur de l'apoptose, de façon dépendante ou non de ses activités transcriptionnelles.

III. . Cycle cellulaire :

Il représente l'ensemble des étapes permettant à une cellule de se diviser pour donner deux cellules filles génétiquement identiques. Ce mécanisme est hautement régulé et conservé chez les eucaryotes. Contrairement aux cellules tumorales caractérisées par un pouvoir prolifératif incontrôlé, la majorité des cellules d'un organisme normal ne se divisent pas : elles sont dites quiescentes (phase G0 pour Gap 0). Pour que ces cellules prolifèrent il faut que le cycle cellulaire (**Figure 38**) se déclenche et que les cellules passent le point de restriction. Une fois le cycle cellulaire déclenché, les cellules progressent à travers quatre phases G1 (Gap 1 ou pause 1, qui précède la synthèse d'ADN), S (synthèse de l'ADN), G2 (Gap 2 ou pause 2) qui précède la phase M (mitose) (**Figure 39**).

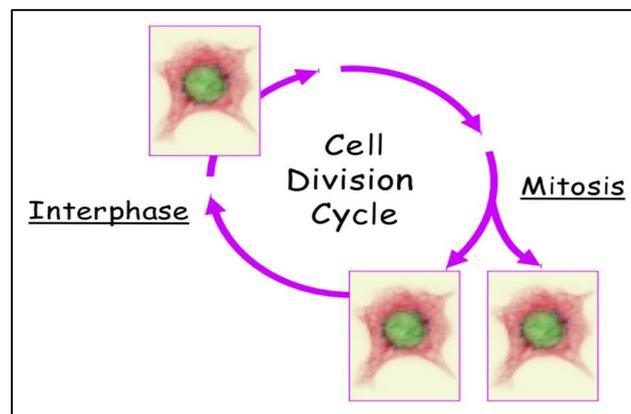


Figure 38 : Le cycle de division (MEIJER, 2003).

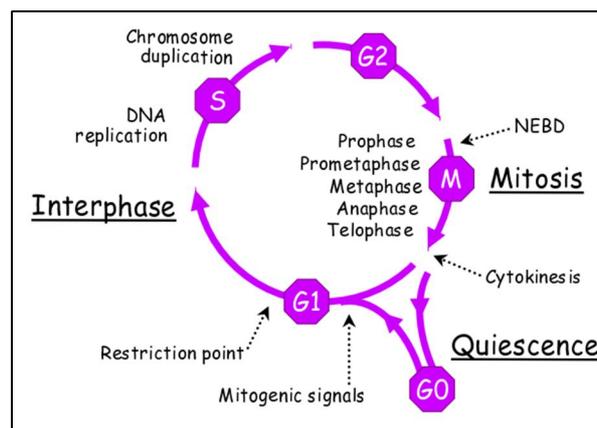


Figure 39 : Les phases et les événements majeurs du cycle de division cellulaire (MEIJER, 2003).

Au niveau moléculaire : ce sont les complexes protéiques constitués de cyclines et de leurs partenaires, les Cdk (cyclin-dependent protein kinases) qui contrôlent la progression des

cellules dans le cycle cellulaire. L'activation des complexes cycline D-Cdk4-6 et cycline E/A-Cdk2 pousse les cellules à passer le point de restriction et à progresser de la phase G1 à la phase S. Les complexes cycline E/A-Cdk2 restent actifs pendant toute la phase S et c'est le complexe cycline B-Cdk1 qui contrôle le passage de la phase G2 à la phase M. La fluctuation cyclique et coordonnée de l'activité de différents complexes cycline-Cdk est sous le contrôle de plusieurs facteurs.

III.1 Point de contrôle du cycle cellulaire :

Le cycle cellulaire est un processus étroitement régulé. Il existe des points de contrôle qui sont les « checkpoints » (i) de la transition G1/S, (ii) intra S, (iii) de la transition G2/M (iv) de l'antéphase mitotique, et (v) du fuseau mitotique, qui, suite à un dommage de l'ADN, s'activent pour arrêter le cycle cellulaire (**Figure 40**). Parallèlement à l'arrêt du cycle, les checkpoints recrutent les systèmes de réparation de l'ADN. Toute altération de ces checkpoints conduit à la multiplication des cellules accumulant des mutations et, par la suite, au développement des cancers.

La localisation cellulaire des cyclines joue aussi un rôle dans la régulation de l'activité du complexe cycline-Cdk. Par exemple, la cycline B1, principalement cytoplasmique pendant l'interphase, se concentre après être phosphorylée au niveau du noyau au moment de la transition G2/M. Les Cdks (Cyclin-dependent protein kinases) sont des serines-thréonines kinases. Parmi les vingt Cdks identifiées chez l'homme, seule Cdk1 s'avère essentielle pour le cycle cellulaire des cellules eucaryotes. La régulation de Cdk1 fait intervenir plusieurs facteurs qui interagissent entre eux. Cdk1 est activée par sa liaison aux différentes cyclines ainsi que par la phosphorylation de la thréonine en position 161 par les kinases CAK (cyclin activated kinase).

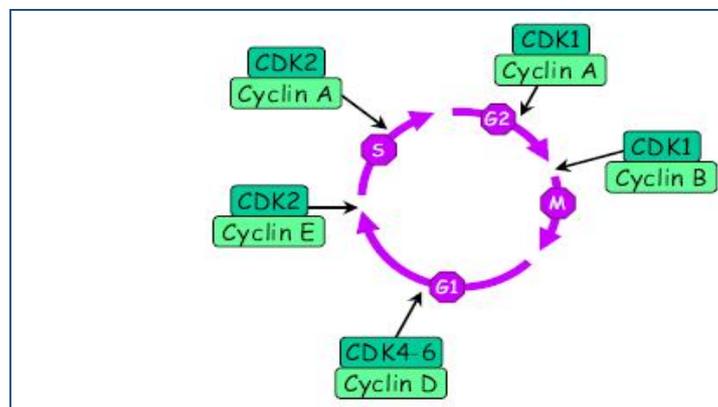


Figure 40 : Les CDKs contrôlent le cycle cellulaire (MEIJER, 2003).

III.2. La réponse cellulaire suite à un dommage à l'ADN :

La réponse cellulaire aux dommages à l'ADN (DDR) responsable de l'arrêt du cycle cellulaire comporte deux voies de signalisation : (i) La voie ATM-Chk2, activée en présence de CDB, et (ii) la voie ATR- Chk1 qui répond principalement à la présence de cassures simple brin de l'ADN. Les deux systèmes ciblent les phosphatases Cdc25, et la voie ATM cible aussi p53 pour aboutir au blocage du cycle cellulaire. ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) et ATR (ATM and Rad 3-related) sont des serines-thréonines kinases qui appartiennent à la famille des PIKKs (phosphoinositide 3-kinase related kinases). Des homologues de ces deux protéines, ainsi que des autres membres des PIKKs, existent chez tous les eucaryotes (**Figure 41**).

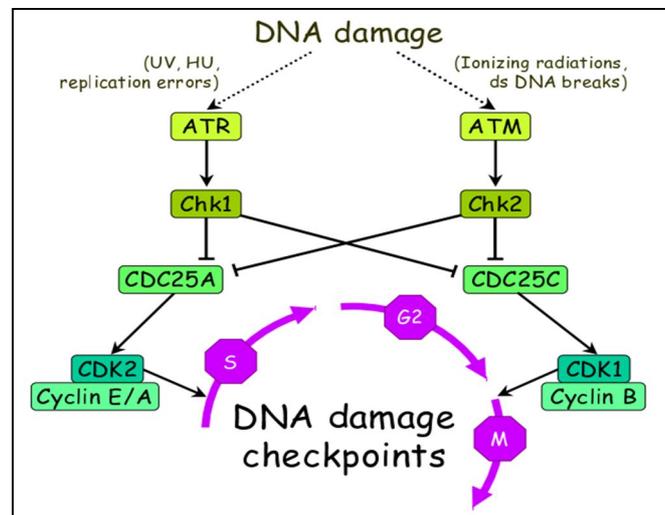


Figure 41 : Le contrôle de l'état de l'ADN et blocage en G1 ou en G2 (MEIJER, 2003).

III.3. La gardienne du génome p53 et régulation du cycle cellulaire :

Le suppresseur de tumeur p53 est un facteur de transcription activé sous l'effet de multiples facteurs (endommagement de l'ADN, hypoxie, choc thermique, par exemple). Il est responsable de l'induction d'un grand nombre de gènes conduisant à des réponses multiples et en particulier à un arrêt du cycle cellulaire ou au déclenchement de l'apoptose.

Dans les conditions normales, p53 se fixe au facteur MDM2 (« murine double minute 2 », Hdm2 chez l'homme), ce qui conduit à sa dégradation et explique la faible abondance de p53 dans les cellules en bon état. En revanche, lorsque l'ADN est endommagé, trois mécanismes contribuent à une stabilisation très marquée de p53 et, en conséquence, à une forte augmentation de son activité transcriptionnelle. Tout d'abord, la kinase ATM est activée et phosphoryle MDM2, inhibant l'interaction MDM2/p53, ce qui libère et stabilise ainsi p53. Par

ailleurs, ATM phosphoryle p53 (directement ou indirectement, par Chk2), renforçant sa stabilité. Enfin, p53 induit la transcription du locus ARF du locus INK4A. La protéine p14ARF se fixe sur MDM2 et induit sa dégradation rapide, renforçant encore davantage la stabilisation et l'accumulation de p53.

On comprend tout l'intérêt de rechercher des inhibiteurs de l'interaction MDM2/p53, qui devraient conduire à une stabilisation de p53, avec pour conséquence l'arrêt de la prolifération cellulaire ou l'apoptose des cellules soumises à un stress (**Figure 42**).

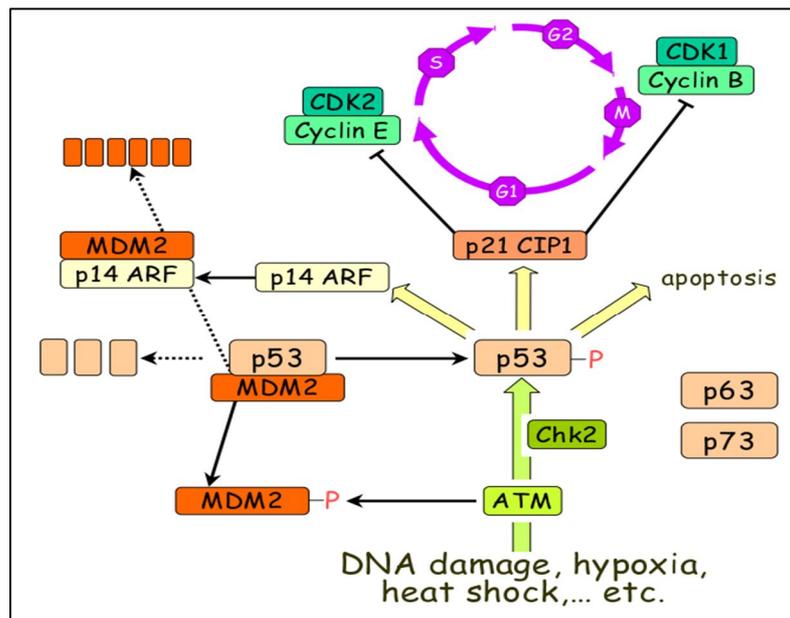


Figure 42: Fonctions de p53 dans la réponse à l'endommagement de l'ADN (MEIJER, 2003).

III.4. Activités oncosuppressives de la protéine p53 :

P53 est un oncosuppresseur qui agit principalement comme un facteur de transcription. Suite à différents stress cellulaires comme l'hypoxie ou des dommages à l'ADN, p53 régule l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou encore l'induction de l'apoptose. Ainsi, suite à des dommages de l'ADN, la protéine p53 induit un arrêt du cycle cellulaire qui permettra de réparer l'ADN ou bien l'apoptose qui permettra d'éliminer les cellules dont l'ADN est endommagé et donc potentiellement dangereuses pour l'organisme.

