



ROYAUME DU MAROC
Université Mohammed V - Rabat
Faculté de Médecine et de Pharmacie
RABAT



Année 2022

N° : MM322022

MEMOIRE DE MASTER

MASTER DE « **Biotechnologie Médicale** »

OPTION : « **Biomédicale** »

Intitulé :

**Utilisation du test de micronoyaux pour l'évaluation de la
génétoxicité d'une molécule de benzothiazines
néosynthétisée.**

Soutenu le 25 Juillet 2022 à 11h00 par :

Mlle. Lina HADDIOUI

Devant le jury composé de :

Pr. **AANNIZ Tarik**

Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat.

Président de jury.

Mr. **JADDI Hassan**

Chercheur au sein du CNESTEN (URMB), Rabat.

Encadrant.

Dr. **MOUSSAIF Ahmed**

Chercheur au sein du CNESTEN(UBIBM), Rabat.

Examineur.

Avant-propos :

Le travail présenté dans ce projet de fin d'études est réalisé dans le cadre de l'obtention du diplôme de Master de Biotechnologie Médicale option Biomédicale de la faculté de Médecine et Pharmacie de Rabat, sous la direction du Pr. IBRAHIMI Azzedine, et sous la coordination du Pr. OUADGHIRI Mouna.

Les différentes étapes expérimentales de ce projet ont été élaborées sous l'encadrement de Mr. JADDI Hassan, au Centre National de l'Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires (CNESTEN), au sein de l'Unité de Biologie et de Recherche Médicale (UBRM) à Rabat.

Dédicace :

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents : ROUKBI Fatima et HADDIOUI Abderrahmane :

Pour l'amour que vous m'avez toujours donné, pour vos encouragements, votre soutien, vos sacrifices, vos prières tout au long de mes études.

Aucun mot, aucune dédicace ne pourrait exprimer le respect, la considération, la gratitude et l'amour que je porte pour vous.

Je suis très fière d'être votre fille, vous n'avez jamais cessé de déployer tous vos efforts afin de subvenir à nos besoins, nous encourager et nous aider à choisir le chemin de la Réussite

Votre patience, votre bonne volonté, vos conseils précieux ainsi que votre confiance en moi ont été pour beaucoup dans ma réussite.

Chère maman, cher papa, je vous dédie ce travail en priant Dieu le tout puissant de vous accorder santé, bonheur, prospérité et longue vie afin que je puisse un jour vous combler de joie à mon tour.

Je vous aime très fort...vous le savez.

A ma chère sœur : Aya et à mes chers frères : Ghassane et Iyade :

Vous êtes la joie de chaque jour, que Dieu protège notre union et exauce vos espoirs.

Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour et inlassable attachement.

A mes chères grands-mères

A mes chères tantes et oncles

A mes chères cousines et mes chers cousins

Et à tous les membres de la famille HADDIOUI et ROUKBI

Veillez trouver, dans ce modeste travail, l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.

Remerciement :

En tout premier lieu, Louange à Dieu le tout puissant, de m'avoir donné la force, la volonté et l'audace pour achever ce modeste travail.

J'exprime ma profonde gratitude à toute l'équipe pédagogique du Master Biotechnologie Médicale option Biomédicale de la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat.

*J'adresse mes sincères remerciements au **Pr. IBRAHIMI Azzedine**, Directeur du laboratoire de Biotechnologie médicale à la faculté de médecine et pharmacie Rabat. Veuillez trouver ici, professeur, l'expression de ma respectueuse considération et ma profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.*

*Je transmets mes chaleureux remerciements à notre coordinatrice du master, **Pr. OUADGHIRI Mouna**, pour tous ses efforts et sa disponibilité tout au long de cette formation. Que son sérieux, et sa rigueur du travail soient pour nous un exemple à suivre.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance à mon encadrant, **Mr. JADDI Hassan**, chercheur à l'UBRM - CNESTEN, Rabat, pour le temps qu'il m'a consacré, pour sa patience, sa disponibilité, ses encouragements, et surtout ses judicieux conseils indispensables à la réalisation de ce travail. Veuillez croire à l'expression de ma profonde gratitude et de mon grand respect.*

*Je remercie également **Pr. AANNIZ Tarik**, de l'honneur que vous m'avez fait en acceptant de présider le jury de ma soutenance. Votre sérieux, et votre modestie n'ont rien d'égal que votre compétence. Veuillez trouver ici, professeur, l'expression de mes sincères remerciements.*

*Je tiens à remercier infiniment **Dr. MOUSSAIF Ahmed**, chercheur à l'unité de biotechnologie et d'ingénierie des biomolécules - CNESTEN, Rabat, d'avoir*

accepté d'évaluer mon travail. Votre participation à mon jury de soutenance est un grand honneur pour moi.

*Je ne pourrais manquer de remercier **Dr. EL MZIBRI Mohammed**, chef de la division des sciences du vivant au CNESTEN - Rabat, **Dr. ATTALIB Mohammed**, chef de l'Unité de Biologie et de Recherche Médicales au CNESTEN - Rabat, **Dr. BENBACER Laila**, responsable du laboratoire de pharmacologie de l'unité UBRM - CNESTEN-Rabat, et **Dr. CHAOUI Imane**, chercheuse au sein de l'unité UBRM – CNESTEN, Rabat, pour leurs confiance, leurs disponibilité, leurs écoute attentif, leurs gentillesse et surtout pour leurs précieuses conseils. Veuillez trouver ici, l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon grand respect.*

Je tiens également à mentionner tout l'honneur et le plaisir que j'ai eu pendant toute la durée de la réalisation de ce travail au sein de l'unité UBRM - CNESTEN, Rabat, et je tiens à remercier particulièrement, Mlle. EL AZZOUZI Merieme, Mlle. BOUOTHMANY Kaoutar et Mr. EL FOUNNINI Younes pour leurs disponibilités et leurs conseils constructifs, un grand merci aussi à mes collègues Ahlam ZAROUK, Souhaila ESSAFI et Youness AIT KHOUYA pour les agréables moments que nous avons passés ensemble.

Enfin, je présente mes remerciements à toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la bonne réalisation de ce mémoire.

Résumé :

Le test de micronoyaux (MN), *in vitro* ou *in vivo*, est une méthode cytogénétique largement utilisée pour la détection, l'analyse et/ou l'étude de la génotoxicité de composés chimiques ou naturels, et pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutique. Pour la réalisation du test MN *in vitro*, la lignée cellulaire CHO k1 de l'ovaire du hamster chinois est une lignée de choix. Le but de notre projet est d'évaluer le pouvoir génotoxique d'un dérivé de Benzothiazines par le test de MN avec blocage de la cytodierèse (CBMN assay).

Les contrôles et les produits chimiques à analyser sont filtrés puis testés en présence de la Cytochalasine-B pour empêcher la cytodierèse. Le DMSO (control négatif) a été testé à raison de 0.5%, la Mitomycine C (control positif) a été testé à 0.6µg/ml et le dérivé de Benzothiazines est testés de 250µg/ml à 3.9µg/ml de concentrations.

Dans ce travail le protocole du test de CBMN s'est montré efficace, avec satisfaction des contrôles habituels, la molécule d'étude s'est montrée, à court et à long termes, relativement toxique (à partir de : 15.6µg/ml pour 4h et 7.8µg/ml pour 24 h) et faiblement génotoxique (à partir de : 15.6µg/ml pour 4h et 3.9µg/ml pour 24 h).

A travers les résultats obtenus, on découvre l'utilité d'une méthodologie incontournable et d'un modèle cellulaire fiables pour l'évaluation d'effets génotoxiques. Aussi, l'évaluation de l'activité cytotoxique et génotoxique de notre dérivé de Benzothiazines néosynthétisé est d'une valeur ajoutée considérable pour sa valorisation.

Mots clé : Génotoxicité, Micronoyaux, CBMN assay, Benzothiazines, CHO-K1.

Abstract:

The micronucleus (MN) assay, in vitro or in vivo, is a cytogenetic method widely used for the detection, analysis and/or study of genotoxicity of chemical or natural compounds, and for the evaluation of therapeutic efficacy. For the realization of the in vitro MN assay, the Chinese hamster ovary CHO k1 cell line is a line of choice. The aim of our project is to evaluate the genotoxic power of a Benzothiazine derivative by the MN assay with blocking cytokinesis (CBMN assay).

Controls and test chemicals are filtered and then tested in the presence of Cytochalasin-B to prevent cytokinesis. DMSO (negative control) was tested at 0.5%, Mitomycin C (positive control) was tested at 0.6µg/ml and Benzothiazines derivative is tested at 250µg/ml to 3.9µg/ml concentrations.

In this work the protocol of the CBMN assay was effective, with satisfaction of the usual controls, the study molecule was shown, in the short and long term, relatively toxic (from: 15.6µg/ml for 4h and 7.8µg/ml for 24 h) and weakly genotoxic (from: 15.6µg/ml for 4h and 3.9µg/ml for 24 h).

Through the obtained results, we discover the usefulness of a reliable methodology and cellular model for the evaluation of genotoxic effects. Also, the evaluation of the cytotoxic and genotoxic activity of our neosynthesized Benzothiazines derivative is of considerable added value for its valorization.

Key words: Genotoxicity, Micronuclei, CBMN assay, benzothiazines, CHO-K1.

ملخص:

اختبار النواة الدقيقة (MICRONOYAX)، في المختبر أو في الجسم الحي، هو طريقة وراثية خلوية تستخدم على نطاق واسع للكشف عن وتحليل و / أو دراسة السمية الوراثية للمركبات الكيميائية أو الطبيعية، وتقييم الفعالية العلاجية. لتحقيق اختبار MN في المختبر، فإن خط خلية CHO k1 لمبيض الهامستر الصيني هو خط الاختيار. الهدف من مشروعنا هو تقييم القوة السمية الجينية لمشتق البنزوثيازين عن طريق اختبار MN مع حصار cytodieresis (فحص CBMN).

يتم ترشيح الضوابط والمواد الكيميائية التي سيتم تحليلها ثم اختبارها في وجود Cytochalasin-B لمنع الارتقاء الخلوي. تم اختبار DMSO (سليبي التحكم) بمعدل 0.5٪، تم اختبار Mitomycin C (التحكم الإيجابي) عند $0.6\mu\text{g/ml}$ وتم اختبار مشتق البنزوثيازين عند $250\mu\text{g/ml}$ بتركيزات $3.9\mu\text{g/ml}$.

في هذا العمل، كان بروتوكول اختبار CBMN فعالاً، مع الرضا عن الضوابط المعتادة، وأظهر جزيء الدراسة، على المدى القصير والطويل، ساماً نسبياً (من: 15.6 ميكروغرام / مل لمدة 4 ساعات و 7.8 ميكروغرام / مل لمدة 24 ساعة) وضعيف السمية الجينية (من: 15.6 ميكروغرام / مل لمدة 4 ساعات و 3.9 ميكروغرام / مل لمدة 24 ساعة).

من خلال النتائج التي تم الحصول عليها، نكتشف فائدة منهجية أساسية ونموذج خلوي موثوق به لتقييم الآثار السامة للجينات. أيضاً، فإن تقييم النشاط السام للخلايا والسمية الجينية لمشتق البنزوثيازين المركب حديثاً لدينا له قيمة مضافة كبيرة لتثمينه.

الكلمات المفتاحية: السمية الجينية، النوى الدقيقة، فحص CBMN، البنزوثيازين، CHO-K1.

Liste des figures :

Figure 1: Représentation de la structure de l'ADN.	2
Figure 2 : Les phases du cycle cellulaire	3
Figure 3 : Les effets génotoxiques, mutagènes et cancérigènes.	5
Figure 4: Certains anomalies de l'ADN résultants d'effet clastogène	7
Figure 5: Les différents types de lésions d'ADN	8
Figure 6: Réparation de l'ADN par réversion directe des lésions.....	10
Figure 7: Réparation de l'ADN par excision de base(BER).....	11
Figure 8: Réparation de l'ADN par excision de nucléotide (NER).....	12
Figure 9: Réparation des mésappariements(MMR)	13
Figure 10: Réparation de l'ADN par recombinaison homologue (HR).	14
Figure 11: Réparation non homologue de l'ADN (NHEJ).....	15
Figure 12: Principe du test d'Ames	17
Figure 13: Principe du test des comètes (A : noyau non endommagé, B : noyau légèrement endommagé, C : noyau endommagé, D : noyau fortement endommagé).	19
Figure 14 : Les différentes apparences et la taille relative de MN dans des cellules binucléées (BN)	27
Figure 15: Les différentes structures qui ne doivent pas être considérées comme de MN dans des cellules binucléées (BN)	28
Figure 16: Schéma de la formation des micronoyaux d'après Fenech (1997)	30
Figure 17: Schéma représentatif des quatre possibilités du devenir des MN (dégradation, réincorporation, extrusion et persistance) après leurs formations	31
Figure 18: Schéma qui représente la distinction entre les effets aneugènes et clastogènes en mettant en évidence les centromères qui se trouvent dans les micronoyaux par l'action d'une sonde pancentromérique fluorescente	35
Figure 19: Une photo d'un tapis cellulaire de notre lignée cellulaire : CHO-K1.....	37
Figure 20 : (A) : Cellule binucléé sans micronoyau. (B) : Cellule mononuclée. (C) : Cellule binucléée avec un petit micronoyau à la suite de l'exposition à la BD 3. (D) : Cellule binucléée avec un micronoyau moyen à la suite de l'exposition à la BD 3.....	45
Figure 21 : Histogramme qui présente les résultats obtenus à partir de la BD 3 testé court terme.	48
Figure 22 : Histogramme représentant les résultats obtenus à partir de la BD 3 testée à long terme.	51
Figure 23: Histogramme présentant les résultats des tests pendant 4h et 24h.	55
Figure 24: Viabilité des cellules en fonction des doses du traitement par la BD7.	56
Figure 25: L'évaluation de la génotoxicité de la dérivé BD 7 par le CBMN assay.	57

Liste des Tableaux:

Tableau I : Les résultats de la première plaque testée à court terme.	47
Tableau II : Les résultats de la deuxième plaque testée à court terme.	47
Tableau III : La moyenne des résultats de plaque testée à court terme.	48
Tableau IV : Les résultats de la première plaque testée à long terme.	50
Tableau V : Les résultats de la deuxième plaque testée à long terme.	50
Tableau VI : Les résultats finals de la plaque testée à long terme (pendant 24h).	51

Liste des abréviations :

Table des matières :

Partie I : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	1
Introduction.....	1
I. Génotoxicité	2
I.1) Rappel sur l'ADN	2
I.2) Rappel sur le cycle cellulaire	3
I.3) Définitions et généralités sur la génotoxicité	4
I.4) Les agents génotoxiques	5
I.5) Les principaux mécanismes d'action des agents génotoxiques	6
a) Un effet clastogène	6
b) Un effet aneugène.....	7
I.6) Les lésions d'ADN et leurs agents provocateurs	7
I.7) Les mécanismes de réparation de ces lésions	9
I.7.1) Réparation par réversion directe (DR)	9
I.7.2) Réparation par excision de bases (BER)	10
I.7.3) Réparation par excision de nucléotides (NER)	11
I.7.4) La réparation des mésappariements (MMR)	12
I.7.5) La recombinaison homologue (HR)	13
I.7.6) La réparation non-homologue (NHEJ).....	14
I.8) Les tests de détection de la génotoxicité.....	15
I.8.1) Le test d'Ames.....	16
I.8.2) Le test de mutation du locus de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HPRT)	17
I.8.3) Le test des comètes.....	18
I.8.4) Le test d'échange des chromatides sœurs.....	20
I.8.5) Le test de la détection des aberrations chromosomiques.....	20
I.8.6) Le test de détection des adduits chimiques	21
I.8.7) Le test de micronoyau.....	22
I.9) Les biomarqueurs de génotoxicité.....	22
I.10) Les cellules utilisées en génotoxicité pour les études in vitro	24
II. La molécule étudiée : une dérivée des benzothiazines néosynthétisée (BD 3).....	26
III. Le Micronoyau en Génotoxicologie.....	27
III.1) La définition du MN.....	27

III.2) Les mécanismes de formation de micronoyaux.....	28
a) La formation de MN constitués de fragments chromosomiques	28
b) La formation de MN constitués de chromosomes entiers ou partiels.....	29
III.3) Le devenir du MN.....	30
III.4) Le devenir des cellules comportant un MN	32
III.5) Les facteurs qui influencent la fréquence de la formation des MN.....	32
III.6) Le test du Micronoyau MN.....	33
a) Historique et Principe du test <i>in vitro</i>	33
b) Le test de MN et la technique de FISH	34
c) Les domaines d'applications du test	35
d) Les avantages et les inconvénients	36
e) Le test de MN <i>in vivo</i>	36
PARTIE II : MATERIEL ET METHODES	37
I)La lignée cellulaire utilisée	37
II)Les techniques de la culture cellulaire	38
a) Les bonnes pratiques de la culture cellulaire	38
b) Les étapes de la culture cellulaire	38
c) Détermination de la concentration des cellules (cellule de Malassez).....	41
III)Le test du micronoyau <i>in vitro</i> avec blocage de la cytodièrese	42
a) Préparation de la substance à étudier : Les benzothiazines	42
b) Préparation des plaques avec les contrôles positif et négatif	42
c) Traitement des cellules par la substance de benzothiazines	42
d) Blocage de la cytocinèse par la cytochalasine B.....	43
e) Coloration des frottis par Giemsa	43
f) Examen microscopique et énumération des MN.....	43
PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION	46
I) Résultats	46
II) La discussion.....	54
a) La validation du test	54
b) Le temps du test (4h et 24h)	54
c) Comparaison des effets de la molécule BD 3 avec les effets de BD 7.....	56
Conclusion et perspectives.....	59
Références Bibliographiques.....	60

Partie I : PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE :

Introduction :

La génotoxicité, se réfère à l'effet des agents dits « génotoxiques », qui induisent des lésions ou des dommages au niveau de l'ADN. Une réparation incomplète ou absente de ces lésions peut conduire à la fixation des mutations géniques ou chromosomiques qui vont provoquer par la suite l'apparition de certaines pathologies chez les sujets exposés à ces agents [1].

La génotoxicité peut être détectée par plusieurs tests, néanmoins le test de micronoyau est reconnu comme l'un des tests les plus réussis, fiables, simples et sensibles pour l'évaluation *in vivo* et/ou *in vitro* des propriétés génotoxiques de divers agents. Il est inclus dans les lignes directrices de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE) en tant que test officiellement approuvé. Cependant la lecture des résultats au microscope exige de l'expérience et une certaine précision.

Les agents génotoxiques sont d'une grande variété. Ils sont omniprésents dans l'environnement et ils peuvent conduire à des conséquences néfastes. Dans le cadre de l'optimisation des expositions à ces agents, les autorités réglementaires ont besoin de données sur le potentiel génotoxiques des molécules à usage thérapeutique. C'est la raison pour laquelle les tests de génotoxicité et notamment le test de micronoyau, font désormais une partie intégrante des exigences réglementaires.

Dans le cadre de notre étude, nous avons évalué la génotoxicité d'une molécule de synthèse par l'utilisation du test du micronoyau avec blocage de la cytodierèse CBMN assay, à court et à long termes, sur la lignée cellulaire CHO-K1 suivant la méthode de Fenech et Morley [2]. Cette molécule est nouvellement synthétisée, elle dérive d'un benzothiazine ayant de nombreuses propriétés biologiques.

Ce travail est divisé en deux parties principales. La première est consacrée à une synthèse bibliographique qui traite deux axes principaux : la génotoxicité, ses mécanismes et son biomarqueur qui est le micronoyau. Et la deuxième partie présente et discute les résultats obtenus après la réalisation du test et l'évaluation du potentiel génotoxique de la molécule dérivée de benzothiazine grâce à l'énumération de notre biomarqueur (le micronoyau).

Ce travail a été réalisé dans le Centre National de l'Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires (CNESTEN) au sein de l'Unité de Recherche et biologie médicale (URBM) Rabat.

I. Génotoxicité :

I.1) Rappel sur l'ADN :

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est le support de l'information génétique, qui sert de modèle pour la détermination de la structure et de la fonction de tous les organismes vivants. Chez les eucaryotes, on le retrouve dans le noyau où ont lieu plusieurs événements majeurs comme la transcription et la réplication. C'est également à cet emplacement qu'a lieu la réparation des dommages de l'ADN. Dans ce compartiment cellulaire, l'ADN se trouve compacté grâce à des protéines appelés les histones, sous la forme de chromosome permettant ainsi un stockage ordonné et très dense de l'ADN. La structure biochimique de l'ADN est décrite pour la première fois en 1953 par Watson et Crick, comme une double hélice avec deux brins ayant une orientation opposée. Les deux brins sont maintenus ensemble par des liaisons hydrogènes et sont organisés via un appariement de base complémentaire. Cette double hélice est formée d'un enchainement de nucléotides, et chaque nucléotide est constitué d'un sucre, d'un phosphate et d'une base azotée. Les quatre bases qui composent principalement l'ADN sont l'adénine, la cytosine, la guanine et la thymine. L'uracile remplace la thymine dans l'acide ribonucléique (ARN). La liaison hydrogène se produit spécifiquement entre l'adénine purine (A) et la thymine pyrimidine (T) et entre la guanine purine (G) et la cytosine pyrimidine (C). Dans la molécule d'ARN, la base de l'adénine se combine à l'uracile (U) [3].

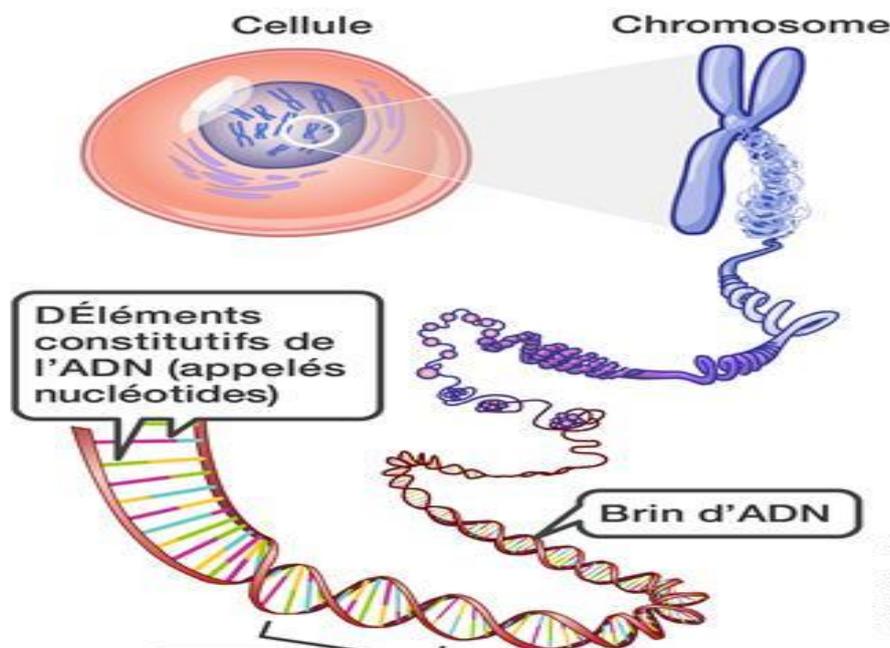


Figure 1: Représentation de la structure de l'ADN[4].

