

1. Généralités

1.1. Historique

La toxicologie provient du terme grec « toxicon » qui signifie « arc ». L'utilisation de flèches empoisonnées représente probablement une des premières applications intentionnelle d'une substance toxique. Bien que les effets de certains poisons aient été connus par des Grecs et des Romains et que leur emploi à des fins criminelles.

- Hippocrate (460-380 AC) fut allusion à quelques maladies qui auraient pu résulter de l'activité professionnelle.
- Pline l'ancien (23-79 AC) est celui qui avait décrit la première utilisation du masque protecteur devant la bouche.
- Gallien (II^{ème} siècle) fait aussi référence aux risques associés à divers professions.
- Au XVI^{ème} siècle, Agricola décrit les maladies des mineurs.
- Paracelse (1493-1541), parlait de l'atteinte pulmonaire et décrivait aussi l'empoisonnement au mercure dans les activités minières. On doit la première description des risques associés à différentes professions à Bernardino Ramazini (1633-1714) dans son livre (maladies des travailleurs) et qui est considéré par la suite comme le fondateur de la médecine du travail. L'étude scientifique des substances toxiques ne débuta cependant XXI^{ème} siècle. En 1814, Orfila publia le premier traité des poisons. Mais, ce n'est qu'au cours de ces dernières décennies, grâce aux développements de la biochimie et de la physiologie que la toxicologie est vraiment fondée.

1.2.Introduction

L'organisme humain est toujours en relation avec son milieu par un ensemble d'échanges qui contribuent à maintenir un équilibre dynamique. Par exemple, la respiration permet d'abord l'oxygène de l'air et d'y rejeter du dioxyde de carbone. Quoique nous fassions, le milieu nous influence et nous l'influons. Ce principe d'action-réaction signifie que toute action a des conséquences. Le milieu ne constitue cependant pas un tout homogène, mais plutôt un ensemble composé de nombreux éléments comprenant les produits chimiques qui peuvent affecter la santé des organismes vivants.

Chaque année, l'industrie met des certaines de nouveaux produits sur le marché, venant ainsi accroître le nombre de ceux qu'on peut déjà utiliser. Il est important de connaître

l'innocuité (la qualité de ce qui n'est pas nuisible) ou la nocivité (caractère de ce qui nuisible) des produits chimique pour bien en saisir les effets sur notre santé. Cela nécessite cependant une certaine connaissance des notions et principes propre à la toxicologie. La toxicologie du grec toxico : poison et logie : étude ou science, est la science étudiant les substances toxique (poison), leur origine, leur propriété physique, chimique ou biologique, leur biotransformation, leur modalité et mécanisme d'actions nocives par la mise en œuvre de procédés thérapeutiques appropriés et de mesures de prévention. La toxicologie est depuis longtemps reconnu comme étant la science des poisons, elle s'intéresse particulièrement a l'identification du danger et a l'analyse du risque lié a l'exposition des organisme vivants aux xénobiotiques, dans le but de définir la modèle expérimentaux moléculaires, cellulaires et intégrés ainsi que des modèle bioinformatique.

1.3.Définition des principaux termes

- ✓ **Un toxique** : c'est un agent solide, liquide ou gaz qui interfère avec les processus vitaux des cellules.
- ✓ **Une toxicité** : est la mesure de la capacité d'une substance chimique de causer des effets néfastes chez un organisme.
- ✓ **Une toxine** : c'est un terme réservé pour les poisons d'origine naturel (animal ou zoo toxine, plante ou phytotoxine).
- ✓ **Un xénobiotique** : c'est un composé étranger a l'organisme animal, il ne possède aucune valeur nutritive, on cite comme exemple les médicaments.
- ✓ **L'intoxication** : atteinte d'un organisme par un produit toxique, c'est-à-dire une substance qui a un effet nocif sur l'organisme dans son ensemble ou sur un organe particulier.
- ✓ **Une dose** : c'est la quantité d'une substance absorbée par le corps.

1.4.Modulation des effets toxiques

Deux principales catégories de facteurs contribuent a expliquer la nature et l'intensité des effets toxiques :

- **Facteurs concernant la substance elle-même :**

La toxicité peut varie en fonction de :

- **La voie d'introduction** : la voie intraveineuse est habituellement plus dangereuse par rapport aux autres voies.
- **La concentration** : les acides corrosifs sont beaucoup plus toxiques sous forme concentrée qu'en solution très diluée.
- **La volatilité** : qui conditionne la pénétration par voie respiratoire.

- **Facteurs physiopathologiques :**
 - **L'âge** : la sensibilité aux effets toxiques est habituellement plus grande chez les enfants et les personnes âgées.
 - **Le sexe** : il existe des différences entre les hommes et les femmes, notamment en ce qui concerne le métabolisme des toxiques.
 - **L'état nutritionnel** : la toxicité peut être influencée par la masse de tissus adipeux, la déshydratation.
 - **L'état de santé** : les individus en bonne santé sont résistants, car ils métabolisent et éliminent les toxiques plus facilement que ceux qui souffrent de maladies hépatiques ou rénales.
 - **La grossesse** : il se produit des modifications de l'activité métabolique des toxiques au cours de la grossesse.

2. Les Différents types de la toxicité

2.1. Selon la nature de produit (toxique)

2.1.1. Toxicité directe

Le toxique produit ses effets néfastes sans aucune biotransformation, sa nature chimique est responsable de sa toxicité. Exemple :

- Acides forts et bases fortes.
- Les oxydants (ingestion d'eau de javel).
- Le monoxyde de carbone (CO) et etc.

2.1.2. Toxicité indirecte

Le toxique n'est pas toxique tel quel, mais nécessite une biotransformation pour révéler sa toxicité, une réaction métabolique (hydrolyse, oxydation, etc.). Exemple : le paracétamol.

2.2. Selon les effets toxiques

On distingue classiquement trois formes essentielles de la toxicité : la toxicité à court terme (aiguë), la toxicité subaiguë (subchronique) et la toxicité à long terme (chronique) (tableau 1).

2.2.1. Toxicité aiguë

Désigne les effets nocifs résultant de l'exposition à une seule forte dose d'un produit ou d'une seule exposition à celui-ci.

2.2.2. Toxicité subaiguë (à moyen termes)

Effet dû à des doses plus faibles se produisant à court terme, sur des organes cibles parfois réversible.

2.2.3. La toxicité à long terme (chronique)

Appeler aussi toxicité à long terme, elle représente la toxicité d'une substance prise par petites doses longtemps répétées qui ne provoquent pas des troubles immédiats mais aboutit au bout d'un certain temps à des troubles de l'organisme.

Tableau1 : représente les différents types de la toxicité

Type de la toxicité	Fréquence d'administration	La durée de l'exposition
Toxicité aiguë	Unique (une seule dose, forte)	≤ 24 heures
Toxicité subchronique	Répétée, faible dose	De 1 à 3 mois
Toxicité subaiguë	Répétée, faible dose	≤ 1 mois
Toxicité chronique	Répétée, faible dose	≥ 3 mois

3. Méthode d'étude d'une éventuelle toxicité

3.1. Rappels

Courbe dose /réponse

La courbe entre la dose d'une substance introduite dans un organisme et la réponse qu'elle détermine se matérialise habituellement par une courbe en sigmoïde (S). En règle générale plus la dose augmente, plus la réponse augmente, soit par la sévérité de cette réponse, soit par le pourcentage d'individus affectés (Figure 1).

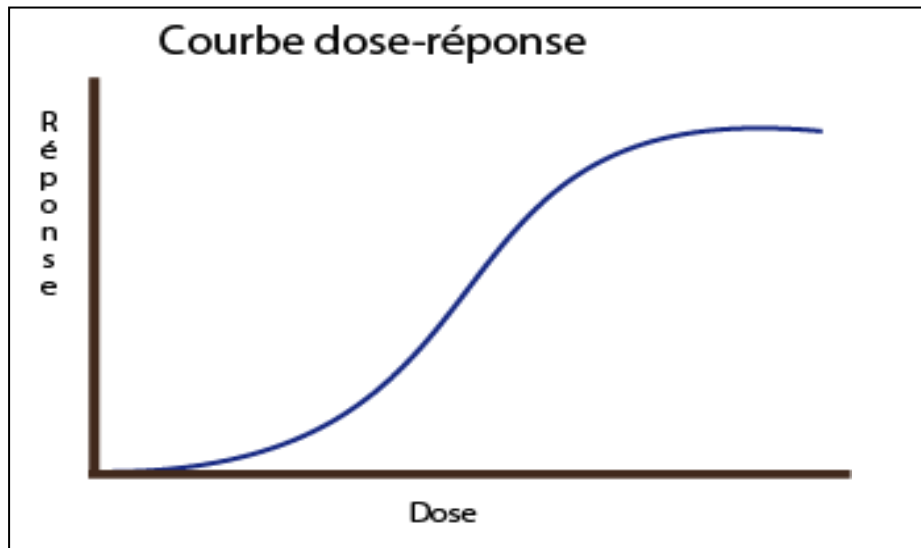


Figure1 : représente la courbe dose-réponse.

✚ La dose efficace 50 (DE50)

La dose efficace 50 (DE50) est celle qui provoque un type d'effet clairement défini (irritation des voies respiratoires, altération hépatiques ou rénales, perturbation sanguines) chez la moitié (50%) des animaux en expérimentation soumis à la substance essayée.

✚ La dose létale 50 (DL50)

C'est la dose d'une substance pouvant causer la mort de 50% d'une population animal dans des conditions d'expérimentation précises.

✚ La concentration létale 50 (CL50)

C'est la concentration atmosphérique entraînant la mort de la moitié de la population animale en expérimentation pour une durée d'exposition déterminée.

L'apparition des effets toxiques d'un médicament est faite sur la base de l'examen au comportement, de la croissance, de la formule sanguine et des épreuves fonctionnelles particulièrement, celles qui se rapportent aux organes excréteurs, ainsi que les examens histologiques qui s'y rattachent.

3.2.Le test d'innocuité

Ce test est appelé aussi essai de la toxicité anormale. Il est surtout utilisé pour tester les produits nouveaux en industrie pharmaceutique. Par définition est considéré comme essai de recherche de toxicité anormale. Tout ou ensemble d'essai permettant de révéler par des méthodes biologique, la présence d'une ou plusieurs anomalies de nature variée et à priori non connue d'un produit, d'une matière première ou d'un médicament terminé par rapport au

produit de références, correspondant dont les normes de conformité accompagnées de tolérances, ont été établies lors des recherches préliminaires à la mise sur le marché. Le contrôle consiste à administrer à des souris ou des rats une dose unique de la substance par la voie appropriée, durant la période d'observation qui est 72h. Aucune anomalie ni mortalité ne doit être constatée. Pour chaque produit des essais préliminaires précis permettent la détermination de la dose optimale à administrer. Deux cas sont possibles :

- Les produits à DL50 connue ; il n'est administré qu'une fraction de la dose correspondant à la DL50, en générale la DL0 (ou la dose maximale tolérée).
- Les produits sans DL50 : dans ce cas, il faut faire le test de la toxicité aigue.

3.3.Le test de la toxicité aigue

L'essai de la toxicité par administration unique donne une idée de zone de toxicité de la substance considérée et s'avère utile pour la fixation des doses à mettre en œuvre pour les testes de la toxicité subaigüe et chronique. Il peut aussi donner des indications sur les effets probables d'un surdosage aigue médicamenteux ou d'une exposition excessive chez l'homme, et contribuer à l'information générale nécessaire pour la programmation des essais thérapeutiques (médicaments) humains. Lorsque les substances à essayer se présentent sous forme de gaz de vapeurs, on établit non plus la DL50, mais la CL50. La dose minimum mortelle chez l'animal, ou dose létale, est toujours délicate à déterminer de façon précise. On préfère habituellement, dans le cadre des essais de toxicité aigue portant sur les médicaments ou les produits chimiques en vue de leur autorisation de mise sur le marché (AMM), établir la dose létale 50 (DL50). L'essai est pratiqué habituellement sur 5 à 6 lots d'animaux généralement le rat ou les souris. Chaque animale d'un même lot reçoit une dose identique (dose unique) de la substance à tester, mais la dose administrée est différente d'un lot à l'autre, afin que le pourcentage de mortalité varie entre 0 et 100.

La voie d'administration est celle qui sera utilisée en clinique, s'il s'agit un médicament (voie orale, injection, etc.), ou celle par laquelle la substance pourra pénétrer dans l'organisme s'il s'agit d'un produit chimique (voie orale, inhalation, voie transcutanée, etc.). Après l'administration les animaux sont observés pendant 14 jours, au cours desquels les examens cliniques sont fréquents. L'instant et les circonstances de la mort sont soigneusement notés. Les animaux demeurés vivants à la fin de l'essai sont sacrifiés. Tous les animaux (morts en cours d'essai et sacrifiés en fin d'essai) font l'objet d'une autopsie. On construit ensuite la courbe donnant le pourcentage de mortalité en fonction du logarithme de la dose. C'est une

courbe en S, dite courbe de trévan, qui peut être linéarisée par des moyens appropriés. On en déduit la DL50 (exprimé en mg/kg de poids corporel) (Figure 2).