III.5. p53 et la réparation de l'ADN :

Il existe de nombreux mécanismes de réparation de l'ADN (comme le système MMR, NHEJ, NER et BER). La protéine p53 peut participer à la réparation de l'ADN via ses activités transcriptionnelles ou indépendamment de celles-ci.

a) Activités non transcriptionnelles de p53 :

D'une part, il a été montré que la protéine p53 possède une activité exonucléase 3'-5'. Cette activité lui permet de se lier à des bases mal appariées au niveau des cassures doubles brins de l'ADN et de participer à leur excision. D'autre part, la protéine p53 est impliquée dans le système de réparation BER.

b) Activités transcriptionnelles de p53 :

Plus classiquement, p53 participe également à la réparation de l'ADN en régulant l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans les systèmes de réparation NER et MMR. p53 induit ainsi l'expression des protéines XPC (Xeroderma Pigmentosum C) et p48XPE (Xeroderma Pigmentosum E), impliquées dans le système NER et celle des protéines MSH2 (MutS protein Homolog 2), MLH1 (MutL Homolog 1) et PMS2 (Postmeiotic Segregation increased 2) impliquées dans le système MMR.

III. 6. Réversion génétique suite à un dommage à l'ADN :

Dans le domaine de la biologie de l'évolution, la réversion est le retour d'un caractère à un état primitif se manifestant par une mutation génique dans l'ADN permettant de retrouver les fonctions d'un gène après qu'il les a perdues suite à une première mutation.

Un des meilleurs exemples est la restauration de la voie de recombinaison homologue par réversion génétique. En effet des études réalisées sur des cellules pancréatiques cancéreuses mutées pour BRCA2 ont montré que la sensibilité au cisplatine ou aux inhibiteurs de PARP peut être éliminée par la réversion génétique qui permet de restaurer la fonction de BRCA2 dans la recombinaison homologue et d'induire une résistance au traitement anti-cancéreux.

III.7. Variation allélique dans les gènes de la DDR (DNA damage response) :

Les mutations des gènes de la DDR affectent aussi la réponse à la chimiothérapie. Un des exemples le plus connu est les mutations du gène TP53 qui code pour la protéine p53 et qui affecte ~50% des tumeurs. Ces mutations peuvent aboutir à la perte de l'expression de la protéine ou peuvent altérer sa fonction (mutations faux sens) en lui conférant une activité

dominante négative ou un gain de fonction. On observe ce type de mutations chez les individus atteints du **syndrome de Li-Fraumeni**, un syndrome génétique prédisposant au cancer. Des études ont montré que certaines mutations de la p53 perturbent l'expression de la p73, dont la fonction semble être déterminante pour la sensibilité cellulaire aux agents anticancéreux, induisant ainsi une résistance à la chimiothérapie.

CHAPITRE VII : Cancérogénèse

CHAPITRE VII : Cancérogénèse.

I. Introduction :

Le cancer reste aujourd'hui l'une des maladies les plus redoutables malgré les progrès réalisés en matière de prévention, détection et traitement. Il est responsable d'un décès sur huit dans le monde et plus de 12 millions de nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année.

Elucider le processus de la tumorigénèse et comprendre comment un cancer naît et évolue, est l'un des principaux buts de la recherche. Concernant ce sujet, plusieurs équipes ont montré que la tumorigénèse chez l'homme est un processus complexe comportant plusieurs étapes. Ces étapes reflètent les altérations génétiques que subit une cellule normale pour se transformer en cellule cancéreuse.

II. La cellule cancéreuse :

La cellule cancéreuse est une cellule anormale douée d'un pouvoir de multiplication indéfinie et incontrôlée ayant tendance à détruire et à envahir les tissus voisins. La cellule cancéreuse apparaît généralement différente des cellules normales. Ses caractères permettent de l'identifier, à l'état isolé et dans le tissu tumoral.

a) Caractères nucléaires :

- Le noyau est de taille augmentée, il peut être multiple ;
- Il est de forme anormale, encochée, bourgeonnante, polylobée ;
- La chromatine est abondante (polyploidie), irrégulièrement répartie, souvent condensée contre la membrane nucléaire. Les nucléoles sont volumineux, souvent multiples ;
- L'aspect du noyau varie d'une cellule à l'autre (anisocaryose). Ce polymorphisme est un bon argument cytologique de malignité.

b) Caractères cytoplasmiques :

- Le cytoplasme est plus ou moins abondant, mais le rapport nucléo-cytoplasmique est toujours augmenté ;
- Il est basophile en raison de sa richesse en ARN comme dans toute cellule jeune ;
- Il peut contenir diverses inclusions et des vacuoles.

Mais ces caractères ne sont pas spécifiques, il n'existe aucun critère cytologique constant de malignité. Aucun de ces caractères morphologiques n'est constant. Une cellule cancéreuse peut avoir une morphologie strictement normale, même en microscopie électronique.

c) Caractères physiologiques :

1. Division cellulaire :

Les mitoses sont nombreuses, elles sont irrégulières, multipolaires, avec un asynchronisme du déplacement des chromosomes et des anomalies chromosomiques. La mort de la cellule peut survenir au cours de la mitose (mitonécrose).

2. Activité fonctionnelle :

La cellule cancéreuse peut présenter une baisse ou une modification de son activité fonctionnelle qui se traduit par des modifications morphologiques.

3. Comportement :

Le comportement des cellules cancéreuses vis-à-vis des cellules qui les entourent n'est pas le même que celui des cellules normales :

- **Perte de la cohésion** entre les cellules, ce qui facilite leur essaimage ;

- **Immortalité** : il n'y a plus d'homéostasie tissulaire ni de régulation des mitoses. Les cellules cancéreuses se multiplient activement et pénètrent les tissus qui les entourent et leurs vaisseaux ;

- **Perte de l'inhibition de contact** : en culture les cellules normales cessent de se diviser quand elles entrent en contact les unes contre les autres ; cependant les cellules néoplasiques continuent à proliférer de façon anarchique sur plusieurs couches.

III. Relation mutation – cancer

Le cancer est une cause majeure de décès dans le monde. Il est à présent établi que les mutations de l'information génétique des cellules initient et participent à son développement, et que certaines mutations transmises au sein des familles prédisposent à son apparition. C'est le cas notamment des mutations des gènes BRCA1 et BRCA2 qui prédisposent aux cancers du sein et de l'ovaire. Les protéines produites par ces gènes sont directement impliquées dans la protection de l'information génétique puisqu'elles participent à la réparation des cassures se produisant dans le support de cette information : l'ADN.

L'ADN peut être endommagé par diverses lésions mais les plus déstabilisatrices de l'information génétique sont les cassures double-brin. Afin de protéger son génome, la cellule possède de nombreux mécanismes de réparation (**Figure 43**) dont la recombinaison homologue qui permet une réparation fidèle, c'est-à-dire sans perte ou modification de l'information génétique, permettant ainsi de prévenir l'apparition du cancer. La recombinaison homologue repose principalement sur l'activité de la protéine RAD51 qui nécessite l'utilisation des médiateurs BRCA2 et PALB2. Tout comme les gènes BRCA1 et BRCA2, PALB2 est un gène suppresseur de tumeur et ses mutations ont été associées avec une susceptibilité aux cancers du sein, de l'ovaire et du pancréas.

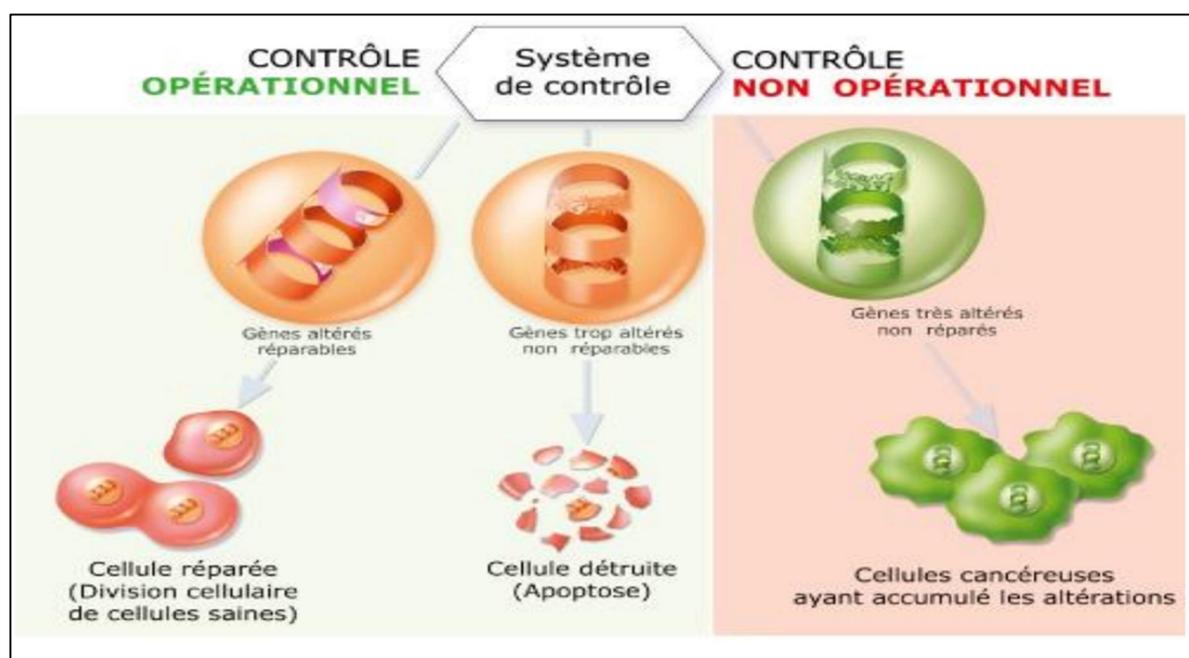


Figure 43 : Représentation schématique du processus du maintien de l'intégrité du génome (<https://www.fondation-arc.org/cancer/quest-ce-quun-cancer>).

IV. Théories du développement du Cancer :

On ne parle pas d'existence d'un cancer mais plutôt des cancers. Selon **HANAHAN et ses collaborateurs**, ce vaste catalogue des cancers peut résulter de la manifestation de six altérations physiologiques typiques caractérisant les cellules cancéreuses et permettant le développement et la dissémination de la tumeur.

Il est important de comprendre comment chacune de ces caractéristiques peut être utile pour la tumorigenèse : Une cellule cancéreuse est d'abord caractérisée par l'**autosuffisance en signaux de prolifération**. En effet, dans un tissu normal, la production des facteurs de prolifération est bien contrôlée afin d'assurer l'homéostasie en nombre de cellules et de

maintenir la bonne architecture et l'adéquate fonction tissulaire. Cependant, dans un tissu cancéreux, cette production est dérégulée ; les cellules cancéreuses ont acquis la capacité de produire elles-mêmes ces facteurs et induire une stimulation autocrine de la prolifération ou, aussi, la capacité de stimuler les cellules normales qui entourent la tumeur pour qu'elles leur produisent les facteurs nécessaires. Une dérégulation du nombre ou de la structure des récepteurs à la surface des cellules cancéreuses peut aussi augmenter leur sensibilité aux facteurs de prolifération.

En plus de sa capacité à induire ses propres signaux de prolifération pour contrôler son destin, une cellule cancéreuse doit aussi réussir à contourner les mécanismes qui régulent négativement la prolifération cellulaire. Beaucoup de ces mécanismes dépendent sur l'action des gènes suppresseurs de tumeurs tels que les gènes codant pour les protéines RB (retinoblastoma-associated) et TP53. La protéine RB intègre des signaux provenant de diverses sources extra- et intracellulaires puis décide en fonction de ces sources si la cellule doit rentrer ou non dans le cycle cellulaire. Ainsi les cellules cancéreuses déficientes en RB prolifèrent de façon permanente. Tandis que RB participe à la transmission des signaux inhibiteurs de la croissance, provenant le plus souvent de l'extérieur de la cellule, TP53 saisit les signaux émis par les senseurs intracellulaires de stress et, en fonction du degré du dommage, contribue soit à l'arrêt du cycle cellulaire soit à l'apoptose.