I.2) Rappel sur le cycle cellulaire :

Le cycle cellulaire est l'ensemble des étapes qui constituent et délimitent la vie d'une cellule. Il se compose de deux grandes périodes [5] : (Figure 2)

L'interphase qui représente l'étape la plus longue et elle est divisée en trois étapes :

- ✓ La phase G₁ : phase de croissance cellulaire et d'activités métaboliques normales.
- ✓ La phase S : phase de la réplication de l'ADN, la quantité de l'ADN est doublé en vue de la mitose.
- ✓ La phase G₂ : phase préparant la mitose par la synthèse d'enzymes et d'organites nécessaires.

La mitose qui est divisée également en plusieurs sous étapes successives :

- ✓ Prophase : c'est l'étape où l'ADN prend la forme de chromosome et la membrane nucléaire disparaît.
- ✓ Métaphase : c'est l'étape où les chromosomes s'alignent au centre de la cellule.
- ✓ Anaphase : c'est l'étape où il y'a la séparation des chromosomes en chromatides à leur point d'attache et ces chromatides s'éloignent l'une de l'autre.
- ✓ Télaphase : c'est l'étape où la membrane nucléaire se reforme, l'ADN reprend sa forme de filament, les organites et le cytosol se répartissent également et la cellule se divise finalement en deux cellules-filles. Cette étape est suivie de la cytokinèse qui se réfère à la scission du cytoplasme, l'étape terminale de la division cellulaire.

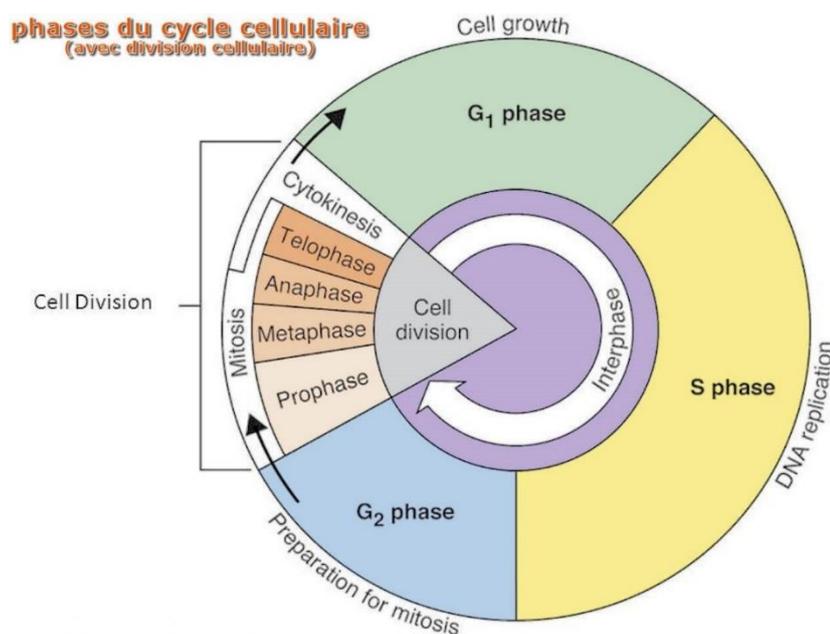


Figure 2 : Les phases du cycle cellulaire [6].

I.3) Définitions et généralités sur la génotoxicité :

La génotoxicité appelée également toxicité génétique, se réfère à l'effet d'agents génotoxiques, qui interagissent avec l'ADN et mènent à des lésions ou des dommages de celle-ci, ces dommages correspondent à des modifications chimiques de l'ADN susceptibles de perturber le fonctionnement de la cellule[1]. L'ADN comme étant une molécule sensible et fragile, elle subit un très grand nombre d'agressions ayant des sources exogènes comme les radiations ionisantes, les rayonnements ultraviolets UV ou encore les agents chimiques, et des sources endogènes comme le phénomène du stress oxydant qui résulte du dysfonctionnement des systèmes de régulation de l'oxygène et de ses métabolites (le radical superoxyde O_2 -et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2). Ce qui engendre un déséquilibre entre la production de ces métabolites appelés espèces réactives de l'oxygène (ERO), et les capacités cellulaires antioxydantes [7,8].

Toutes ces agressions aboutissent à l'apparition des lésions de L'ADN qui peuvent avoir deux types de conséquences :

- Des conséquences à court terme : Il s'agit soit de la mort cellulaire par apoptose dans le cas où le nombre de ces lésions est très élevé pour être réparé, soit de l'arrêt du cycle cellulaire dans le cas de l'accumulation du gène suppresseur de tumeur p53 sauvage qui engendre une réponse de type SOS. L'implication de ce gène suppresseur de tumeurs dans la transition de la phase G1 à la phase S est bien importante, parce qu'il transactive le gène p21 qui inhibe la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRB qui exerce un contrôle négatif par rapport au cycle cellulaire), ce qui bloque le passage de la phase G1 à la phase S [9,10].
- Des conséquences à long terme : Lorsque la réparation de ces lésions est incomplète, imparfaite ou absente dans le cas où le gène p53 est muté, il n'y aura pas de réponse de type SOS pour réparer les dommages, ceci va conduire à l'installation des mutations ce qui va provoquer l'apparition des pathologies chez les personnes exposées. Bien que le cancer ne représente pas la seule pathologie qui peut résulter des dommages de l'ADN mais il reste la plus importante préoccupation dans la prévention des expositions aux agents génotoxiques [1,10].

Donc un effet génotoxique n'est pas le même qu'un effet mutagène encore moins qu'un effet cancérogène. Parce que l'effet génotoxique se limite à la présence des lésions au niveau de l'ADN, alors que l'effet mutagène s'exprime lorsque la réparation de ces lésions ne se fait pas correctement ce qui donne naissance à des mutations génique ou chromosomiques, et on parle

d'effet cancérigène lorsque la mutation est à l'origine d'un évènement clé dans les premières étapes du processus de la cancérogenèse[10]. (Figure 3).

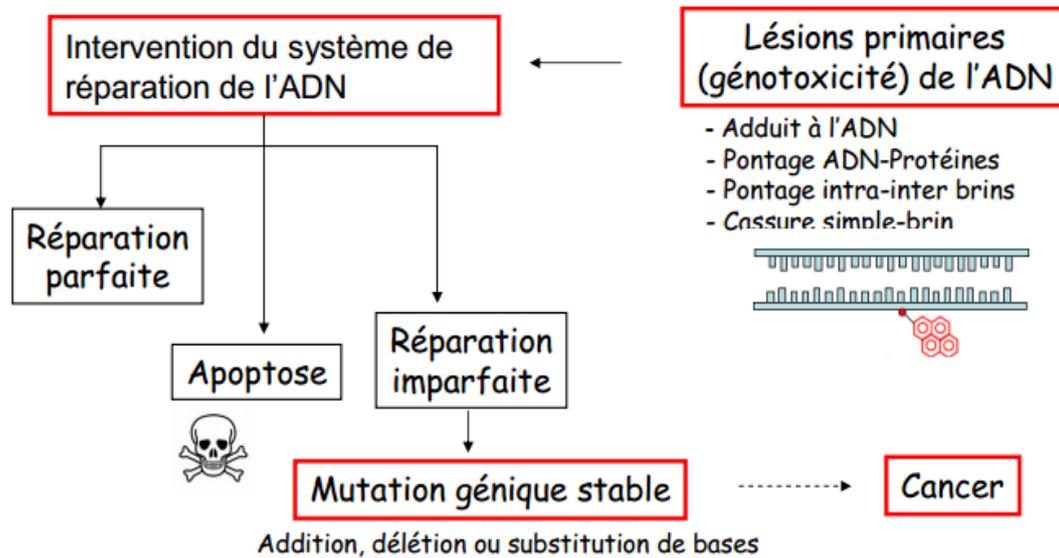


Figure 3 : Les effets génotoxiques, mutagènes et cancérigènes [8].

D'où on peut conclure qu'un agent génotoxique n'est pas nécessairement mutagène ni cancérigène, cependant les agents mutagènes et cancérigènes sont souvent génotoxiques [11].

I.4) Les agents génotoxiques :

Les agents génotoxiques, sont des agents qui ont le pouvoir d'altérer l'information génétique codée par l'ADN. Ces agents peuvent être soit de nature biologique, de nature physique ou de nature chimique comme la substance d'intérêt de notre étude.

- Les agents biologiques : ils peuvent être d'origine endogène comme ils peuvent être exogène. On parle d'origine endogène lorsqu'il s'agit des molécules issues du métabolisme normal des cellules et qui ont un pouvoir de provoquer des lésions d'ADN comme par exemple le cas du stress oxydant, et ceux d'origine exogène comme les virus par exemple[1].
- Les agents physiques : ils ont tous une origine exogène, ils peuvent être classés en deux types :
 - ✓ Les radiations ionisantes qui sont hautement énergétiques. Ils sont largement employés en radiologie et en radiothérapie. Et à mesure que les usages de ces rayonnements se multiplient, les dangers qu'ils peuvent comporter pour la santé, s'ils ne sont pas correctement utilisés ou confinés, augmentent. Des effets sanitaires aigus tels que des brûlures cutanées ou un syndrome d'irradiation aigu

peuvent se produire lorsque les doses de rayonnements dépassent un certain niveau. Les faibles doses de rayonnements ionisants peuvent accroître le risque d'effet à long terme comme le cancer [12].

- ✓ Les radiations non ionisantes qui sont des rayonnements de notre quotidien dont on parle principalement des rayonnements UV du soleil. Ces rayonnements sont largement filtrés par le champ magnétique terrestre. Ils sont capables d'induire d'importantes réactions photochimiques dans l'air, et de provoquer des dommages moléculaires qui peuvent aboutir par exemple au vieillissement de la peau, cancer de la peau et aux lésions rétiniennes photochimiques et thermiques [13].
- Les agents chimiques (souvent électrophile) : qui peuvent avoir un caractère génotoxique direct c'est-à-dire ils interagissent directement avec l'ADN et d'autres qui ont un caractère dis, pro génotoxique qui nécessitent une bio-activation par des systèmes enzymatiques adéquats pour pouvoir exercer leurs effets [1]. Les réactions de bio-activation donnent naissance à des métabolites réactifs principalement : les électrophiles, les radicaux libres et les nucléophiles [14,15].

I.5) Les principaux mécanismes d'action des agents génotoxiques :

a) Un effet clastogène :

Le mot clastogène est dérivé du grec ancien et il signifie : « causer des fragments, des cassures » et on parle d'effet clastogène lorsqu'il y'a des anomalies de structure résultant des cassures chromosomiques suivies d'une reconstitution dans une combinaison anormale. Ces anomalies impliquent un ou plusieurs chromosomes. Les aberrations chromosomiques qui résultent de l'action d'un agent génotoxique clastogène impliquant un seul chromosome peuvent être des délétions, des inversions des duplications ou des iso chromosomes, ainsi que les translocations et les insertions dans le cas de l'implication de deux ou plusieurs chromosomes [16]. (Figure 4)

b) Un effet aneugène :

Le mot aneugène est dérivé du grec ancien et il signifie : « multiple erroné » et on parle d'effet aneugène lorsqu'il y a des anomalies dans la répartition du nombre de chromosomes pendant la division cellulaire. Les effets aneugènes sont des effets indirects qui provoquent généralement des aberrations chromosomiques par interaction avec les structures cellulaires qui constituent l'appareil mitotique [17,18].

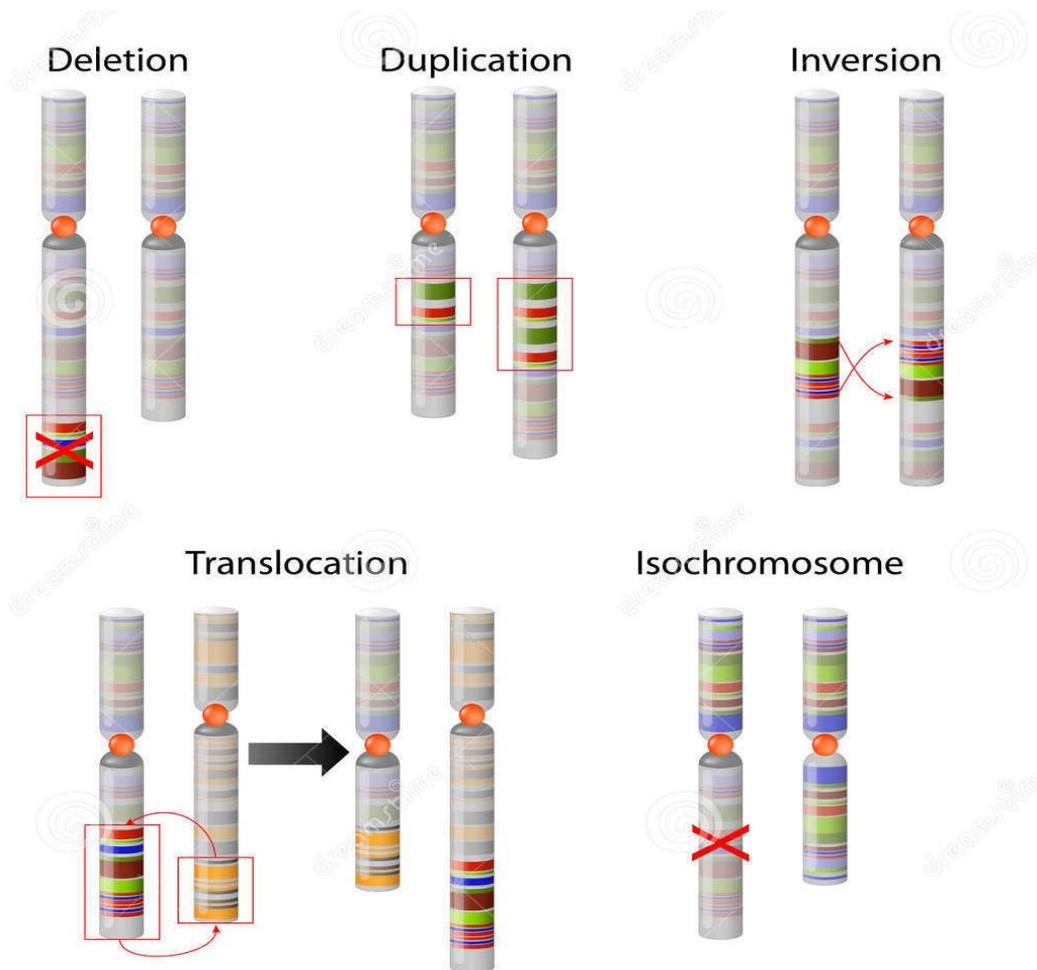


Figure 4: Certains anomalies de l'ADN résultants d'effet clastogène [19].

I.6) Les lésions d'ADN et leurs agents provocateurs :

Parmi ces lésions on trouve tout d'abord les adduits, qui résultent de la fixation de l'agent génotoxique (molécule chimique électrophile) sur un site nucléophile d'une base de l'ADN. (Les groupements hydroxyles, les azotes aromatiques, et carbonyles des bases constitutives de l'ADN sont les sites nucléophiles favorisés des génotoxiques). Ce type de lésion aboutit à une modification de la structure spatiale de l'ADN au voisinage de l'adduit ce qui va perturber sa

reconnaissance par l'ADN polymérase au cours de la réplication, et la formation de telles lésions sont des étapes clé vers la mutagenèse et le développement tumoral. Ensuite il y a les pertes, les insertions ou les modifications d'une ou plusieurs bases de l'ADN, où la plupart des agents génotoxiques impliqués sont des analogues de bases azotées qui s'incorporent à l'ADN et génèrent des appariements incorrects et ils peuvent aussi s'insérer entre les paires de bases et entraîner l'étirement de l'ADN et l'insertion d'une base surnuméraire. Et enfin il existe d'autres types de lésions mais qui sont moins fréquentes, tel que les cassures doubles et simples brins résultants essentiellement de l'exposition aux rayonnements ionisants et il y' a aussi les pontages intra ou inter-brins générées par la formation des liaisons covalentes anormales entre des bases de l'ADN [1,10]. (Figure 5).

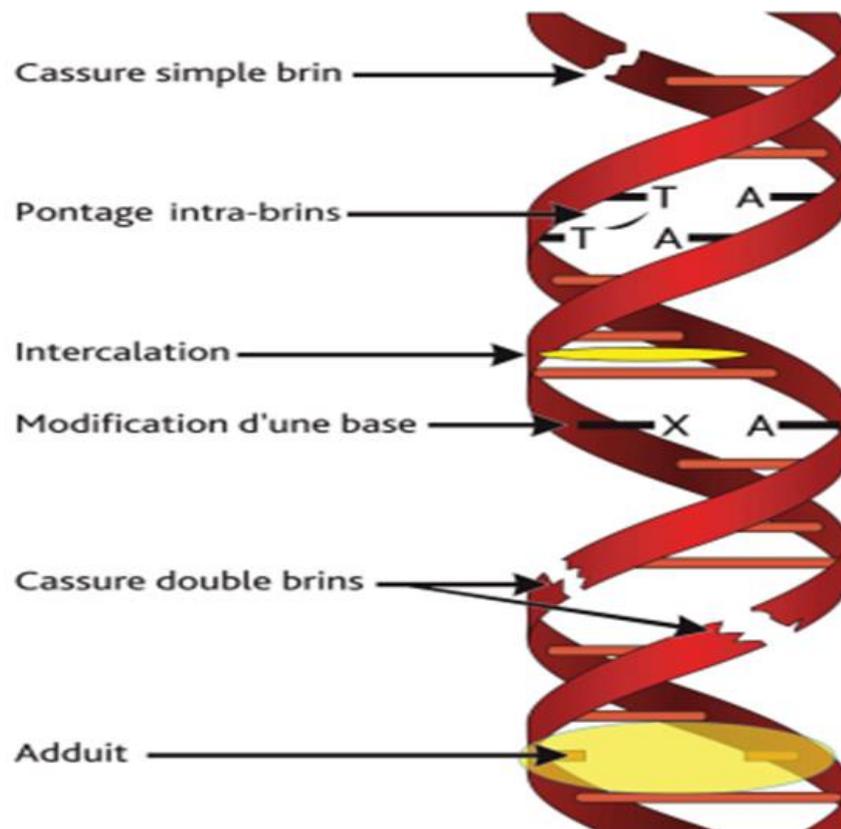


Figure 5: Les différents types de lésions d'ADN [1].

I.7) Les mécanismes de réparation de ces lésions :

Plusieurs mécanismes de réponse ont été développés pour réparer d'une façon spécifique chacun de ces types de lésions. Donc chaque type de lésion peut être pris en charge par un mécanisme de réparation spécifique. Ces mécanismes ont des processus bien différents surtout au niveau des protéines intervenants dans chacune des voies. Cependant, certaines étapes sont similaires dans tous ces mécanismes tel que la première étape qui est la reconnaissance de la lésion et qui est généralement suivie d'un arrêt du cycle cellulaire qui va permettre soit la mise en œuvre d'un mécanisme de réparation spécifique à la lésion, soit la mise en œuvre d'un programme de mort cellulaire si les lésions ne peuvent être réparées correctement. Parmi les principales voies de réparation de l'ADN chez l'homme il y'a la réparation par réversion directe (DR), la réparation par excision de base (BER), la réparation par excision de nucléotides (NER), la réparation des mésappariements (MMR), la recombinaison homologue (HR) et la réparation non-homologue (NHEJ) [20].

I.7.1) Réparation par réversion directe (DR) :

C'est un mécanisme qui entraîne une réversion de la lésion et ne concerne que les adduits alkylés et les photo-produits. Pour ceci, ce mécanisme ne nécessite l'action que d'une seule protéine qui va déplacer la base endommagée à l'extérieur des brins de l'ADN puis la réparer. Il existe deux familles d'enzymes qui sont impliquées dans cette voie :

- ✓ La famille des enzymes O6-alkylguanine-DNA alkyltransférases (AGT ou MGMT) qui prennent en charge les lésions O-alkylés (O6-méthyl-guanine, O4-méthyl-thymine ...)
- ✓ La famille des dioxygénases ALKBH qui répare les adduits bases N-alkylées (1-méthyladenine, 3-méthylcytosine, ...). Cette voie, contrairement aux autres voies de réparation, ne nécessite pas d'étape d'excision de l'ADN. Donc elle n'utilise pas

d'ADN polymérase qui peuvent entraîner des anomalies dans l'insertion des nouvelles bases, et de ce fait elle n'est donc pas source d'erreur [20]. (Figure 6)

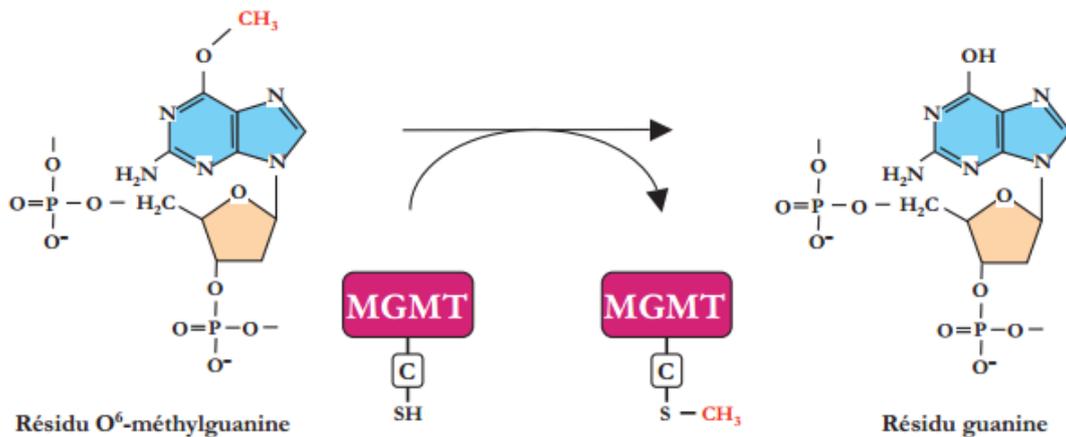
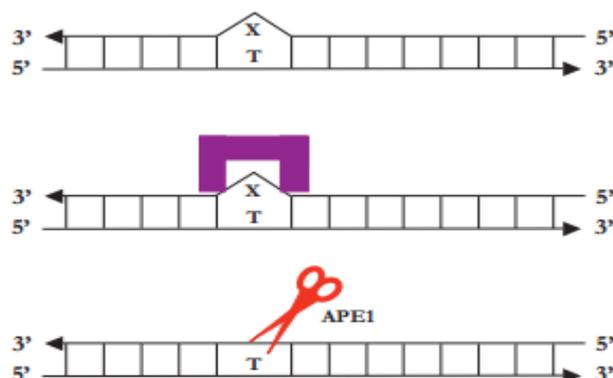


Figure 6: Réparation de l'ADN par réversion directe des lésions [20].