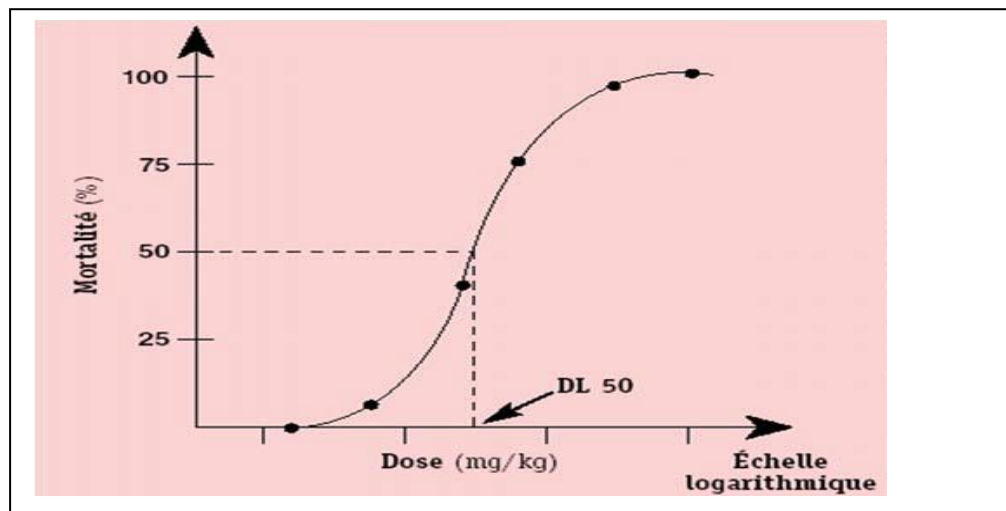


Figure2 : Détermination de la DL50

3.4.Le test de la toxicité subaigüe et chronique

En plus des essais de la toxicité aiguë (DL50, CL50), des essais de la toxicité subaigüe et chronique. Doivent être entrepris dans le cadre des demandes d'autorisation de mise sur le marché formulées par les fabricants pour les médicaments et pour les produits chimiques à autres usages. Ils durent de 2à3 mois (toxicité subaigüe) ou dépassent souvent une année (toxicité chronique). La voie d'administration est, l'à encore, celle qui est prévue en clinique (médicament) ou la voie possible de pénétration dans l'organisme (produit chimique). Plusieurs lots d'animaux (autant de males que de femelles) sont mis en expérimentation, y compris des lots témoins appropriés. Les essais doivent porter sur 2 espèces animales, dont l'une n'appartient pas à l'ordre des rongeurs, de façon à réduire autant que possible les erreurs d'extrapolation. Classiquement on a recours au rat et au chien. Trois niveaux de doses sont administrés 7jours sur 7 :

- Une dose forte entraînant une toxicité pour les organes cibles d'autres fonctions.
- Une dose faible, suffisante pour provoquer un effet pharmacodynamique ou l'effet thérapeutique désiré, ou pour donner des concentrations sanguines comparables à celles qui devraient être corrélées à ces effets chez l'homme.

- Une dose intermédiaire, représentant par exemple la moyenne géométrique entre les deux doses précédentes.

Habituellement l'un des lots témoins ne reçoit pas la substance à tester, l'autre traité par la dose la plus forte, est observé pendant 14 jours après la dernière administration pour pouvoir se rendre compte de la réversibilité, de la persistance, ou de l'apparition retardée des effets toxiques. Les animaux sont observés avant l'essai et au cours d'étude sur le plan de :

- La consommation alimentaire
- Le poids corporel
- L'hématologie, la chimie, l'analyse des urines.
- L'ophtalmologie
- L'électrocardiographie
- Le comportement général

Ils sont sacrifiés en fin d'essai et leurs organes sont soumis à un examen anatomopathologique attentif.

3.5. Autres essais de la toxicité par administration répétées

Effectivement les études de la toxicité à terme doivent aussi comporter :

- ✓ L'examen de la toxicité fœtale, par exemple : la recherche d'effet cumulatif sur la descendance après passage transplacentaire.
- ✓ L'examen de la fonction de reproduction, avec étude de la fertilité du male et de la femelle.
- ✓ L'étude des effets sur la péri et la postnatalité de la tératogénèse (apparition de malformation congénitale).
- ✓ Des essais de mutagénèse résultant d'interaction entre des agents mutagène et le matériel génétique des organismes, le plus souvent recherché par des tests rapides in vitro et in vivo. Une substance mutagène est potentiellement cancérigène et on a constaté que 85 à 90% des cancérigènes chimiques connus sont mutagènes expérimentalement.
- ✓ Des essais de cancérigénèse dont l'interprétation est toujours délicate malgré la multiplicité des tests pouvant actuels être mise en ouvre.

Plus la DL50 est faible, plus le produit est jugé toxique :

- Si la $DL_{50} \leq 5$ mg/kg : le produit est extrêmement toxique
- Si la DL_{50} comprise entre 5 et 50 mg/kg : le produit est très toxique.
- Si la DL_{50} comprise entre 50 et 500 mg/kg : le produit est toxique.
- Si la DL_{50} comprise entre 500 et 5000 mg/kg : le produit est peu toxique.
- Si la $DL_{50} > 5000$ mg/kg : le produit n'est pas toxique.

4. Les Mécanismes d'action des toxiques

4.1. Toxicocinétique

L'intensité des effets toxiques exercés par des toxiques est liée à la concentration de l'espèce toxique dans le tissu ou l'organe cible.

Dans bien des cas, la durée au cours de laquelle ces effets se manifestent dépend de la période pendant laquelle l'espèce toxique est en contact avec ce tissu ou cet organe. Par ailleurs, de nombreux exemples montrent que l'administration d'une dose identique de deux substances ayant le même potentiel toxique ne se traduit pas nécessairement par des concentrations équivalentes de chacune d'elles au point d'action. Or, ce phénomène est souvent dû au métabolisme respectif des deux substances qui peut être différent. C'est le métabolisme qui détermine le devenir d'une substance dans l'organisme, parce qu'il est le résultat des processus d'absorption, de distribution et d'élimination (biotransformation et excrétion) qui gouvernent son cheminement dans les divers compartiments du corps humain. Par conséquent, le métabolisme joue un rôle clé dans la détermination de la concentration et de la toxicité des espèces toxiques aux endroits cibles.

La toxicocinétique peut être définie comme l'étude des mouvements dynamiques des toxiques durant leur passage dans le corps humain. En d'autres mots, la toxicocinétique renseigne sur la façon avec laquelle l'organisme agit sur une substance par l'intermédiaire des processus d'absorption, de distribution, de biotransformation et d'excrétion.

Le passage transmembranaire

L'absorption est le processus par lequel les xénobiotiques atteignent la circulation sanguine après avoir traversé des membranes ou barrières biologiques. Ce passage au travers des membranes cellulaires a lieu grâce à différents types de transports. Les xénobiotiques absorbés par les principales voies d'accès : poumons, peau, tractus gastro-intestinal, sont ensuite transférés par les milieux sanguins et lymphocytaires vers d'autres organes (reins, foie, etc...).

Pour rappel, la cellule est séparée du milieu extérieur par une membrane biologique, constituée d'un double feuillet de phospholipides qui la protège. Cette bicouche lipidique garantit le contrôle du passage des molécules et permet d'assurer l'homéostasie du milieu intracellulaire. Il existe différents modes de transport des molécules au travers de cette membrane. Certains modes ne requièrent pas l'utilisation d'énergie car ils se font dans le sens du gradient de concentration (ou électrochimique), c'est le cas de la diffusion simple et de la diffusion facilitée. Les autres modes sont des transports actifs qui nécessitent l'utilisation d'énergie pour permettre le transport contre le gradient de concentration (figure 3)

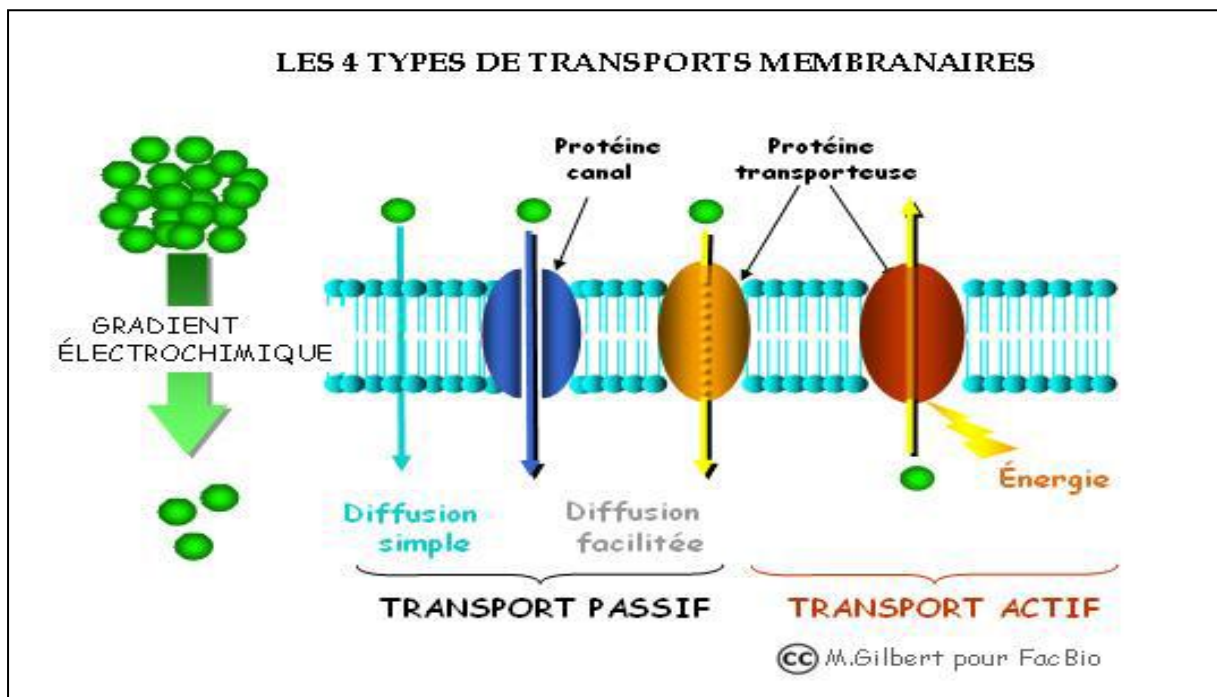


Figure 3 : L'absorption à l'échelle cellulaire : transporteurs membranaires et diffusion simple

La diffusion simple n'est possible que si la molécule est « soluble » dans la membrane phospholipidique, c'est-à-dire qu'elle peut traverser directement la bicouche de phospholipides. La molécule doit donc être lipophile ou, si elle est hydrophile, être suffisamment petite (cas de l'éthanol). La vitesse de diffusion dépend de la différence de concentration (gradient de concentration, ou électrochimique pour des ions) mais aussi de la taille de la protéine et de la température. Ce mécanisme est lent par rapport à la diffusion facilitée car les molécules doivent se dissoudre dans la double couche de phospholipides avant

de passer de l'autre côté. La diffusion simple est la méthode de transport principalement utilisée au niveau du tractus gastro-intestinal et de la peau.

La diffusion facilitée emploie un transporteur transmembranaire afin de transporter des molécules polaires ou des protéines (glucose, Na⁺, etc...). Ces transporteurs sont soit des canaux ioniques qui forment des pores, soit des protéines porteuses aussi appelées perméases qui changent de conformation pour déplacer la molécule d'un côté de la membrane à un autre. Ce type de transport est saturable et spécifique pour des substances ayant une étroite analogie de structures, ce qui rend les interactions médicamenteuses possibles.

Le transport actif désigne le passage d'une molécule au travers d'une membrane contre son gradient de concentration. Cette action nécessite l'utilisation d'énergie qui peut être fournie par l'hydrolyse d'un nucléotide triphosphate (majoritairement ATP) ou par la présence d'une différence de potentiel électrochimique. Ce transport est très employé par les xénobiotiques, par exemple, au niveau de la muqueuse gastro-intestinale par le plomb, le manganèse ou par des médicaments mimant des peptides normalement pris en charge par une famille de transporteurs actifs. Parmi les protéines réalisant ce transport actif, on peut citer les transporteurs ABC (ATP Binding Casette). Elles permettent le transport de petits peptides, d'un certain nombre d'enzymes en particulier stéroïdiennes, de nombreux médicaments et produits toxiques. Ces transporteurs sont souvent étudiés lors d'études toxico-cinétiques. Le premier transporteur découvert est le MDR (Multi Drug Resistance). Il est fortement exprimé dans les cellules cancéreuses, ce qui exclut un traitement par chimiothérapie car les agents toxiques entrant dans la cellule pour la détruire vont être rapidement transportés par les MDR à l'extérieur de celle-ci. Ces protéines peuvent aussi être bénéfiques pour la cellule, l'expression de ces transporteurs (MDR, MRP, etc..) par les cellules permet de les protéger des agents toxiques en les éliminant du milieu intracellulaire.

les Pompes à l'exportation des xénobiotiques est un terme qui décrit un certain nombre de transporteurs actifs primaires qui médiate l'exportation vectoriel de composés endogènes et exogènes à partir de la cellule vers l'espace extracellulaire. Parce que ce processus ne soit pas entraîné par un produit chimique gradient, mais plutôt par la consommation d'ATP, ce transport en amont peut en effet se produire de manière très efficace contre un gradient de concentration. les pompes d'export des xénobiotiques logiquement jouer un rôle central dans le foie et les reins, et Il est dans ces organes qui ont également été impliqués dans les mécanismes

lié à la toxicité. Dans le foie, un certain nombre de systèmes de pompage à l'exportation ont été identifiés qui sont impliqués dans la formation de la bile et l'excrétion des xénobiotiques. Le transport des protéines sont situés sur le domaine de la membrane apicale des hépatocytes. Toutes ces protéines appartiennent à la (ABC) transporteur ATP-binding cassette et superfamille partagent des caractéristiques structurelles et fonctionnelles communes. P-glycoprotéine de la multi-résistance (codée par le gène MDR1) transporte une large gamme de xénobiotiques. les substrats Non endogène ont encore été identifiés pour ce transporteur. Il est relativement faible exprimé dans le foie, mais abondante dans d'autres organes. La pompe d'exportation phospholipides (MDR3) est un transporteur qui fonctionne comme lipase pour déplacer les phospholipides a l'intérieur vers les feuilles externe de la membrane. Les phospholipides biliaires sont utilisés dans la formation des vésicules et des micelles mixtes La pompe conjugué à l'exportation (MRP2, l'isoforme canaliculaire de la polychimiothérapie résistance à la protéine associée) transporte un grand nombre d'anions organiques dans la bile. Parmi ceux-ci sont un certain nombre de composés endogènes, y compris des conjugués de bilirubine, glutathion, et de glutathion conjugués. surtout, MRP2 est le transporteur qui exporte glucuronide des xénobiotiques ou de sulfate conjugués et joue donc un rôle essentiel dans le métabolisme des médicaments. La bile canaliculaire pompe à l'exportation de sel (BSEP) médie le transport des acides biliaires provenant des hépatocytes dans l'arbre biliaire. D'autres isoformes de certains de ces transporteurs (par exemple MRP1 et MRP3 à 6) sont situé sur la membrane baso-latérale plutôt que le domaine apical. Leur fonction est pas encore clairement déterminée, mais ils pourraient prendre en charge le transport de secours fonction dans des conditions de déficience grave de la sécrétion canaliculaire, afin d'éviter l'accumulation de composés potentiellement toxiques dans la cellule. Un certain nombre d'exemples ont illustré dans le passé comment les pompes d'exportation hépatobiliaire peuvent constituer la base moléculaire et sont la force motrice réelle, pour un xénobiotiques pour devenir toxiques dans l'arbre biliaire. Un cas récent c'est la toxicité du foie induite par le bénomaxprofène.