Les cellules cancéreuses possèdent aussi un potentiel réplicatif illimité, leur permettant d'acquérir l'immortalité et de générer des tumeurs macroscopiques. Cette immortalité réplicative est absente dans un tissu normal où les cellules subissent un nombre limité de division. Plusieurs études ont montré un rôle des télomères dans l'acquisition de ce pouvoir. En effet dans les cellules non-immortalisées, les télomères, connus depuis longtemps pour leur rôle de protection des chromosomes et pour leur contribution au maintien de l'intégrité du matériel génétique, se raccourcissent progressivement après chaque cycle cellulaire limitant ainsi le nombre de division. La perte des télomères induit des fusions entre les extrémités des chromosomes et, par conséquence, une instabilité génomique. Lorsqu'un seuil-limite est atteint, c'est-à-dire que l'extrémité du chromosome a été "rongée" par les divisions successives, un signal antiprolifératif se déclenche et la cellule entre en sénescence puis en crise pour mourir finalement.

V. Oncogènes, gènes suppresseurs de tumeur et cancers :

Très schématiquement deux types de gènes interviennent dans la formation d'un cancer : les protooncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur. En effet, il existe un équilibre dynamique entre un contrôle positif, exercé par les proto-oncogènes, et un contrôle négatif, dépendant des gènes suppresseurs de tumeur. Dans la cellule normale, ces deux types de gènes régulent la prolifération et la différenciation. La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse est le résultat de la **rupture de l'équilibre** entre les deux types de gènes.

V.1. Proto-oncogènes/oncogènes :

Les proto-oncogènes, gènes normalement présents dans la cellule, jouent un rôle dans la croissance et la différenciation cellulaire et participent également à la transduction du signal entre l'environnement cellulaire et le noyau par des mécanismes variés.

Ces différents proto-oncogènes sont des gènes dominants. Leur activation en oncogènes correspond à un gain de fonction ; ils sont alors dotés de propriétés transformantes. Cette activation peut être liée à un virus ou non.

Le mécanisme prédominant d'activation des proto-oncogènes est dans la plupart des cas non viral : il peut s'agir ainsi d'amplifications géniques, de mutations ponctuelles, de délétions ou de translocations chromosomiques avec translocation d'un proto-oncogène à proximité d'une zone transcriptionnellement active, ou encore de modification du promoteur du gène.

V.2. Les gènes suppresseurs de tumeurs :

Contrairement aux oncogènes qui deviennent hyperactifs dans les cellules cancéreuses, les gènes suppresseurs de tumeurs **perdent leurs fonctions** dans les cancers humains. Il peut s'agir soit de délétions d'une région du chromosome contenant le gène, soit de mutations ponctuelles qui détruisent ou altèrent sa fonction (**Figure 44**).

Pour que la fonction d'un gène suppresseur soit perdue, il est nécessaire que les deux copies du gène soient inactivées. Le premier gène suppresseur de tumeur, Rb1, a été découvert dans le rétinoblastome, un cancer de l'œil chez l'enfant. Par la suite de nombreux gènes suppresseurs ont été découverts. Certains sont inactivés dans des cancers très spécifiques, à l'instar de BRCA1 et BRCA2 dans les cancers du sein, d'APC dans les cancers du côlon, ou de WT1 dans les cancers du rein. D'autres gènes suppresseurs de tumeurs ont un spectre

d'inactivation plus large comme p53 ou p19ARF qui sont inactivés dans un grand nombre de types de cancer.

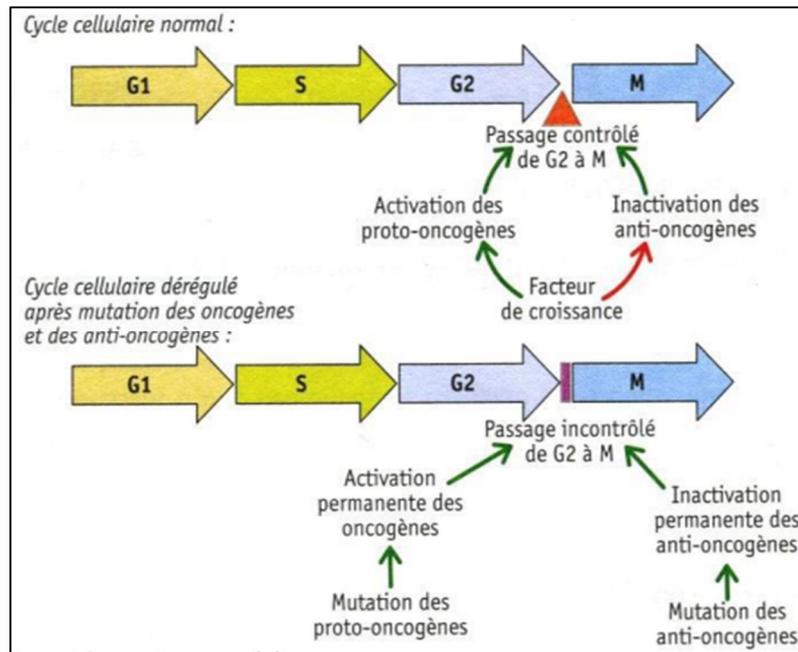


Figure 44 : Illustration du déséquilibre entre les 2 familles de gènes contrôlant le cycle cellulaire (**Proto-oncogènes** et **Suppresseurs de tumeurs**).

VI. Le processus multi-étapes des cancers :

Différentes étapes ont été identifiées dans le développement d'un cancer : **l'initiation**, la **promotion** et la **progression** (**Figure 45**).

Dans un premier temps, il se produit une lésion majeure au niveau de l'ADN d'une cellule ; il en résulte une **transformation** de cette cellule. Dans un second temps, la cellule transformée se développe et **prolifère** en formant un groupe de cellules transformées identiques. Enfin, dans un troisième temps, la cellule acquiert les **caractéristiques** d'une cellule cancéreuse : elle se multiplie de façon anarchique, en perdant en partie son caractère différencié (son identité liée au tissu auquel elle appartenait).

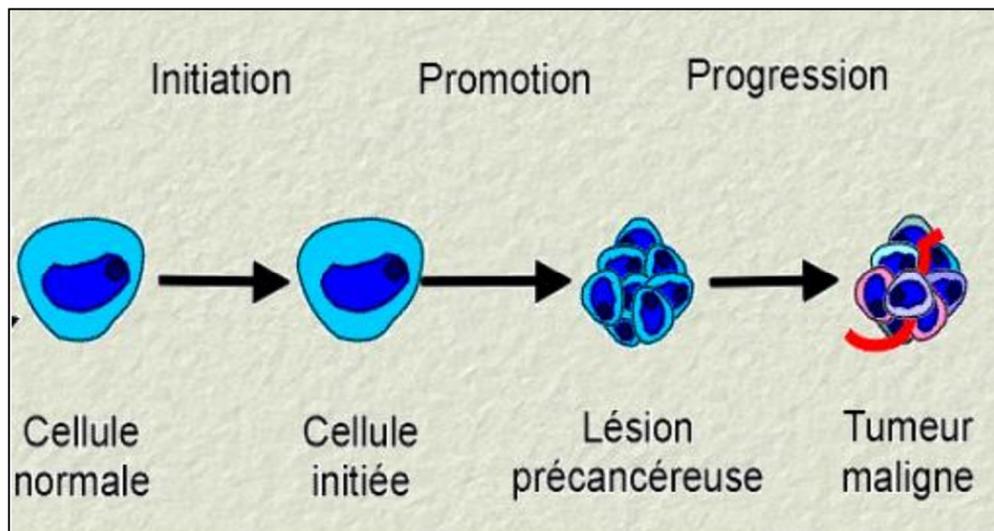


Figure 45 : Illustration du processus multi-étapes de la transformation néoplasique.

L'évolution se fait d'abord **localement**, puis peut s'étendre via le sang et la lymphe à d'autres endroits du corps où se forment les **métastases** (**Figure 46**).

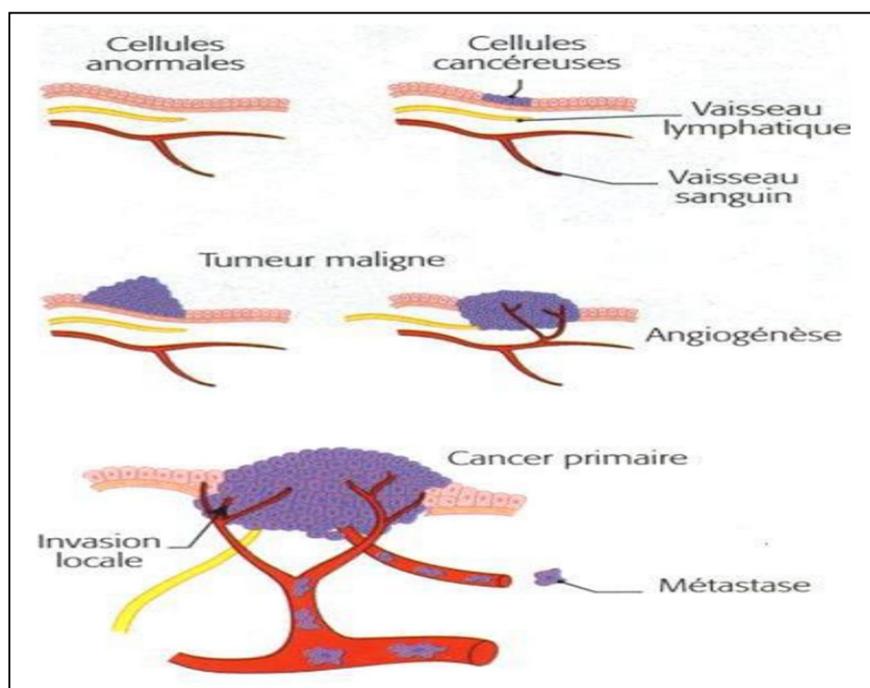


Figure 46 : Illustration de l'évolution de la cellule cancéreuse vers des métastases.

VII. Les événements cellulaires impliqués dans le développement tumoral :

Le développement des cancers passe par l'accumulation de multiples mutations oncogéniques qui confèrent aux cellules un phénotype malin caractéristique, qui leur permettent par exemple d'échapper à l'apoptose, aux points de contrôles du cycle cellulaire, d'avoir un

potentiel réplicatif augmenté, de surexprimer certains facteurs de croissance et par conséquent de devenir incontrôlables.

En 2000, **HANAHAN et WEINBERG** expliquent que le développement d'un cancer dépend de six capacités biologiques distinctives : la capacité à éviter l'apoptose, la possibilité de se diviser de manière indéfinie, la capacité de développer des métastases, l'insensibilité aux inhibiteurs de croissance, la capacité à induire l'angiogenèse et l'autosuffisance en signaux de croissance (**Figure 47**).

Onze années plus tard, un deuxième article de ces auteurs permet d'ajouter deux nouveaux paramètres à cette liste : la capacité à éviter la destruction par le système immunitaire et la dérégulation du métabolisme énergétique des cellules. Ils mettent aussi en évidence deux caractéristiques favorisant les cancers (mais qui ne sont pas qualifiées de capacités distinctives), il s'agit de **l'inflammation**, favorisant les tumeurs, ainsi que **l'instabilité** et les **mutations** du génome.

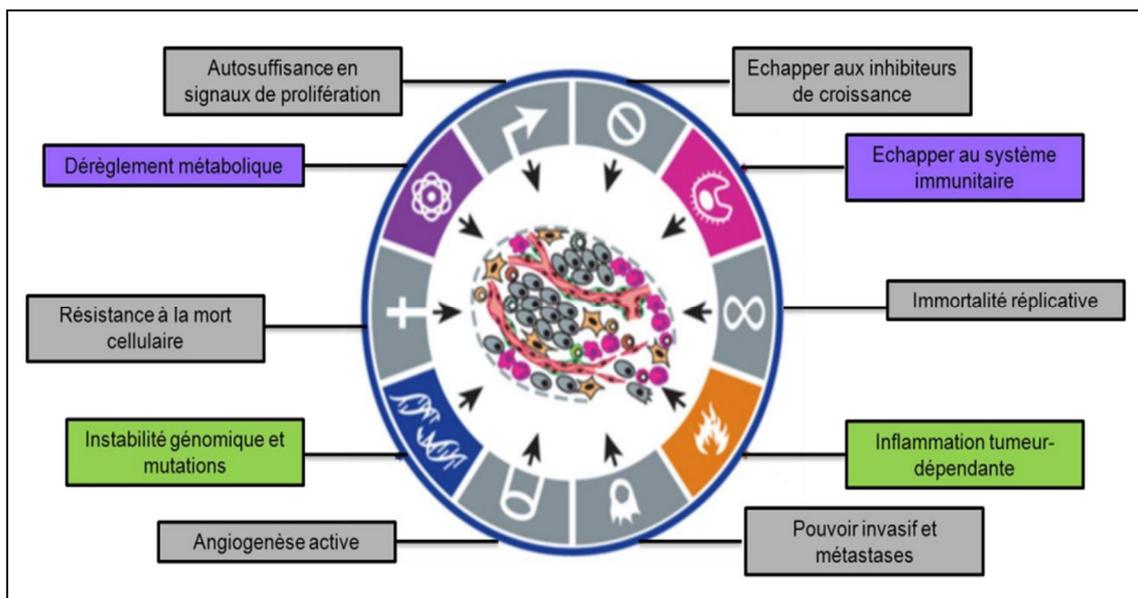


Figure 47 : Les caractéristiques principales du cancer (**HANAHAN et WEINBERG, 2000**).