I.7.2) Réparation par excision de bases (BER) :

C'est un mécanisme qui répare les lésions ponctuelles d'une seule base. Il est utilisé pour restaurer une base endommagée, à son état initial grâce à une simple élimination de cette base. Il vise le plus souvent à remplacer les bases azotées altérées par un processus oxydatif endogène. Ce mécanisme se déroule en quatre étapes : tout d'abord l'ADN glycosylase, dont la nature varie selon la base endommagée (uracile-ADN glycosylase, oxoguanine-ADN glycosylase, méthylpurine-ADN glycosylase...), clive la liaison glycosidique qui correspond à la base altérée, formant ainsi un site apurique ou apyrimidique, ce qui laisse un résidu désoxyribose sans base dans la double hélice. Ces sites sont aussi formés dans les conditions physiologiques normales par l'hydrolyse spontanée d'une liaison glycosidique. Ensuite une endonucléase spécifique coupe le résidu désoxyribose, et le trou est par la suite comblé par une ADN polymérase tout en utilisant le brin intact comme matrice. Enfin il y'a la ligature par l'ADN ligase [20]. (Figure 7)



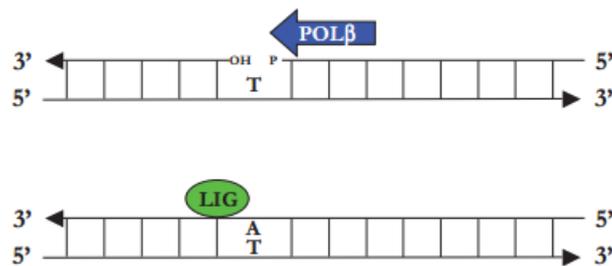


Figure 7: Réparation de l'ADN par excision de base(BER) [20].

I.7.3) Réparation par excision de nucléotides (NER) :

C'est un mécanisme qui sert à réparer les lésions assez importantes de l'ADN. Il représente la voie de réparation la plus polyvalente en termes de reconnaissance des dommages. Ce mécanisme, mis en jeu principalement pour la réparation des lésions provoqués par les rayons UV, est mis à profit pour réparer d'autres lésions impliquant en particulier les adduits volumineux formés par certains agents alkylants. Cette voie de réparation fait intervenir plusieurs protéines incluant les protéines XP, cette dénomination, XP, est relative de la maladie appelée xeroderma pigmentosum, due à une NER génétiquement défectueuse et elle est caractérisée par une hypersensibilité aux rayons UV et une prédisposition héréditaire aux cancers de la peau [20].

La reconnaissance des lésions peut se faire de deux façons [21,22]:

- ✓ Dans le cas du global génome NER (GG-NER), le mécanisme répare les lésions sur l'ensemble du génome grâce au complexe protéique XPC-RAD23B.
- ✓ Dans le cas du TC-NER relative à « transcription couplé NER », seules les lésions survenant au niveau des régions transcrites de l'ADN sont prises en charge grâce à l'intervention de protéines nommées Cockayne syndrome A et B (CSA et CSB).

Dans les deux cas, des hélicases nommées XPD (ou ERCC2) et XPB (ou ERCC3), qui ont une polarité opposée, sont liées au complexe protéique de transcription nommé TFIIH pour maintenir la double hélice d'ADN en position ouverte afin de permettre l'accessibilité aux enzymes de réparation. La protéine XPA reconnaît et vérifie la présence de la lésion, la protéine trimérique RPA s'associe à l'ADN endommagé et l'endonucléase XPG (ou ERCC5) coupe le brin endommagé en 3' de la lésion. Ensuite

l'endonucléase XPF (ou ERCC4) intervient, en association avec le facteur *excision repair cross complémentation group 1* (ERCC1), qui effectue une incision au niveau de l'ADN endommagé en 5' de la lésion, ce qui aboutit à la libération d'un fragment simple brin de 24 à 32 nucléotides. Par la suite l'ADN polymérase reconstitue la partie excisée en ajoutant les nucléotides complémentaires à ceux du brin non endommagé qui serve de matrice, et à la fin une ligase restaure la continuité de l'ADN. (Figure 8)

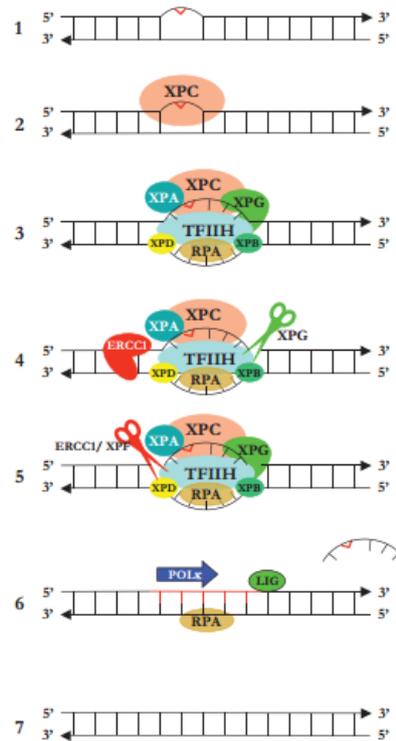


Figure 8: Réparation de l'ADN par excision de nucléotide (NER) [20].

I.7.4) La réparation des mésappariements (MMR) :

La voie de réparation des mésappariements (MismatchRepair : MMR) représente un mécanisme de défense contre les erreurs commises lors de la synthèse de l'ADN. C'est un processus qui vise à corriger, comme son nom l'indique, les mésappariements de bases c'est-à-dire lorsque la règle de complémentarité des bases (A-T ou C-G) n'est pas respectée. Donc cette voie traite les défauts de complémentarité qui peuvent induire toutefois des défauts de structure au niveau de l'ADN. Des hétérodimères formés par les protéines MSH2 et MSH6, ou MSH2 et MSH3 (MSH : *MutShomolog*) pour de très courtes insertions et délétions, ont le pouvoir de reconnaître ces lésions et de recruter des protéines spécialisées dans leur réparation, *MutLhomolog 1* (MLH1) et *postmeioticsegregationincreased* (PMS2), formant un complexe tétramère avec les précédentes. Le complexe glisse à distance du mésappariement, ensuite il hydrolyse le brin qui porte l'erreur sur quelques dizaines de nucléotides en aval, pendant que l'autre brin est protégé

des exonucléases par la protéine réplication protéine A1 (RPA). Après une nouvelle synthèse de l'ADN est réalisée par une ADN polymérase et la continuité du brin restaurée par une ligase [20]. (Figure 9)

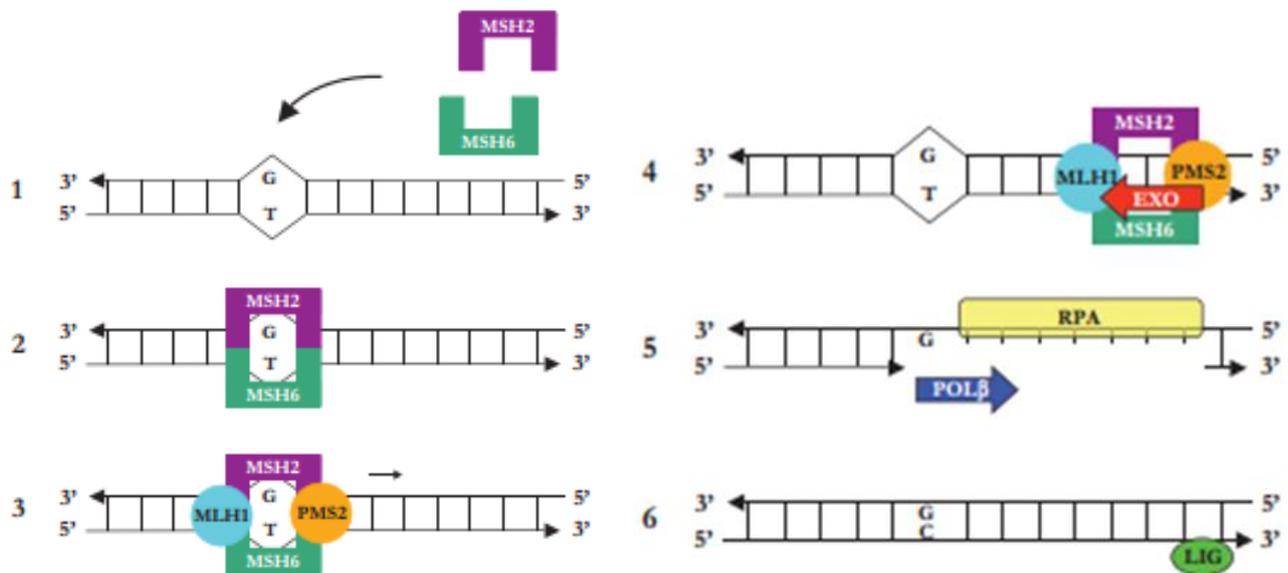


Figure 9: Réparation des mésappariements(MMR) [20].

I.7.5) La recombinaison homologue (HR) :

Les cassures double brin de l'ADN, en particulier celles créées par les radiations ionisantes sont réparés par le mécanisme de recombinaison homologue qui nécessite des homologies de séquences. La première étape de ce mécanisme est de reconnaître les lésions par des kinases senseurs de la famille des *ataxiatelangiectasiamutated* (ATM) et *ataxiatelangiectasia and Rad-3 related protein* (ATR). Ensuite ces molécules sont susceptibles de reconnaître et de phosphoryler de nombreuses protéines, parmi ces protéines on a celles qui peuvent s'impliquer directement dans la réparation, comme l'histone H2AX ; d'autres qui s'impliquent dans l'arrêt du cycle cellulaire comme *checkpoint 1 et 2* (CHK1 et CHK2) ou encore, dans l'apoptose comme *murine double minute homolog 2* (MDM2). Après un complexe protéique, appelé MRN parce qu'il est formé de trois protéines *meiotic recombination homolog 11* (MRE11), *radiation response yeast homolog 50* (RAD50) et *Nijmegen breakage syndrome 1* (NBS1), est activé par phosphorylation par ATM et exerce une activité 3' exonucléasique. Par la suite une série de protéines, RAD51, XRCC2, XRCC3, *breast cancer protein 1 et 2* (BRCA1, BRCA2) sont impliquées dans la resynthèse du brin lésé, qui est obtenue en recopiant la séquence homologue sur la chromatide sœur. La recombinaison homologue (HR) représente une voie qui est assez lente, et qui assure une réparation très fidèle parce qu'elle utilise le chromosome non

endommagé pour servir de matrice, ce qui confirme le caractère conservateur de cette voie [20,23]. (Figure 10)

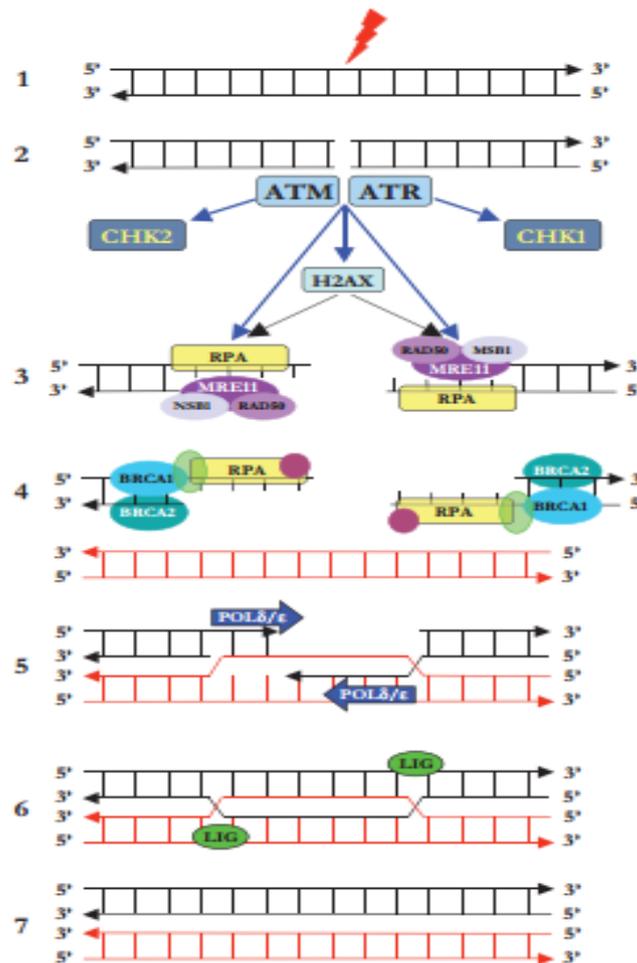


Figure 10: Réparation de l'ADN par recombinaison homologue (HR) [20].

I.7.6) La réparation non-homologue (NHEJ) :

La réparation non homologue est une voie qui ne nécessite pas de brin homologue. Et du coup il existe une étroite compétition et collaboration entre ce mécanisme et la recombinaison homologue. Actuellement, la recombinaison non-homologue est considérée comme le principal système de réparation des cassures double brin chez l'homme, même s'il est peu fidèle car il peut introduire des délétions ponctuelles, mais il a la capacité d'intervenir rapidement et tout au long du cycle cellulaire contrairement à la HR qui est plus lente et qui n'intervient qu'en phase S et G2 du cycle cellulaire. Le principe du mécanisme consiste à réassocier les extrémités séparées par la cassure. Ces extrémités sont reconnues par un complexe formé de deux protéines, KU70 (ou XRCC6) et KU80 (ou XRCC5) et d'une autre kinase, la *DNA-related protein kinase, catalytic subunit* (DNAPKcs) qui par phosphorylation active une exonucléase 3' appelée *Artemis* ou *DNA cross-link repair* (DCLRE), qui sert à préparer les

extrémités coupées avant quela ligase 4, qui est liée à une protéine XRCC4 et à un facteur XRCC4-like factor (XLF), ne viennent associer les deux extrémités séparées [20,24]. (Figure 11)

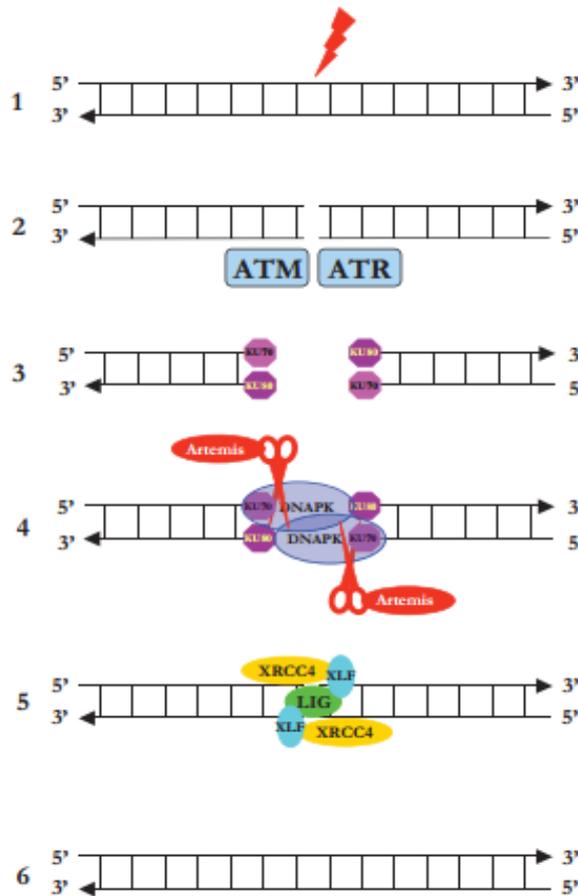


Figure 11: Réparation non homologue de l'ADN (NHEJ) [20].

I.8) Les tests de détection de la génotoxicité :

Vu que les types des lésions et des altérations qui peuvent toucher l'ADN sont assez diverses, il existe également plusieurs tests pour détecter la génotoxicité d'un agent, afin de déterminer les mécanismes moléculaires et cellulaires qui sont impliqués. Ces tests de génotoxicité mettent en évidence la capacité des agents physique ou chimique à induire un effet génotoxique. Ils permettent principalement la détection des lésions au niveau de l'ADN, c'est-à-dire la détection des cellules normales qui ont subis une agression cellulaire et non pas les cellules cancéreuses [25].

Ces tests de génotoxicité sont de différents types, parmi les plus utilisés on trouve :

Le test d'Ames, le test de mutation du locus de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HPRT), le test des comètes, le test d'échange des chromatides sœurs, le test des aberrations chromosomiques, le test de détection d'adduits chimiques et le test de micronoyaux

auquel s'intéresse cette étude et que nous allons bien détailler dans le chapitre suivant. Il existe des facteurs confondants qui doivent être pris en considération, notamment l'âge, le tabac, le polymorphisme génétique d'expression de certaines enzymes du métabolisme et de la réparation..., lors de l'interprétation de ces tests ou lors de la constitution de groupes contrôles.

I.8.1) Le test d'Ames :

a) Principe du test :

Le test d'Ames ou mutatest est un test de mutation bactérienne inverse sur les souches de *Salmonella typhimurium*, qui a été développé en 1975 par Bruce Ames (d'où sa nomination) et son équipe à l'Université de Californie à Berkeley. Il s'agit d'un test qui consiste à détecter la capacité d'un agent physique ou chimique à induire des mutations spécifiques chez différentes souches hypersensibilisées de *Salmonella typhimurium* [26].

Les souches utilisées sont porteuses d'une mutation dans un des gènes qui codent pour la synthèse de l'acide aminé histidine. Ces souches ne peuvent pas synthétiser l'histidine donc elles sont des souches auxotrophes « His- » et de ce fait elles n'ont pas le pouvoir de pousser sur un milieu dépourvu de cet acide aminé. En présence d'un agent génotoxique, ces souches retrouvent leur capacité à pousser sur un milieu sans histidine, par une mutation reverse. Et elles deviennent donc des souches phototrophes « His+ ». Ces mutants « His+ », dits révertants, vont donc pousser sur le milieu dépourvu d'histidine et leur nombre est proportionnel au pouvoir génotoxique de l'agent étudié. La numération de ces révertants va permettre de quantifier l'induction des mutations reverses « His- » → « His+ ». Il existe plusieurs souches bactériennes génétiquement différentes, porteuses de mutations His- qui peuvent être utilisées pour tester les effets des agents mutagènes. Parmi ces souches on trouve notamment les souches TA97a, TA98, TA100, TA102, TA1535 et TA1537 [27,28]. (Figure 12)

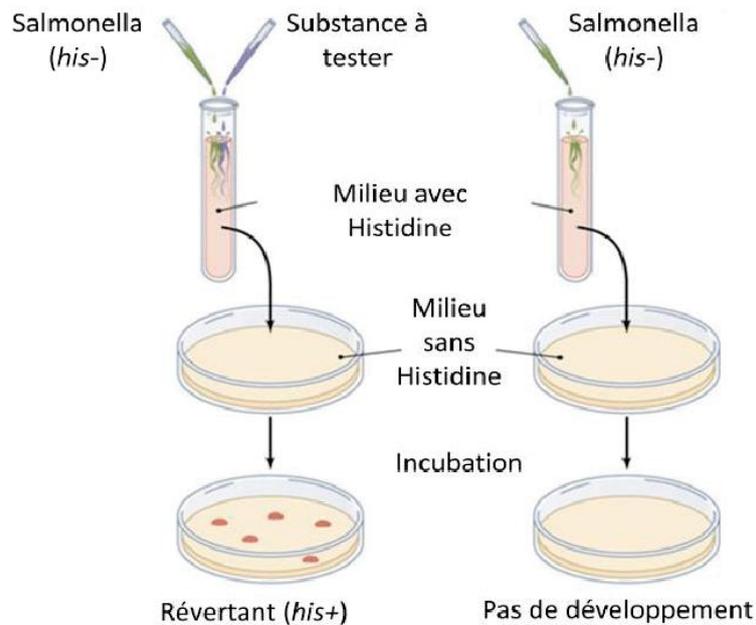


Figure 12: Principe du test d'Ames[29].

b) Les avantages et les inconvénients :

Le test d'Ames est un test qui est applicable à l'étude du pouvoir mutagène de produits chimiques ou de mélanges, mais aussi de fluides biologiques telles que les urines chez les sujets exposés. C'est un test qui est relativement peu coûteux, il permet d'obtenir des résultats dans un délai très court, il est sensible (80%), spécifique (87%) et reproductible. De ce fait il est moins susceptible d'identifier faussement le pouvoir mutagène d'une substance.[18,30,31]

Cependant c'est un test bactérien donc il peut rendre en théorie critiquable l'extrapolation à des cellules humaines, Et il existe aussi des paramètres qui peuvent influencer les résultats qui concernent l'analyse du pouvoir mutagène des urines par ce test, notamment le tabac et l'exposition aux fumées de cuisson [18].

Le test d'Ames fait enfin l'objet d'une ligne directrice de l'organisation pour la coopération et le développement économique (OCDE) pour les essais de produits chimiques (ligne 471).

I.8.2) Le test de mutation du locus de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HPRT) :

a) Principe du test :

Selon OCDE (ligne 476), il s'agit d'un test qui détecte des mutations générées par des produits chimiques. Ce test se réalise sur des cellules de mammifères qui peuvent être exposées in vitro ou in vivo à l'agent génotoxique étudié. Il est basé sur l'apparition des cellules mutantes déficientes en hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HPRT), qui est une enzyme

non essentielle à la croissance des cellules en culture puisque les purines peuvent être fournies par une synthèse de novo, et ces cellules sont détectées par leur capacité à proliférer in vitro en présence de la 6-thioguanine (TG), qui est un analogue toxique des purines et qui nécessite l'enzyme HPRT pour sa bioactivation. Tandis que les cellules normales qui contiennent l'enzyme HPRT ne peuvent pas proliférer en présence de TG [32].

b) Avantages et inconvénients :

Le test HPRT a l'avantage d'explorer une mutation fixée par ce que le gène HPRT présente un avantage sélectif, et il est utile dans les études des mutations récessives parce qu'il s'agit d'un gène lié au chromosome X donc il est hémizygote dans les cellules mâles et fonctionnellement hémizygote dans les cellules femelles, ce qui le rend utile en particulier dans les études de ce type de mutations. Cependant il a l'inconvénient de nécessiter une culture de cellules, et d'avoir une sensibilité modérée. Ainsi qu'il existe des facteurs confondants qui doivent être pris en compte comme le sexe et le tabac [18,33].