Enfin, le dernier type de transport cellulaire est l'endocytose (phagocytose pour les solides, pinocytose pour les liquides) qui est une forme spécialisée de transport limitée aux

grosses molécules ou particules insolubles. Ce mécanisme implique un processus d'invagination de la membrane cellulaire participant aux défenses de l'organisme (macrophages, leucocytes l'utilisent). La pinocytose est utilisée par quelques médicaments ayant une masse moléculaire élevée ou par des colorants ou endotoxines bactériennes absorbés au niveau du tractus gastro-intestinal.

Tous ces mécanismes de transport membranaire contribuent au maintien de la composition du milieu intracellulaire nécessaire au bon déroulement des réactions biochimiques intracellulaires et donc à la survie de la cellule. Également empruntés par les xénobiotiques, ces voies de transport présentent des spécificités selon les tissus ou organes. Ainsi certaines molécules vont être préférentiellement absorbées par un organe en empruntant un type de transport qui lui est spécifique.

4.1.1. L'absorption

La plupart des xénobiotiques exercent leur toxicité après avoir pénétré l'organisme. L'absorption est le processus par lequel les xénobiotiques atteignent la circulation sanguine, après avoir transverse des membranes ou barrières biologiques. Les principales voies de pénétration des xénobiotiques présents dans l'environnement sont les poumon, la peau et le tractus gastro-intestinal (Figure 3 et Tableau 2).

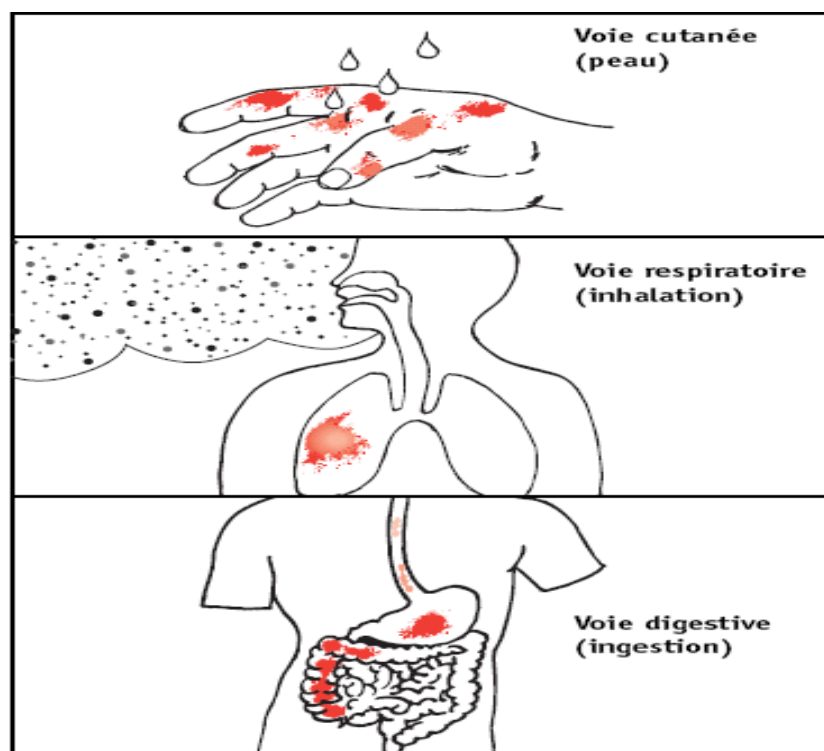


Figure4 : Les voies d'absorption usuelles.

Tableau 2 : les voies d'absorption de certains produits

Substance	État physique	Voie respiratoire	Voie cutanée	Voie digestive
Acide phosphorique	Solide	Faible	Faible	Faible
Alcool éthylique	Liquide	Oui	Faible	Oui
Béryllium	Solide	Oui	Faible	Faible
Chlorpyrifos	Solide	Oui	Oui	Oui
Mercure	Liquide	Oui	Oui	Faible
Monoxyde de carbone	Gaz	Oui	Non	Non
Toluène	Liquide	Oui	Oui	Oui

➤ **La voie respiratoire (inhalation)**

L'appareil respiratoire est la porte d'entrée privilégiée des toxiques qui existent sous forme de gaz, de vapeurs ou de fines particules solides ou liquides. Trois facteurs contribuent à favoriser l'absorption des substances par le poumon : l'important volume d'air auquel un adulte est exposé quotidiennement (10 000 à 20 000 L), la très grande surface de la région alvéolaire (~ 80 m²) et l'extrême minceur de la paroi alvéolaire (~1 µm). La solubilité d'un toxique détermine le point d'absorption et la quantité absorbée dans l'appareil respiratoire. Certains contaminants hydrosolubles (SO₂, acétone) peuvent se dissoudre dans la phase aqueuse du mucus tapissant la muqueuse nasale - où ils pourront être absorbés par diffusion passive - avant même d'atteindre la région alvéolaire. D'autres, comme le formaldéhyde, réagissent avec des composants du mucus pour former des complexes. Les contaminants liposolubles (solvants) traversent la paroi alvéolaire par diffusion passive et se dissolvent dans le sang. La ventilation alvéolaire (fréquence respiratoire, volume de l'inspiration) joue un rôle important dans les quantités absorbées de substances très solubles dans le sang (styrène, xylène). L'absorption pulmonaire des substances peu solubles (1, 1, 1-trichloroéthane, cyclohexane), tout en étant peu sensible aux modifications de la ventilation alvéolaire, peut être significativement accrue à la suite d'une augmentation de la perfusion sanguine des poumons résultant d'une activité musculaire intense. L'absorption des particules liquides ou

solides, sous forme d'aérosols, est fonction de leur forme, taille et diamètre, ces facteurs jouant un rôle prépondérant sur la localisation de leur dépôt dans l'appareil respiratoire. Les grosses particules se déposent principalement dans la région du naso-pharynx d'où elles seront éventuellement éliminées par la toux, l'éternuement ou le mouchage. Les particules insolubles de taille moyenne (entre 1 et 5 μm) se déposent dans la région trachéobronchique et peuvent être vidangées par l'action de l'appareil muco-ciliaire. Celles qui sont captées par le mucus peuvent être repoussées par l'action des cils vibratiles vers le pharynx et dégluties. Les petites particules (entre 0,1 et 1 μm) se retrouvent dans la région alvéolaire où elles pourront être phagocytées par des macrophages ou transportées dans le système lymphatique pulmonaire après diffusion à travers la paroi alvéolaire (Tableau 3 et Figure 5).

Tableau 3 : Déposition des gaz et des vapeurs dans les voies respiratoires

Substance	Solubilité dans l'eau	Absorption	Remarque
Dioxyde de soufre (SO ₂)	Très soluble	Pénètre peu profondément dans le système respiratoire	Se limite au nez. Absorption par le mucus et le tissu.
Monoxyde de carbone (CO)	Peu soluble	Pénètre profondément dans le système respiratoire	Passe dans le sang et est distribué dans l'organisme.

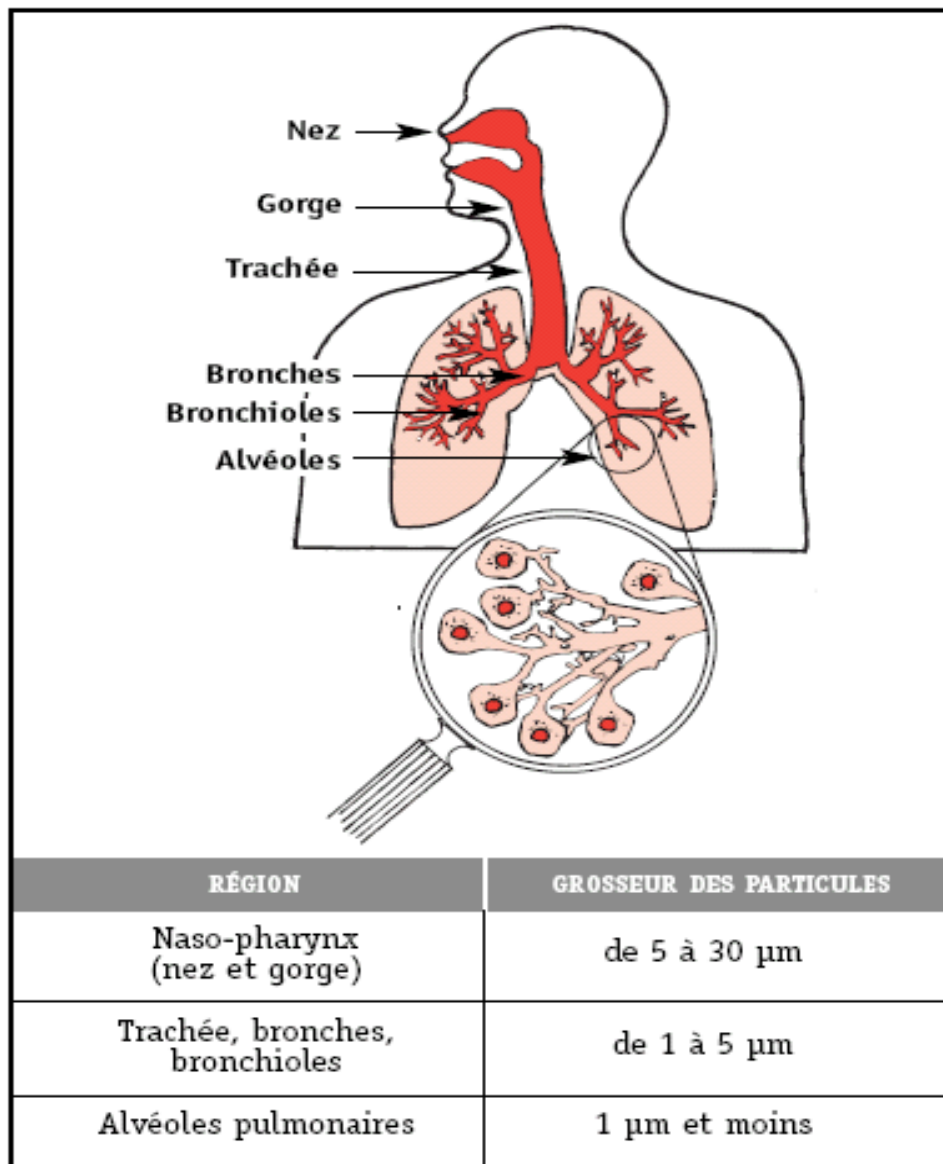


Figure 5 : Déposition des poussières dans les voies respiratoire

➤ **La voie cutanée**

La peau est une barrière efficace, relativement imperméable aux contaminants de l'environnement. Elle est formée de deux éléments principaux : l'épiderme et le derme. Le premier comprend plusieurs couches de cellules dont une couche externe, formée de cellules mortes kératinisées, et la couche cornée ou *stratum corneum* (10 μm) dont l'épaisseur varie considérablement d'une région anatomique à l'autre. Certaines substances peuvent traverser l'épiderme par diffusion passive. Le derme, plus facilement franchissable, est formé

principalement de tissu conjonctif et de tissu adipeux ; il renferme des capillaires, des terminaisons nerveuses, des glandes sébacées, des glandes sudoripares et des follicules pileux. Les contaminants liposolubles (insecticides organophosphorés, solvants) traversent bien la peau. Le passage est facilité par la vasodilatation cutanée, le degré d'hydratation de la peau, la présence de lésions mécaniques ou l'irritation de l'épiderme (Figure 6).