VIII. Instabilité génomique et cancers :

L'acquisition de toutes ces capacités est favorisée par **l'instabilité génomique** et les **mutations** qui vont accorder aux cellules cancéreuses des avantages prolifératifs. Pour cette raison, les cellules cancéreuses se mobilisent pour augmenter le taux de mutation, soit en augmentant leur sensibilité aux agents mutagènes soit en perturbant la machinerie responsable du maintien de l'intégrité du génome.

La perturbation de la machinerie de maintenance de l'ADN passe par la perturbation des gènes connue sous le terme de '**care-takers**' ; ce sont les gènes impliqués dans la détection des dommages de l'ADN, l'activation des voies de réparation, la réparation elle-même et l'inactivation des mutagènes avant qu'elle attaque l'ADN.

En plus de l'instabilité génomique, l'inflammation tumeur-dépendante facilite aussi l'acquisition des capacités déjà décrites par les cellules tumorales. En effet, et contrairement à toute attente, l'inflammation tumeur dépendante jouera un rôle positif dans la progression tumorale, en fournissant au micro-environnement tumoral des molécules bioactives (facteurs de croissance et de survie, signaux de prolifération, facteurs pro-angiogéniques...) ou des molécules mutagènes (ROS).

CHAPITRE VIII : Tératogénèse

CHAPITRE VIII : Tératogénèse.

I. Définition

La **tératologie** est la branche de l'embryologie qui étudie les anomalies (malformations) du développement, qu'elles soient structurales, fonctionnelles ou biochimiques présentes à la naissance avec ses manifestations typiques telles que le développement fœtal insuffisant, l'avortement ou la mort *in-utero*, la carcinogénèse et les malformations. La tératologie vient de "**teras**", "**teratos**" qui signifient monstre et "**logos**" la science. La **tératogénèse** est l'étude de l'évolution embryologique des malformations.

Caractère **héréditaire** et caractère **congénital** ? Jusqu'au milieu des années 30, "congénital" et "héréditaire" étaient interchangeables et souvent synonymes. Actuellement, "**congénital**" correspond à un caractère, (un élément du phénotype), de l'individu à la naissance, même si ce caractère n'est pas décelable immédiatement. "**Héréditaire**" se dit d'un caractère transmissible à la descendance. Aujourd'hui, il est clair que 90% des malformations congénitales sont provoquées par des facteurs de l'environnement (identifiés ou non), et ne sont donc généralement pas transmissibles.

II. Fréquence des malformations congénitales :

Les malformations congénitales représentent, dans les pays industrialisés, la 1^{ère} cause de mortalité infantile. Leur fréquence est difficile à évaluer dans la mesure où :

- 1) Une forte proportion d'embryons malformés n'arrive pas au terme de la gestation.
- 2) Certaines anomalies peuvent passer complètement inaperçues.

La fréquence des malformations congénitales est estimée d'environ 6 % à 5 ans de vie.

III. Les facteurs tératogènes :

Les malformations congénitales résultent de l'action délétère de facteurs tératogènes sur le développement de l'embryon ou du fœtus. On définit comme tératogène tout médicament, substance chimique, biologique ou polluant qui perturbe le développement normal de l'embryon et du fœtus.

a) Les facteurs externes, ou facteurs de l'environnement : sont responsables d'environ 12% des anomalies du développement.

b) Les facteurs internes, endogènes ou génomiques : correspondant à des anomalies chromosomiques ou génétiques, sont responsables d'environ 8% des anomalies du développement. Dans 20 % des cas de malformations congénitales, on invoque une étiologie multifactorielle. Le plus souvent (60% des cas), la naissance d'un enfant malformé reste sans explication.

III.1. Les facteurs tératogènes externes :

III.1.1 Facteurs nutritionnels :

- Les carences et les excès vitaminiques ;
- Les carences en acides aminés ;
- Les troubles hormonaux.

III.1.2. Facteurs physiques :

- Radiations ionisantes ;
- L'hyperthermie ;
- Les champs magnétiques ;
- Les ultrasons (destruction de calculs rénaux, par ex.).

III.1.3. Les facteurs biologiques :

- Les virus (La Rubéole) ;
- Les parasites (La toxoplasmose) ;
- Les bactéries (La listériose) ;

III.1.4. Médicaments :

Historiquement, le tératogène le plus connu est la thalidomide, un médicament anti-nauséux et hypnotique-sédatif également utilisé dans le traitement de la lèpre et de la tuberculose. Ce désastre des années 1960 a démenti l'idée, autrefois très répandue, selon laquelle le placenta pouvait protéger le fœtus contre les médicaments. En effet, à la suite de son administration, entre le 27^{ème} et le 42^{ème} jour après la conception, de graves malformations aux membres sont apparues avec, en dehors de cet intervalle, des anomalies cardiaques et rénales. Bien que 20 à 30 % des fœtus aient été atteints de manière caractéristique, l'effet tératogène est

resté méconnu pendant des années, engendrant par la suite la crainte que n'importe quel médicament pris au cours de la grossesse puisse représenter un danger. La Thalidomide provoque un syndrome polymalformatif chez 20% des fœtus exposés en début de grossesse, même après **une prise unique (Figure 48)**.



Figure 48 : Bébé de thalidomide (Source : Internet : <https://www.alamyimages.fr/photos-images/bébé-thalidomide.html?sortBy=relevant>).

III.1.5. Facteurs toxiques :

A. Le syndrome d'alcoolisation fœtal (SAF) :

Le SAF associe une hypotrophie fœtale, un retard mental, des anomalies faciales et cardiaques. Le syndrome complet apparaît à partir d'une consommation de 90 ml d'alcool pur par jour, mais on n'a pas déterminé de dose seuil. Il est plus sage d'éviter toute prise d'alcool, même ponctuelle, au cours de la grossesse. La prévalence du syndrome d'alcoolisation fœtale (SAF) dans le monde occidental est environ de 0,5 à 3 cas pour 1 000 naissances vivantes, alors que l'ensemble des troubles causés par l'alcoolisation fœtale (ETCAF) est estimé à 9 cas pour 1 000 naissances vivantes. 700 à 3 000 enfants sur 750 000 naissances par an auraient un SAF grave notamment avec une incidence plus élevée dans certaines régions en particulier la Normandie d'après l'Inserm en 2001. Elle est la première cause d'handicap mental d'enfant d'origine non génétique. De ce fait, le message recommandant « Zéro alcool » pendant la grossesse reste d'actualité (**Figure 49**).



Figure 49 : Exemple d'affiche informative.

- B. **Les métaux lourds** (Mercure, méthylmercure et plomb) : Malformations du système nerveux.
- C. **Insecticides** : (DTT) Bien que sans effet tératogène démontré, Il présente des effets œstrogéniques chez le rat mâle (diminution de la taille du testicule, effets néfastes sur la spermatogenèse).
- D. **Drogues** : Elles ont le potentiel d'interférer avec l'établissement des connections neuronales. D'après le baromètre de santé 2010, **le cannabis** semble être la drogue la plus consommée étant donné sa facilité d'accès dans les différentes échelles sociales. 37,6% des femmes de 15-30 ans ont déjà fumé du cannabis. Entre 20 et 25 ans, les niveaux d'usage régulier sont les plus importants, quel que soit le sexe. L'exposition prénatale au cannabis serait à l'origine de diverses complications obstétricales, développementales et de troubles cognitifs pouvant avoir des conséquences à long terme.
- E. **Le tabagisme maternel** : Chez une femme fumant plus de 10 cigarettes/jour, le poids de l'enfant à terme sera inférieur à 2,5 kg. Des composants de la fumée de tabac (nicotine) ont un effet **vasoconstricteur** sur les artérioles utérines. De plus, le sang maternel n'est pas oxygéné de façon optimale (**hypoxie fœtale** due au dioxyde de carbone).

III.1.6. Dose tératogène :

L'embryon est souvent **plus sensible** que la mère à l'action toxique. Ainsi, une molécule administrée à dose non toxique pour la mère peut se révéler tératogène chez l'embryon.

III.2. les facteurs internes, endogènes ou génomiques :

III.2.1. Sensibilité génétique :

La réaction de l'embryon aux agents tératogènes dépend de sa **constitution génétique**. Pour une même exposition médicamenteuse ou toxique, la réponse embryo-fœtale est extrêmement variable. **2 hypothèses sont possibles :**

- 1) La variation individuelle du métabolisme maternel ;
- 2) La sensibilité intrinsèque liée au génotype embryo-fœtal susceptible de modifier le métabolisme médicamenteux.

III.2.2. Sensibilité spécifique de l'embryon :

L'embryon est plus sensible que l'adulte à l'action des médicaments à cause de l'immatunité métabolique (Foie) et notamment l'absence de mécanismes de conjugaison nécessaires à la détoxification.

III.2.3. Facteurs immunologiques :

Tel que la maladie **hémolytique** par incompatibilité fœto-maternelle dans le système rhésus ou allo-immunisation anti-Rh (anti-D) : la mère est **Rh-** et porte un enfant **Rh+** et le sang maternel contient des anticorps anti-Rhésus. Dans les formes sévères, une hémolyse massive a lieu *in-utéro*.

III.2.4. Facteurs génétiques :

- 1) **Echelle moléculaire** : mutation génétique.
 - Substitution d'une base par une autre ;
 - Addition ou suppression d'une base (radiation, produits chimiques et l'influence de l'âge des géniteurs).
- 2) **Echelle chromosomique** : mutation ou aberration chromosomique.
 - **Accidents de la méiose** :
 - Non disjonction méiotique ;
 - Cassures chromosomiques ;
 - Division anormale du centromère.
 - **Accidents des premières mitoses du zygote** :
 - Perte d'un chromosome ou d'un chromatide ;
 - Non disjonction des chromosomes ;

- Un remaniement structurel.

IV. Les périodes de sensibilité aux agents tératogènes :

Le stade du développement embryo-fœtal exerce une grande influence sur l'impact des facteurs tératogènes sur l'embryon ou le fœtus (**Figure 50**).

IV.1. La période dite d'insensibilité tératogénique : (période du tout ou rien)

Elle s'étend de la fécondation jusqu'à la fin du stade blastula et dure environ 2 semaines. Elle inclut par conséquent la période de la vie libre de l'embryon (de la fécondation au 6^{ème} jour) et la nidation (6^{ème} au 11^{ème} jour). Aucune anomalie ne peut être déterminée durant cette période, exception faite de mosaïques chromosomiques.

IV.2. La période de grande sensibilité tératogénique :

Elle correspond à la période embryonnaire du 15^{ème} jour à la fin de la 8^{ème} semaine de la Gestation. Durant cette période, les facteurs tératogènes déterminent des anomalies graves qui sont souvent létales, ou au moins très visibles et/ou invalidantes. Chaque organe présente une période de sensibilité qui lui est spécifique :

1. **Le système nerveux central (SNC)** est sensible du 18^{ème} jour (date d'apparition de la plaque neurale) jusqu'après la naissance.
2. Les périodes de grande sensibilité du **cœur** (20^{ème} au 50^{ème} jour) et de **l'œil** (20^{ème} au 60^{ème} jour) sont précoces ; celle des organes génitaux externes est plus tardive (7^{ème} - 10^{ème} semaine).