I.8.3) Le test des comètes :

a) Principe du test :

Le test des comètes est une technique qui a été décrite la première fois en 1984 par Ostling et Johanson et puis améliorée par Singh et ses collaborateurs en 1988. Il s'agit d'une technique qui permet de mesurer le degré des dommages d'ADN au sein d'une population cellulaire. Elle concerne notamment les cassures de l'ADN, qui sont l'un des dommages à forte probabilité d'apparition après l'exposition à des agents génotoxiques. Ce test des comètes correspond à une technique d'électrophorèse sur micro-gel d'agarose en conditions alcalines, ce qui permet de détecter des fragmentations de l'ADN de cellules individualisées, c'est-à-dire il permet la détection des cassures de l'ADN simple et double brin et aussi des sites de réparation incomplète d'alcali-labile. Le principe du test se base sur la charge négative de l'ADN qui va se déplacer vers l'anode sous influence du courant de migration. La présence de cassures permet à l'ADN de migrer et le noyau va donc prendre la forme d'une comète. On distingue une partie contenant de l'ADN non endommagé, appelée tête de la comète et une partie plus allongée, contenant l'ADN fragmenté ayant migré, constituant la queue de la comète [34]. (Figure 13)

Principe de l'essai comète
(Single Cell Gel electrophoresis, SCG)

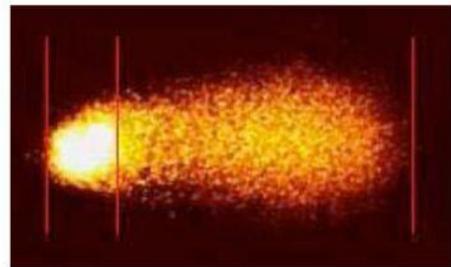
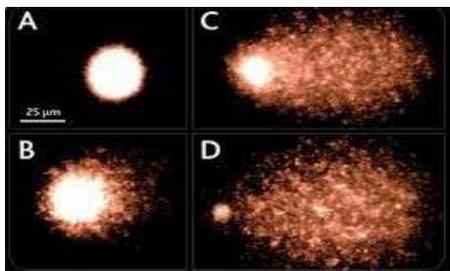
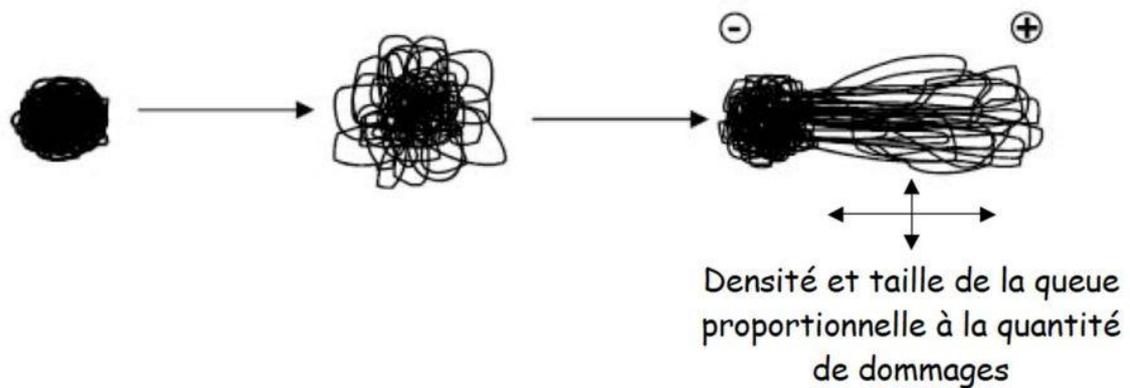


Figure 13: Principe du test des comètes [34]. (A : noyau non endommagé, B : noyau légèrement endommagé, C : noyau endommagé, D : noyau fortement endommagé).

b) Les avantages et les inconvénients :

Le test des comètes est une technique qui est simple à mettre en œuvre, ne demande pas de culture cellulaire et il peut être utilisé pour la surveillance des personnes exposés à des agents génotoxiques. Elle permet aussi d'analyser les cellules individuellement, ce qui fournit des données assez suffisantes pour des analyses statistiques robustes à l'égard de la détection d'un effet génotoxique chez un sujet. Ainsi que c'est une technique qui nécessite peu de cellules et elle est applicable à toutes les cellules nucléées. Néanmoins c'est un test qui ne s'intéresse pas à l'aspect fondamental des dommages de l'ADN, donc il peut détecter des lésions qui sont susceptibles d'être réparées. Et aussi il nécessite une manipulation sans lumière parce que les rayons lumineux peuvent provoquer des cassures supplémentaires à l'ADN. Sans oublier les facteurs confondants qui doivent être pris en compte, notamment : le tabac, l'âge, le régime alimentaire, l'exercice physique, et l'exposition à la pollution atmosphérique [18].

I.8.4) Le test d'échange des chromatides sœurs :

a) Principe du test :

Le test d'échange entre des chromatides sœurs est un test qui permet d'analyser les anomalies des chromatides survenant en réponse à l'exposition à un génotoxique. Les échanges de chromatides sœurs entre chromosomes résultent de cassures de l'ADN et de la réversion des fragments cassés à une position presque équivalente après l'échange entre les deux chromatides sœurs du même chromosome ; leur formation dépend donc de la phase S du cycle cellulaire ou des processus de duplication de l'ADN. Les agents génotoxiques augmentent la fréquence des SCE par cellule, ce qui serait lié à une action sur la réparation pendant la phase S du cycle cellulaire. Ce test est applicable pour tester in vitro l'effet d'un composé sur les cellules mais aussi pour évaluer les effets d'une exposition in vivo à des agents génotoxiques. Il peut donc être utilisé pour mesurer le potentiel génotoxique d'un composé donné, mais aussi pour surveiller le personnel exposé [18].

b) Les avantages et les inconvénients :

Le test d'échange de chromatides sœurs est relativement fastidieux à réaliser ; il nécessite notamment la production des cultures cellulaires. Il présente l'inconvénient de ne pas nécessairement détecter les lésions fixées. Ainsi que pour le suivi des personnes exposées, il nécessite un prélèvement cellulaire, et de ce fait il peut donc être considéré comme un test invasif. Le test d'échange de chromatides sœurs est sensible à certains facteurs de confusion, notamment la consommation d'alcool et du tabac. Le polymorphisme d'expression enzymatique est également un facteur d'interférence [18].

I.8.5) Le test de la détection des aberrations chromosomiques :

a) Principe du test :

L'objectif de ce test est de déterminer les anomalies du caryotype des cellules eucaryotes, liées à l'exposition à des composés génotoxiques provoquant des cassures de l'ADN. Ce test peut se réaliser in vivo (exposition expérimentale de rongeurs), en analysant les cellules qui peuvent être des lymphocytes isolés de sujets humains ou d'animaux et qui sont exposés à des produits chimiques ; comme il peut être réalisé in vitro (traitement de cultures cellulaires), en utilisant des cellules de la lignée ou des lymphocytes qui sont exposés à des génotoxiques. Ce type de test peut donc être utilisé pour mesurer le potentiel génotoxique d'un composé in vitro ou in vivo [18].

Après la réalisation du caryotype, en bloquant les cellules avec de la colchicine en métaphase, plusieurs types d'anomalies chromosomiques peuvent être détectée, notamment les anomalies du nombre de chromosomes (aneuploïdie) qui peuvent correspondre soit à une augmentation du nombre de chromosomes : hyperploïdie soit au contraire à une diminution du nombre de chromosomes : hypoploïdie, ou les anomalies de structure des chromosomes comme la délétion, la translocation, ou l'inversion. Les résultats sont généralement rapportés en % de métaphases présentant des aberrations [18].

b) Les avantages et les inconvénients :

C'est un test qui met en œuvre des dommages stables et permet la détection de tout type d'atteinte chromosomique ainsi qu'il est applicable à l'évaluation d'une exposition cumulée. Cependant il a l'inconvénient de nécessiter une culture cellulaire. Ainsi que l'utilisation de ce test pour l'étude de personnel exposé demande obligatoirement l'analyse comparée du groupe de sujets exposés à un groupe de sujets témoins non exposés et aussi il s'agit d'un test qui a un caractère invasif comme dis précédemment. Comme tous les tests de génotoxicité, c'est un test qui représente des facteurs confondants interférents dont on cite principalement le tabac et l'âge [18].

Les tests d'aberrations chromosomiques font l'objet de lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques applicable à des expositions in vitro (ligne 473) ou in vivo sur moelle osseuse de mammifères (ligne 475).

I.8.6) Le test de détection des adduits chimiques :

a) Principe du test :

Les adduits de l'ADN formés par les produits chimiques ont le pouvoir de produire des effets biologiques néfastes, au cours de la réplication du matériel génétique ou plus tard lors de la traduction. Ce type de lésion présente une étape importante dans le phénomène d'initiation d'un cancer. Alors comme expliqué précédemment si ces anomalies ne sont pas réparées ou elles sont mal réparées, l'information génétique va donc être modifiée. Ce qui peut provoquer des mutations qui vont être par la suite à l'origine de développement de tumeurs. Donc la détection de ces adduits est importante et elle peut se faire par immuno-marquage à l'aide d'anticorps dirigés contre les adduits quand ils sont disponibles, par des méthodes chromatographiques souvent couplées à la spectrométrie de masse ou par le post marquage au phosphore 32 qui constitue une méthode extrêmement sensible et très fine pour identifier le pouvoir génotoxique d'une substance. Ainsi qu'elle présente le triple avantage de ne pas nécessiter l'utilisation de

cancérogène radioactif, de pouvoir être utilisée en épidémiologie et de permettre la détection de 1 adduit par 10^{10} nucléotides [18,35].

b) Les avantages et les inconvénients du test :

La réalisation de ces techniques, nécessite un prélèvement cellulaire qui est souvent sanguin. Donc on peut dire que ce type d'analyse a un caractère relativement invasif. En outre, en raison de la courte durée de vie de la plupart des adduits de l'ADN (moins de 2 jours), il est nécessaire de collecter des échantillons le plus tôt possible après une exposition aiguë ou à la fin d'une exposition chronique. Et il faut savoir que la formation de ces adduits semble dépendre de facteurs confondants qui doivent être pris en compte tel que le tabac et l'âge qui concerne notamment les dommages oxydatifs à l'ADN [18].

I.8.7) Le test de micronoyau :

Le test des micronoyaux ou aussi test de numération des micronoyaux est un test de génotoxicité qui est très utilisé, et il se base sur la détection et le comptage des micronoyaux dans des cellules exposées à un agent génotoxique ou un agent qu'on veut identifier sa génotoxicité. Ce test fait l'objet d'une ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, applicable aux érythrocytes de mammifères (ligne 474).

Le test du micronoyau est le test auquel s'intéresse cette étude et nous allons bien le détailler dans le chapitre suivant.

I.9) Les biomarqueurs de génotoxicité :

Étant donné que le cancer est la plus importante préoccupation dans la prévention des expositions aux agents génotoxiques et il ne survient qu'après une période de latence, il est essentiel de développer des biomarqueurs précoces pouvant aider à identifier et à prévenir les risques génotoxiques.

Un biomarqueur est une caractéristique mesurable avec fiabilité et précision et il peut être utilisé comme marqueur d'un processus biologique normal au sein de l'organisme, ou d'un processus pathologique, ou encore d'une réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique. Et la validation d'un simple biomarqueur nécessite des études étalées sur des longues périodes depuis le développement et la standardisation du protocole de recherche, jusqu'à l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité de ce biomarqueur comme prédicteur de risque du cancer. Néanmoins il existe plusieurs biomarqueurs de type différent qui peuvent soit marquer la

présence d'un cancer, soit indiquer le risque de développer ultérieurement un type particulier de cancer ou encore de suivre l'évolution d'un traitement [36].

Les biomarqueurs les plus appliqués dans la prévention des cancers sont habituellement classés en trois catégories : [37]

✓ Les biomarqueurs d'exposition :

Comme leur nom l'indique ils permettent de mesurer l'exposition de l'organisme à une substance exogène, donc ils permettent d'évaluer la pénétration de cette substance à l'organisme et ceci se fait par le dosage de la substance concernée ou de ces métabolites dans les fluides biologiques, les cellules ou les tissus et de donner une appréciation de la dose interne. L'utilisation de ces biomarqueurs nécessite de prendre en considération les différentes voies d'absorption ainsi que les conditions réelles de déroulement de cette exposition.

✓ Les biomarqueurs d'effet :

Appelé aussi biomarqueurs de réponse biologique, ils représentent des changements biologiques observables et quantifiables dans un organisme, et ils sont dû à l'interaction d'une substance génotoxique avec le matériel génétique de la cellule. La mesure de ces biomarqueurs peut se faire dans de différents échantillons biologiques humains, principalement dans le sang (le sérum) et l'urine. Au cours de ces dernières décennies l'augmentation de l'utilisation de ces biomarqueurs a été nettement remarqué, parce qu'ils présentent l'avantage de pouvoir être utilisés pour déterminer la réaction de chaque personne envers l'exposition à une substance donnée et aussi d'identifier les variations entre les individus. Ainsi qu'ils ont la capacité à détecter les changements dans l'organisme avant le développement d'un effet indésirable particulier ou d'une pathologie donnée. Grâce à cette détection précoce des actions préventives plus efficaces peuvent être mises en œuvre.

✓ Les biomarqueurs de susceptibilité :

Ces biomarqueurs sont destinés à l'explication des différences interindividuelles dans la réponse à une exposition génotoxique. Cette sensibilité interindividuelle résulte principalement du polymorphisme des gènes impliqués dans le métabolisme des xénobiotiques et dans la réparation des lésions de l'ADN. La dose efficace d'un agent génotoxique dépend de la compétition entre les réactions de détoxification de cet agent et celles d'activation de ce dernier. De ce fait toute variation dans ces voies métaboliques présente un point important pour la détermination de la susceptibilité

individuelle, ce qui indique que le développement de biomarqueurs de susceptibilité peut aboutir à une meilleure identification des déterminants de cette variabilité interindividuelle.

Généralement, les deux premiers biomarqueurs sont considérés comme des biomarqueurs de prévention, et le dernier comme un biomarqueur de prédiction ou de susceptibilité. Les biomarqueurs de prédiction prédisent le développement d'une pathologie et peuvent aider à mettre en place des programmes de prévention. Quant aux biomarqueurs de prévention comme leur nom l'indique, sont plus utilisés pour l'identification et le calcul d'un risque ou d'une prédisposition pathologique. Les biomarqueurs cytogénétiques les plus utilisés en génotoxicité sont les aberrations chromosomiques (AC), les échanges de chromatides sœurs (ECS) et les micronoyaux (MN). Et au cours de ces derniers temps le test de micronoyaux gagne de plus en plus en popularité parce qu'il est facile à réaliser et aussi l'analyse de ces MN est plus rapide que l'analyse des métaphases dans le test des AC par exemple [37].

I.10) Les cellules utilisées en génotoxicité pour les études *in vitro* :

Les études sur la génotoxicité peuvent être réalisées *in vivo* ou *in vitro*. Ces études *in vitro* font progresser les connaissances sur les mécanismes d'action de nombreuses substances génotoxiques et elles permettent aussi d'obtenir des informations supplémentaires lorsque l'interprétation des résultats obtenus des études *in vivo* est compliquée. Les études *in vitro* sont des études qui s'effectuent en exposant des cellules à une substance unique avec des concentrations bien définies et l'avantage principal de ces études c'est la détermination de la relation dose-effet ainsi que le seuil cytotoxique. Ces études sont relativement rapides et permettent d'évaluer séparément les effets biologiques de chacune des substances cependant il faut prendre en considération le milieu biologique réel de l'humain et les interactions qui peuvent se produire avec les autres substances qui se trouvent dans l'environnement réel et qui sont impossible de prévoir. C'est donc pour cette raison que des efforts sont consacrés pour développer des procédures qui combinent entre les deux types des études (*in vivo* et *in vitro*), afin de diminuer les erreurs dans l'évaluation de la génotoxicité des agents testés [38,39].

De ce fait, les modèles cellulaires utilisés pour évaluer la génotoxicité d'une substance *in vitro* sont généralement du genre animal ou humain. La plupart des études de mesure de génotoxicité sur des cellules en culture montrent que la quasi-totalité des expériences sont faites chez l'humain, sur des fibroblastes, des lymphocytes et des lignées cellulaires, et chez l'animal, sur

des lymphomes de souris et des cellules de Hamster comme les CHO sur lesquelles s'articule cette étude [40].

II. La molécule étudiée : une dérivée des benzothiazines néosynthétisée (BD 3) :

Dans le cadre de la réalisation de cette étude, on a utilisé une molécule néosynthétisée des benzothiazines comme une substance d'intérêt.

Les benzothiazines constituent un groupe de composés hétérocyclique en un noyau benzénique attaché à l'hétérocycle thiazine à 6 chaînons. Leur formule chimique est la suivante : C_8H_7NS .

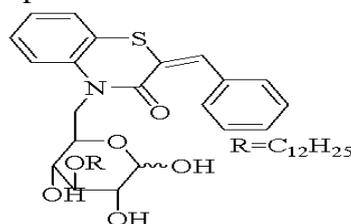
Les composés hétérocycliques en général, représentent un groupe qui a un grand intérêt tant au niveau médical qu'au niveau industriel et au cours de ces derniers décennies un grand intérêt a été porté aux benzothiazines vu leur large éventail d'activités pharmacologiques. On s'est intéressé à l'étude du pouvoir génotoxique de ces substances benzothiaziniques parce qu'elles sont utilisées dans la préparation de médicaments anti-inflammatoires et de médicaments antitumoraux vis-à-vis d'une large plage de tumeurs et de maladies inflammatoires. Ainsi qu'elles ont aussi une activité antibactérienne, antifongique, antivirale et antiparasitaire [41].

Pour la réalisation de cette étude nous avons utilisé un dérivé sous le nom de BD 3, ce dernier provient de la synthèse à partir du benzothiazine (1,4-Benzothiazin-3-one, pour évaluer son effet génotoxique par le test de micronoyaux avec blocage de la cytodivision (CBMN assay).

La formule chimique de la molécule BD3 est la suivante : $C_{33}H_{42}NO_6S$

2-((E)-benzylidene) 4-(((2R,3R,4S,5R)-4-(dodecyloxy)-3,5,6-trihydroxytetrahydro-2H-pyran-2-yl)methyl)-2H-benzo[b][1,4]thiazin-3(4H)-one

Sa structure chimique est présentée comme suit :



Les résultats que nous allons obtenir de cette étude pour le BD3, seront comparés avec ceux obtenus pour la molécule BD 7 ($C_{11}H_{11}NO_2S$), qui a fait l'objet d'un projet d'article en cours de publication de H. JADDI et al, la méthodologie suivie est inspirée de cet article.

On s'est basé sur cette comparaison parce que notre substance d'intérêt la molécule BD3 et la molécule BD 7 dérivent de la même molécule (1,4-Benzothiazin-3-one).

III. Le Micronoyau en Génotoxicologie :

III.1) La définition du MN :

Le MN est une entité nucléaire sous forme d'un petit noyau supplémentaire, qui s'est formé anormalement lors de la division cellulaire lorsque l'ADN présente des cassures double-brin ou encore lorsqu'il y a des anomalies au niveau du fonctionnement de l'appareil mitotique. Ce MN possède sa propre membrane nucléaire et l'ADN présent dans ce petit noyau est actif du point de vue transcriptionnel et répllicationnel [42].

Le MN est généralement situé autour du noyau principal dans la moitié intérieure du cytoplasme et il est facilement identifiable par microscopie optique. Parmi les caractéristiques qui permettent d'identifier un MN, nous avons le diamètre qui est généralement entre 1/3 et 1/16 de celui du noyau principal donc il peut être facilement différencier au niveau des cellules binucléées, ainsi que l'intensité de sa coloration et la texture de sa chromatine qui sont similaires à celles du noyau principal et sans oublier qu'il ne présente aucune liaison avec le noyau principal. Le MN doit toujours être distingué des dépôts de taches, des poussières nucléaires, des ponts nucléaires, des bourgeons des cellules, des fragments cytoplasmiques agglutinés, des fragments nucléaires superposés provenant d'autres cellules et des kératohyalines granulés [43]. (Figure 14 et 15)

Comme indiqué dans la partie de biomarqueurs, le MN est utilisé en tant qu'un biomarqueur précoce des anomalies chromosomiques et éventuellement de risque de cancer. Les MN représentent à la fois des biomarqueurs d'effet et des biomarqueurs de susceptibilité parce qu'ils sont des indicateurs potentiels de la réponse biologique à des agents génotoxiques [37].

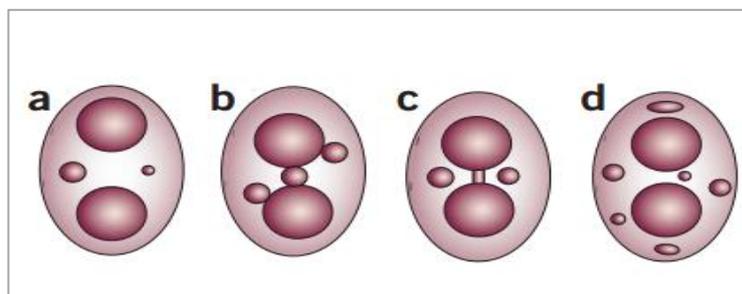


Figure 14 : Les différentes apparences et la taille relative de MN dans des cellules binucléées (BN) [41]. (a) : Cellule avec deux MN un avec 1/3 et l'autre 1/9 du diamètre de l'un des noyaux principaux. (b) : MN qui touche les noyaux principaux mais ne se chevauchent pas avec eux. (c) : Une cellule BN avec un pont nucléoplasmique entre les noyaux principaux et deux MN. (d) : Une cellule BN avec six MN de différentes tailles ; ce type de cellule est rarement constaté dans les cellules qui ne sont pas exposés à de fortes doses des agents génotoxiques.

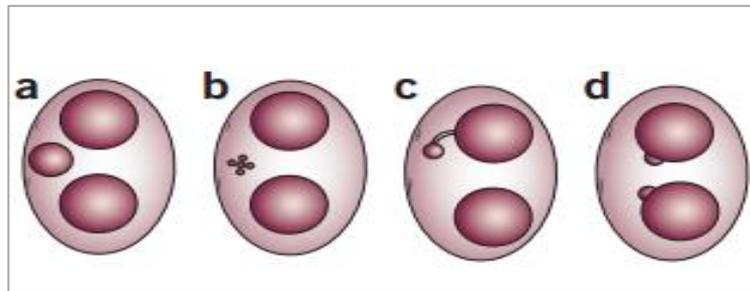


Figure 15: Les différentes structures qui ne doivent pas être considérées comme de MN dans des cellules binucléées (BN) [41]. (a) : Cellule trinuécléée dans laquelle l'un des noyaux est relativement petit mais il a un diamètre supérieur à 1/3 du diamètre des deux autres noyaux. (b) : Cellule avec des petits fragments denses dans une région spécifique du cytoplasme. (c) : Cellule avec un bourgeon nucléoplasmique qui apparaît comme un MN mais il représente une connexion étroite au principal noyau. (d) : Cellule avec des bourgeons nucléaires.