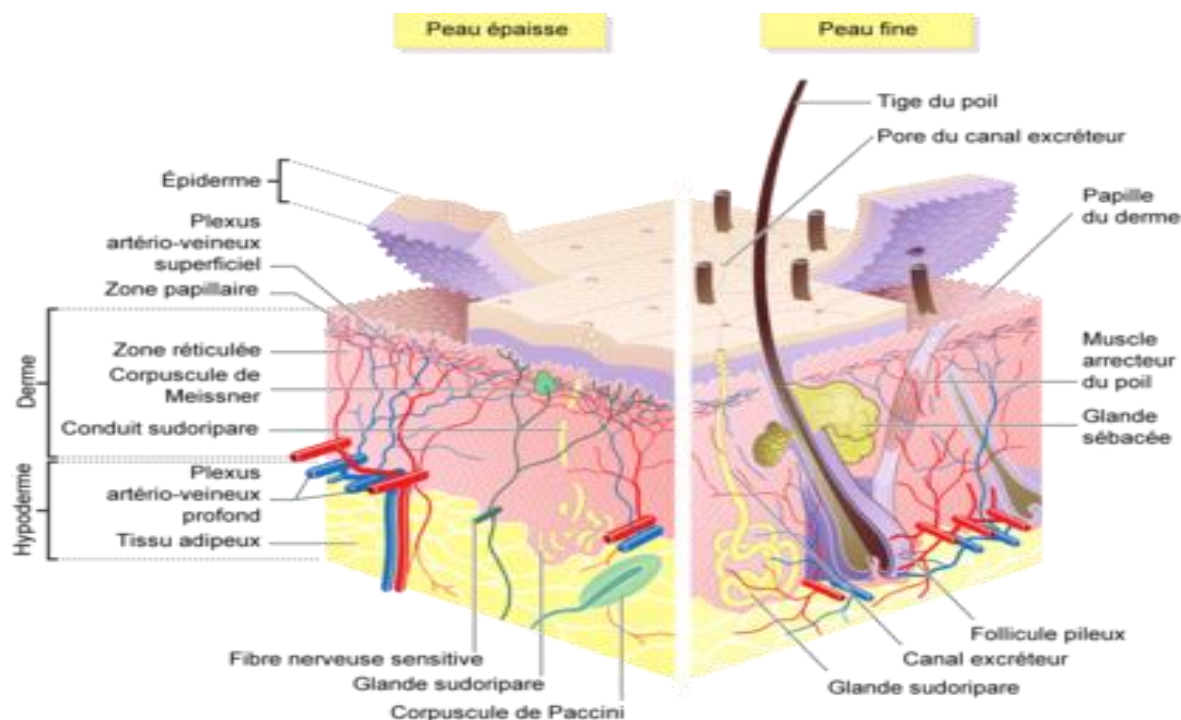


Figure 6 : L'anatomie de la peau.

➤ La voie orale (Tractus gastro-intestinal)

Le système digestif est une porte d'entrée importante pour certains toxiques. Deux caractéristiques anatomiques contribuent à favoriser le passage à ce niveau : une surface de contact très grande (»200 fois la surface corporelle) et la minceur de la muqueuse.

L'absorption peut se faire tout le long du tractus (estomac ® intestin), principalement par diffusion passive, et dépend surtout du degré d'ionisation des molécules, lequel est fonction du pKa des substances et du pH du contenu des différentes régions. Les molécules non ionisées (neutres) ayant un caractère acide faible sont absorbées dans l'estomac (pH : 1-3) alors que les bases faibles sont plutôt absorbées par le petit intestin (pH : 5-8). Cependant, le petit intestin, en raison de sa très grande surface, est une région dans laquelle l'absorption d'acides faibles est parfois importante. Certains toxiques font appel à des mécanismes spécialisés pour traverser la muqueuse gastro-intestinale : transport actif (plomb, manganèse),

pinocytose (colorants, endotoxines bactériennes). Après avoir traversé la muqueuse gastro-intestinale, les toxiques passent par le foie avant d'atteindre la grande circulation sanguine. Ce passage peut donner lieu à un phénomène appelé *effet de premier passage hépatique* au cours duquel une fraction plus ou moins grande du toxiques est biotransformée en un métabolite (métabolisée).

➤ Les autres voies

Il existe d'autres voies d'entrée, appelées parentérales, d'une importance généralement moindre et propres à certains milieux de travail, par exemple les injections accidentelles d'un médicament et les piqûres d'aiguilles en milieu hospitalier.

4.1.2. La Distribution

Une fois absorbés, les toxiques sont, par l'entremise de la circulation sanguine, distribués dans les divers tissus et organes, où ils exercent leur toxicité, sont stockés ou sont éliminés. Deux facteurs ont un impact important sur la distribution des toxiques dans l'organisme: la perfusion sanguine des organes et l'affinité des toxiques pour les tissus et les protéines plasmatiques. Certains tissus sont très vascularisés (cerveau, viscères) alors que d'autres le sont beaucoup moins (peau, os). Une perfusion sanguine importante favorise l'arrivée rapide des toxiques.

L'affinité des toxiques pour un tissu est influencée principalement par leurs caractéristiques physico-chimiques et la composition des tissus de l'organisme. Le transfert du sang vers les tissus dépend de l'efficacité des membranes biologiques à agir comme barrière.

Les albumines, présentes en grande quantité dans le plasma, représentent un site de stockage qui peut être important pour certains contaminants, bien que ce phénomène soit d'avantage connu pour les médicaments. La liaison aux protéines plasmatiques, bien que réversible, limite la distribution des substances en dehors du compartiment vasculaire vers d'autres tissus. Certains tissus agissent comme un réservoir de stockage d'où les substances peuvent cependant être libérées pour éventuellement exercer leur toxicité. Ainsi, les graisses accumulent les substances liposolubles comme les pesticides organochlorés (DDT), les biphényles polychlorés (BPC), les dioxines, une foule de solvants organiques (toluène, benzène, styrène) et des anesthésiques volatils (halothane). Les os emmagasinent le plomb, le fluor (fluorose osseuse), le strontium (cancers osseux). Certaines protéines présentes dans le foie et le rein appelées *métallothionéines* possèdent une affinité particulière pour fixer certains

métaux comme le cadmium et le zinc et constituent en quelque sorte une protection, bien que limitée, contre les effets toxiques de ces métaux.

Le rein est un site majeur de l'excrétion des xénobiotiques et / ou de leurs métabolites. Les substances toxiques (50 kD) peuvent passer la barrière de filtration glomérulaire. Les composés de petite taille sont excrétés dans l'urine. Cependant, si leur taille dépasse le seuil de masse moléculaire, ils sont excrétés par d'autres voies, y compris la sécrétion active de l'épithélium tubulaire. En effet, des supports spécifiques situés sur la membrane baso-latérale des tubules proximaux, les cellules peuvent transporter des composés du sang dans les cellules épithéliales contre une concentration plus élevée. D'autres transporteurs à l'opposé (apical) du domaine membranaire peuvent excréter des composés dans la lumière tubulaire (urine). Dans certains cas, cependant, surtout si le taux d'absorption dans les cellules dépasse largement la capacité de transport pour les étapes ultérieures d'excrétion, un composé peut accumuler dans les cellules tubulaires proximales et d'atteindre des niveaux dangereux. Un exemple typique de néphrotoxicité des antibiotiques : les céphalosporines. Un indice important pour le mécanisme de toxicité est venu de premières observations indiquant que les céphalosporines sont des substances toxiques, mais pas leurs congénères non toxiques.

Les céphalosporines capables d'accumuler dans le cortex rénal, le mécanisme de toxicité des céphalosporines est basé sur l'absorption de la concentration de médicament dans les épithéliums tubulaires proximales dans le cortex rénal. Plus précisément, la céphaloridine est rapidement transportée à travers la membrane baso-latérale via l'anion transporteur organique, OAT1. Le transport sur le côté apical est moins bien caractérisé, mais il est clair que le mouvement de la céphaloridine à travers la membrane de la lumière de cellule à tubulaire est très réduite, probablement due au groupe cationique dans la même molécule, conduisant à une accumulation intracellulaire considérable du médicament.

En revanche, la molécule céphalothine anionique se déplace rapidement à travers les épithéliums du sang dans l'urine.

Plus en aval, au niveau moléculaire, la toxicité des céphalosporines a des causes multiples. Ceux-ci incluent le cycle redox de l'anneau de pyridine, l'acylation et l'inactivation des protéines des cellules tubulaires à travers la réactivité spontanée des -lactamines et l'inhibition de l'acide gras mitochondrial responsable du transport de l'acyl carnitine. Les mêmes mécanismes d'accumulation rénale dus à une absorption rapide au baso-lateral

d'une membrane couplée à l'exportation inefficace à la membrane apicale tubulaire . par exemple sur d'autres xénobiotiques impliqués dans la toxicité cellulaire : le cidofovir ou l'adéfovir, des analogues de nucléosides (phosphonates de nucléosides acycliques) et anti-rétroviraux médicaments utilisés contre le VIH, partagent les mêmes caractéristiques de transport vectoriales avec céphalosporines. Les médicaments sont avidement repris via OAT1, mais mal excrétés dans l'urine et donc accumuler dans les cellules tubulaires proximales. En effet, le potentiel de néphrotoxicité clinique de cidofovir et l'adéfovir est devenu évident chez les patients.

Un autre exemple sur la toxicité spécifique entraîné porteuse est la lésion pulmonaire sélective associée a l'exposition de paraquat. Les effets pulmonaires peuvent être facilement expliquées par la participation d'un système de transport abondamment exprimé dans certains types de cellules dans le poumon. le paraquat n'est pas métabolisé dans le foie. Le paraquat accumule typiquement dans les poumons (les concentrations pulmonaires peuvent être six ou sept fois plus élevées que celles dans le plasma), et le composé est retenu dans le poumon même lorsque les niveaux de sang commencent à diminuer. À la recherche du mécanisme sous-jacent, il a été constaté que les poumons accumulent le paraquat d'une manière dépendant de l'énergie. En outre, son accumulation comprend saturabilité, qui est compatible avec le concept de porteuse transmembranaire Médie transport. Mais comment le paraquat sélectivement concentrée dans les poumons? Un certain nombre de substrats physiologiques ont été trouvés pour inhiber l'absorption de paraquat dans les tissus pulmonaire. Parmi ceux-ci, sont des inhibiteurs puissants de polyamines. Cela a conduit à l'hypothèse que le système de transport des polyamines pourrait être la porte pour l'absorption de paraquat. Si l'on compare les structures chimiques de ces diamines avec celle de paraquat, il est indique que les deux composés partagent quelques similitudes. En particulier, à la fois ont deux atomes d'azote quaternaire, séparés par une chaîne alkyle ou aromatique les anneaux ayant une dimension d'espacement similaire. Par conséquent, de nombreux éléments de preuve ont conduit à la concept actuel. Le paraquat est en effet un substrat pour le support de type polyamine situé dans la membrane des cellules alvéolaires de type I et II. La spécificité de substrat est assez rigoureuse. Afin d'agir comme substrat pour le système de transport de polyamine pulmonaire, un xénobiotique doit présenter un certain

nombre de caractéristiques. D'abord, il doit posséder deux (ou plus) des atomes d'azote chargés; la charge positive maximale doit entourer ces azotes. En outre, un groupe apolaire doit séparer ces charges, et il doit y avoir un minimum l'encombrement stérique. En outre, la distance optimale entre les deux atomes d'azote est de quatre atomes de carbone (méthylène des groupes), comme cela se produit dans la putrescine, qui présente une distance N-N de 6,6 Å (mais jusqu'à sept atomes de carbone sont tolérées). ces conditions, la distance entre deux atomes d'azote chargés de paraquat est de 7,0 Å, ce qui explique son affinité pour le transporteur. Les deux noyaux pyridine, posent toutefois un peu l'encombrement stérique, faisant le paraquat un substrat moins idéal pour le support et avec un peu plus faible affinité (K_m plus élevé) que polyamines. Néanmoins, des quantités substantielles de paraquat sont repris dans les poumons grâce à ce système d'absorption. En revanche, le diquat, qui est pas pneumotoxiques et qui ne s'accumule pas dans les cellules alvéolaires, présente une beaucoup plus faible la distance intramoléculaire entre les deux atomes d'azote chargés, qui rend ce composé un mauvais substrat pour le transporteur, et qui explique sa marge de sécurité beaucoup plus grande (figure 7).

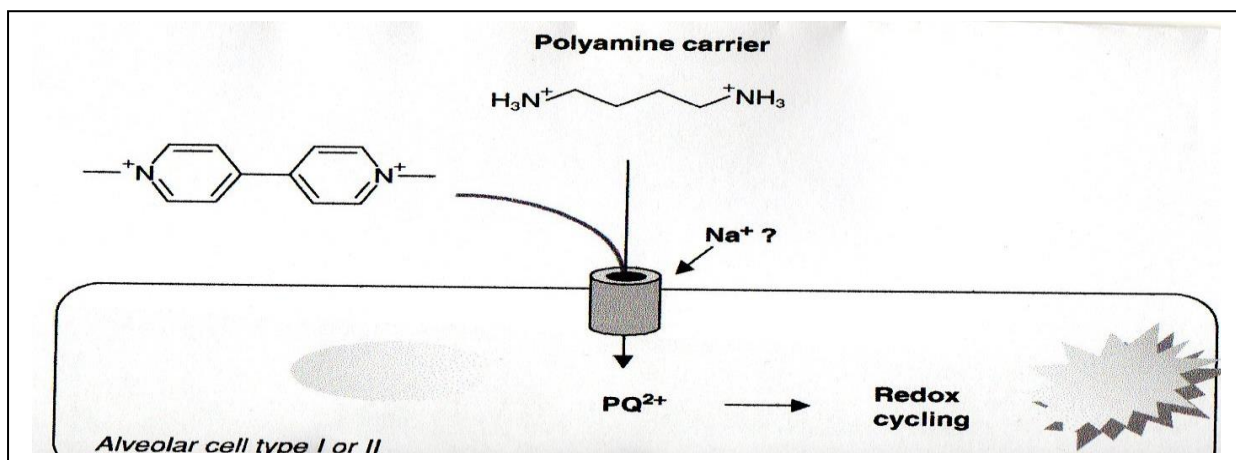


Figure7 : presente le système de transport de polyamine pulmonaire

Plus en aval, au niveau toxicodynamique, le mécanisme moléculaire de paraquat cytotoxicité aux cellules alvéolaires I et II est basé sur le cycle redox et intracellulaire le stress oxydatif.