Un agent tératogène affecte souvent, simultanément, le développement de plusieurs organes ayant la même période de sensibilité. En d'autres termes, la période d'exposition à un agent tératogène est parfois plus importante que sa nature dans la genèse d'une association donnée d'anomalies (syndrome malformatif). Il existe cependant de nombreux agents tératogènes dont les actions sont spécifiques, soit parce qu'ils agissent en se liant à des récepteurs, soit parce qu'ils s'accumulent dans des structures spécifiques. Exemples :

1. **Les androgènes** n'ont d'action que sur les organes génitaux externes et internes qui sont leurs organes cibles normaux (seuls ces organes expriment le récepteur des androgènes) ;
2. **L'iode** et les anti-thyroïdiens n'agissent que sur la thyroïde fœtale ;

3. **Les psychotropes** s'accumulent dans le SNC et perturbent son développement de façon préférentielle.

IV.3. La période de sensibilité tératogénique modérée :

Elle couvre la période fœtale (de la 8^{ème} à la 38^{ème} semaine). Les anomalies déterminées durant cette période constituent des fœtopathies. Les anomalies déterminées durant la période fœtale sont très souvent viables : plus que les embryopathies, les fœtopathies posent un problème de prise en charge par la société.

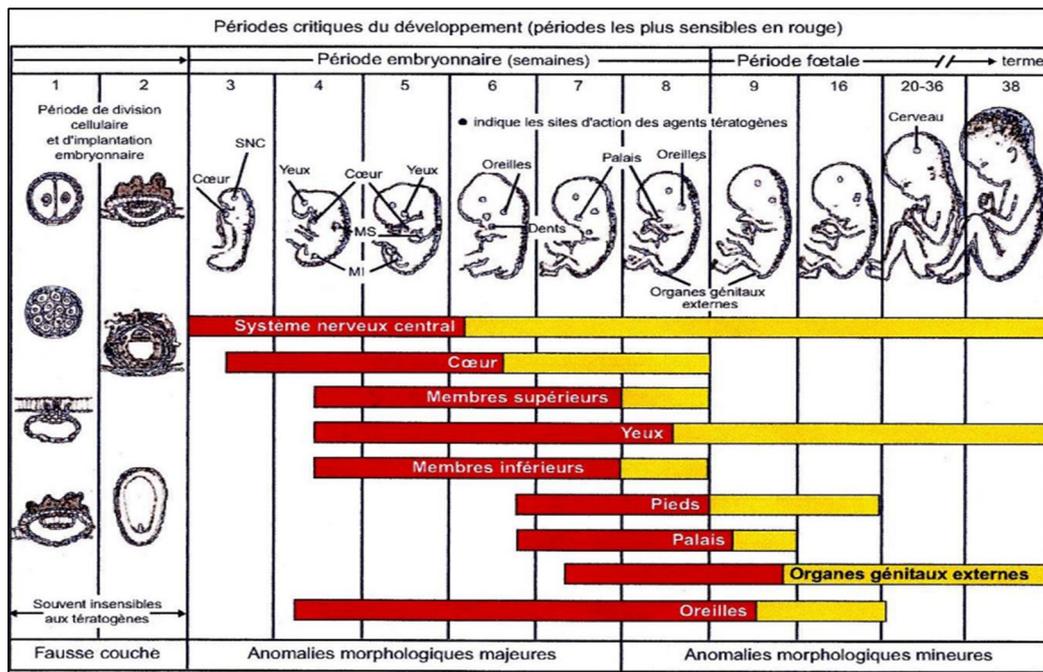


Figure 50 : Périodes critiques du développement embryonnaire et fœtal (Source : Intérêt de la consultation préconceptionnelle, 2008).

V. L'effet tératogène dépend étroitement de plusieurs facteurs :

- L'agent ;
- La dose et la durée de l'exposition ;
- La voie d'administration ;
- Les autres expositions concomitantes ;
- La période d'exposition pendant la grossesse ;
- La prédisposition génétique de l'individu.

VI. Relation mutagenèse et tératogenèse :

La **tératogenèse** est la formation et le développement *in-utéro* d'anomalies aboutissant à des malformations ou à des monstruosité. La **mutagenèse** est la production des mutations, qui désignent une modification irréversible de la séquence d'un génome (ADN ou ARN). Les mutations peuvent être dues à des erreurs de copie du matériel génétique au cours de la division cellulaire, ou à l'exposition à des agents mutagènes (radiations, agents chimiques, virus). Une très grande partie des erreurs commises au cours de la réplication du génome sont corrigées immédiatement par des mécanismes complexes et efficaces de réparation de l'ADN, et seule une faible part de ces erreurs deviennent des mutations transmises aux cellules-filles. Si une mutation affecte les cellules sexuelles (dites germinales), elle est transmise aux descendants de l'individu mutant. La nouvelle séquence du gène est alors appelé un allèle.

Dans certains cas, cette mutation peut procurer un avantage sélectif ou au contraire être défavorable. (C'est la sélection naturelle). En revanche, pour la plupart des mutations accidentelles (provoquées par irradiation ou substances chimiques), si elles affectent les cellules non sexuelles (dites somatiques), la mutation ne se transmet pas et n'affectera donc que le sujet l'ayant subie directement. S'il y a une surproduction incontrôlée des cellules, il y a possibilité de création d'une tumeur pouvant évoluer vers un cancer. Au contraire, sans division excessive l'effet est négligeable.

VI.1. Les types de mutations :

A. Les mutations géniques :

Elles affectent la structure du matériel génétique au sein d'un seul gène. Dues à des erreurs lors de la réplication de l'ADN, elles sont à l'origine de l'apparition d'allèles nouveaux. Si elle porte sur un seul nucléotide, on parle de mutation ponctuelle. Il peut y avoir :

-Substitution d'un nucléotide par un autre ;

-Addition (insertion) et suppression (délétion) : décalent le cadre de lecture, donc modifient tous les codons qui suivent.

B. Les mutations chromosomiques et génomiques :

Modifications quantitatives de l'information héréditaire. Ce sont des changements profonds dans la structure d'un ou de plusieurs chromosomes (mutations chromosomiques) ou

des variations du nombre des chromosomes (mutations génomiques). Ces anomalies sont cytologiquement décelables et se définissent par un caryotype particulier.

VI.2. Origine des mutations :

A. Mutations spontanées :

Les mutations spontanées résultent d'un processus naturel, et se produisent au moment de la réplication cellulaire. En général, elles sont rares et aléatoires, et donc elles constituent la principale source de diversité génétique, moteur de l'évolution.

B. Mutations induites par les agents chimiques et tératogènes :

De nombreuses tentatives ont été faites pour déterminer le rôle éventuel des mutations induites chimiquement, vis-à-vis de la genèse des malformations. Certains auteurs ont montré que le cyclophosphamide, tératogène très connu, administré à la souris le 12^{ème} jour de la gestation, provoquait simultanément des malformations variées ainsi qu'un effet mutagène (micronoyaux et échange de chromatides sœurs) dans les hépatocytes du fœtus. Les auteurs suggèrent que ces effets mutagènes peuvent contribuer indirectement à la présence des malformations. L'expression des deux phénomènes chez le même individu n'implique pas obligatoirement une causalité de l'un à l'autre.

Il faut remarquer que ces résultats sont obtenus avec une catégorie de substances bien particulière, celle des agents alkylants, qui sont des antimétabolites puissants, il faut donc éviter de généraliser ces observations à d'autres classes de produits et dans l'état actuel des connaissances, ne pas extrapoler de la **mutagénèse** vers la **tératogénèse**, il convient donc d'évaluer le risque de chaque activité potentielle en tenant compte de ses modalités propres.

CHAPITRE IX : Notions sur la stratégie, la législation des produits mutagènes et la sécurité au laboratoire (étude de cas)

CHAPITRE IX : Notions sur la stratégie, la législation des produits mutagènes et la sécurité au laboratoire (étude de cas).

I. Généralités :

L'évaluation des risques sanitaires dans les établissements de santé est aujourd'hui encadrée par plusieurs textes réglementaires concernant notamment les vigilances. Dans le secteur des laboratoires de biologie moléculaire, les principaux risques professionnels source d'accidents de travail sont les risques chimique et biologique, du fait même de la nature de l'activité (manipulation de produits chimiques et d'agents biologiques). Si le risque biologique est fréquemment évalué et fait l'objet de mesures de prévention et protection importantes, il n'en est pas de même du risque chimique parfois sous ou mal évalué bien que concernant la majorité du personnel des laboratoires.

Le grand nombre et la diversité des produits manipulés rendent nécessaire une évaluation périodique des risques afin de mieux cerner les situations dangereuses et de proposer au personnel des solutions pratiques et adaptées.

Les produits Cancérigènes, Mutagènes et Toxiques pour la Reproduction (C, M et R) notamment font l'objet de mesures réglementaires strictes quant à leur manipulation et aux protections à utiliser ; leur identification est donc un préalable indispensable à une meilleure information et protection du personnel. Elle doit également permettre de faciliter le suivi de son exposition et plus globalement sa surveillance médicale par la médecine du travail.

Dans la mise en place d'une telle démarche, une des difficultés consiste dans le choix de la méthode d'évaluation et dans son application rapide par un groupe de travail pluridisciplinaire.

II. Travail en laboratoire et risques pour la sante :

Les laboratoires de routine ou de recherche recouvrent des situations de travail très diverses. Le travail en laboratoire implique la mise en œuvre de techniques et la manipulation de substances qui peuvent être différentes. Le secteur d'activité peut varier également : activité de routine, activité publique ou privée, recherche publique dans les universités/centres hospitaliers universitaires, organismes spécialisés (INSERM, INRA, INRS, CNRS, etc.) et activité privée de type recherche industrielle. Il existe aussi des laboratoires ayant des activités de production et de recherche, c'est le cas de l'Institut Pasteur en France. Il est aussi fréquent que les personnels relèvent de statuts différents dans un même laboratoire.

D'une façon générale, la précarité des contrats de recherche et le passage de nombreux étudiants (thésards, formation continue, etc.) entraînent un turn-over important des personnels rendant difficile la prévention, également du fait que les plus jeunes sont souvent peu sensibles à celle-ci. De plus les mêmes dosages réalisés dans des équipes différentes peuvent utiliser des techniques diverses ; l'activité de laboratoire est multiple et reflète une grande variété de tâches nécessitant une étude spécifique pour connaître l'exposition potentielle des personnels. La surveillance médicale est ainsi difficile et surtout basée sur le respect des « bonnes pratiques de laboratoires ». Malgré tout dans la majorité des cas les niveaux d'expositions sont faibles (du fait de quantités utilisées généralement faibles : du microlitre à quelques litres) et varient en fonction des périodes étudiées.

III. Accidents et effets aigus sur la santé :

Le travail en laboratoire (laboratoire de recherche ou de routine) est associé à l'exposition à de nombreux agents chimiques. Les produits chimiques peuvent être à l'origine d'incendies et d'explosions avec des conséquences dévastatrices : salariés blessés ou tués, biens détruits, pollution de l'environnement. Les accidents (bris de tubes, déversement, erreurs de manipulation, etc.) peuvent avoir des conséquences traumatiques plus ou moins importantes pour l'individu, ainsi qu'un risque d'intoxication immédiat.

La survenue d'accident de travail peut être révélatrice de situations dangereuses. Ce risque accidentel touche le personnel technicien et chercheur travaillant dans les laboratoires mais aussi et surtout les agents chargés des tâches de ménage et de ramassage des déchets.

Ainsi une étude réalisée en 1993 dans un centre hospitalier universitaire aux Etats Unis montre que l'exposition accidentelle professionnelle à des produits chimiques touche en majorité les personnels chargés du nettoyage (60,1 accidents pour 1000 personnes/année) et de la maintenance (18,6 accidents pour 1000 personnes/année). Les techniciens représentent dans cette étude 13,1 accidents pour 1000 personnes/année. Ces accidents entraînent la plupart du temps des lésions de type irritation et/ou brûlure cutanée et mettent en cause des agents désinfectants et des solvants dans la majorité des cas.