III.2) Les mécanismes de formation de micronoyaux :

Selon la nature du mécanisme de formation impliqué, le micronoyaux (MN) peut contenir soit des fragments acentriques soit des chromosomes entiers ou encore des chromosomes partiels. Lorsqu'il s'agit de fragments acentriques, il y'a l'implication des agents clastogène et de ce fait un mécanisme clastogène direct, et lorsqu'il s'agit de chromosomes entiers ou partiels, il y'a l'implication des agents aneugènes et de ce fait un mécanisme aneugène. Donc on peut conclure que le contenu des MN dépend du mécanisme de formation impliqué. Et il faut savoir aussi que le type d'exposition et les facteurs biologiques tel que l'âge et le sexe influencent la constitution des MN [44]. Il existe alors deux types de mécanisme de formation :

a) La formation de MN constitués de fragments chromosomiques :

Alors comme nous venons de l'expliquer ci-dessus un MN constitué de fragments acentriques (sans centromère) est engendré par un effet clastogène et comme nous l'avons mentionné dans la page 6, le mot clastogène signifie : « causer des fragments, des cassures » et il correspond à des anomalies de structure qui résultent des cassures chromosomiques. Cet effet clastogène est un effet direct qui est généré bien évidemment par des agents clastogènes qui ont généralement la capacité de s'insérer entre les paires de bases de l'ADN en induisant des cassures double brin. Et ceci revient à leur structure chimique plane qui favorise ce positionnement. Si ces cassures double brin ne sont pas réparés avant de passer à la division cellulaire, lors de la mitose

il y'aura la libération d'un fragment chromosomique issu de la cassure double brin et qui va être exclu par le phénomène de rejet de ce dernier hors du noyau à l'aide de l'exonucléase qui est une enzyme (nucléase) qui effectue une coupure à partir de l'extrémité du brin en formant ainsi un MN [45].

b) La formation de MN constitués de chromosomes entiers ou partiels :

Les micronoyaux qui sont constitués de chromosomes entiers ou partiels sont porteurs des centromères (MN C+) et ils sont générés par l'action d'un agent aneugène qui engendre bien évidemment un effet aneugène qui est en fait un effet indirect. Et comme déjà mentionner dans la page 7, ces effets indirects sont généralement provoqués par des altérations des éléments qui composent l'appareil mitotique. Cet appareil est une structure qui est organisée par la cellule eucaryote lors de la mitose et notamment lors de la prophase. Il est constitué de microtubules qui forment un véritable fuseau entre les deux pôles opposés de la cellule. Et il permet d'assurer une bonne répartition des chromosomes lors de la division cellulaire, en liant les chromosomes par leurs kinétochores, qui sont des feuilles protéiques situées dans les centromères des chromosomes dans lesquels sont ancrés les microtubules de cet appareil, ensuite les localiser à l'équateur et de les déplacer vers les pôles de la cellule. De cette façon, la répartition des chromosomes est établie et donc le fuseau mitotique est indispensable à la division et au développement cellulaire. De ce fait la formation des micronoyaux avec centromère revient à une mauvaise répartition des chromosomes, qui résulte d'un dysfonctionnement au niveau de la disjonction, de la ségrégation ou de la migration des deux lots de chromosomes-fils, à cause de l'instabilité dynamique des microtubules ou des anomalies au niveau des kinétochores. Ce qui aboutit à une aneuploidie des cellules-filles qui ont, soit perdu, soit gagné un ou des chromosomes [43,46,47].

La figure ci-dessous (figure 16) représente un schéma de formation de Micronoyaux d'après Fenech 1997 :

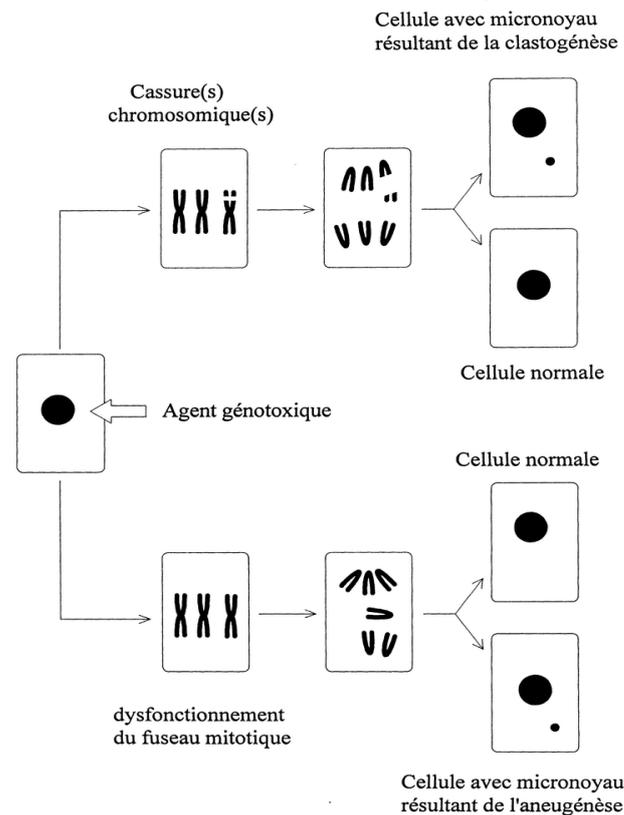


Figure 16: Schéma de la formation des micronoyaux d'après Fenech (1997)[48].

III.3) Le devenir du MN :

Le devenir des MN après leurs formation dans la cellule est encore mal connu. Pourtant il existe quatre principales possibilités post mitotique : la dégradation, la réincorporation, l'extrusion et la persistance. Et ces possibilités dépendent de la situation fonctionnelle de la cellule [49]. (Figure 17)

- ✚ La dégradation : est l'un des destins possibles des MN et elle conduit à la disparition de ce dernier. Dans ce contexte, la dégradation désigne la destruction enzymatique de l'ADN des MN. Et d'un point de vue mécanique, les micronoyaux peuvent être dégradés par des processus de type apoptose qui vont se limiter juste au micronoyaux. Comme ils peuvent être dégradés par l'autophagie qui est un processus catabolique de dégradation des composants cellulaires à l'intérieur de lysosomes. Cependant, certains auteurs considèrent explicitement qu'il est peu probable que les micronoyaux soient dégradés [50].
- ✚ La réincorporation : est l'une des options possibles pour le devenir des MN. Elle désigne la réintégration du MN dans le noyau principal. La réincorporation pourrait théoriquement se produire pendant l'interphase, mais il est certainement plus probable

qu'elle se produise lors de la mitose suivante. Ce processus ne se réalise que lorsque le chromosome à réincorporer est indifférencié de ceux du noyau principal. Et c'est ainsi que la cellule va reprendre son activité biologique normale [49,50].

- ✚ L'extrusion : est considérée par plusieurs auteurs comme une possibilité d'élimination des MN hors de la cellule, parce qu'il s'agit d'une diffusion du MN à l'extérieur de la cellule principale. Et ceci se produit lorsque l'ADN qui constitue le MN est considéré comme non fonctionnel ou incapable de se répliquer en raison de l'absence des composants cytoplasmiques nécessaires [49,50].
- ✚ La persistance : est considérée comme la situation la plus fréquente en ce qui concerne le devenir des MN. Elle signifie la conservation du MN à l'intérieur du cytoplasme de la cellule en tant qu'une entité extranucléaire. Ce processus se produit lorsque le MN a pu effectuer un ou plusieurs cycles de répllication de l'ADN qu'il contient. Et cette rétention signifie que la dégradation, la réincorporation et l'extrusion ne se produisent pas dans de tels conditions expérimentales [49,50].

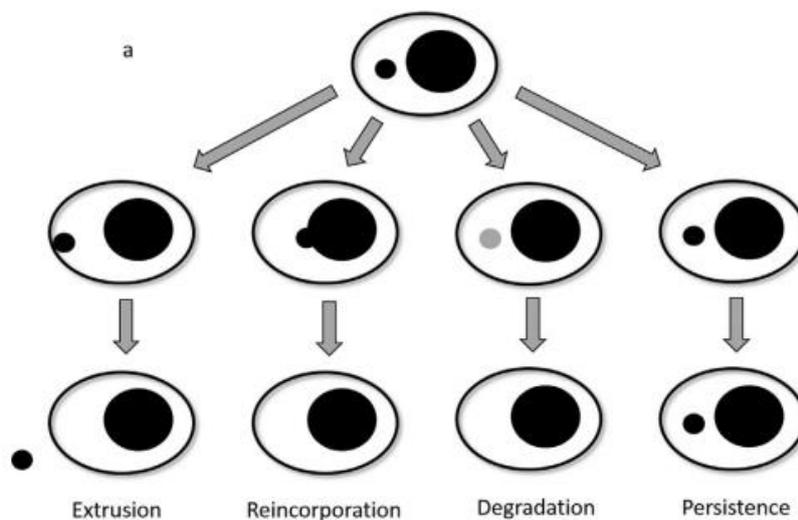


Figure 17: Schéma représentatif des quatre possibilités du devenir des MN (dégradation, réincorporation, extrusion et persistance) après leurs formations[50].

III.4) Le devenir des cellules comportant un MN :

Le devenir des cellules qui comportent un micronoyau est toujours en discussion, mais d'après les études portées sur ce point nous pouvons conclure qu'il existe deux voies possibles pour les cellules contenant un MN qui a persisté. Les deux voies s'articulent autour de la survie de la cellule micronucléée.

Si la cellule qui contient un MN a pu survivre et se diviser, elle peut aboutir par conséquence à un développement tumoral parce que comme déjà mentionner le MN est le résultat d'un agent clastogène ou aneugène, et les effets aneugène entraînent une aneuploïdie qui représente un événement crucial dans la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse. Même s'il existe des cas bien particulier de l'aneuploïdie et la polyploïdie qui sont compatibles avec la vie cellulaire, comme par exemple le cas du syndrome de Down pour les individus porteurs d'un troisième chromosome 21, et le cas du syndrome de Turner pour les individus ayant un seul chromosome X. Ces deux cas sont tout à fait viables, malgré leurs constitutions génétiques qui est anormale. Et nous avons aussi le phénomène de la chromothripsie, (multiples réarrangements qui se produisent au cours d'un seul événement cellulaire pour aboutir à la formation d'un ou de plusieurs chromosomes fortement remaniés), qui peut donner naissance à des chromosomes hyper-mutés, conduisant ainsi à un processus tumoral (cancer) [50].

Et si la cellule qui comporte un MN ne peut survivre et se diviser, on aura le phénomène de l'apoptose. Dans ce cas, la cellule ne présente pas de risque pour l'organisme mais au contraire, elle peut même faire partie du processus d'élimination des cellules dont l'ADN est endommagé, réduisant ainsi la survie des cellules qui peuvent initier un processus tumoral [50].

III.5) Les facteurs qui influencent la fréquence de la formation des MN :

Il existe de nombreux facteurs qui peuvent avoir un impact sur la fréquence de formation des MN. Parmi ces facteurs, nous allons citer que les principales sources de variabilités qui se représentent généralement en trois facteurs : l'âge, le genre et le mode de vie de l'individu.

D'après plusieurs études, le taux de MN est significativement plus élevé chez les personnes âgées et ceci est expliqué par l'accumulation des mutations qui est plus importante avec l'âge et aussi à cause de la diminution de l'efficacité du système de réparation des dommages de l'ADN. Et concernant le genre, on parle surtout de l'implication fréquente du chromosome X chez les femmes et du chromosome Y chez les hommes, dans les pertes chromosomiques. Ainsi

que selon l'analyse du caryotype, l'incidence de la perte du chromosome X chez les femmes est nettement plus élevée que celle du chromosome Y chez les hommes. Et ceci est peut-être expliqué par les changements hormonaux, qui sont plus importants chez les femmes que chez les hommes, et ces changements peuvent influencer l'aneuploïdie des chromosomes sexuels. Comme c'est le cas pour l'aneuploïdie des chromosomes X chez les femmes qui est influencée, par exemple, par la diminution des œstrogènes avec l'âge. Sans oublier aussi, l'importance du mode de vie de l'individu dans la formation de MN, parce que les personnes qui ne mangent pas sainement, qui ne pratiquent pas du sport, et surtout qui consomment de l'alcool et qui fument sont beaucoup plus susceptibles à la formation de MN [46,51].

III.6) Le test du Micronoyau MN :

a) Historique et Principe du test *in vitro* :

Il s'agit d'un essai de génotoxicité qui consiste à mettre en évidence les micronoyaux qui se trouvent dans le cytoplasme de cellules en interphase pour évaluer le potentiel génotoxique d'un produit chimique à étudier. En fait la première description du micronoyau était à la fin du 19^{ème} siècle lorsque Howell et Jolly ont trouvé des petites inclusions dans le sang prélevé des chats et des rats. Ces petites inclusions ont été observées aussi dans les érythrocytes du sang périphérique de patients atteints d'anémie sévère. Et donc ce sont ces entités qui représentaient le MN proprement dit. Ensuite en 1976 Countryman et Heddle, ont réalisé la première exécution du test des MN sur des lymphocytes. Et depuis plusieurs chercheurs ont participé au développement de ce test parmi eux, Fenech et Moley en 1985, ils ont proposé l'utilisation de la cytochalasine B, qui est une mycotoxine qui inhibe la polymérisation des microfilaments d'actine responsables de la formation du sillon de clivage lors de la télophase, afin d'exploiter la courte période durant laquelle la cellule est binucléée, mais pas encore divisée en cellules-filles. Et le tout c'est dans le but de réduire les défauts de décompte de MN parce que la fréquence des MN observés dépendait de la proportion des cellules ayant répondu à l'action de l'agent génotoxique, ainsi que du nombre de divisions cellulaires ayant survenues durant la période de culture avant la récolte cellulaire. Et depuis, ce test est largement appliqué dans plusieurs usages spécifiques tels que la surveillance humaine...[52].

Selon la ligne directrice 487 de l'OCDE/OECD, le principe de l'essai est que : durant ou après l'exposition au produit chimique de l'essai, les cellules (peuvent être d'origine humaine ou provenant d'autres mammifères) sont mises en culture pendant une période suffisante pour que la lésion chromosomique ou d'autres effets sur le cycle cellulaire ou la division cellulaire,

conduisent à la formation de micronoyaux dans les cellules en interphase. Ensuite les cellules récoltées en interphase sont colorées et soumises à une analyse microscopique en vue de détection de micronoyaux. En effet, l'examen des micronoyaux ne devrait être réalisé que dans les cellules ayant effectué une mitose durant l'exposition au produit chimique d'essai, ou pendant la période qui suit le traitement, si l'essai la prévoit. Il existe deux types de culture : des cultures ayant été exposées à un agent de blocage de la cytokinèse, et dans ce cas il suffit de procéder à l'examen des cellules binucléées. Et des cultures qui n'ont pas été exposées à un agent de blocage de la cytokinèse, et dans ce cas il est important de démontrer que les cellules analysées ont selon toute vraisemblance subi une mitose, d'après l'augmentation de la population cellulaire, pendant ou après l'exposition au produit chimique d'essai. Pour tous les protocoles, il convient de démontrer qu'une prolifération cellulaire a eu lieu tant dans les cultures témoins que dans les cultures traitées. Ainsi que le degré de cytotoxicité ou de cytotasie induit par le produit chimique d'essai doit être évalué pour toutes les cultures dans lesquelles est réalisé l'examen des micronoyaux [53]. Les étapes de ce test seront bien détaillées ultérieurement dans la partie Matériel et Méthodes.

b) Le test de MN et la technique de FISH :

Le test de MN peut être utilement complété par une technique qui va étudier le type et la qualité du matériel génétique trouvé dans le micronoyau. C'est la technique d'hybridation in situ fluorescente (technique FISH). Il s'agit d'une technique qui consiste à utiliser une séquence d'ADN comme sonde pancentromérique fluorescente qui reconnaît tous les centromères des chromosomes et elle permet la détection de la présence de ces derniers dans le MN. De ce fait, elle permet de savoir aussi si les produits étudiés sont des agents clastogènes : dans le cas où il n'y a pas de fluorescence donc il s'agit que des fragments chromosomiques sans centromère (MN C-). Ou des agents aneugènes : dans le cas où il y a la fluorescence et donc il s'agit des chromosomes entiers ou partiels avec la présence du centromère (MN C+). (Figure 18)

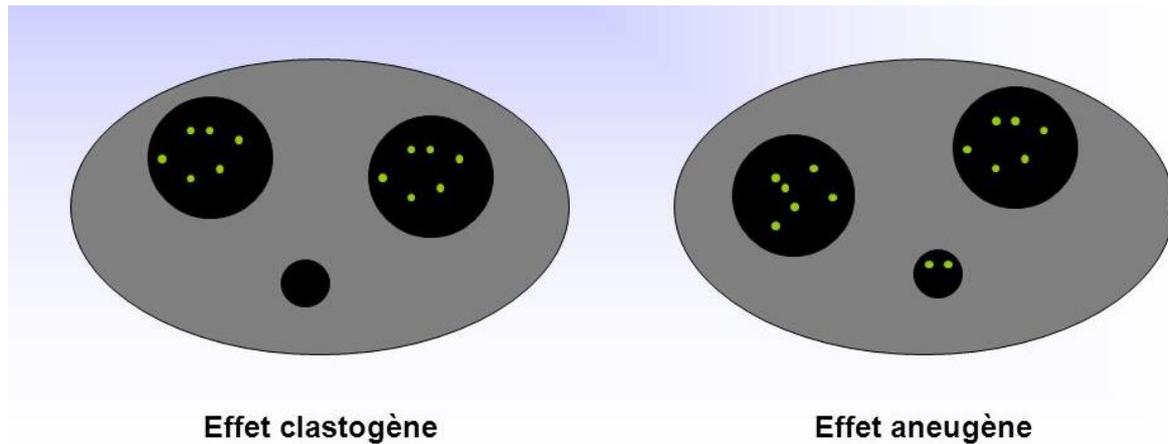


Figure 18: Schéma qui représente la distinction entre les effets aneugènes et clastogènes en mettant en évidence les centromères qui se trouvent dans les micronoyaux par l'action d'une sonde pancentromérique fluorescente [54].

c) Les domaines d'applications du test :

Comme nous venons de le mentionner, le test de MN est un test qui permet de détecter les micronoyaux dans les cellules qui ont subi une exposition à des agents génotoxiques ou supposés tel, il peut être utilisé sur tout type de cellules-cibles (cellules vésicales, endo buccales, fibroblastes, kératinocytes, etc.) y compris sur des cellules végétales, et il présente de nombreux usages spécifiques tel que : la biosurveillance de l'environnement ; où il est utilisé pour surveiller la pollution de l'air, des eaux de surface, des sols ou encore l'exposition de plantes, d'animaux, de champignons ou de microorganismes à des polluants mutagènes qui peuvent provenir par exemple des émissions de l'industrie ou de sites de déchets dangereux etc. Il est aussi largement utilisé en épidémiologie moléculaire et en cytogénétique afin d'évaluer la présence et l'étendue des dommages chromosomiques dans une population exposée à des agents génotoxiques ou pour étudier un profil génétique. Donc il est utilisé pour la surveillance des personnels potentiellement exposés à des agents mutagènes, surtout qu'il présente une valeur prédictive pour le risque de cancer. Comme il peut être utilisé pour évaluer des produits chimiques avant l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché. Il est également utilisé dans la recherche pour l'évaluation de produits anti-génotoxiques. Ainsi qu'il peut intervenir dans les études sur les dommages causés à l'ADN et aussi celles portées sur la réparation de l'ADN ou l'apoptose [55].

d) Les avantages et les inconvénients :

Le test de MN est un test applicable à toutes les cellules cibles, il est simple à réaliser, ses résultats sont fiables, le coût de la technique est peu élevé, il permet d'étudier la qualité du matériel génétique contenu dans le micronoyau lorsqu'il est couplé à technique de FISH, il est utile pour évaluer une exposition récente, il permet de faire la distinction entre les cellules apoptotiques, les cellules nécrotiques et les cellules sénescents. Et les limites que nous pouvons citer concernant ce test c'est qu'il ne détecte pas souvent toutes les aberrations chromosomiques et il présente un certain caractère invasif parce qu'il nécessite un prélèvement cellulaire [18].

e) Le test de MN *in vivo* :

Selon la ligne directrice 474 de l'OECD/OCDE, le test de MN peut être pratiqué aussi *in vivo* chez les mammifères, afin d'évaluer la génotoxicité d'une substance chimique par la détection de la formation de micronoyaux dans les érythrocytes provenant de la moelle osseuse ou dans les cellules du sang périphérique d'animaux qui sont généralement des rongeurs. En effet le principe de ce test consiste à exposer les animaux à la substance chimique que nous voulons tester par une voie d'exposition qui est adéquate. S'il est désiré d'utiliser la moelle osseuse, les animaux utilisés dans le test doivent être euthanasiés au moment approprié (le temps que la substance d'essai pénètre dans le tissu cible) après le traitement, et ensuite la moelle est extraite puis préparée sur des lames et colorée suivant des méthodes bien établies afin de l'examiner. Et lorsqu'il est souhaité d'utiliser le sang périphérique, ce dernier est prélevé au moment approprié après le traitement d'une façon qui est conforme aux normes en vigueur en matière de bien-être de l'animal, soit selon une méthode qui permet la survie de l'animal d'essai (par exemple prélèvement à partir de la veine caudale ou un autre vaisseau sanguin approprié), soit par ponction cardiaque ou prélèvement sur un vaisseau sanguin principal après l'euthanasie de l'animal, et ensuite les préparations sont réalisées et colorées pour les analyser. Ces préparations que ce soit celles de la moelle osseuse ou du sang périphérique sont analysées afin de détecter la présence de micronoyaux et ceci se fait par visualisation directe à l'aide d'un microscope, par analyse d'image, par cytométrie à balayage laser ou par cytométrie en flux. Il faut noter que le test de MN *in vivo* n'est considéré comme pertinent, que lorsqu'il est prouvé que la substance d'essai ou ses métabolites ont atteint le tissu cible sinon les résultats ne sont pas significatifs [41].

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES :

I) La lignée cellulaire utilisée :

Dans le cadre de la réalisation de cette étude, on a utilisé la lignée cellulaire CHO-K1 (Figure 19). C'est une lignée qui a été dérivée de la lignée cellulaire CHO parentale en tant que sous-clone. Elle a été obtenue la première fois en 1957 à partir d'une biopsie d'un ovaire d'un hamster chinois femelle adulte, et ce sont des cellules qui ont la morphologie des cellules épithéliales.