Un paradigme de type cellulaire accumulation sélective d'un composé toxique dans le cerveau, qui ouvre la voie pour le développement ultérieur de lésions neuronales toxiques, est MPTP. Des mécanismes de lésion MPTP aux neurones dopaminergiques: MPTP, qui est un

composé lipophile, peut traverser la barrière hémato-encéphalique et atteindre le système nerveux central, où il est absorbé par les cellules gliales. Dans les astrocytes, la MPTP est convertie par la monoamine oxydase (MAO) -B, une enzyme mitochondriale, à PEPM, qui auto-oxide alors +MPP. Ce MAO-B est en effet impliqué dans la critique MPTP bioactive a été montré dans des expériences dans lesquelles des inhibiteurs chimiques de la MAO-B ont empêché la toxicité du MPTP. Avec cette connaissance, il peut aussi être facilement expliqué le mécanisme pourquoi le rat est une espèce qui ne sont pas sensibles à la neurotoxicité de MPTP; chez le rat, l'expression de MAO-B dans les astrocytes est pauvre. Encore une fois, les phénomènes de transport sélectifs fournissent la clé de l'énigme. il se que un bon substrat pour un transporteur qui se trouve sur le +MPP plasma la membrane des neurones dopaminergiques et qui transporte de la dopamine dans ces neurones. L'accumulation de MPP dans les neurones explique la mort cellulaire. Plus en aval, au niveau moléculaire et toxicodynamique, le mécanisme de l'ultra toxicité est basée sur la capacité du composé à se lier à de MPP et inhiber l'activité du complexe I dans les mitochondries. Cela se traduit par la génération de réactif des espèces d'oxygène ce qui pose un stress et dommages oxydative au niveau des mitochondries. En outre, le neurone fera face à une crise énergétique aiguë

4.1.3. La Biotransformation (métabolisme)

Au cours de l'évolution, les organismes vivants ont perfectionné des outils visant à favoriser l'élimination des toxiques, ce qui constitue, en quelque sorte, un moyen de défense contre l'action néfaste de certains d'entre eux. Le processus de biotransformation est l'un de ces outils. La biotransformation désigne l'ensemble des réactions qui résultent en des modifications, par l'intermédiaire d'enzymes, de la structure chimique d'un toxique. Ces réactions ont pour effet de rendre les toxiques, qui sont plutôt liposolubles au départ, plus polaires (ionisables), les rendant plus solubles dans l'eau et ainsi plus facilement excrétables dans l'urine. Le foie est le principal organe impliqué dans la biotransformation des toxiques, bien que la peau, le rein, la muqueuse intestinale et le poumon, pour ne nommer que ceux-là, puissent également biotransformer (métaboliser) certaines substances. En règle générale, les réactions de biotransformation ont pour effet de diminuer, voire d'annuler complètement, la

toxicité d'un toxique (détoxication). Cependant, il existe de plus en plus d'exemples montrant que la biotransformation rend, au contraire, certaines substances plus toxiques ou leur confère, dans certains cas, une toxicité nouvelle comparativement à celle qui est associée à la substance mère (bioactivation) (Figure 8).

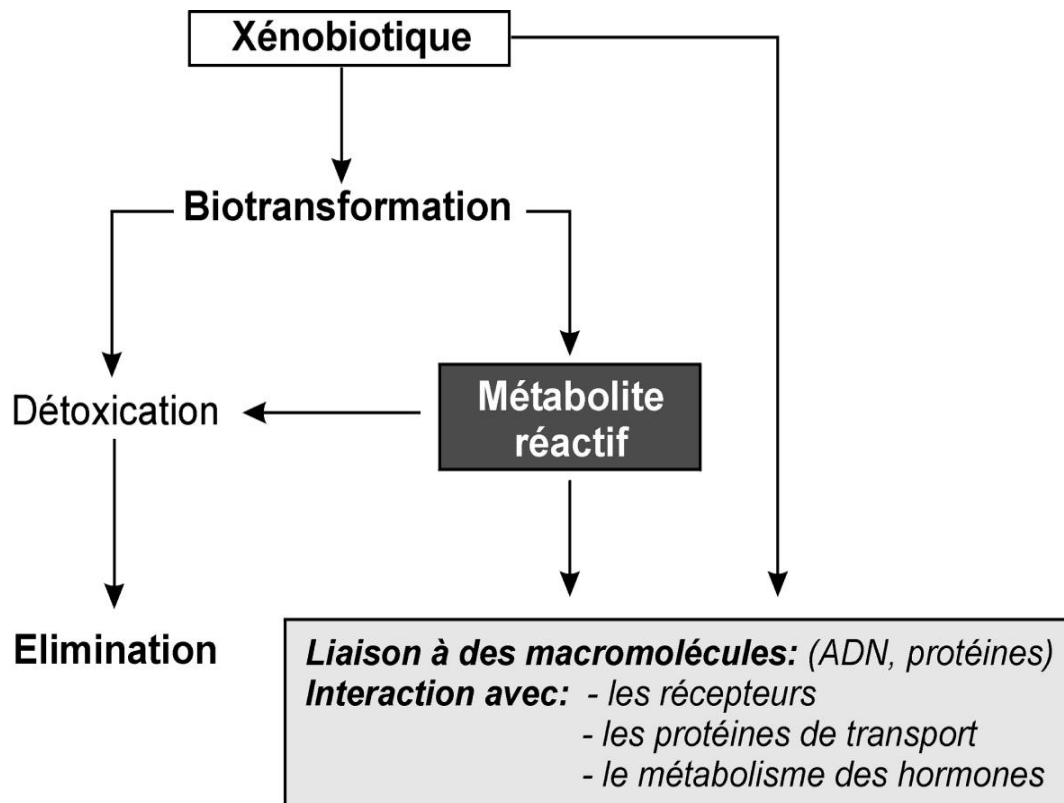


Figure 8 : La biotransformation des toxiques dans l'organisme.

Deux classes de réactions enzymatiques peuvent intervenir pour transformer un produit en un métabolite (produit de biotransformation) : les réactions de phase I et les réactions de phase II

- **La Réaction de phase I**

Trois types de réaction sont possibles : oxydation, réduction et hydrolyse. Les réactions d'oxydation, les plus importantes, font intervenir principalement un groupe d'enzymes appelées «monoxygénases à fonction mixte» (incluant le cytochrome P-450 et la

NADPHcytochrome- P-450 réductase) situées dans le réticulum endoplasmique lequel, lorsque isolé en laboratoire, est désigné sous l'appellation de microsomes. On parle alors d'oxydations microsomiques (Figure 9).

Il existe plusieurs formes de cytochromes P-450 (isoformes CYP2E1, CYP1A2). Chacune de ces isoformes possède une affinité pour des substrats ou des familles de substrats particuliers. D'autres enzymes, également impliquées dans des réactions d'oxydation, sont présentes dans les mitochondries ou dans le cytosol. Les principales enzymes impliquées dans les réactions d'oxydation de phase I sont, en plus des monooxygénases à fonction mixte, les mono-oxygénases (indépendantes du P-450) faisant intervenir la flavine, les monoamine oxydases, les déshydrogénases des alcools et des aldéhydes, et les peroxydases. Les réactions de réduction, moins fréquentes, présentent moins d'intérêts que les précédentes sur le plan toxicologique. Finalement, certains toxiques (esters, amides) subissent des réactions d'hydrolyse qui ont pour résultat d'introduire des groupes fonctionnels polaires (-OH, -SH, -COOH) augmentant ainsi la polarité globale des molécules. Les enzymes (microsomiques ou cytosoliques) qui assurent ces réactions d'hydrolyse sont de deux types : 1) les hydrolases des époxydes lesquelles, par exemple, transforment le benzo(a)pyrène 7-8 époxyde en benzo(a)pyrène trans- 7-8-dihydrodiol, et 2) les carboxylestérases et les amidases, qui jouent un rôle plus important dans le métabolisme de certains médicaments.

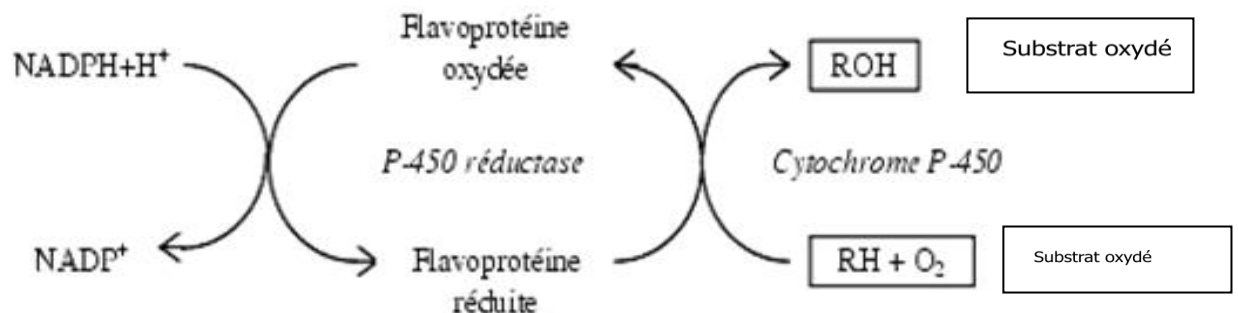


Figure 9 : le rôle de Cytochrome P450.

- **Cytochromes P450 (CYP)**

Cytochrome P450 est sans aucun doute la famille de l'enzyme la plus importante dans le mécanisme de toxicologie. Par conséquent, son rôle, la réglementation et la variabilité génétique seront mis en évidence

avec des exemples sélectionnés. Deux caractéristiques associées à CYP sont toxicologiquement importantes: leur réglementation et le potentiel d'induction, et de la variabilité génétique, y compris des polymorphismes. Tout d'abord, les CYP sont étroitement réglementés et peuvent être induites sur le besoin par de nombreux substrats et xénobiotiques. Pour la plupart des CYP, la régulation est la transcription, mais pour certains et la régulation post-traductionnelle se produit également. Le résultat est que l'expression accrue de l'activité du cytochrome P450 peut grandement augmenter la bioinactivation / de -Activation de composés potentiellement toxiques. Un exemple impressionnant, utilisé pour illustrer les conséquences profondes de CYP l'induction de l'ampleur de la toxicité d'un xénobiotique, la cocaïne est toxique pour les hépatocytes et son potentialisation par la forme de CYP inducteurs multiple. les mécanismes moléculaires de l'induction de CYP par le phénobarbital est de: activation transcriptionnelle de différents CYP qui sont régulée par des mécanismes distincts. Par exemple, CYP1A1, CYP1A2, et CYP1B1 sont régulés par le récepteur aryl-hydrocarbone (AHR). Dans contraste, CYP3A est régulée par le récepteur pregnane X (RPX). Enfin, CYP2B6, CYP3A et CYP2C induction est médiée par le constitutivement récepteur actif (CAR). Elucidation de la dernière de ces mécanismes a finalement versé un peu de lumière sur le mécanisme d'induction phénobarbital sous-jacent. Aujourd'hui, nous savons que l'induction est médiée par un récepteur nucléaire, CAR (Récepteur constitutivement actif). Ce récepteur peut transactiver CYP sans avant la liaison d'un ligand. Par conséquent, contrairement à la plupart des autres récepteurs nucléaires impliqués en induction de CYP, PB est un inducteur mais pas un ligand pour la RCA. PB peut médier deux étapes réglementaires: (1) déphosphorylation de la RCA en sa forme active, de sorte que la RCA peut migrer dans le noyau, et (2) la phosphorylation de la voiture, une fois qu'il est dans le noyau, de sa forme active, de sorte qu'elle peut se lier aux éléments de réponse de l'ADN. C'est effectuée par la formation d'un hétérodimère avec RXR, le récepteur de rétinoïde X. L'hétérodimère se lie à PBREM (module d'amplificateur sensible phénobarbital), après la transcription de la CYP2B6 est augmentée. Les agonistes inverses peuvent désactiver le récepteur et la transcription des gènes (tels agonistes inverses comprennent des stéroïdes lié à androstanol). Le CAR est régulée à la baisse par les cytokines pro-inflammatoires, ce qui

pourrait expliquer la réponse négative de la phase aiguë provoquée par ces cytokines (Figure 10).