Les brûlures sont des conséquences accidentelles fréquentes. Deux types de brûlures existent : les brûlures thermiques qui peuvent être provoquées par des incendies ou des explosions, par contact avec des produits très chauds (vapeurs surchauffées) ou très froids (cryogéniques) comme l'air ou l'azote liquide ; les brûlures chimiques résultent du contact direct avec des produits corrosifs (acides ou bases concentrés) qui détruisent la peau, les

muqueuses oculaires ou respiratoires. Les lésions sont plus ou moins graves en fonction de la nature du produit, de sa concentration, de la durée du contact et de sa localisation. Les bases pénètrent plus profondément les tissus que les acides. Les dommages liés aux brûlures des solutions basiques sont donc potentiellement plus importants (en particulier pour les yeux).

IV. Travail en laboratoire et effets chroniques sur la santé :

L'intoxication chronique résulte d'une exposition prolongée ou répétée à des doses faibles de produit. Les troubles se révèlent lentement : difficultés respiratoires, fatigue, troubles nerveux, digestifs, sanguins...etc. Les produits les plus utilisés dans les laboratoires, outre les acides et les bases, sont les solvants. Une exposition régulière à un ou plusieurs solvants peut entraîner à plus ou moins long terme une atteinte souvent irréversible des organes cibles. La pénétration dans l'organisme est cutanée et respiratoire.

Les solvants peuvent donner des atteintes neurologiques de type psychosyndrome organique aux solvants (fatigue, troubles du sommeil, difficultés de concentration, pertes de mémoire, troubles de l'humeur, dépression, altération des fonctions cognitives). Des atteintes hématologiques sont aussi décrites pour le benzène et certains éthers de glycol.

Enfin les solvants étant en partie métabolisés par le foie et éliminés par les reins, ces organes sont des cibles privilégiées. Les solvants sont responsables d'atteintes rénales et hépatiques qui doivent être prévenues.

V. Travail en laboratoire et risque cancérigène :

A côté de ces effets à court terme, ayant en général une cause facilement identifiable, l'apparition d'effets à long terme (ophtalmologiques, respiratoires, rénaux, hématotoxiques, hépatotoxiques) doit être prévenue. Certains produits manipulés dans les laboratoires sont connus ou suspectés d'être cancérigènes, mutagènes ou tératogènes. Parmi eux on retrouve des agents chimiques (solvants, agents alkylants, agents intercalants, amines aromatiques, hormones, métaux lourds...), des agents biologiques (virus de l'hépatite B et C, virus HTLV, mycotoxines, organismes génétiquement modifiés) et des composés radioactifs (radio-isotopes, radiations ionisantes). Les expositions multiples à plusieurs substances chimiques simultanément, mais aussi à des agents biologiques et physiques, ne sont pas rares.

CORDIER et ses collaborateurs (1995) comparent les populations exposée et témoin en fonction du domaine d'activité (biologie moléculaire, génétique, etc.) et des produits manipulés (substances chimiques, agents biologiques, rayonnements) pour les différentes

localisations de cancers survenus chez les salariés de l'Institut Pasteur ; ils notent en 1995 que la plupart des sujets avaient travaillé en biologie moléculaire, en contact à la fois avec des substances comme l'acrylamide, des agents biologiques comme les ADN recombinants, et des produits radioactifs (32 Phosphore principalement).

V.1. Cancers cérébraux :

Plusieurs études rapportent des excès non significatifs de cancer du cerveau chez les personnels de laboratoires de recherche. L'étiologie des tumeurs cérébrales est encore mal connue et les seules causes externes reconnues sont les radiations ionisantes et peut-être certaines nitrosamines. Les produits chimiques utilisés couramment dans les laboratoires comme l'acrylamide, le chlorure de vinyle, l'oxyde de propylène et oxyde d'éthylène induisent des tumeurs cérébrales chez l'animal. Cependant aucun de ces produits carcinogènes n'ont été reconnus neuro-oncogènes chez l'humain pour l'instant.

V.2. Cancers du sein :

Plusieurs études retrouvent un risque élevé de cancer du sein chez les femmes travaillant dans un laboratoire mais peu d'études prennent en compte les antécédents gynécologiques ou les habitudes de contraception. La plus récente est une étude de cohorte associée à une étude cas témoin ; elle retrouve un SIR de 1.67 (IC 95%, 1.22-2.24) pour l'ensemble des femmes travaillant en laboratoire après une période de 20 ans d'exposition.

Pour certains types de laboratoires (recherche, biologie moléculaire, contrôle qualité, routine, médecine nucléaire), on retrouve des SIR significativement élevés quand on ajuste le risque sur une durée d'exposition de 20 ans. Bien qu'aucun facteur de risque professionnel n'ait été identifié avec certitude, plusieurs auteurs ont rapporté une augmentation non significative de la mortalité par cancer du sein parmi les personnels des laboratoires. Ce risque accru pourrait être dû aux caractéristiques socio-démographiques de la population visée ; en effet, une parité faible et un âge tardif au premier enfant, ainsi qu'une première période d'allaitement tardive et courte, constituent des facteurs de risque avérés.

V.3. Cancers cutanés :

Plusieurs études trouvent un excès de risque significatif de mélanome chez le personnel de laboratoire et notamment chez les femmes. Ce risque est notamment corrélé à la durée de travail en laboratoire. Un excès de risque avait déjà été établi dans les populations de chimistes, par exemple dans la cohorte de salariés de Dupont de Nemours.

V.4. Cancers hématopoïétiques :

Les premières études réalisées sur le personnel des laboratoires notent des excès de risques non significatifs de cancers hématopoïétiques. Dans une étude conduite à l'Institut Pasteur de Paris le personnel travaillant dans des unités de microbiologie génétique et de biologie moléculaire avait une tendance à développer des cancers hématopoïétiques avec respectivement un OR (odds ratio) de 12.1 [1.9-76] et 12.6 [1.9-86] en particulier des lymphomes malins non Hodgkiniens (OR=13.8 - 25 - [1.5-125] et OR=51.5 [3.7-722], respectivement). Les cas auraient été plus exposés aux agents alkylants et intercalants qui comprennent la méthyl-nitrosoguanidine, l'éthylméthanesulfonate, l'acrylamide, le bromure d'éthidium, l'ADN recombinant et le 32P.

Parmi les agents chimiques auxquels est exposé le personnel de laboratoire, le benzène est reconnu comme une cause de leucémie. L'oxyde d'éthylène, le formaldéhyde sont suspectés de provoquer des leucémies. Ce dernier a d'ailleurs été classé dans la catégorie 1 du CIRC (cancérogène pour l'homme) en juin 2004 en ce qui concerne les cancers de l'oropharynx.

VI. Travail en laboratoire et fonction de reproduction :

Les effets sur la fertilité sont variables et recouvrent les effets néfastes sur la libido, le comportement sexuel, l'ensemble des aspects de la spermatogenèse ou de l'ovogenèse, l'activité hormonale, la réponse physiologique susceptible d'interférer avec la fécondation elle-même ou le développement de l'ovule fécondé y compris l'implantation.

Chez l'homme, plusieurs sites potentiels peuvent être la cible des agents chimiques toxiques pour la reproduction. Certains agents chimiques peuvent interférer avec la synthèse des hormones (Gn RH, LH, FSH, testostérone) impliquées dans la spermatogenèse. Ainsi des oestrogènes peuvent bloquer la spermatogenèse en inhibant la production des hormones FSH et LH. La baisse de la libido peut être liée à un dérèglement hormonal. Une autre cible est localisée directement au sein du patrimoine génétique (ADN). Certaines substances vont ainsi endommager l'ADN et interférer avec le processus de division cellulaire, conduisant à l'inhibition de la production de sperme.

Comme pour les autres effets, les effets rapportés dans la littérature sont difficiles à attribuer à un seul type d'agent du fait de la co-exposition fréquente à de nombreux produits. Cependant on peut rappeler par exemple la toxicité des éthers de glycols tels que l'EGEE (Ethylène Glycol Ethyl Ether), EGME (Ethyl Glycol Méthyl Ether) et leurs acétates responsables d'une baisse de la fertilité masculine (diminution de la concentration du sperme

en spermatozoïdes). Chez la femme, de nombreux événements pathologiques sont étudiés : anomalies de fertilité : infertilité totale (conception impossible), réduite (augmentation du temps nécessaire à la conception), avortements spontanés : précoces ou tardifs ; avec ou sans anomalies chromosomiques, atteintes de l'enfant : mort-né ; mortalité néonatale accrue ; malformations congénitales ; prématurité ; retard de croissance *intra-utérin* ; retard mental ; cancers de l'enfant.

VII. Classification des substances mutagènes :

Le terme «mutagène» désigne les agents qui augmentent la fréquence des mutations dans des populations de cellules et/ou d'organismes.

On distingue **3 catégories de substances mutagènes** :

a) Mutagène de catégorie 1A :

Les substances mutagènes de catégorie 1A sont des substances dont la capacité d'induire des mutations héréditaires dans les cellules germinales des êtres humains est avérée. La classification dans la catégorie 1A est fondée sur des résultats positifs provenant d'études épidémiologiques humaines.

b) Mutagène de catégorie 1B :

Les substances mutagènes de catégorie 1B sont des substances à considérer comme induisant des mutations héréditaires dans les cellules germinales des êtres humains.

La classification en catégorie 1B est fondée :

- sur des essais *in-vivo* de mutagénicité héréditaire sur des cellules germinales de mammifères qui ont donné un ou des résultats positifs ; ou
- sur des essais *in-vivo* de mutagénicité sur des cellules somatiques de mammifères qui ont donné un ou des résultats positifs, et sur certains indices montrant que la substance peut provoquer des mutations dans les cellules germinales.

c) Mutagène de catégorie 2 :

Les substances mutagènes de seconde catégorie sont des substances préoccupantes du fait qu'elles pourraient induire des mutations héréditaires dans les cellules germinales des êtres humains.

La classification dans la catégorie 2 est fondée sur les résultats positifs d'expériences menées sur des mammifères et/ou, dans certains cas, d'expériences *in vitro*.

VII.1. Etiquetage des substances mutagènes :

Toute matière dangereuse doit être correctement étiquetée. C'est à partir de sa classification qu'est définie l'étiquette du produit chimique. L'étiquette constitue la première information, essentielle et concise, fournie à l'utilisateur sur ces dangers et sur les précautions à prendre lors de l'utilisation (**Figure 51**).



Figure 51 : Les 9 pictogrammes du danger.
(www.inrs.fr/risques/classification-etiquetage-produits-chimiques).

VII.2. Les bonnes pratiques de laboratoire :

- L'affichage : À l'entrée de chaque laboratoire, une affiche indique le nom du laboratoire et ses coordonnées, les consignes de sécurité, les avertissements, les dangers et les personnes responsables ;
- Porter des lunettes de sécurité en tout temps ;
- Remplacer ses lentilles cornéennes par des verres correcteurs (**les verres correcteurs ne sont pas des lunettes de sécurité**) ;
- Porter les équipements de protection et une tenue adéquate ;
- S'exposer le moins possible aux produits dangereux ;

- Éviter le travail en solitaire et surtout en dehors des heures normales.
- Séparer les zones propres d'écriture et de lecture des zones de manipulation ;
- Ne pas porter de gants dans les zones propres ;
- Éviter les mouvements brusques, marcher au lieu de courir ;
- Fumer, manger ou garder de la nourriture dans les laboratoires est à proscrire. La nourriture ne doit jamais être en contact avec de la verrerie, des ustensiles ou des équipements de laboratoire ;
- Les laboratoires sont réservés aux personnes autorisées seulement ;
- Se laver les mains en quittant le laboratoire et avant de consommer de la nourriture (en dehors du labo).

VII.3. Analyse des risques :

L'employeur exécute une analyse des risques pour toutes les activités où peut avoir lieu une exposition à des agents cancérigènes ou mutagènes. Cette évaluation doit être répétée à intervalles déterminés et au moins une fois par an. Dans tous les cas, elle doit être à nouveau réalisée à chaque modification des circonstances qui peuvent influencer l'exposition.

VII.4. Mesures de prévention :

L'employeur applique les principes de prévention suivants dans l'ordre hiérarchique ci-dessous pour prévenir l'exposition des travailleurs au laboratoire :

- Remplacer l'agent cancérigène ou mutagène par une substance, une préparation ou un procédé qui dans les circonstances auxquelles il (elle) est utilisé(e) est moins dangereux (se) ou ne l'est pas pour la santé et la sécurité des travailleurs ;
- Si cela n'est pas réalisable techniquement, faire se dérouler la production et l'utilisation de l'agent cancérigène ou mutagène dans un système fermé ;
- Si cela n'est pas réalisable techniquement, limiter l'exposition des travailleurs à un niveau aussi bas que possible.