Cette lignée cellulaire représente une lignée qui est couramment utilisée dans la biotechnologie et la recherche en toxicologie et vue sa sensibilité, nous l'avons choisi comme un modèle pour la réalisation de ce test de micronoyau.

Alors dans le laboratoire, les cellules ont été stockées en cryotubes de 1 ml dans de l'azote liquide (-196°C) pour assurer une conservation à très long terme. Parce qu'en dessous de (-136°C), il est estimé que toutes les divisions cellulaires, ainsi que les processus métaboliques, sont arrêtées. Et du coup les échantillons peuvent être stockés théoriquement sans altérations ni modifications. Il s'agit de la cryoconservation, qui représente la seule méthode fiable existante reconnue.

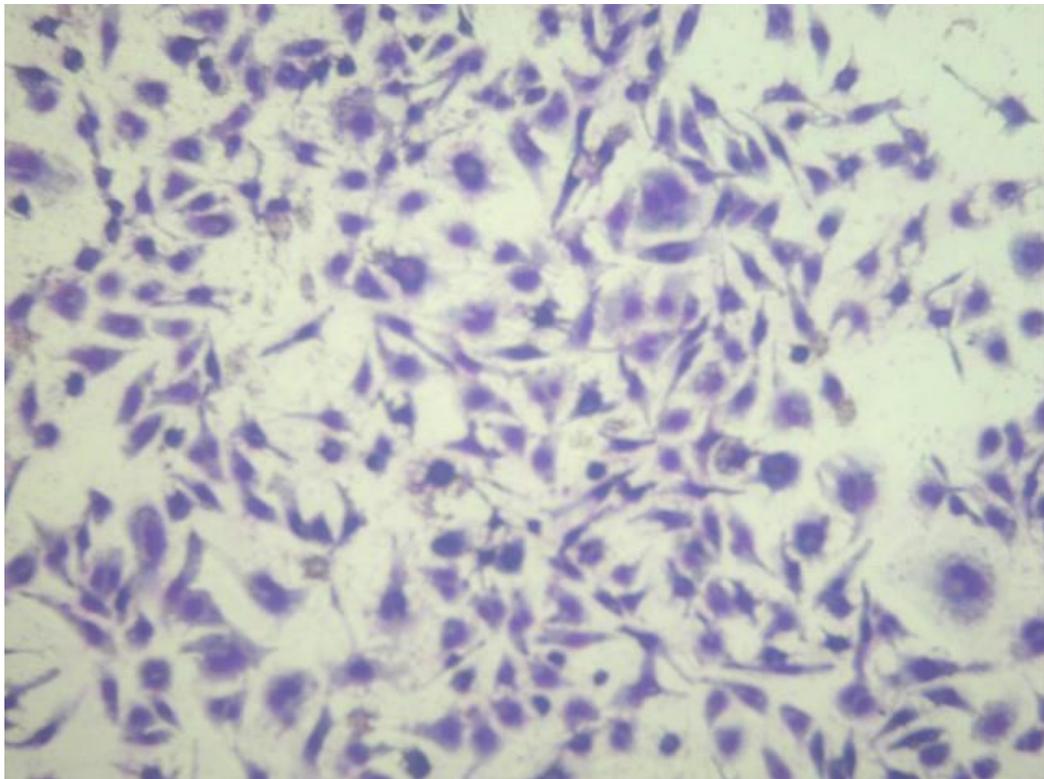


Figure 19: Une photo d'un tapis cellulaire de notre lignée cellulaire : CHO-K1.

II) Les techniques de la culture cellulaire :

a) Les bonnes pratiques de la culture cellulaire :

Les cellules sont très sensibles aux troubles de leur environnement. C'est pour cette raison qu'il faut être très attentif lors de la manipulation des cellules, et il faut respecter les normes de la pratique en culture cellulaire pour ne pas avoir des contaminations des cellules et aussi pour protéger le manipulateur.

Tout d'abord le manipulateur doit porter une blouse propre et qui est réservée au laboratoire de la culture cellulaire, des gants pour manipuler les cellules et des lunettes de sécurité.

Pour la manipulation sous la hotte, il existe des règles à respecter : comme le fait de désinfecter et de décontaminer tout le matériel avant de l'introduire à la hotte, de ne pas stocker les déchets et le matériel inutile à côté ou sous la hotte, d'allumer les UV avant et après chaque utilisation de la hotte afin de stériliser la surface de travail, de ne pas faire des mouvements brusques afin de ne pas générer des aérosols, de ne pas passer les mains au-dessus des récipients, de ne pas laisser les flacons de culture ou les milieux de culture ouverts inutilement, de travailler au milieu du plan de travail de la hotte et de ne pas être très proche de la veine de garde.

En ce qui concerne les étuves qui servent d'incubateurs, il faut minimiser la fréquence et la durée de leurs ouvertures, il faut les désinfecter dans le cas de projection de liquide mais il ne faut pas utiliser des désinfectants ayant un effet cytotoxique et il faut vérifier d'une façon régulière le contenu des flacons pour éliminer ceux où les cellules ne peuvent pas adhérer.

L'élimination se fait dans une autre pièce que celle de la culture cellulaire en ajoutant l'eau de javel aux flacons et après une nuit d'action on peut éliminer les déchets selon la procédure de chaque laboratoire. Sans oublier les bains-marie qu'il faut nettoyer régulièrement et renouveler l'eau d'une façon fréquente avec un antifongique, et il faut aussi utiliser un couvercle pour filtrer la lumière et limiter le développement des algues. Aussi pour les pipettes électriques il faut penser à changer les filtres régulièrement pour minimiser le nombre des sources de contamination. Et bien sûr le nettoyage et la désinfection des sols de laboratoire qui est aussi un point très important pour une bonne pratique en culture cellulaire.

b) Les étapes de la culture cellulaire :

La culture cellulaire est un processus qui permet aux cellules de se croître en dehors de leur milieu d'origine ou de l'organisme dont elles sont extraites afin de réaliser une expérimentation

scientifique. Dans cette étude nous nous sommes basés sur la culture des cellules CHO-K1 et ci-dessous nous allons décrire les étapes que nous avons suivies.

Tout d'abord et avant de commencer la première étape de la culture cellulaire, nous allumons les UV de la hotte aspirante pendant 20 à 30 minutes afin de stériliser le milieu de travail. Une fois les UV s'éteignent, il faut aller chercher les cellules qui sont conservés dans de l'azote liquide, avec toutes les mesures de préventions possible afin d'éviter tout risque d'asphyxie ou de brûlure, pour les mettre ensuite dans le bain marie à une température de 37° C. Ainsi que tous les réactifs dont nous aurons besoin pour la préparation du milieu de culture et qui ont été stocké dans un réfrigérateur de + 4°C. Maintenant et après que nous avons tout préparé pour la culture, nous pouvons commencer notre manipulation :

- **La préparation du milieu de culture : (Sous la hotte)**

Après avoir réchauffer les réactifs dans le bain marie à 37°C. Nous préparons ensuite le milieu de culture complet de 50 ml. Et pour faire ceci il faut 44 ml du milieu McCOys5a, 500 µl d'antibiotique pour éviter les contamination, 500 µl de glutamine pour enrichir le milieu de culture et 5 ml du sérum de veau fœtal (SVF) pour empêcher l'action de toute substance toxique pour les cellules. On homogénéise le mélange (on peut l'utiliser sur le champ comme on peut le conserver au réfrigérateur +4°C) et ensuite on passe à la décongélation des cellules.

- **La décongélation des cellules :**

Alors après avoir décongeler les cellules dans le bain marie à 37 °C, nous prenons un volume de 10 ml du milieu de culture complet que nous avons préparé, nous le mettons dans un petit flacon de culture de 25 cm³ et on ajoute le 1 ml de cellule contenu dans le cryotube. On mélange un peu le contenu du flacon pour bien disperser les cellules. Par la suite on examine le contenu du flacon et l'état des cellules par le microscope et on le met juste après dans l'étuve pendant 24h à 37°C, sous une atmosphère de 5% de CO₂, pour permettre aux cellules de retrouver les conditions pour se multiplier. Et après les 24h nous devons changer le milieu de culture.

- **Le changement de milieu : (Sous la hotte)**

Avant de changer le milieu, il faut observer l'aspect des cellules et vérifier que le tapis cellulaire est uniforme. La congélation des cellules nécessite le diméthylsulfoxyde (DMSO) donc le premier milieu où se trouvent les cellules après leur décongélation contient le DMSO qui est toxique pour les cellules parce qu'il est un agent cryoprotecteur. C'est pour cette raison qu'il faut changer le milieu pour assurer une bonne adhésion des cellules. Alors on élimine le milieu

qui est déjà dans le flacon, on ajoute à notre flacon 10 ml du milieu de culture complet frais déjà préparé. Et par la suite on incube pendant 3 jours à 37 °C avec observation quotidienne au microscope optique, qui permet de déceler d'éventuelles contaminations bactériennes et de suivre l'état de la croissance des cellules.

- **La trypsination : (Sous la hotte)**

Lorsque les cellules sont confluentes, elles doivent être repiquées puis passées dans des flacons plus grands. Ceci est réalisé à l'aide de la trypsine qui permet de détacher le tapis cellulaire formé dans le flacon. Alors tout d'abord on élimine le milieu de culture trouvé dans le flacon, on lave deux fois par 2ml de PBS pour enlever les traces de SVF qui inhibe la trypsine. Ensuite on ajoute 1 ml de la trypsine pour détacher les cellules en tapis, on la répartir sur tout le tapis cellulaire, après on doit vérifier sous le microscope que les cellules commencent à se détacher et qu'elles deviennent rondes, et par la suite on incube pendant 2 à 5min à 37°C. Le temps nécessaire au décollement du tapis cellulaire (ce dernier dépend de la lignée cellulaire). Pour éviter tout dommage de l'intégrité membranaire, qui peut résulter à la suite d'une longue exposition des cellules à la trypsine, après il faut arrêter l'effet de la trypsine en ajoutant 5 ml du milieu de culture complet qui contient du SVF. Par la suite on disperse soigneusement les cellules par aspiration et refoulement à la pipette et à chaque refoulement, il faut envoyer le liquide sur le fond de la bouteille pour finir le décollement des cellules. Après on peut repiquer les cellules dans un nouveau flasque moyen de 75 cm³ et les cellules sont ensuite mises à incuber pendant 3 jours, pour avoir une confluence de l'ordre de 80 %, à 37°C, dans une atmosphère de 5% de CO₂.

Généralement on effectue 4 à 5 passages avant de passer à la réalisation du test et à la congélation des cellules pour enrichir le stock.

- **La congélation des cellules :**

Les cellules que nous voulons conserver sont traités par la trypsine puis lavées au PBS et ensuite centrifugées à 1500 RPM (Revolutions Per Minute) pendant 15 min à 4°C. Après on récupère le culot cellulaire, on le remet en suspension dans 5 ml du milieu de culture complet déjà préparé et qui contient 20% de SVF. Par la suite on distribue la suspension cellulaire à raison de 1.106 cellules/ml soit 500µL par cryotube. Après on ajoute un volume de 500µl d'un milieu complet déjà préparé et refroidi à la glace et qui est constitué de 10 % SVF et 10 % DMSO. Ce volume est ajouté goutte à goutte afin de ne pas choquer les cellules. La congélation des cellules doit se faire à températures décroissantes de façon progressive. Dans un premier temps, les cryotubes

ont été conservés une heure à -20°C puis une nuit à -80°C puis transférés dans de l'azote liquide pour une conservation à moyen et long terme. Cette étape peut se faire avant la réalisation du test comme elle peut être effectuée après le test, dans notre cas on a congelé nos cellules avant la réalisation du test.

c) Détermination de la concentration des cellules (cellule de Malassez) :

Dans chaque puit de plaque, on doit avoir une concentration de $2 * 10^4$ cellule/ml. C'est pour cette raison qu'on effectue la numération par cellule de Malassez afin de déterminer la concentration de notre suspension cellulaire. Alors on trypsine les cellules de notre flacon, on ajoute le milieu de culture pour arrêter l'effet de la trypsine, ensuite on met le contenu dans un tube, et on récupère le culot cellulaire par centrifugation.

Après la récupération du culot, dans un nouveau tube on prend un volume de ce culot, on le dilue par du PBS selon un facteur de dilution qu'on choisit. On homogénéise le mélange, ensuite dans un autre tube on prend un volume à partir de la dilution effectuée et on dilue avec le bleu de trypan selon un facteur de dilution (souvent 1/5). On doit noter ces deux facteurs pour ne pas oublier de multiplier le résultat final du comptage par ces facteurs. Le bleu de trypan est un colorant d'exclusion parce qu'il est exclu de la membrane de cellules vivantes et il traverse que celle des cellules mortes. A partir de ce mélange (cellule avec bleu de trypan) on prend $20\mu\text{l}$ et on le dépose entre la lame et la lamelle de la cellule, on attend que les cellules se sédimentent pendant 5 min et on commence le comptage sous microscope.

Le comptage s'effectue de préférence dans 10 rectangles au hasard pour au moins 100 cellules. Chaque rectangle a un volume de $0.01\ \mu\text{l}$. Ce volume doit être multiplié par le nombre de rectangle où on a effectué le comptage pour avoir le volume totale. Ensuite on multiplie le nombre de cellule trouvés par ce volume totale afin d'avoir la concentration des cellules dans la chambre de comptage, et enfin cette concentration doit être multipliée par les deux facteurs de dilution effectuée pour avoir la concentration de notre suspension cellulaire. C'est à partir de cette concentration et selon le nombre des plaques que nous voulons préparer (ce nombre reflète le volume qu'on doit avoir : 1ml par puit et chaque plaque contient 6 puits) on va diluer notre suspension cellulaire (le reste du culot) d'une façon à avoir une concentration de $2 * 10^4$ cellules par puit. La dilution se fait en ajoutant le volume correspondant du milieu de culture complet.

III) Le test du micronoyau in vitro avec blocage de la cytodivision :

a) Préparation de la substance à étudier : Les benzothiazines

Dans ce test nous avons traité nos cellules avec la BD 3 qui est une dérivée du benzothiazine. Et comme mentionné précédemment, on va comparer nos résultats obtenus avec ceux de la molécule BD 7 qui représente la molécule à partir de laquelle la BD 3 a été synthétisée.

La BD 3 est soluble et stable dans le DMSO, il est donc considéré comme le solvant véhiculaire de notre molécule étudiée et c'est pour cela qu'on l'a utilisé en tant que contrôle négatif pour notre test. Ce dernier ne doit pas dépasser 0,5% afin de ne pas provoquer d'interférences avec les effets des substances à analyser ou d'affecter le fonctionnement cellulaire normal. De ce fait notre molécule est solubilisée dans ce solvant en vue d'avoir une concentration massique initiale de (250µg/ml). Pour cela on a pesé notre halicote, ensuite un calcul est effectué pour déterminer le volume de dilution correspondant et après une série de dilution a été préparée, commençant de la concentration initiale qui est de 250µg/ml jusqu'à 7.81µg/ml en effectuant des dilutions de demi en demi.

b) Préparation des plaques avec les contrôles positif et négatif :

Après avoir déterminé la concentration de la suspension cellulaire et diluer le reste du culot et la préparation du volume nécessaire pour la préparation de nos plaques, on va mettre 1 ml (Cellules + milieu de culture complet) dans chaque puits des plaques à analyser (2×10^4 cellules par puit), ensuite on incube nos plaques à 37 °C dans une atmosphère humidifiée à 5 % de CO₂ pendant 24h. Après le temps de l'incubation, on élimine le milieu de culture de tous les puits et on les lave par du PBS. Et à ce moment-là on peut traiter nos cellules avec les substances qu'on souhaite étudier.

Pour la vérification et la validation de la qualité de cette expérimentation, on doit avoir des contrôles positif et négatif qui ne vont pas être traités par les benzothiazines. Pour le contrôle positif, on ajoute la Mitomycine C 0,6 µg/ml parce qu'elle représente un agent clastogène qui aboutit à la formation des micronoyaux avec un taux élevé et pour le négatif on ajoute du DMSO comme mentionné précédemment.

c) Traitement des cellules par la substance de benzothiazines :

Une fois les plaques sont préparées avec les contrôles positif et négatif, on va exposer les cellules à la substance de notre étude qui s'agit, comme mentionné précédemment, d'un dérivé de benzothiazine et plus précisément de la BD 7 : c'est la BD 3 et elle va être testée en double.

On commence à traiter nos cellules par la BD 3 à 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, et 7.18 $\mu\text{g/ml}$. Une fois les cellules sont traitées, on va incuber une plaque pendant 24h et l'autre plaque pendant 3h, la molécule est testée est en double.

d) Blocage de la cytocinèse par la cytochalasine B :

Après l'incubation, les cellules sont lavées avec du PBS et ensuite un milieu de culture complet fraîchement préparé et qui contient une solution de la cytochalasine B qui permet d'arrêter la cytotérièse est ajouté aux différents puits (même les contrôles positif et négatif) avec une concentration finale de $3\mu\text{g/ml}$. Par la suite on incube nos plaques pendant 18h avant la récupération des cellules. Après le temps d'incubation les cellules sont lavées avec du PBS puis fixées à l'aide d'une solution qui se compose de 3 constitutions : Ethanol, Méthanol et A. Acétique pendant une minute, par la suite les cellules sont séchées à l'air libre avant de procéder à la coloration.

e) Coloration des frottis par Giemsa :

Après le séchage complet des cellules, on procède à la coloration par Giemsa afin d'effectuer notre examen microscopique. La coloration par Giemsa est une coloration basée sur l'utilisation d'un colorant bleu neutre constitué d'un colorant acide : l'éosine, et d'un colorant basique : l'azur de méthylène qui a la propriété de donner à certains tissus une teinte différente de sa couleur propre. Alors tout d'abord et selon le nombre de plaques qu'on veut colorer on estime le volume de la solution de travail giemsa 10% dont on aura besoin (soit 1 ml par puits). On laisse le colorant agir 8 à 10 min avec les cellules. Après le temps de coloration, on élimine doucement notre colorant Giemsa et on lave avec une solution d'eau tamponnée, jusqu'à ce qu'il ne reste plus de colorant. Par la suite, on fait sécher les cellules à l'air libre et une fois sécher on peut commencer à les analyser par le microscope.

f) Examen microscopique et énumération des MN :

L'examen microscopique représente la dernière étape pratique de notre test. C'est l'étape qui nous permet d'examiner les effets engendrés par notre substance étudiée. En énumérant dans chaque puit de la plaque, les micronoyaux trouvés dans 1000 cellules binucléées. Pour faire ceci on a utilisé le microscope optique et un compteur manuel des cellules.

- **Le comptage des cellules :**

Le compteur manuel des cellules est un petit appareil qui permet d'afficher un nombre entier à l'aide des gâchettes actionnables par le manipulateur. L'exertion d'une pression sur ces

gâchettes émet un son, afin de confirmer à l'utilisateur que la pression exercée a été prise en compte. Notre compteur est de 4 chiffres donc le nombre total maximal est de 9999 et ces chiffres sont affichés grâce à un dispositif d'affichage mécanique, avec un disque rotatif pour chaque chiffre. Ce compteur est également équipé d'une touche de remise à zéro. Le but de cet appareil est de faciliter le décompte, en permettant de se concentrer sur l'ensemble à dénombrer, sans avoir à garder le total en mémoire, ni à le remettre à jour mentalement à chaque modification.

C'est le mode de comptage le plus répandu dans les laboratoires, car il est rapide et très facile à mettre en œuvre ainsi que c'est l'utilisateur lui-même qui choisit de compter ou non certaines formes cellulaires. Dans le cadre de cette étude, on a compté les cellules binucléées, les MN des BN, les cellules mononucléées et les MN de ces derniers.

- **La lecture au microscope et le comptage des MN :**

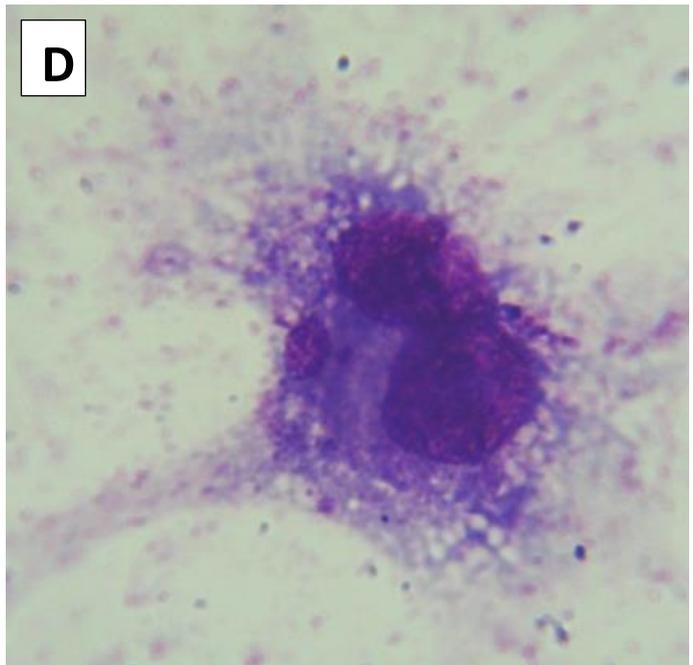
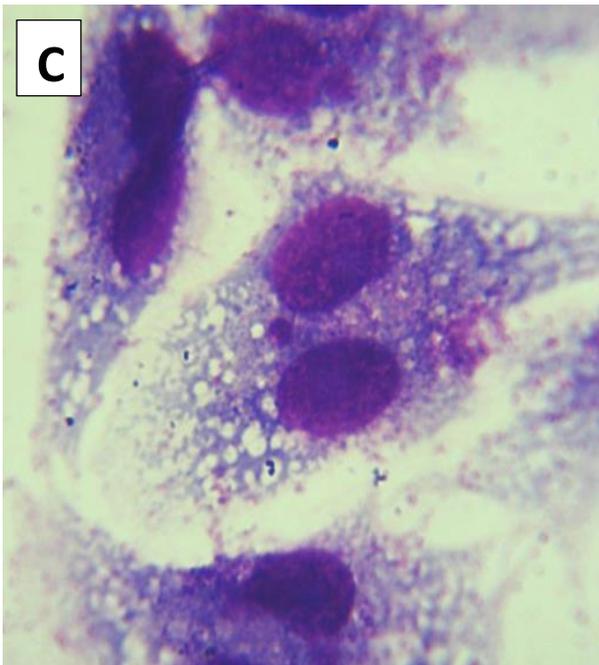
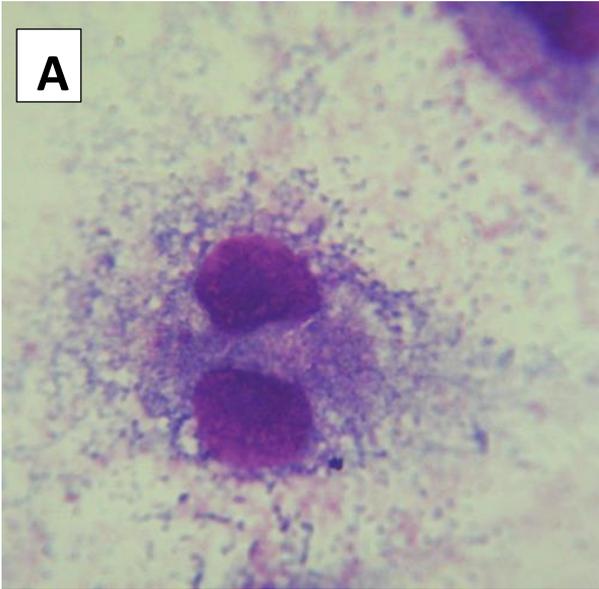
Pour chaque concentration 1000 cellules binucléées sont énumérées en comptant ainsi tous les MN trouvés dans ces cellules et aussi les cellules mononucléées pour pouvoir calculer l'indice de prolifération et avoir une idée sur la cytotoxicité/cytostase de la molécule. Les résultats de la lecture et de comptage seront présentés dans la partie Résultats et Discussion.