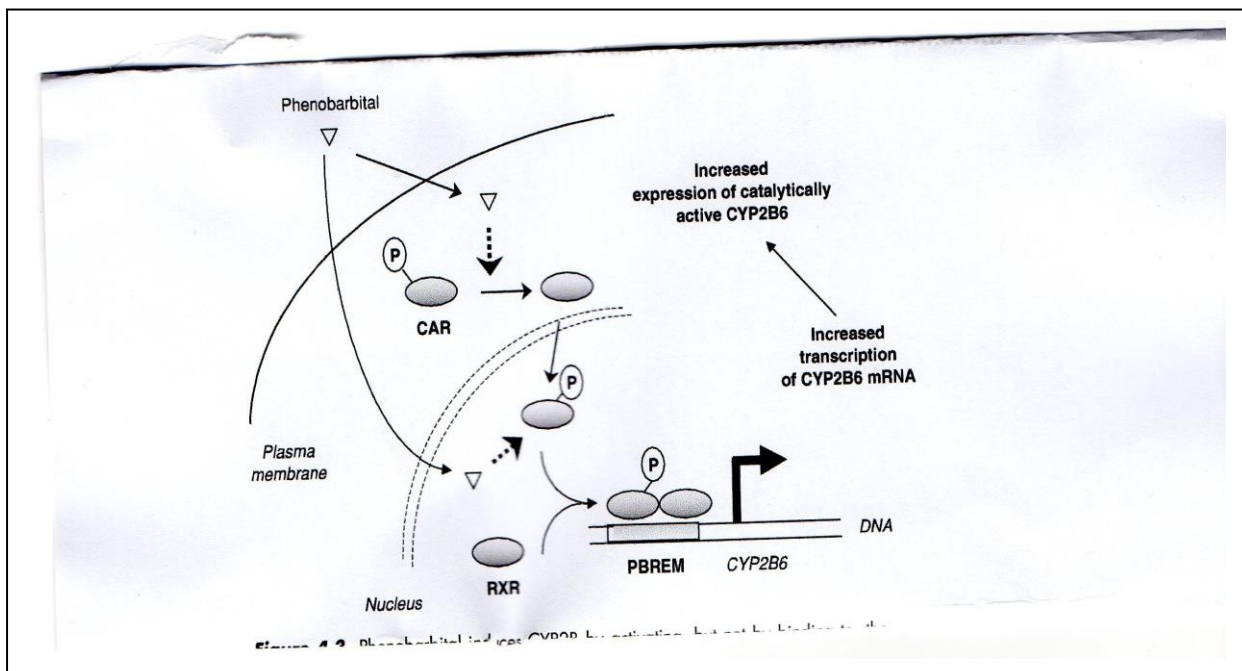


Figure 10 : présente l'induction enzymatique de CYP au niveau moléculaire

La deuxième caractéristique toxicologique associée à CYP est la génétique variabilité chez les humains. Il existe plusieurs polymorphismes connus (définis comme survenant en 1 pour cent de la population) et d'autres, les variations des allèles moins fréquents pour les gènes CYP individuels. Là encore, ces différences individuelles dans la puissance de métabolisme des xénobiotiques pourraient facilement expliquer le bon nombre des réactions différentielles observées aux xénobiotiques entre les individus et les différentes populations. Le premier polymorphisme du CYP a été détectée par un heureux hasard, et son élucidation a été déclenchée par un premier réponses pharmacologiques inexplicées avec le débrisoquine de drogue. Aujourd'hui, on sait qu'elle est la CYP2D6 humaine qui présente une nette génétique polymorphisme en raison de la présence de diverses mutations du gène CYP2D6. Les bases moléculaires de ces mutations a été élucidée. La perte de fonction de certains allèles conduit au phénotype des «métabolisme lents». Les hétérozygotes sont

souvent «métabolismes intermédiaires». D'autre part, l'amplification d'un gène actif peut conduire au phénotype "métabolisme ultrarapides. polymorphismes similaires ont été trouvés pour d'autres CYP et pour la phase II des enzymes. En fait, de nombreux génotypes modifiés résultent dans le phénotype de métabolisme faible. Étant donné que le métabolisme de ces enzymes a été impliquée dans l'activation, la toxicité et la cancérogénicité de certains xénobiotiques, une corrélation entre la le génotype et le développement de l'expression individuelle de la toxicité provoquée par un xénobiotiques est probable

- **Mécanismes et conséquences toxicologiques de l' induction de isoforme de CYP**

Parmi les nombreuses implications de l'activité de CYP en mécanisme de toxicologie, un conséquence du métabolisme des xénobiotiques par des niveaux fortement exprimés de CYP est l'augmentation du taux indésirable de la clairance d'un xénobiotique. Si cela est un médicament thérapeutique, la perte rapide de la fonction thérapeutique peut en résulter, entraînant éventuellement des effets physiopathologique. Cela peut se produire lorsque un médicament induit une forme de CYP pour lequel un second médicament est un substrat, aussi, ce qui conduit à des interactions médicamenteuses. À la fois la cyclosporine A et l'éthinyl estradiol sont des substrats pour la CYP3A4 humaine, et l'augmentation de l'expression de CYP3A4 causerait ces médicaments à métaboliquement éliminés trop rapidement. En effet, l'hyperforine, le composant actif du millepertuis, est un inducteur puissant du CYP3A4 dans le foie Les conséquences logiques d'une telle CYP induction non reconnue pourrait être loin: par exemple, si l'induction enzymatique était de modifier la disposition d'un contraceptif oral, l'échec de la contraception pourrait conduire à un être foetus exposés par inadvertance à un nouveau médicament. Par conséquent, il existe un besoin urgent d'établir les propriétés d'induction enzymatique de toutes les nouvelles entités chimiques. Mais la façon dont la cellule hépatique "de détection de la présence d'un agent inducteur est possible, peut et comment la transcription et l'expression accrue du CYP peuvent être réglementées? Ce est obtenue par le PXR.. Co-activateurs peuvent également participer à l'induction de la transcription Deux PXR et RXR peut être induite par l'activation d'un autre récepteur, le

récepteur de glucocorticoïde (GR). Ceci explique pourquoi glucocorticoïdes (indirectement) induisent la transcription de CYP3A4. D'autre part, PXR est régulée à la baisse par proinflammatoire des cytokines (par exemple IL-6), qui est à la base de l'observation bien connue que ces cytokines exercent une réponse négative de la phase aiguë et provoquent une diminution dans certains P450.

- **Mécanismes et conséquences de l' inhibition de l'isoforme de CYP**

Un autre aspect de mécanisme toxicologique est l'inhibition d'une isoforme CYP particulier par un xénobiotique. Par contraste avec le phénomène d'induction de CYP par un composé, qui nécessite plusieurs doses et plusieurs jours pour atteindre l'effet maximal, l'inhibition est un effet immédiat. L'inhibition de l'enzyme pourrait conduire à l'accumulation d'autres substrats pour cette forme de CYP, en raison de la clairance métabolique altérée, et, dans de rares cas, la toxicité. Comme les mécanismes d'inhibition CYP sous-jacente, un irréversible destruction de CYP par un composé. L'interactions compétitive de deux substrats pour la forme même de CYP (par exemple CYP3A4 et les interactions médicamenteuses sont possibles. En effet, la réactivité d'un métabolite produit par CYP peut grandement déterminer le site et l'étendue des conséquences en aval de ces métabolites réactifs. Si la stabilité (demi-vie) du métabolite est extrêmement courte, ce qui peut interagir avec la bonne molécule au niveau du site de la génération, à savoir l'enzyme elle-même. La conséquence logique d'une telle inactivation est basé sur un mécanisme d'auto-limitation de la réaction, parce que le CYP impliqué est irréversiblement endommagé et doit être resynthétisé. le mécanisme d'inactivation de CYP se produit également avec d'autres substances tel que furano-coumarins réactifs (psoralènes), y compris ceux qui sont impliqués dans des réactions toxiques photoactivés. le furanocoumarine le plus largement étudié, 8- méthoxypsoralène (8-MOP), est un puissant inhibiteur de la CYP2A6 humaine. le mécanisme d'inhibition a été élucidée; il procède par bioactivation de 8-MOP à un époxyde réactif, ce qui modifie de manière covalente un résidu d'acide aminé de la CYP apoprotéine (**Figure 11**).

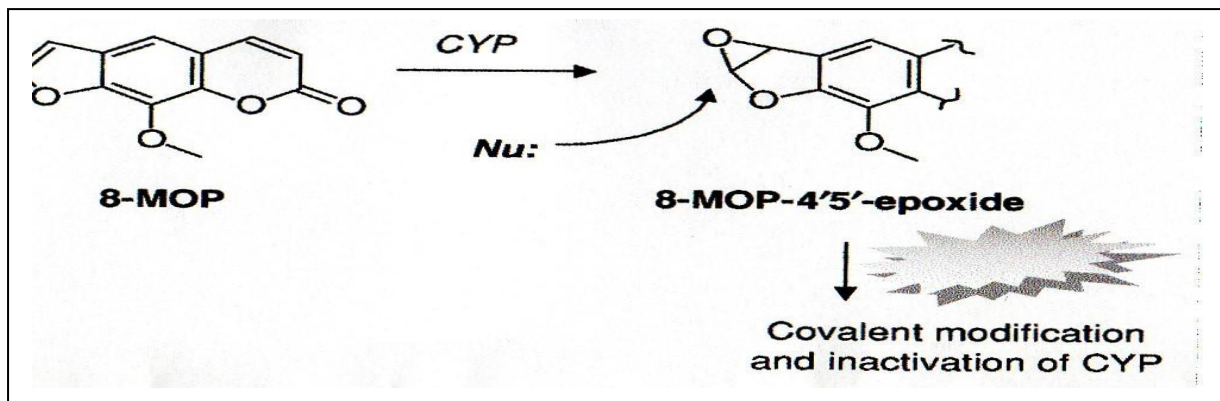


Figure 11 : représente l'inhibition enzymatique de CYP au niveau moléculaire

- **Régulation du métabolisme des xénobiotiques**

La régulation des enzymes de métabolisme de xénobiotique, et plus particulièrement celle des CYPs constitue un paramètre capital de l'élimination et de l'innocuité des molécules chimiques formées après métabolisation des xénobiotiques. L'expression de ces enzymes membranaires localisées dans le réticulum endoplasmique est inductible. Elle dépend généralement de la liaison des composés à des récepteurs et constitue la première étape nécessaire à l'adaptabilité de la cellule, entraînant la transcription des enzymes de phase I et de II. L'induction, activation ou inhibition des différentes formes de CYP peut se traduire par une modification des taux de synthèse des hormones lorsqu'elles sont prises en charge par ces enzymes. Par exemple, l'atrazine est un inducteur du CYP2C19 (aromatase) favorisant une surproduction d'oestrogène et entraînant des effets féminisants. Par des effets anti-aromatase, d'autres pesticides (propiconazole, ketoconazole, tributylétain, organochlores) perturbent la fonction androgénique. Il existe un polymorphisme génétique important pour plusieurs CYP, en particulier les formes 2C9, 2C19 et 2D6, conduisant à des niveaux d'expression enzymatiques très différents selon les individus. Ce polymorphisme se traduit par des différences interindividuelles de susceptibilité à l'action des toxiques. Les enzymes de phase II peuvent être également induites ou inhibées par des xénobiotiques mais dans une moindre mesure que les cytochromes P450.

• La Réaction de phase II

Les réactions de phase II confèrent également un caractère hydrosoluble aux molécules et facilitent d'autant leur excrétion, sauf pour les réactions d'acétylation et de méthylation. Les réactions de phase II ont souvent comme substrat un produit de biotransformation de la phase I. Cependant, certains produits peuvent être directement impliqués dans une réaction de phase II. Ces réactions produisent des conjugués suite au couplage entre un toxique (ou un métabolite) et un produit endogène, déjà présent dans l'organisme. Les réactions de phase II sont la glucuroconjugaison (glucuronyltransférase), la sulfoconjugaison (sulfotransférase), la conjugaison avec le glutathion (glutathion transférase), la conjugaison avec des acides aminés (acyltransférase), l'acétylation (N-acétyltransférase) et la méthylation (N ou Ométhyltransférase) (Figure 12).

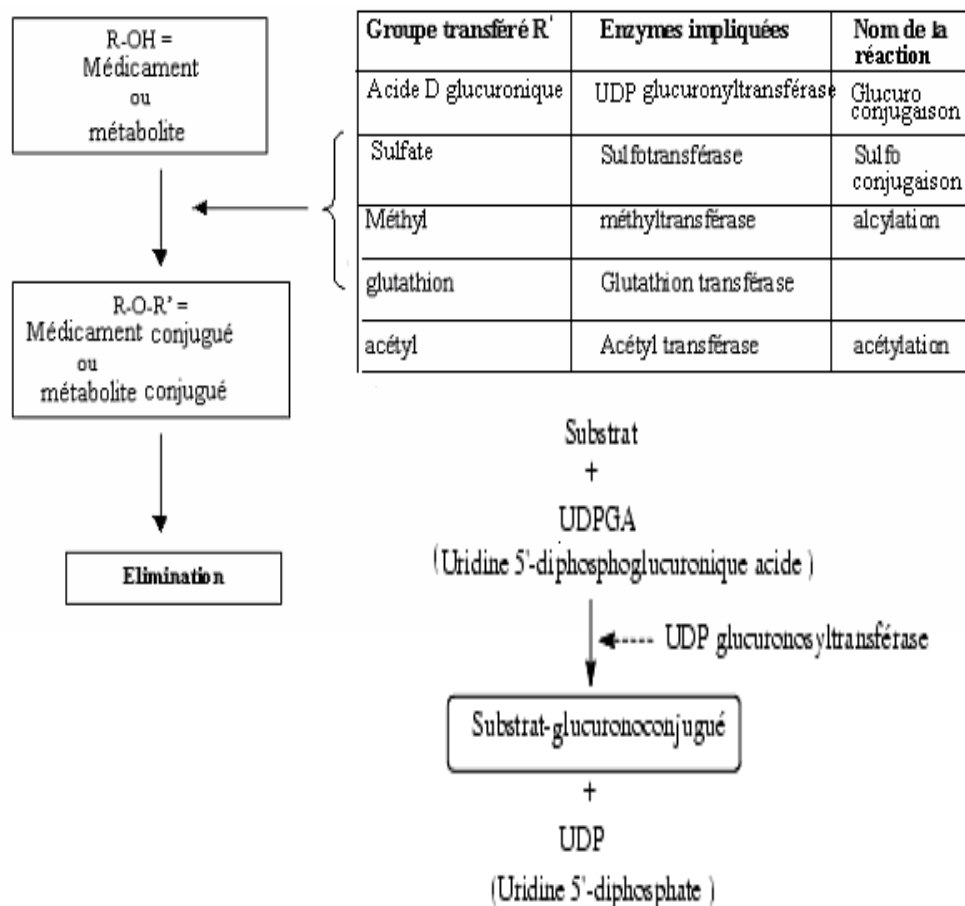


Figure 12 : les réactions de la phase II.