VIII. Législation :

L'évaluation des risques professionnels constitue un moyen essentiel de préserver la santé et la sécurité des travailleurs au sein des laboratoires. En Algérie, l'obligation générale de

sécurité incombe à l'employeur qui doit mettre en place toutes les mesures nécessaires pour assurer la sécurité et protéger la santé des travailleurs

Plusieurs textes réglementaires inclus dans le journal officiel de la république Algérienne guident cette évaluation.

VIII 1. Les textes réglementaires :

Quelques extraits du journal officiel Algérien régulant l'utilisation des substances toxiques sont représentés comme suit :

JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 46/Chapitre 11/page 24 : 16 Dou El Kadada 1439 29 juillet 2018 :

Art. 256. — Un contrôle qualité des laboratoires est assuré par les services compétents du ministère chargé de la santé conformément aux procédures et normes en la matière.

Art. 257. — Le transfert de prélèvements biologiques concernant les analyses spécialisées est **interdit à l'exception des cas et selon les conditions et les modalités fixées par voie réglementaire.**

JOURNAL OFFICIEL DE LA REPUBLIQUE ALGERIENNE N° 04/page 15/28 Dou El Kadada 1425/9 janvier 2005 :

Art. 6. — Sans préjudice des dispositions législatives et réglementaires en vigueur, toutes les substances, produits ou préparations dangereuses doivent être étiquetés et marqués de manière à permettre leur identification et fournir les informations essentielles au sujet :

- de leur nom chimique ;
- de leur désignation ou de leur nom commercial ;
- de leur classification ;
- de leur symbole d'identification ;
- des dangers qu'ils présentent ;
- des conseils de prudence en matière de sécurité.

Art. 8. — Le stockage doit être entouré de précautions particulières destinées à préserver les travailleurs, les biens et l'environnement, des risques qui s'y rattachent selon les règles et les normes en vigueur.

Art. 12. -Les prescriptions particulières de prévention à prendre par l'organisme employeur pour assurer la protection des travailleurs sont les suivantes :

- la surveillance médicale des travailleurs exposés aux substances, produits ou préparations dangereuses ;
- les examens médicaux d'embauchage et périodiques obligatoires ;
- le remplacement du poste de travail n'entraînant pas l'exposition aux substances, produits ou préparations dangereuses pour la santé de l'enfant à naître ou du nourrisson pour les travailleuses en état de grossesse ou d'allaitement.

IX. Etude de cas : le BET

Le bromure d'éthidium (BET) est bien connu des personnels de laboratoire. En biologie moléculaire et cellulaire, cette substance chimique est largement utilisée mais n'en est pas moins redoutée pour son caractère toxique et potentiellement mutagène.

Le BET est utilisée dans les laboratoires de biologie moléculaire et cellulaire comme marqueur non radioactif des acides nucléiques. Il permet d'identifier et de visualiser des brins d'ADN ou d'ARN dans les électrophorèses et dans d'autres méthodes de séparation. Le BET est une substance cristalline rouge sombre, non volatile, modérément soluble dans l'eau et qui produit facilement une fluorescence de couleur rose à rougeâtre lorsqu'il est exposé aux ultraviolets.

Sa structure et sa conformation lui permettant de s'insérer entre les bases des acides nucléiques, on qualifie le BET d'agent intercalant. Sa fluorescence, plus intense lorsque le BET est intercalé dans une molécule d'ADN, fait de cette substance un indicateur très sensible pour la détection des acides nucléiques. C'est pour cette raison que son usage est très répandu. Le BET est aussi connu pour être un inhibiteur de la synthèse d'ADN.

Le BET est un produit très toxique et potentiellement mutagène. Le personnel de laboratoire, le plus souvent informé des dangers de cette substance, l'utilise dans des analyses de routine et est donc susceptible d'être exposé sur de longues périodes. Il est donc indispensable d'observer des procédures adaptées lors de sa manipulation et son élimination.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques :

- ABRAHAM RT.** PI 3-kinase related kinases: 'big' players in stress-induced signaling pathways. *DNA Repair.*, 2004, (Amst) 3(8-9): 883-887.
- ADAMS JM & CORY S.** The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 2007, 26(9): p. 1324-37.
- ALSATARI S., AZAB M., KHABOUR F., ALZOUBI H. & SADIQ F.** Assessment of DNA damage using chromosomal aberrations assay in lymphocytes of waterpipe smokers. *International journal of occupational medicine and environmental health*, 2012, 25(3), 218-224.
- AMES N., DURSTON E., YAMASAKI E. & LEE D.** Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1973, 70(8): 2281-2285.
- ATTARDI, L.D. AND T. JACKS,** The role of p53 in tumour suppression: lessons from mouse models. *Cell Mol Life Sci.*, 1999. 55(1) : p. 48-63.
- AUROUX M.** Foetopathies : toxiques et médicaments. *Eurobiologiste*, 1996, 222: 11-15.
- BARTEK J & LUKAS J.** Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, 2003. 3(5): p. 421-9.
- BELLI S., COMBA P., DE SANTIS M., GRIGNOLI M. & SASCO A.J.** Mortality study of workers employed by the Italian Institute of Health, 1960-1989. *Scandinavian Journal of Work, Environment and Health*, 1992, 18 : 64-67.
- BERTHELOT-RICOU A., PERRIN J., DI GIORGIO C., DE MEO M., BOTTA A. & COURBIERE B.** Genotoxicity assessment of mouse oocytes by comet assay before vitrification and after warming with three vitrification protocols. *Fertility and sterility*, 2013, 100(3): 882-888
- BHOWMICK NA., NEILSON EG. & MOSES HL.** Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 2004, 432(7015): p. 332-7.
- BLASCO MA.** Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.*, 2005. 6(8): p. 611-22.
- BOFFETTA P., NORPPA H., FABIANOVA E., FUCIC A., GUNDY S., LAZUTKA J. et al.** Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from Central Europe. *Am J Epidemiol*, 2007, 165:36-43.
- BROWN TP., PAULSON J., PANNETT B., COUPLAND C., COGGON D., CHILVERS CED. & SASCO AJ.** Mortality pattern among biological research laboratory workers. *British Journal of Cancer*, 1996; 73 : 1152-1155.
- BURKHART, DL. & SAGE J.** Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer*, 2008. 8(9): p. 671-82.
- CARPENTER L., BERAL V., ROMAN E., SWERDLOW AJ. & DAVIES G.** Cancer in laboratory workers. *Lancet*, 1991, 338 : 1080-1081.
- CHAVERON H.** Introduction à la toxicologie nutritionnelle. 5 nov. 1999. Edition Tec & Doc Lavoisier.

- CHENG N *et al.*** Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol Cancer Res.*, 2008, 6 (10): p. 1521-33.
- CHIN CF. & YEONG FM.** Safeguarding entry into mitosis: the antephase checkpoint. *Mol Cell Biol.*, 30(1): p. 22-32.
- CICCIA A & ELLEDGE S.J.** The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell.*, 40(2): p. 179-204.
- CLERE N., FAURE S. ET GUERRIAUD M.** Bases fondamentales en pharmacologie : Sciences du médicament. 11 March 2014, Elsevier Health Sciences France. ISBN 978-2-294-72449-7.
- CONNORS TA.** Alkylating agents, nitrosoureas and alkyltriazenes. *Cancer chemotherapy*, 1987, (5), 30-65.
- CORDIER S., MOUSEL ML., LE GOASTER C., GACHELIN G., LE MOUAL N., MANDEREAU L. *et al.*** Cancer risk among workers in biomedical research. *Scandinavian Journal of Work, Environmental and Health*, 1995; 21: 450-459.
- DA RE S & PLOY MC.** Antibiotiques et réponse SOS bactérienne: Une voie efficace d'acquisition des résistances aux antibiotiques. *Med Sci.*, 2012, 28, (2): 179–184.
- DANIAL NN & KORSMEYER SJ.** Cell death: critical control points. *Cell*, 2004, 116(2): p. 205-19. 14.
- DELMAS E.** Régulation de l'apoptose dépendante de p53 par le FGF1 intracellulaire : caractérisation des mécanismes d'action. Biologie cellulaire. Université de Versailles-Saint Quentin en Yvelines, 2014. Français. ffnnt : 2014VERS0037ff. fftel-01339857f
- DENARDO DG., ANDREU P. & COUSSENS LM.** Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.*, 2010, 29(2): p. 309-16.
- EDOUARD G et PROCUREUR V.** Biologie du développement et de la reproduction. Editions Estem, 1999.
- EDWARDS SL., BROUGH R., LORD CJ., NATRAJAN R., VATCHEVA R., LEVINE DA. *et al.*** Resistance to therapy caused by intragenic deletion in BRCA2. *Nature*, 2008, 451(7182): 1111-5. doi: 10.1038/nature06548. Epub 2008 Feb 10. PMID: 18264088.
- FOULDS L.** The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res.*, 1954, 14(5): p. 327-39.
- FRIEDBERG E., WALKER G., SIEDE W., WOOD R., SCHULTZ R. & ELLENBERGER T.** DNA Repair and Mutagenesis, Washington D.C: ASM Press, 2005, 1118p.
- GERHARD VOGEL H., JOCHEN MAAS. & FRANZ JAKOB HOCK.** Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays ; with 125 Tables. *Springer Science & Business Media*. 2006, 599–600. ISBN 978-3-540-25638-0.
- GRIFFITHS A., WESSLER S., CAROLL S. & DOEBLEY J.** Introduction to Genetic Analysis. New York: Macmillan Publishers. 2012, 800p.

- GU H, MARTH JD, ORBAN PC, MOSSMANN H. & RAJEWSKY K.** Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science*, 1994, 265(5168): 103-106.
- HANAHAHAN D & WEINBERG RA.** The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100(1): p. 57- 70.
- HANAHAHAN D & WEINBERG RA.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144(5): p. 646-74.
- HERY M & SIMON P.** Places et limites des prélèvements atmosphériques et biologiques et des valeurs réglementaires et indicateurs associés. EMC (Elsevier masson SAS, Paris), Pathologie professionnelle et de l'environnement, 16-001-B-10, 2011.
- HOEIJMAKERS JH.** Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 2001, 411(6835): 366-374.
- HOUSSET C & RAISONNIER A.** Biologie Moléculaire. Polycopié de cours. Université Pierre et Marie Curie. 2009-2010 : 139-207.
- HUNTER T.** Oncoprotein networks. *Cell*, 1997, 88: 333-46.
- IRWIN MS., KONDO K., MARIN MC., CHENG LS., HAHN WC. & KAE LIN WG JR.** Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell*, 2003, 3(4): 403-10. doi: 10.1016/s1535-6108(03)00078-3. PMID: 12726865.
- KRÜSE JH., VERHAAR WK. & RAAT DE.** The Practical Applicability of Toxicokinetic Models in the Risk Assessment of Chemicals: Proceedings of the Symposium The Practical Applicability of Toxicokinetic Models in the Risk Assessment of Chemicals held in The Hague, The Netherlands, 17–18 February 2000. Edit. Springer Science & Business Media. ISBN 978-94-017-3437-0. 17 April 2013.
- JACKSON SP & BARTEK J.** The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 2009, 461(7267): 1071-8.
- JASCUR T & BOLAND CR.** Structure and function of the components of the human DNA mismatch repair system. *Int J Cancer*, 2006, 119(9): 2030-2035.
- JOHNSON EF & STOUT CD.** Structural diversity of human xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 monooxygenases. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 338 (1):331-6.
- JUNTTILA MR & EVAN GI.** p53-a Jack of all trades but master of none. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(11): 821-9.
- KALOW W.** Heredity and the Response to Drugs. *Pharmacogenetics*, 1963, (58)4: 757-757. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-58-4-757>
- KALOW W.** Pharmacogenetics of drug metabolism. New York: *Pergamon Press*, 1992, 95-178.
- KALTENBACH S.** Rôle des facteurs de la réparation de l'ADN dans la dynamique du génome au sein du système immunitaire. Génétique. Thèse de l'Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. ffNNT : 2015USPCB037ff. fftel-01356265f.
- KHALIFA J., BOYRIE S. & MOYAL R.** Repair of radiation-induced DNA damage and radiosensitivity. *Correspondances en Onco-Théranostic.*, 2012, 1 (4): 155.