La lecture et la sélection des cellules binucléées et des micronoyaux doit suivre un certain nombre de critères afin de ne pas avoir des résultats faussés.

Tout d'abord pour la sélection des cellules binucléées : (Figure 20)

- ✓ Le cytoplasme de la cellule doit avoir une limite intacte et nettement distincte de celle des cellules voisines.
- ✓ Les limites des deux noyaux doivent être nettement distinctes, ces deux noyaux peuvent être proche mais ne doivent pas se chevaucher.
- ✓ La membrane nucléaire des deux noyaux doit être intacte.
- ✓ Les deux noyaux doivent avoir approximativement la même taille et la même intensité de coloration.

Ensuite pour la sélection des MN, on doit respecter les mêmes critères déjà mentionner dans la page 27 (Définition du MN), ainsi qu'il doit avoir une forme ronde ou ovoïde et il ne doit pas être réfringent sous la lumière du microscope. (Figure 20)



PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

I) Résultats:

La cytotoxicité des contrôles et du dérivé benzothiazinique est évaluée à l'aide de l'indice de prolifération (IP) , l'indice de prolifération est basé sur l'évaluation du taux de dédoublement de la population cellulaire , les substances cytotoxiques et cytostatiques font diminuer ce taux, et c'est l'indice de prolifération qui exprime mathématiquement toute variation de ces deux paramètres en fonction du nombre 'N' des cellules mononuclées et binucléées, pour cela on utilise ces deux paramètres entant qu'équivalents.

Dans ce rapport, on a retenu le terme cytotoxicité plutôt que cytostase et le calcul de l'indice de prolifération est estimé grâce à la formule suivante [56]:

$$IP = ((N \text{ (cellules mononuclées)} + (2 \times N \text{ (cellules binucléées})) / (\text{total de cellules comptés}).$$

La variation de cet indice est proportionnelle à celle de l'effet cytotoxique qui en est responsable, d'où la formule de calcul de la cytotoxicité relative à l'indice de prolifération :

$$\% \text{ Cytotoxicité} = 100 - ((IP \text{ test} - 1) / (IP \text{ Négatif Contrôle} - 1)) \times 100.$$

La fréquence des micronoyaux énumérés dans les binucléaires est déduite de la formule suivante :

$$\% \mu N = (\text{nombre de } \mu N \text{ dans les cellules binucléées (BN)} / \text{le nombre totale des BN}) \times 100.$$

Résultats du test à court terme :

Nous avons testé notre molécule pendant 4 heures en double, ci-dessous, nous avons les résultats obtenues (tableau I et II) :

Tableau I : Les résultats de la première plaque testée à court terme.

BD 3 (4h) (1 ^{ère} fois)	Dose de BD 3 ($\mu\text{g/ml}$)	MN	BN	%μN (BN)	CBPI	% Cytotoxicité
CN : DMSO 0.5%	-	42	458	2.6	1.91	-
CP : MMC 0.6$\mu\text{g/ml}$	-	214	286	18	-	37
P7	3.9	81	491	3.7	1.84	8
P6	7.18	159	341	3.4	1.68	25
P5	15.62	236	264	5.3	1.53	42
P4	31.25	334	164	4	1.32	64
P3	62.5	-	-	-	-	-
P2	125	-	-	-	-	-
P1	250	-	-	-	-	-

Tableau II : Les résultats de la deuxième plaque testée à court terme.

BD 3 (4h) (2 ^{ème} fois)	Dose de BD 3 ($\mu\text{g/ml}$)	MN	BN	%μN (BN)	CBPI	% Cytotoxicité
CN : DMSO 0.5%	-	42	458	2.6	1.91	-
CP : MMC 0.6$\mu\text{g/ml}$	-	214	286	18	-	37
P7	3.9	131	369	5.5	1.74	19
P6	7.8	140	360	4.4	1.72	21
P5	15.6	249	251	5.9	1.50	45
P4	31.2	354	146	6.9	1.29	68
P3	62.5	-	-	-	-	-
P2	125	-	-	-	-	-
P1	250	-	-	-	-	-

Nous avons combiné les résultats des deux plaques en effectuant la moyenne de % μ N et de cytotoxicité, le tableau ci-dessous représente le résultat final (Tableau III) :

Tableau III : La moyenne des résultats de plaque testée à court terme.

BD3	La moyenne de :	
	% cytox	% μ n
DMSO 0,5%	CBPI= 1.91	2,6
MMC 0,6 μ g/ml	37	18
Dose de BD3 (μ g/ml)		
62,5	-	-
31,2	66	5,5
15,6	43	5,6
7,8	23	3,9
3,9	13	4,6

A partir du tableau III, nous avons tracer le graphique ci-dessous pour mieux visualiser et discuter les résultats obtenus (Figure 21) :

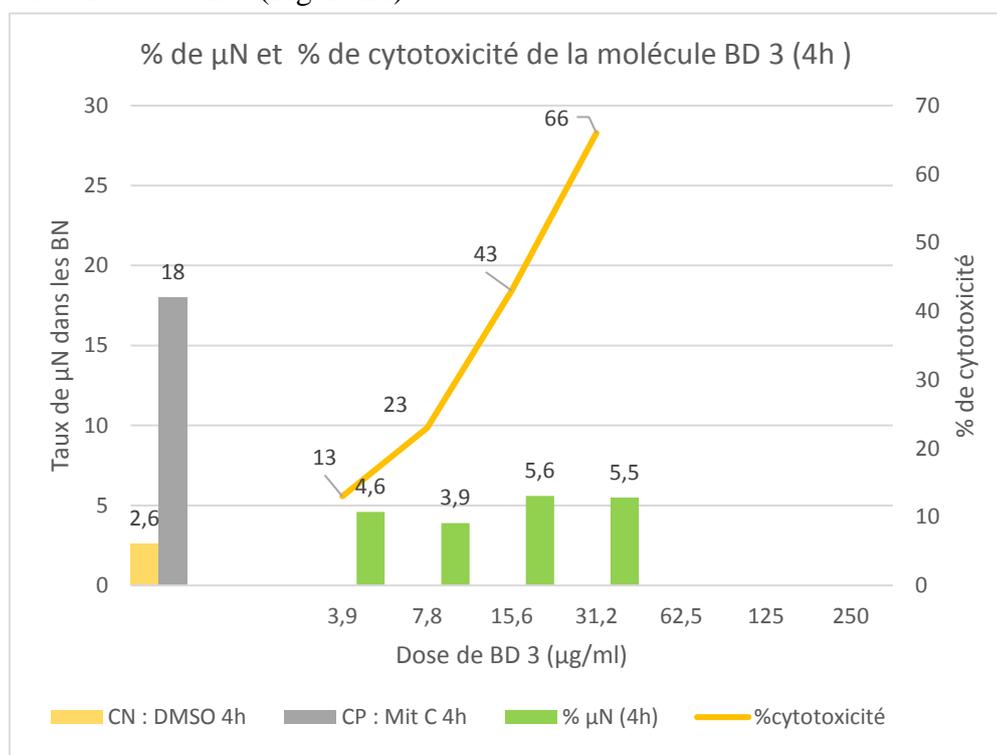


Figure 21 : Histogramme qui présente les résultats obtenus à partir de la BD 3 testé court terme.

Les résultats de la lecture de la plaque traitée par la Bd 3 à court terme (4 heures) sont présentés par le graphique ci-dessus : (figure 21)

Pour le contrôle négatif (CN) qui correspond au solvant DMSO 0.5%, on constate que son indice de prolifération est de 1.91 ce qui est considéré comme la cytotoxicité nulle, pour conclure qu'il n'y a pas de génération de cytotoxicité dans les conditions des manipulations. En ce qui concerne la génotoxicité, le CN a exprimé un taux de μN de 2.6 %. Ces réponses font partie des valeurs habituellement trouvés pour le CN.

Pour le contrôle positif (CP) correspondant au Mitomycine C (0.6 $\mu\text{g/ml}$), on constate que le taux de cytotoxicité est de 37%, qui représente une valeur significative. Ce qui nous permet de conclure que la MMC est une substance qui a le pouvoir de toxicité important vis-à-vis du modèle cellulaire. Ainsi le taux de μN généré à la suite de l'exposition des cellules à la MMC est de 18%, ce qui représente un taux très significatif par rapport au contrôle négatif. Donc MMC donne un résultat positif ce qui prouve que notre expérimentation est capable de détecter une expression d'effets génotoxiques par génération de micronoyaux. Les résultats obtenus par les contrôles CN et CP confirment la validité de notre test (Test de micronoyau).

Pour les cellules traitées par notre molécule BD3 avec les différentes doses allant de 3.9 jusqu'au 250 $\mu\text{g/ml}$, on constate que à partir de la concentration de 62.5 $\mu\text{g/ml}$ la cytotoxicité calculée à partir de l'indice de prolifération est très élevé. Ce qui explique l'absence ou la rareté des cellules viables et en bon état et qui peuvent faire l'objet de numération des micronoyaux pour les concentrations (62.5, 125, 250 $\mu\text{g/ml}$).

Pour les quatre autres concentrations (3.9, 7.8, 15.6, 31.2 $\mu\text{g/ml}$), on constate que le pourcentage de cytotoxicité augmente avec la dose. Pour la première concentration on a un taux de 13%, et ce taux va aller jusqu'au 66% pour la concentration de 31.2 $\mu\text{g/ml}$ passant par une cytotoxicité de 23% et 43% correspondant respectivement aux 7.8 et 15.6 $\mu\text{g/ml}$. Ce qui nous permet de dire qu'il existe une relation dose-effet pour notre molécule BD 3 au niveau cytotoxique.

Sur le plan génotoxique, pour les quatre premières concentrations (3.9, 7.8, 15.6, 31.2 $\mu\text{g/ml}$) nous avons des taux de micronoyau qui sont semblables. Pour la première concentration 3.9 $\mu\text{g/ml}$ on a un taux de micronoyau qui représente 1.76 fois la fréquence de micronoyau du contrôle négatif, pour la deuxième concentration 7.8 $\mu\text{g/ml}$ on a obtenu un taux qui 1.5 fois le % de μN que celui du contrôle négatif et pour les deux dernières concentrations (15.6 et 31.2 $\mu\text{g/ml}$) nous avons obtenu des taux qui sont presque identiques et qui représentent 2.11 fois la fréquence de micronoyau du contrôle négatif.

✚ Résultats de la plaque testée à long terme :

Notre molécule a été testée en double à long terme (24h), et ci-dessous nous avons les résultats obtenus (Tableau IV et V) :

Tableau IV : Les résultats de la première plaque testée à long terme.

BD 3 (24h) (1 ^{ère} fois)	Dose de BD 3 ($\mu\text{g/ml}$)	MN	BN	%μN (BN)	CBPI	% Cytotoxicité
CN : DMSO 0.5%	-	80	420	3.4	1.84	-
CP : MMC 0.6$\mu\text{g/ml}$	-	300	200	25	-	56
P7	3.9	63	437	6.3	1.847	4
P6	7.8	76	424	6.5	1.848	7
P5	15.62	-	-	-	-	-
P4	31.25	-	-	-	-	-
P3	62.5	-	-	-	-	-
P2	125	-	-	-	-	-
P1	250	-	-	-	-	-

Tableau V : Les résultats de la deuxième plaque testée à long terme.

BD 3 (24h) (2 ^{ème} fois)	Dose de BD 3 ($\mu\text{g/ml}$)	MN	BN	%μN (BN)	CBPI	% Cytotoxicité
CN : DMSO 0.5%	-	80	420	3.4	1.84	-
CP : MMC 0.6$\mu\text{g/ml}$	-	300	200	25	-	56
P7	3.9	86	414	7.9	1.784	9
P6	7.8	108	392	8.3	1.784	14
P5	15.62	-	-	-	-	-
P4	31.25	-	-	-	-	-
P3	62.5	-	-	-	-	-
P2	125	-	-	-	-	-
P1	250	-	-	-	-	-

Nous avons combiné les résultats des deux plaques de 24 heures en effectuant la moyenne des % de μ N et de cytotoxicité, le tableau ci-dessous représente le résultat final (Tableau VI) :

Tableau VI : Les résultats finals de la plaque testée à long terme (pendant 24h).

BD3 (24h)	La moyenne de :	
	% cytotoxicité	% μ n
DMSO 0,5%	CBPI=1.84	3,4
MMC 0,6 μ g/ml	56	25
DEBD3 (μ g/ml)		
62,5	-	-
31,2	-	-
15,6	-	-
7,8	10	7,4
3,9	6	7,1

A partir du tableau VI, nous avons tracer le graphique ci-dessous pour mieux visualiser et discuter les résultats obtenus (Figure 22) :

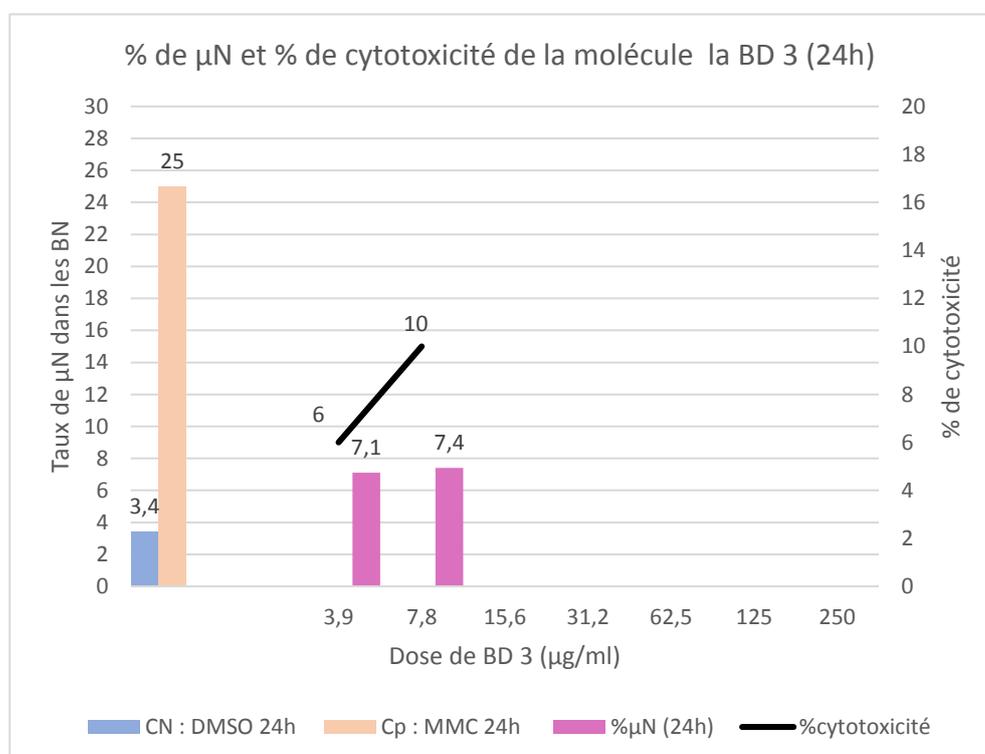


Figure 22 : Histogramme représentant les résultats obtenus à partir de la BD 3 testée à long terme.

Les résultats de la lecture de la plaque traitée par la Bd 3 à long terme (24 heures) sont présentés par le graphique ci-dessus : (figure 22)

Pour ce test à long terme, le contrôle négatif (DMSO 0.5%) et le contrôle positif (MMC 0.6µg/ml) ont donné des résultats qui sont relativement élevées par rapport au test à court terme en restant dans les valeurs habituelles. Ce qui nous permet de confirmer encore une fois la validité de notre test.

Le contrôle négatif a donné un IP de 1,84%. C'est une valeur acceptable au point de vue cytotoxique. Et sur le plan génotoxique, on a un taux de µN qui est de 3.4% qui reste aussi un pourcentage qui fait partie des valeurs habituelles du contrôles négatifs.

Pour le contrôle positif, on constate que le taux de cytotoxicité est de 56%. C'est une valeur très significative. Et sur le plan génotoxique, le taux de µN généré à la suite de l'exposition des cellules à la MMC, est de 25%. C'est un taux qui est très élevé par rapport au contrôle négatif.

Pour les cellules traitées par notre molécule BD3 avec les différentes doses allant de 3.9 jusqu'au 250 µg/ml pendant 24h, on constate qu'à partir de la concentration de 15.6 µg/ml le taux de cytotoxicité est élevé. Ce qui peut expliquer l'absence des cellules qui sont viables et en bon état pour la numération des micronoyaux à ces concentrations (15.6, 31.2, 62.5, 125, 250 µg/ml). C'est-à-dire à partir de la concentration de 15.63µg/ml, la cytotoxicité est très élevée ce qui nous a empêcher d'évaluer la génotoxicité de notre molécule à ces concentrations pour le test à long terme.

Pour les deux autres concentrations (7.8, 3.9µg/ml), on constate une cytotoxicité de 10% qui correspond à la concentration de 7.8µg/ml et cette cytotoxicité est de 6% pour la dernière dose du traitement 3.9µg/ml. Donc la cytotoxicité à ces doses permettra la numération des micronoyaux.

Sur le plan génotoxique, on a des taux de micronoyaux qui sont presque identique dans les deux doses : 7.4% de µN pour 7.8µg/ml et 7.1 % µN pour 3.9 µg/ml. Ces taux représentent 2 fois le %µN trouvé pour le contrôle négatif. Ainsi qu'elles sont des valeurs significatives sur le plan génotoxique de notre molécule BD 3.

Récapitulatif des résultats :

Nous pouvons conclure que les résultats obtenus par les contrôles CN et CP confirment la **validité de notre test** (Test de micronoyau) et notre molécule « la BD 3 » présente **un effet cytotoxique très important** à partir de la concentration de 31.12µg/ml pour le test à court terme

et à partir de 15.2 µg/ml pour le test à long terme. Comme elle présente **un effet génotoxique** mais **qui est relativement faible** et qui a été évalué par la génération de micronoyaux à partir de la concentration de 31.2 µg/ml pour le test à court terme et de 7.8µg/ml pour le test à long terme.

II) La discussion :

Vu l'absence des données scientifiques qui traitent la valorisation de ces molécules par le test de micronoyaux, la discussion est portée sur la validation du test, le temps d'incubation et la comparaison de la molécule testée avec la molécule BD7.

a) La validation du test :

Le test de CBMN sur la lignée cellulaire de l'ovaire de hamster chinois CHO-K1 a été utilisé conformément aux recommandations du protocole de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE)[41].

Pour la validation du test, selon [2], les différents contrôles doivent obéir à des valeurs appropriées et la validation de la méthode repose sur les dommages cytogénétiques spontanés qui doivent être limités avec l'utilisation de la cytochalasine B. Aussi, il est indispensable que les résultats des traitements, à court et à long terme, soient en accord avec les valeurs appropriées pour l'évaluation des micronoyaux [42].

En effet le contrôle négatif (CN) qui correspond au solvant DMSO 0.5%, dont l'indice de prolifération est de 1.91, représente la cytotoxicité spontanée du test, cette cytotoxicité rentre dans les valeurs habituelles des manipulations, ainsi que le taux de micronoyaux générés. Aussi la cytotoxicité et le taux de μN du contrôle positif (CP) significatifs témoignent de l'aptitude du test à la détection des dommages cytogénétiques éventuels.

b) Le temps du test (4h et 24h) :

D'après les résultats obtenus, on constate qu'il y a une différence entre les résultats du test à court terme et du test à long terme. C'est pour cette raison que nous avons combiné les deux graphiques afin de mieux comparer et discuter ces différences (Figure 23).

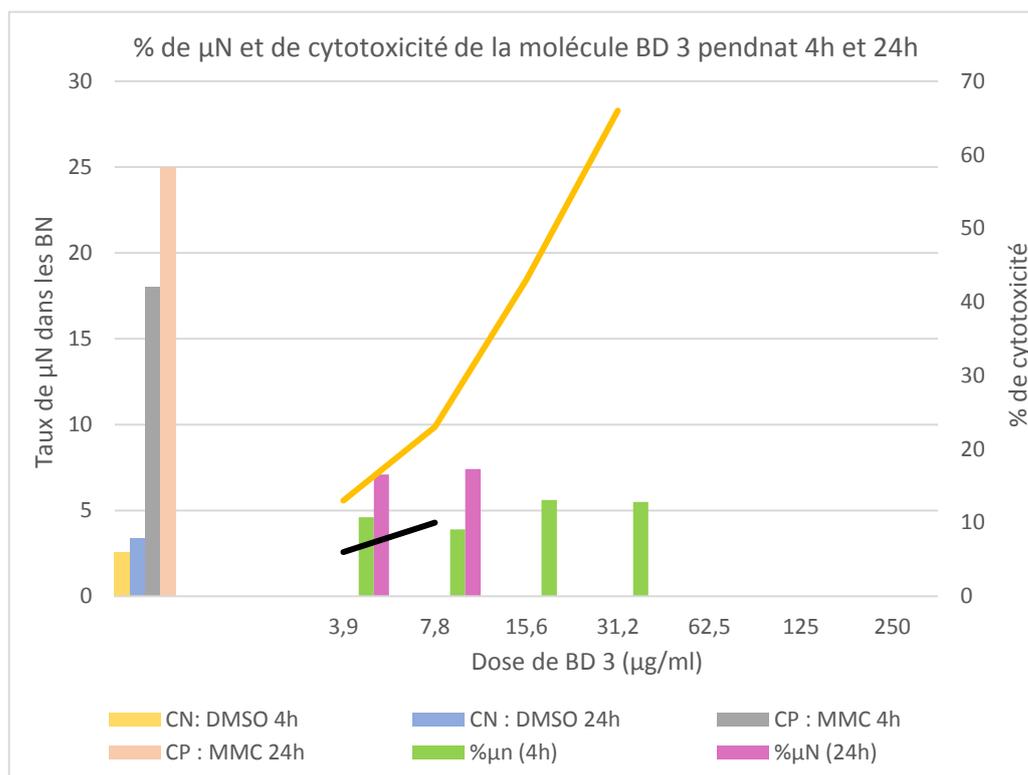


Figure 23: Histogramme présentant les résultats des tests pendant 4h et 24h.