- **Quelque exemple sur la biotransformation des substances toxiques**
- **Hydrocarbures aromatiques benzéniques**

Le chef de file de ces hydrocarbures est le benzène, constitué uniquement d'un noyau aromatique, ce qui le distingue de ses homologues supérieurs qui possèdent une ou plusieurs chaînes latérales aliphatiques comme le toluène, l'éthylbenzène ou les xylènes par exemple. Cette différence est essentielle dans la formation de métabolites toxiques, car il est plus facile d'oxyder une chaîne latérale aliphatique qu'un noyau aromatique et les métabolites seront donc de nature très différente. Seul le benzène est considéré comme cancérogène. Environ 50 % du benzène qui arrive au niveau sanguin est éliminé surtout par voie pulmonaire, et plus faiblement sans métabolisation, par voie urinaire. Le reste est soit stocké dans le tissu adipeux et la moelle osseuse, soit métabolisé au niveau hépatique et, à un degré moindre, dans la moelle osseuse. Le CYP2E1 transforme le benzène en époxybenzène qui est spontanément réarrangé en phénol, lui-même métabolisé ultérieurement par le CYP2E1 en hydroquinone. L'hydroquinone et ses métabolites hydroxylés sont convertis dans la moelle osseuse par la myéloperoxydase en benzoquinones, qui sont des substances hématotoxiques et génotoxiques pouvant être reconverties par les NQO1 en métabolites hydroxylés moins toxiques. Une étude a montré que les individus présentant une toxicité hématologique au benzène avaient une activité CYP2E1 forte et une activité NAD(P)H : quinone oxydoréductase (NQO1) faible (figure 13).

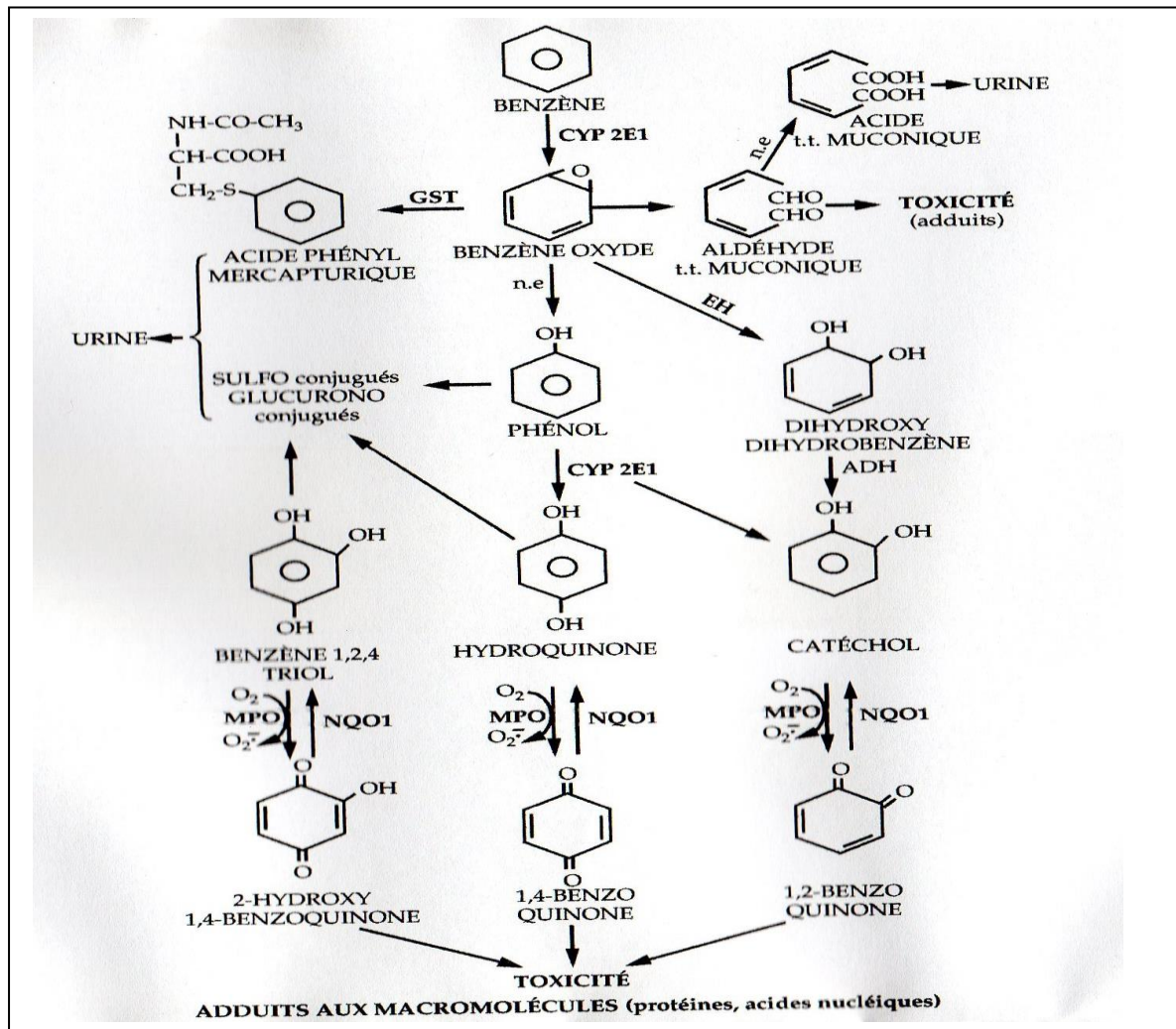


Figure13 : représente le métabolisme de l'hydrocarbures aromatiques benzéniques

4.1.4. L'excrétion

Le processus d'excrétion conduit à une élimination définitive d'une substance hors de l'organisme. Les substances mères et leurs métabolites sont alors principalement éliminées par le rein dans l'urine, par la bile (féces), par les poumons dans l'air exhalé, par le lait, la salive et parfois même les phanères (cheveux, ongles). Les mécanismes de transfert trans membranaires impliqués dans l'excrétion des toxiques et de leur(s) métabolite(s) sont ceux décrits plus haut: diffusion passive, filtration et transport actif. La voie urinaire est sans contredit la plus importante des voies d'excrétion. Deux processus contribuent, de façon plus ou moins marquée, à la formation de l'urine et à l'excrétion urinaire des substances : la filtration glomérulaire et les mouvements tubulaires (réabsorption et sécrétion). Chacun est sous le contrôle de plusieurs facteurs, comme la pression hydrostatique (filtration

glomérulaire), le pH de l'urine et l'ionisation des molécules (réabsorption), et la présence de transporteurs spécifiques pour les acides et les bases (transport actif). Par ailleurs, certains toxiques sont éliminés de façon importante dans les fèces. C'est notamment le cas pour une substance qui est peu ou pas absorbée au niveau du tractus gastrointestinal ou pour une substance qui se retrouve dans l'intestin, après avoir été excrétée dans un premier temps dans la bile sous forme d'un conjugué de l'acide glucuronique ou du glutathion. L'expression «cycle entéro-hépatique» désigne le phénomène par lequel un toxiques, déjà conjugué, est hydrolysé dans l'intestin puis réabsorbé dans la circulation hépato-portale pour finalement effectuer un nouveau passage au foie et éventuellement dans la grande circulation. Les substances volatiles dont la concentration sanguine est en équilibre avec les concentrations tissulaires peuvent être excrétées dans l'air exhalé par les poumons. On exploite parfois cette voie d'excrétion pour évaluer l'exposition de travailleurs à certains solvants (styrène, toluène) ou pour estimer le taux d'alcoolémie chez les individus ayant consommé de l'alcool.

Finalement, le lait maternel peut contenir des quantités appréciables de produits liposolubles (DDT, mercure méthylé) en raison de son contenu élevé en lipides. D'autres toxiques comme le plomb sont excrétés dans le lait, en empruntant le système de transport du calcium. Certains métaux, comme le mercure, se déposent dans les cheveux dont la croissance est d'environ 1 cm par mois. À partir de sections de cheveux, il est possible de mesurer l'exposition à ce métal en fonction du temps. Il est également possible d'estimer l'exposition au plomb par la mesure de sa concentration dans la salive.

4.2. La Toxicodynamique

La phase toxico dynamique (interaction avec le tissu cible), La fraction de substance qui passe de la phase toxico cinétique à la phase toxico dynamique détermine la disponibilité biologique ou bio disponibilité, C'est à l'issue de la phase toxico dynamique que l'on peut observer les effets toxiques d'une substance. La toxicodynamique c'est le Processus d'interaction des substances potentiellement toxiques avec des sites cibles et les conséquences physiologiques et biochimiques conduisant à des effets indésirables (Figure 14). Le récepteur physiologique possède 2 propriétés fondamentales

- Il reconnaît spécifiquement un agent toxique.
- Il produit un effet biochimique ou biophysique en réponse à la fixation de cet agent toxique

La quasi-totalité des substances toxiques est électrophile ou le devient après bio transformation. Les récepteurs moléculaires sont donc des sites nucléophiles.(Radicaux contenant des hétéros atomes OH, SH, NH-,... portés par des biomolécules ADN, ARN, protéines. Les macromolécules biologiques

(ADN, ARN, protéines) sont riches en sites nucléophiles et sont des récepteurs de choix pour des toxiques électrophiles. Les lipides insaturés sont également des sites d'attaque privilégiés des agents toxiques.

Les sites nucléophiles des protéines sont représentés par quelques acides aminés riches en électrons histidine, cystéine, lysine, tyrosine, tryptophane, méthionine, ces acides aminés réagissent avec les cancérogènes, Les acides nucléiques, la nature des substituants des bases de ces acides nucléiques : les hydrocarbures attaquent le groupe aminé de la guanine

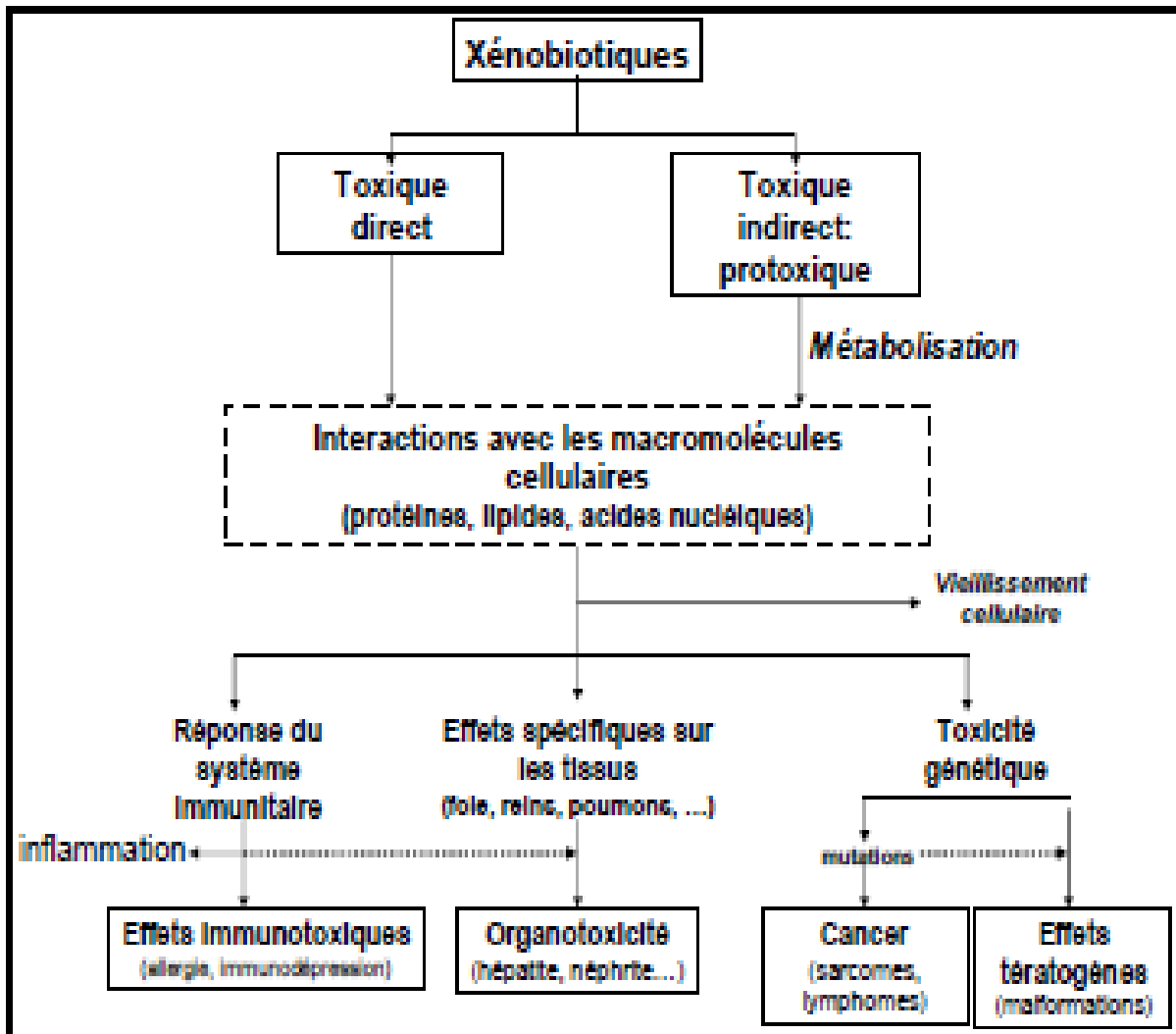


Figure 14 : La phase toxicodynamique des xénobiotiques.

5. La détoxification des substances toxiques

5.1. Les réactions de la phase I

Au cours de la détoxification des xénobiotiques, des modifications chimiques permettent de modifier (en général diminuer) l'activité de ces molécules, donc leur toxicité. Ces réactions sont les réactions de phase I, ce sont en général des oxydations : hydroxylations par les cytochromes p450, époxydations, déshydrogénations. Mais certains xénobiotiques sont hydrolysés, réduits, désaminés ou subissent des réactions de soustraction : désalkylations, déshalogénations... Il arrive que ces réactions conduisent à des produits plus toxiques qu'au départ, mais ces réactions dangereuses sont rares : benzopyrène, fluoroacétate, glucosides cyanogénétiques...