- KIM SJ., RIM KT., KIM JK., KIM HY. & YANG JS.** Evaluation of the Genetic Toxicity of Cyclopentane and Ammonium Nitrate - In vitro Mammalian Chromosomal Aberration Assay in Chinese Hamster Ovary Cells. *Saf Health Work*, 2011, 2:17-25.
- KRYENESTSKY EY., TAI HL. & YATES CR.** Genetic polymorphism of thiopurine S-methyltransferase : clinical importance and molecular mechanisms. *Pharmacogenetics*, 1996, 6: 279-90.
- LAUWERYS ROBERT R.** Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles. 5^{ème} édition. 2007.
- LEIBELING D., LASPE P. & EMMERT S.** Nucleotide excision repair and cancer. *J Mol Histol.*, 2006, 37(5-7): 225-238.
- LEONARD A.** Les mutagènes de l'environnement et leurs effets biologiques : Mont-Royal, Québec. Masson.306p, 1990.
- LEVINE AJ & OREN M.** The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(10): p. 749-58.
- LI GM.** Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res.*, 2008, 18(1): 85-98.
- LOEB LA.** Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.*, 1991, 51(12): 3075-9.
- LOWE SW., CEPERO E. & EVAN G.** Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 2004, 432(7015): 307-15.
- MALUMBRES M., HARLOW E., HUNT T., HUNTER T., LAHTI JM., MANNING G. et al.** Cyclin-dependent kinases: a family portrait. *Nat Cell Biol.*, 2009, 11(11): 1275-6.
- MATES J. & JIMENEZ F.** Antioxidant Enzymes and their Implications in Pathophysiological Processes. *Frontiers in Bioscience*, 1999, 4: 339-345.
- MATTISON DR., MALEK A. & CISTOLA C.** Physiologic adaptations to pregnancy: Impact on pharmacokinetics. In: Yaffe-Aranda, ed. Pediatric Pharmacology, Therapeutic Principles in Practice (2^{ème} edition). Philadelphia : WB Saunders Company; 1993, p. 81-96.
- MEIJER L.** Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie*, 2003, 5: 311-326.
- MELET A.** Etude par mutagenèse dirigée de la topologie des sites actifs et des spécificités de substrats des cytochromes P450 2C9 et 2C8 humains. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris 5 Sorbonne Descartes, 2004.
- MELLON I.** Transcription-coupled repair : a complex affair. *Mutat Res.*, 2005, 577(1-2): 155-161.
- MIRCHEVA J., LEGENDRE C., SORIA-ROYER C., THERVET E., BEAUNE P. & KREIS H.** Monitoring of azathioprine-induced immunosuppression with thiopurine methyltransferase activity in kidney transplant recipients. *Transplantation*, 1995, 60 : 639-42.
- MODRICH P & LAHUE R.** Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem.*, 1996, 65: 101-133.

- MOLOGNONI F., DE MELO M., DA SILVA T. & JASIULIONIS G.** Ras and Rac1, frequently mutated in melanomas, are activated by superoxide anion, modulate Dnmt1 level and are causally related to melanocyte malignant transformation. *PloS one*, 2013, 8(12), e81937.
- MOORE KL & PERSAUD WB.** The Developing Human. Clinical Oriented Embryology Saunders Company 6th Edition, 1998.
- NEGRINI S., GORGOULIS VG. & HALAZONETIS TD.** Genomic instability-an evolving hallmark of cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2010, 11(3): p. 220-8.
- NISHIWAKI H., MIURA M., IMAI K., OHNO R. & KAWASHIMA K.** Experimental studies on the antitumor effect of ethidium bromide and related substances. *Cancer Research*, 1974, 34 (10):2699-703.
- NYBERG KA., MICHELSON RJ., PUTNAM CW. & WEINERT TA.** Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet*, 2002. 36: p. 617-56.
- OLIVE KP., TUVESON DA., RUHE ZC., YIN B., WILLIS NA., BRONSON RT. et al.** Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell*, 2004. 119(6): p. 847-60.
- OLSEN AK., BJORTUFT H., WIGER R., HOLME J., SEEBERG E. et al.** Highly efficient base excision repair (BER) in human and rat male germ cells. *Nucleic Acids Res.*, 2001, 29(8): 1781-1790.
- O'RAHILLY R & MULLER F.** Human embryology and teratology. New York : Edit. John Wiley and sons, 2001.
- ORSIERE T., SARI-MINODIER I., DECOME L., BOTTA C., GIARMARCOVAI G. et al.** Journées Nationales de Santé au Travail dans le BTP : De la génotoxicologie à la biosurveillance. *Annales*, 28:25-28.
- ORTIZ R & ROBERTO HEREDIA ORTIZ.** Modélisation toxicocinétique du benzo(a)pyrène : L'interprétation des données de surveillance biologique de l'exposition chez les travailleurs. (20 August 2015) PAF. ISBN 978-3-8416-3266-1.
- PAUTY J.** La réparation de l'ADN par la recombinaison homologue et le développement de molécules anticancéreuses Thèse de Doctorat en biologie cellulaire et moléculaire Philosophiae Doctor (Ph.D.).Université LAVAL, Quebec, Canada, 2015 : 1-237.
- POPESCU P & PECH A.** Une bibliographie sur la translocation 1/29 de bovins dans le monde (1964-1990). *Ann Zootech*, 1991, 40: 271-305.
- POURQUIER P.** Agents alkylants. *Bulletin du Cancer*, 2011, 98(11): 1237-1251.
- PRESTON R., DEAN J., GALLOWAY S., HOLDEN H., MCFEE F. & SHELBY M.** Mammalian in vivo cytogenetic assays analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 1987, 189(2), 157-165.
- QUENOT W.** Embryogenese normale et pathologique. *Point vétérinaire*, 1996, 28, N0 speciale : 36-40.

- RAPP A & GREULICH KO.** After double-strand break induction by UV-A, homologous recombination and nonhomologous end joining cooperate at the same DSB if both systems are available. *J Cell Sci.*, 2004, 117(Pt 21): 4935-4945.
- RENAN MJ.** How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog*, 1993, 7(3): p. 139-46.
- RIEDL SJ & SHI Y.** Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2004, 5(11): 897-907.
- RUSSO AA., JEFFREY PD & PAVLETICH NP.** Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nat Struct Biol*, 1996. 3(8): 696-700.
- SAGE E.** Distribution and repair of photolesions in DNA: genetic consequences and the role of sequence context. *Photochemistry and photobiology*, 1993, 57(1): 163-174.
- SAKAI W., Swisher EM., Karlan BY., Agarwal MK., Higgins J. & Friedman C.** Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers. *Nature*, 2008, 451(7182): 1116-20.
- SASCO AJ.** Risques pour la santé dans les laboratoires de recherche biologique et médicale : le point sur les connaissances épidémiologiques actuelles. *Médecine Sciences*, 1989; 5: 489-498.
- SCOTT EE & HALPERT JR.** Structures of cytochrome P450 3A4. *Trends Biochem Sci.*, 2005, 30(1): 5-7.
- SCOTT EE & HALPERT JR.** Structures of cytochrome P450 3A4. *Trends in Biochemical Sciences*, 2005, 30(1): 5-7. doi:10.1016/j.tibs.2004.11.004 10.1016/j.tibs.2004.11.004.
- SHERR CJ & MCCORMICK F.** The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2002, 2(2): 103-12.
- SHERR C.J. & ROBERTS JM.** Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.*, 2004, 18(22): 2699-711.
- SHIMADA T., YAMAZAKI H., MIMURA M., INUI Y. & GUENGERICH F P.** Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1994, 270 (1): 414-423.
- SHÜTZ E., GUMMERT J., MOHR F & OELLERICH M.** Azathioprine-induced myelosuppression in thiopurine methyltransferase deficient heart transplant recipient. *Lancet*, 1993, 341: 436.
- SORIA-ROYER C., LEGENDRE C., MIRCHEVA J., PREMEL S., BEAUNE P. & KREIS H.** Thiopurine-methyl-transferase activity to assess azathioprine myelotoxicity in renal transplant recipients. *Lancet*, 1993, 341: 1593.
- SUNG JS. & DEMPTE B.** Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA. *Febs J.*, 2006, 273(8): 1620-1629.
- TEBBS RS., FLANNERY ML., MENESES JJ., HARTMANN A., TUCKER JD. et al.** Requirement for the Xrcc1 DNA base excision repair gene during early mouse development. *Dev Biol.*, 1999, 208(2): 513-529.

- THERVET E.** Polymorphisme de la thiopurine méthyltransférase et toxicité médullaire. *La Lettre du Pharmacologue*. 2000, 14(5) : 112-114.
- TOSSA P., ROGUET T., THOREN C. & PIOTROWSKI A.** Potentiel génotoxique des nanomatériaux: où en est la recherche?. *Environnement, Risques & Santé*, 2014, 13(2): 113- 122.
- TRIPATHI N & JENA B.** Intervention of astaxanthin against cyclophosphamideinduced oxidative stress and DNA damage: a study in mice. *Chemico-biological interactions*, 2009, 180(3): 398-406.
- VALIN M. S.** État des lieux et freins de la consultation préconceptionnelle chez les médecins Haut-Normands en 2017. *Médecine humaine et pathologie*. 2018. ffdumas-01760456.
- VENEMA J., MULLENDERS LH., NATARAJAN AT., VAN ZEELAND AA. & MAYNE LV.** The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(12): 4707-4711.
- WATSON J., BAKER T., BELL S., GANN A., LEVINE M. & LOSICK R.** Molecular biology of the gene, 7th edition, New York: Cold Spring Harbor Press, 2014, 911p.
- WEAVER VM., MCDIARMID MA., GUIDERA JA., HUMPHREY FE. & SCHAEFER JA.** Occupational chemical exposures in an academic medical center. *Journal of Occupational Medicine*, 1993; 35 (7) : 701-706.
- WEINHILBOUM RM & SLADEK SL.** Mercaptopurine pharmacogenetics : monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet.*, 1980, 32 : 651-62.
- WEINSHILBOUM R.** Inheritance and drug response. *N Engl J Med.*, 2003, 348: 529-537. DOI : 10.1056/NEJMra020021.
- WENNBORG H., YUEN J., AXELSSON G., AHLBOM A., GUSTAVSSON P. & SASCO A.J.** Mortality and cancer incidence in biomedical laboratory personnel in Sweden. *American Journal of Industrial Medicine*, 1999; 35 : 382-389.
- WENNBORG H., YUEN J., NISE G., SASCO A.J., VAINIO H. & GUSTAVSSON P.** Cancer incidence and work place exposure among Swedish biomedical research personnel. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 2001; 74(8) : 558- 564.
- WILLIAMS PA., COSME J., VINKOVIC DM., WARD A., ANGOVE AC. et al.** Crystal structures of human cytochrome P450 3A4 bound to metyrapone and progesterone. *Science*, 2004, 305 (5684): 683-686. DOI: [10.1126/science.1099736](https://doi.org/10.1126/science.1099736)
- YANO JK., WESTER MR., SCHOCH GA., J GRIFFIN KJ., STOUT CD. & JOHNSON EF.** The structure of human microsomal cytochrome P450 3A4 determined by X-ray crystallography to 2.05-Å resolution. *J Biol Chem.*, 2004, 279(37):38091-4.
- ZDZIENICKA MZ., VENEMA J., MITCHELL DL., VAN HOFFEN A., VAN ZEELAND AA. et al.** (6-4) photoproducts and not cyclobutane pyrimidine dimers are the main UV-induced mutagenic lesions in Chinese hamster cells. *Mutat Res.*, 1992, 273(1): 73-83.

LIENS INTERNET:

Cummings benjamin, (2006), Pearson education, Prince George's community college, [en ligne]. <http://academic.pgcc.edu/>. (Consulté le 08.05.2016).

<https://www.alamyimages.fr/photos-images/bébé-thalidomide.html?sortBy=relevant>

<https://www.aquaportail.com/definition-5077-mutagene.html>

<https://www.fondation-arc.org/cancer/quest-ce-quun-cancer>

PHARMACOMédicale.org

<http://www.hematologyatlas.com>

www.inrs.fr/risques/classification-etiquetage-produits-chimiques