Pour les contrôles négatifs (4h et 24h), il y a une légère différence sur le plan cytotoxique (1.91 % et 1.84% de IP) et aussi sur le plan génotoxique (2.6% et 3.4%). Donc on peut dire que par rapport au DMSO le temps d'incubation n'a pas une influence qui est très significative.

Pour les contrôles positifs (4h et 24h), il y'a une différence qui est remarquable sur le plan cytotoxique (37% et 56%) ainsi que le plan génotoxique (18% et 25%). Donc on peut dire que le temps d'incubation par rapport à la MMC 0.6μg/ml joue un rôle assez important dans la génération de la cytotoxicité et la génotoxicité. Plus la durée d'incubation est longue plus les taux de cytotoxicité et de génotoxicité générés sont élevés.

Dans la plaque testée à court terme (4h), la première dose létale trouvée c'était à partir de la concentration de 62.5μg/ml alors que pour le test à long terme (24h) c'est à partir de 15.6μg/ml. La première dose létale obtenue pour le test à court terme représente 4 fois celle du test à long terme. Donc plus que la durée de l'exposition des cellules à notre substance est longue plus que la valeur de la première dose létale est petite.

Les deux doses suivantes 3.9 μg/ml et 7.8μg/ml représentent les seules concentrations où nous avons une génération de génotoxicité et de cytotoxicité dans les plaques testées pendant les deux durées (4h et 24h). Pour les plaques de 24h le taux de μN pour ces deux concentrations représente 1.5 fois le taux obtenu dans les plaques de 4h.

Et sur le plan cytotoxique, pour la concentration 3.9µg/ml testée pendant 24h le taux de cytotoxicité est de 1.3 fois le taux obtenu pendant 4h pour la même concentration. Et pour la concentration de 7.8µg/ml testée pendant 24h nous avons obtenu un taux de cytotoxicité qui représente 2.56 fois celui obtenu pendant 4h pour la même concentration.

A partir de cette comparaison, nous pouvons conclure que **le temps de l'exposition des cellules à notre substance présente une grande influence sur le plan cytotoxique et aussi sur le plan génotoxique**. De ce fait il faut prendre en considération le temps de l'exposition des cellules aux substances étudiées en vue d'évaluer les propriétés génotoxiques grâce au test de micronoyaux.

c) Comparaison des effets de la molécule BD 3 avec les effets de BD 7 :

Comme pour la molécule BD 7, la molécule BD3 provient des réarrangements du (1,4-Benzothiazin-3-one). Donc la molécule BD 7 représente une molécule de comparaison pour notre substance étudiée. Cette molécule a fait l'objet d'un article scientifique de *H. JADDI et al* qui est en cours de publication. L'article a évalué les propriétés génotoxique et cytotoxique de la molécule BD 7 par le test CBMN assay porté sur la lignée cellulaire des CHO. Les résultats de l'article sont les suivant : Figure 24(cytotoxicité) et figure 25 (génotoxicité).

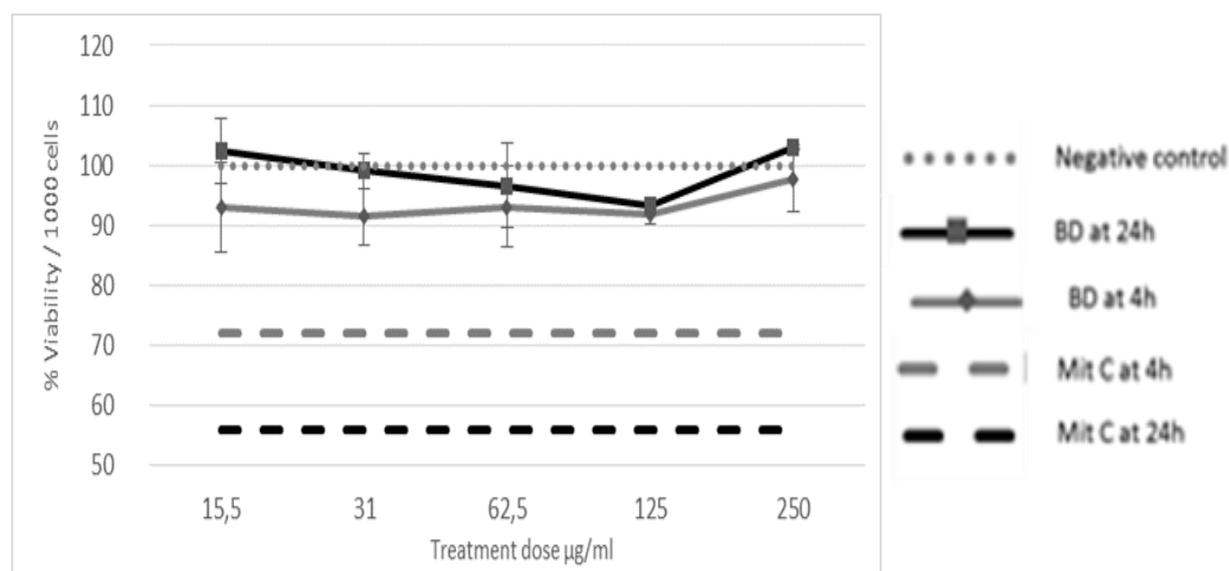


Figure 24: Viabilité des cellules en fonction des doses du traitement par la BD7.

D'après cette figure, on constate que la viabilité des cellules traitées par la BD 7 pendant 24h et 4h est presque identique que celle du contrôle négatif. Donc la dérivée BD 7 ne présente pas d'effet toxique pour les cellules. Alors que la BD 3 qui est dérivé à partir de cette molécule présente une cytotoxicité très importante comme mentionné précédemment.

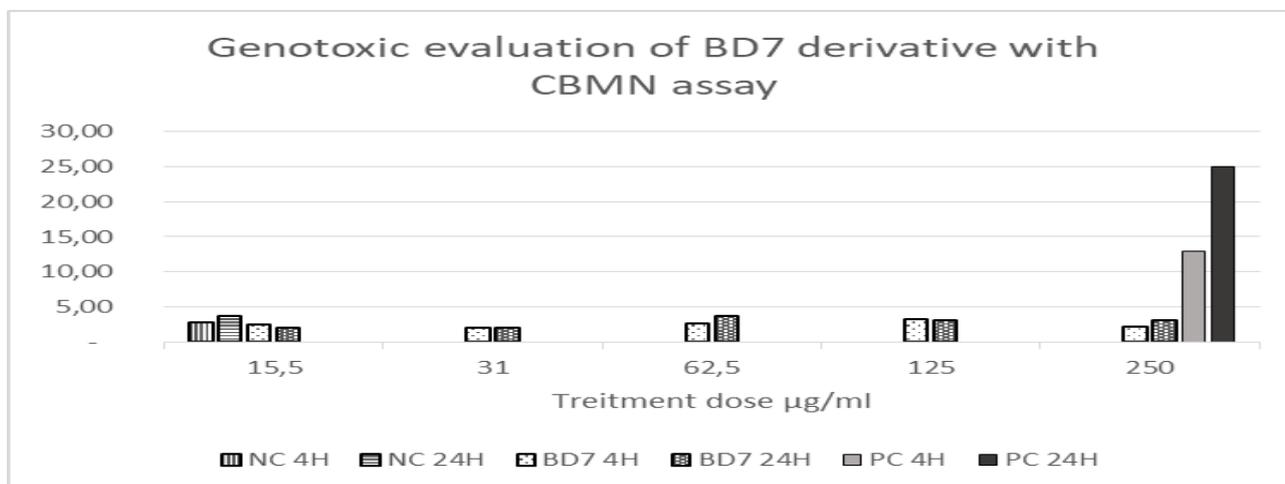
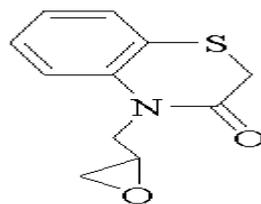


Figure 25: L'évaluation de la génotoxicité de la dérivé BD 7 par le CBMN assay.

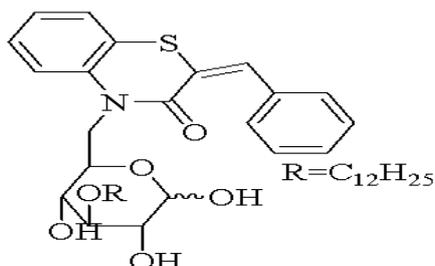
D'après cette figure, on constate que la génotoxicité générée par la molécule BD 7 pendant 4h ou pendant 24h est presque la même et elle se limite à l'intervalle des contrôles négatifs. De ce fait la molécule ne présente pas d'effet génotoxique pour les cellules. Alors que la molécule de notre étude et qui dérive de la BD 7 présente un effet génotoxique même si cet effet est relativement faible.

Sachant que l'activité biologique des benzothiazines est due à sa composition atomique et son organisation moléculaire (Fringuelli), nous pouvons conclure, nous pouvons conclure, d'après cette comparaison, que l'effet cytotoxique et génotoxique présenté par la molécule BD3 lors de ce test de micronoyaux peut être expliqué par la différence de réarrangements subits par la molécule (1,4-Benzothiazin-3-one) lors de la synthèse des deux molécules. Car les deux molécules (BD 3 et BD 7) ont été testées en double, par le même test, sur la même lignée cellulaire et avec les mêmes concentrations. Alors que la molécule de notre étude BD3 a présente des effets différents de la molécule BD 7 au point de vue cytotoxique et génotoxique.

La structure de la molécule de référence BD 7 :



La structure de la molécule BD 3 :



À partir des résultats de cette étude, nous pouvons conclure que la durée du test de micronoyau présente une influence très importante sur l'effet cytotoxique évalué par l'indice de prolifération et aussi sur l'effet génotoxique évalué par le taux de micronoyau généré par la molécule de synthèse étudiée. Donc la durée du test est un paramètre très important à prendre en considération lors de l'application du test.

La molécule BD3 a présenté des résultats différents sur le plan cytotoxique et génotoxique (effet cytotoxique très important et effet génotoxique faible) par rapport à la molécule BD7 (pas d'effet génotoxique et cytotoxique). Donc cette différence d'effets est peut-être due à la différence de réarrangement entre la molécule BD7 et la molécule la BD3.

Conclusion et perspectives :

Dans notre étude, nous avons évalué le potentiel génotoxique et cytotoxique de la molécule des benzothiazines (BD3), par le test de micronoyaux *in vitro* avec blocage de la cytodierèse (CBMN assay).

À travers les résultats obtenus, nous pouvons dire que la BD3 présente un effet génotoxique faible avec une activité cytotoxique importante. Ces effets sont différents de ceux de la molécule BD7 qui ne présente aucun effet génotoxique ou cytotoxique selon l'intervalle de concentrations testées.

En conclusion, notre projet de recherche montre que le test du micronoyaux avec blocage de la cytodierèse *in vitro* est un test fiable qui nous a permis d'obtenir des résultats reproductibles afin d'évaluer l'effet de molécules de synthèses sur le plan génotoxique par l'induction de micronoyaux et sur le plan cytotoxique par l'indice de prolifération. Ce test, même s'il est fiable et facile à monter, sa réussite demande de l'expérience et une certaine précision lors de la lecture microscopique.

En perspectives ces résultats sont :

- ✓ À confronter avec d'autres tests de génotoxicité et aux autres tests de cytotoxicité afin de mieux valoriser cette molécule.
- ✓ Tester d'autres dérivés de ces molécules pour comparer les résultats et avoir des conclusions solides.
- ✓ Rendre le test du micronoyaux, un test utilisable à l'échelle nationale pour le suivi des employés qui s'exposent quotidiennement aux agents génotoxiques.

Références Bibliographiques :

- [1] Cachot J, Dégremont C. Quel risque pour les espèces aquatiques ? n.d.:38.
- [2] Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res Mutagen Relat Subj* 1985;147:29–36. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(85\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(85)90015-9).
- [3] Partin AW, Dmochowski RR, Kavoussi LR, Peters CA, editors. *Campbell-walsh-wein urology*. 12th ed. Philadelphia: Elsevier; 2020.
- [4] N.d. https://www.reussite-bac.com/imprimer/revisions/TST2S/biologie-humaine/fiches-de-revision/le-chromosome-au-cours-du-cycle-cellulaire-tst2s_bio_08 (accessed May 10, 2022).
- [5] Alloprof aide aux devoirs | Alloprof n.d. <https://www.alloprof.qc.ca/fr/elevs/bv/sciences/les-etapes-de-la-mitose-notions-avancees-s1530> (accessed July 15, 2022).
- [6] Les phases du cycle cellulaire en détail n.d. <https://www.aquaportail.com/article-288-les-phases-du-cycle-cellulaire-en-detail.html> (accessed May 10, 2022).
- [7] Gardès-Albert M, Bonnefont-Rousselot D, Abedinzadeh Z. Espèces réactives de l’oxygène n.d.:6.
- [8] Hoeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 2001;411:366–74. <https://doi.org/10.1038/35077232>.
- [9] Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 1991;352:345–7. <https://doi.org/10.1038/352345a0>.
- [10] Thybaud V. Existe-t-il une dose seuil pour les effets génotoxiques ? *Arch Mal Prof Environ* 2012;73:658–66. <https://doi.org/10.1016/j.admp.2012.06.001>.
- [11] Bolt HM, Foth H, Hengstler JG, Degen GH. Carcinogenicity categorization of chemicals—new aspects to be considered in a European perspective. *Toxicol Lett* 2004;151:29–41. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2004.04.004>.
- [12] Rayonnements ionisants, effets sur la santé et mesures de protection n.d. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/ionizing-radiation-health-effects-and-protective-measures> (accessed July 15, 2022).
- [13] Rayonnement non ionisant — Wikipédia n.d. https://fr.wikipedia.org/wiki/Rayonnement_non_ionisant (accessed July 15, 2022).
- [14] Gupta P. Disposition. *Illus. Toxicol.*, Elsevier; 2018, p. 67–106. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813213-5.00002-X>.
- [15] Taburet AM, Furlan V. Le système des cytochromes P450 : définition, rôle et implication dans la pharmacocinétique des anti-infectieux. *M ISE AU POINT* 2000:6.
- [16] Dimassi S, Tilla M, Sanlaville D. Anomalies chromosomiques. *J Pédiatrie Puériculture* 2017;30:249–70. <https://doi.org/10.1016/j.jpp.2017.09.007>.
- [17] Mateuca R, Lombaert N, Aka PV, Decordier I, Kirsch-Volders M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. *Biochimie* 2006;88:1515–31. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.004>.
- [18] Fardel O, Vernhet L, Nouvel V. Utilisation des tests de génotoxicité pour la surveillance de l’exposition des travailleurs dans l’industrie du traitement et recyclage des déchets n.d.:18.
- [19] Mutation Anomalie De Chromosome Illustration de Vecteur - Illustration du mitose, mutations: 66484915 n.d. <https://fr.dreamstime.com/illustration-stock-mutation-anomalie-chromosome-image66484915> (accessed May 26, 2022).

- [20] Pourquier P, Robert J. Présentation générale des mécanismes de réparation de l'ADN. *Bull Cancer (Paris)* 2011;98:229–37. <https://doi.org/10.1684/bdc.2011.1323>.
- [21] Nospikel T. DNA Repair in Mammalian Cells: Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:994–1009. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8737-y>.
- [22] Cleaver JE, Lam ET, Revet I. Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nat Rev Genet* 2009;10:756–68. <https://doi.org/10.1038/nrg2663>.
- [23] Kurz EU, Lees-Miller SP. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. *DNA Repair* 2004;3:889–900. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.029>.
- [24] Pardo B, Gómez-González B, Aguilera A. DNA Repair in Mammalian Cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:1039–56. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-8740-3>.
- [25] Godet E, Vasseur B, Sabut M. Essais de génotoxicité in vitro et in vivo applicables à l'environnement hydrique. *Rev Sci Eau* 2005;6:285–314. <https://doi.org/10.7202/705177ar>.
- [26] Ames BN, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res Mutagen Relat Subj* 1975;31:347–63. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90046-1](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90046-1).
- [27] Péliissier AL, uffaut F, De Méo MP, Botta A. Le test d'Ames: Application aux urines de fumeurs. *Rev Médecine Interne* 1996;17:635–9. [https://doi.org/10.1016/0248-8663\(96\)87149-9](https://doi.org/10.1016/0248-8663(96)87149-9).
- [28] Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res Mutagen Relat Subj* 1983;113:173–215. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](https://doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9).
- [29] Déroulement d'un test d'Ames. Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., | Download Scientific Diagram n.d. https://www.researchgate.net/figure/Deroulement-dun-test-dAmes-Copyright-C-2006-Pearson-Education-Inc_fig3_285061897 (accessed July 15, 2022).
- [30] Dhawan A, Bajpayee M, Springer Science+Business Media, editors. *Genotoxicity assessment: methods and protocols*. New York: Humana Press; 2013.
- [31] Cheli C, DeFrancesco D, Petruccio LA, McCoy EC, Rosenkranz HS. The salmonella mutagenicity assay: Reproducibility. *Mutat Res Mutagen Relat Subj* 1980;74:145–50. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(80\)90239-3](https://doi.org/10.1016/0165-1161(80)90239-3).
- [32] Test No. 476: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xpRT genes | en | OECD n.d. <https://www.oecd.org/chemicalsafety/test-no-476-in-vitro-mammalian-cell-gene-mutation-tests-using-the-hprt-and-xprt-genes-9789264264809-en.htm> (accessed May 18, 2022).
- [33] Stout JT, Caskey CT. HPRT: GENE STRUCTURE, EXPRESSION, AND MUTATION. *Annu Rev Genet* 1985;19:127–48. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.19.120185.001015>.
- [34] Collins AR. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. *Mol Biotechnol* 2004;26:249–61. <https://doi.org/10.1385/MB:26:3:249>.
- [35] Pfohl-Leszkowicz A, Guillemaut G, Masfaraud JF, Rether B, Haguenoer JM. Détection des adduits à l'ADN comme biomarqueurs d'exposition aux substances génotoxiques de l'environnement. *Pollut Atmos* 1995. <https://doi.org/10.4267/pollution-atmospherique.4019>.

- [36] Les biomarqueurs en cancérologie | Fondation contre le Cancer n.d. <https://www.cancer.be/le-cancer/examens-m-dicaux/biomarqueurs/les-biomarqueurs-en-canc-ologie> (accessed May 31, 2022).
- [37] Orsière T, Iarmarcovai G, Botta A. Les micronoyaux, un biomarqueur de susceptibilité ? *Arch Mal Prof Environ* 2008;69:475–84. <https://doi.org/10.1016/j.admp.2008.02.002>.
- [38] Blaauboer BJ. Biokinetic Modeling and *in Vitro* – *in Vivo* Extrapolations. *J Toxicol Environ Health Part B* 2010;13:242–52. <https://doi.org/10.1080/10937404.2010.483940>.
- [39] Bolt HM, Hengstler JG. Most cited articles in the Archives of Toxicology: the debate about possibilities and limitations of *in vitro* toxicity tests and replacement of *in vivo* studies. *Arch Toxicol* 2008;82:881–3. <https://doi.org/10.1007/s00204-008-0379-6>.
- [40] Clare G. Industrial Genotoxicology Group (IGG): Cytotoxicity *In Vitro*, Royal Society of Medicine, London, UK, 6 December 1999. *Mutagenesis* 2001;16:179–82. <https://doi.org/10.1093/mutage/16.2.179>.
- [41] Essai n° 487 : Essai *in vitro* de micronoyaux sur cellules de mammifères | Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques, Section 4 : Effets sur la santé | OECD iLibrary n.d. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/essai-n-487-essai-in-vitro-de-micronoyaux-sur-cellules-de-mammiferes_9789264264878-fr (accessed June 11, 2022).
- [42] Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* 2007;2:1084–104. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.77>.
- [43] Samanta S, Dey P. Micronucleus and its applications. *Diagn Cytopathol* 2012;40:84–90. <https://doi.org/10.1002/dc.21592>.
- [44] Lindberg HK, Falck GC-M, Jarventaus H, Norppa H. Characterization of chromosomes and chromosomal fragments in human lymphocyte micronuclei by telomeric and centromeric FISH. *Mutagenesis* 2008;23:371–6. <https://doi.org/10.1093/mutage/gen027>.
- [45] Lacave R, Larsen C-J, Robert J. *Cancérologie fondamentale*. Montrouge: J. Libbey Eurotext; 2005.
- [46] Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA, Orsière T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. *Mutat Res Mutat Res* 2008;658:215–33. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2007.10.001>.
- [47] Fuseau mitotique : définition et explications n.d. <https://www.aquaportail.com/definition-836-fuseau-mitotique.html> (accessed June 5, 2022).
- [48] Schema de la formation des micronoyaux d'après Fenech (1997) | Download Scientific Diagram n.d. https://www.researchgate.net/figure/Schema-de-la-formation-des-micronoyaux-dapres-Fenech-1997_fig1_326080109 (accessed June 5, 2022).
- [49] Ladeira C. Mycotoxins. *Environ. Mycol. Public Health*, Elsevier; 2016, p. 343–61. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411471-5.00020-X>.
- [50] Hintzsche H, Hemmann U, Poth A, Utesch D, Lott J, Stopper H. Fate of micronuclei and micronucleated cells. *Mutat Res Mutat Res* 2017;771:85–98. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.02.002>.
- [51] Wojda A, WITT M. Manifestations of ageing at the cytogenetic level. *J Appl Genet* 2003;44(3):383–399:17.
- [52] Hayashi M. The micronucleus test—most widely used *in vivo* genotoxicity test—. *Genes Environ* 2016;38:18. <https://doi.org/10.1186/s41021-016-0044-x>.

- [53] Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test | en | OECD n.d.
<https://www.oecd.org/env/ehs/testing/test-no-487-in-vitro-mammalian-cell-micronucleus-test-9789264264861-en.htm> (accessed June 8, 2022).
- [54] Un exemple d'utilisation de marqueurs biologiques: - ppt video online télécharger n.d.
<https://slideplayer.fr/slide/1186676/> (accessed June 8, 2022).
- [55] Test des micronoyaux — Wikipédia n.d.
https://fr.wikipedia.org/wiki/Test_des_micronoyaux (accessed June 8, 2022).
- [56] Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, et al. Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* 2003;540:153–63. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2003.07.005>.