➤ Les réactions d'hydroxylation

Les réactions d'hydroxylation sont les plus fréquentes des réactions de phase I, elles sont catalysées par les cytochromes p450, chromoprotéines à noyau hème, qui forment avec une oxydoréductase à NADPH et une redoxine, une petite chaîne respiratoire microsomiale. Les hydrogènes du NADPH et d'un proton, servent à décomposer une molécule d'oxygène dont un atome est réduit en H₂O et l'autre est ajouté au substrat. Ce sont donc des monooxygénases. Les hydroxylases participent à de nombreux métabolismes en particulier des hormones stéroïdes. Leurs substrats de détoxification sont extrêmement variés, souvent aromatiques, comme le benzène qui est transformé en phénol par les cytochromes p450 (Figure 15).

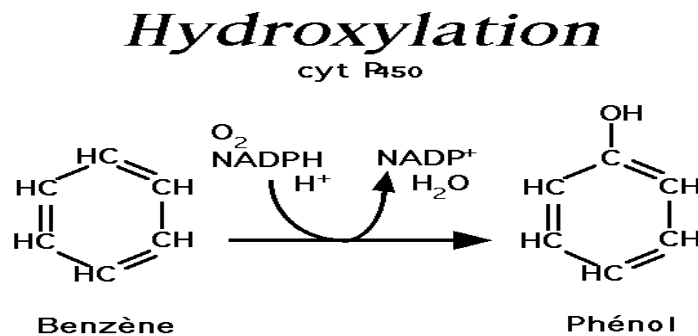


Figure15: les réactions d'hydroxylation.

➤ **Les réactions d'époxydation**

D'autres cytochromes p450, par une réaction identique à celle d'hydroxylation, catalysent l'addition d'un des atomes d'oxygène sur une liaison éthylénique en créant un pont époxyde. Les époxydases agissent sur des substrats du métabolisme : squalène pour la synthèse du cholestérol, arachidonate pour la formation des eicosanoïdes. La fumée du tabac permet l'inhalation de carbures polycycliques comme le benzopyrène. Le benzopyrène subit une époxydation dans le foie, qui aboutit à un produit plus cancérigène que le substrat : dans ce cas la phase I conduit à une augmentation de la toxicité (Figure 16).

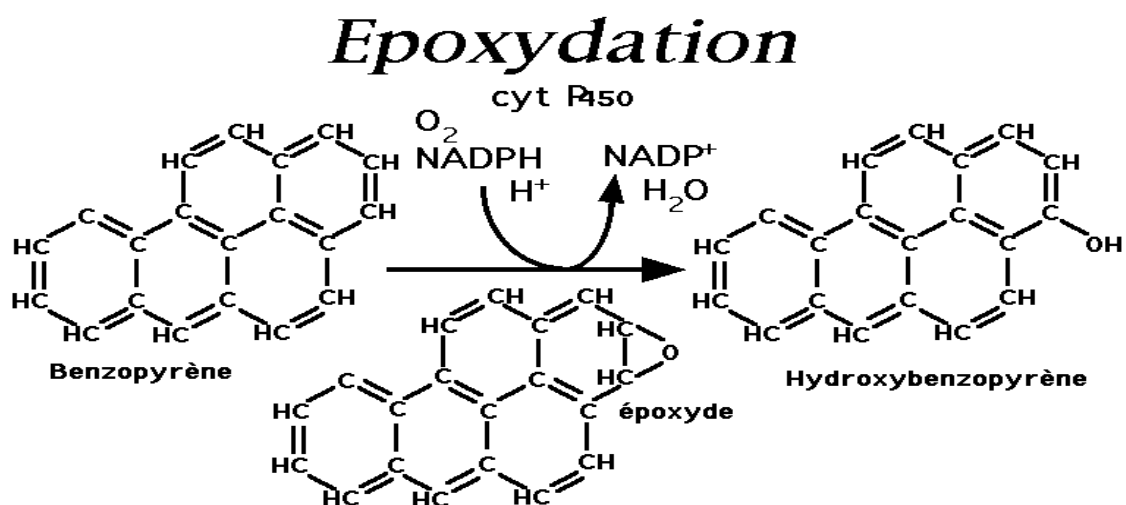


Figure 16 : Les réactions d'époxydation.

➤ Les réactions ω -oxydation

Le cytochrome p450 4A1 permet l'oxygénation spécifique du carbone terminal des chaînes aliphatiques (ω -hydroxylation), en transférant un des atomes d'oxygène sur le méthyl terminal conduisant à une fonction alcool. Cette réaction permet le métabolisme des carbures aliphatiques naturels qui sont transformés en alcools gras puis oxydés et conjugués en acyl-CoA, avant d'être soumis à la β -oxydation. Beaucoup de détergents ménagers sont à base de laurylsulfate (= dodécylsulfate), alcool gras à 12 carbones sulfaté. La fonction sulfate ne permettant pas la β -oxydation de ces composés, le foie fait une oxydation à l'autre extrémité de la chaîne afin de pouvoir oxyder la chaîne grasse. Le dernier composé sulfoglycolate est éliminé dans les urines (Figure 17).

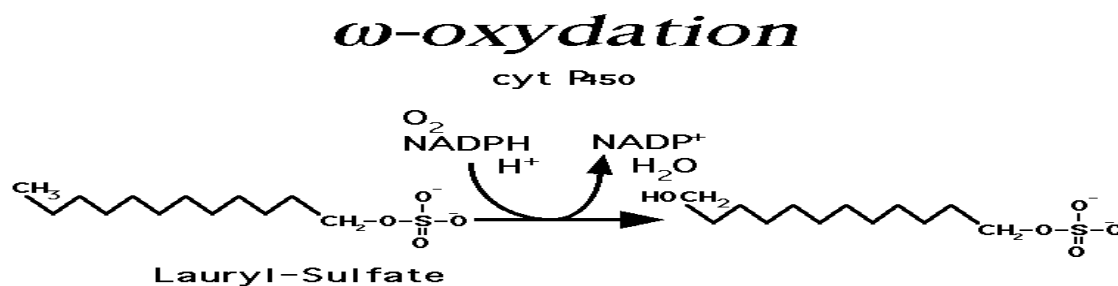


Figure 17 : Les réactions ω -oxydation

➤ Les réactions desmolyse

L'oxydation de deux carbones voisins par les hydroxylases à Cyt p450 se poursuit jusqu'à la séparation des ces deux carbones oxydés en aldéhydes ou en cétones. Dans le métabolisme des stéroïdes l'oxydation des carbones 20 et 22 aboutit au détachement de la chaîne latérale (iso), celle du carbone 17 au détachement d'un acétaldéhyde. De même la tryptophane pyrrolase oxyde les carbones et du noyau indol pour l'ouvrir. Certains carbures ou acides gras insaturés peuvent être oxydés au niveau des liaisons éthyléniques pour produire des acides gras à chaînes courtes (Figure 18).

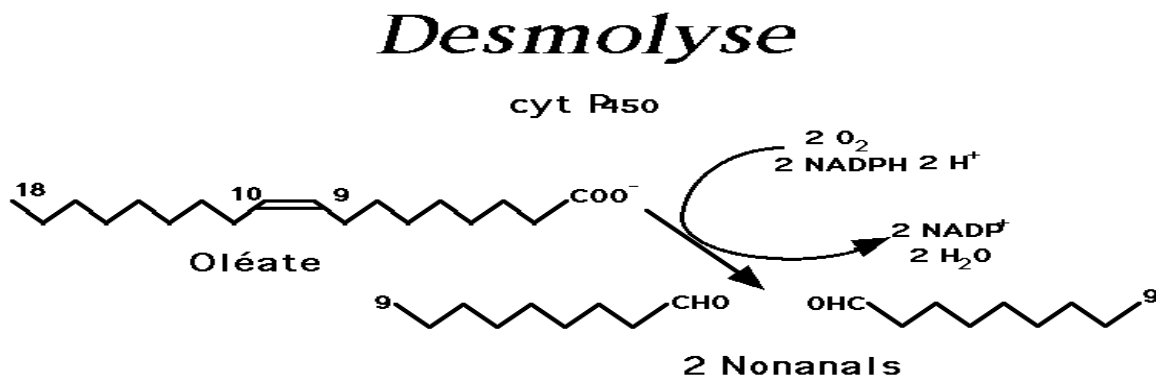


Figure 18 : Les réactions desmolyse.

➤ Les réactions désamination

Les amines de l'alimentation ou celles produites par les décarboxylases des bactéries intestinales sont absorbées au niveau de l'intestin. Celui-ci possède une monoamine oxydase (MAOB) qui procède à une désamination oxydative de ces amines. Les amines exogènes sont abondantes dans certains fromages. Chez les sujets traités par des inhibiteurs irréversibles de la MAO, la tyramine n'est pas oxydée au niveau intestinal et passe dans la circulation où elle se manifeste par une hypertension artérielle. Les crises hypertensives qui accompagnent ces traitements sont appelées « effet fromage » (Figure 19).

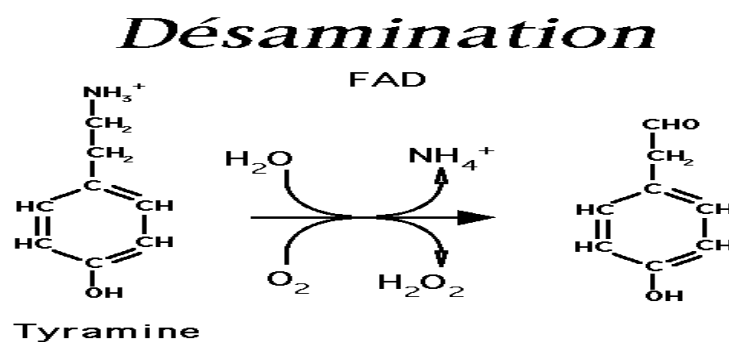


Figure 19 : Les réactions désamination.

➤ Les réactions désalkylation

D'autres réactions de phase I sont des soustractions de radicaux alkyl, en particulier des déméthylations. Celles ci peuvent porter sur un radical lié à une fonction amine (N-désalkylation) ou à une fonction alcool (O-désalkylation). Cette soustraction est catalysée par une oxydase à cyt p450 qui fixe un atome d'oxygène sur le premier carbone du radical et détache ensuite celui-là sous forme d'aldéhyde. Ces désalkylations oxydatives se rencontrent dans plusieurs métabolismes : lysine, choline, ... Le Cyt P450 (CYP 1A2) métabolise 80 % de la caféine en paraxanthine urinaire. Le radical méthyl est soustrait et oxydé en formaldéhyde (Figure 20).

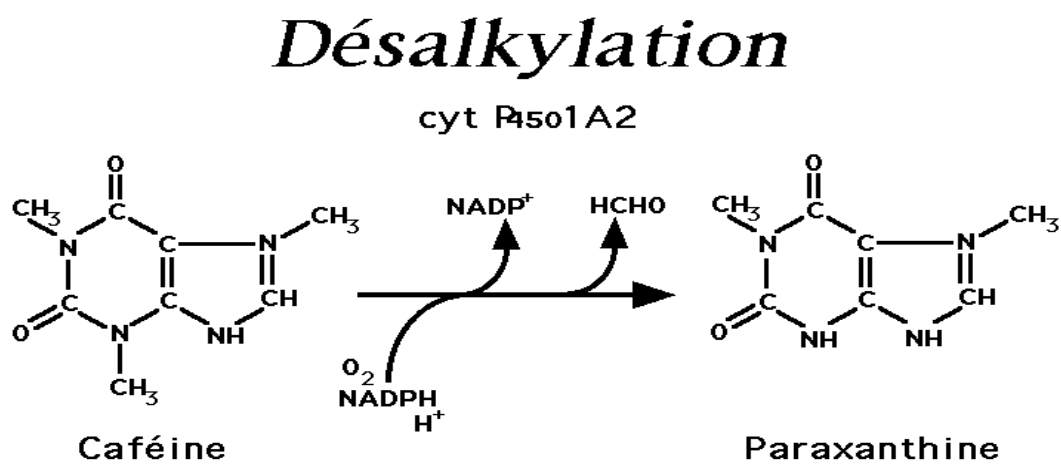


Figure 20: Les réactions désalkylation.

➤ Les réactions de réduction

Bien que beaucoup plus rares que les réactions d'oxydation, il existe dans les réactions de phase I des réactions de réduction. Elles sont souvent catalysées par des réductases à NADPH ou à glutathion. Ainsi l'acide picrique est réduit en acide picramique par une réductase à NADPH. La trinitrine est réduite par une glutathion réductase en dérivés nitriques et nitrite (Figure 21).

Réduction

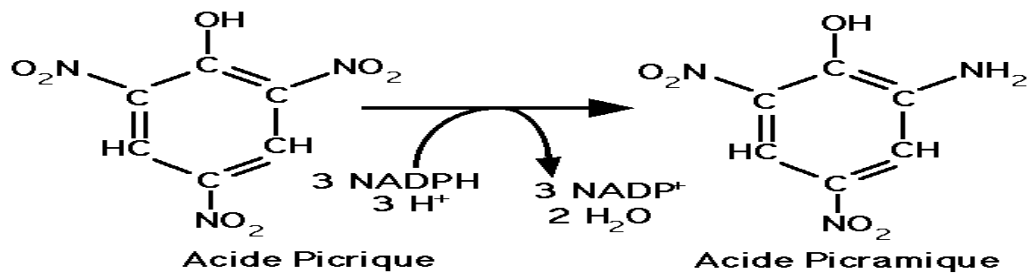


Figure 21: Les réactions de réduction.

➤ Les réactions déshalogénéation

Les hormones thyroïdiennes ou les acides aminés iodés résultant du catabolisme de la thyroglobuline sont désiodés au cours de leur catabolisme. Cette déshalogénéation est catalysée par une enzyme qui peut aussi désioder des substrats exogènes. Le DDT (DichloroDiphénylTrichloroéthane) est un pesticide qui fut longtemps employé contre les mouches. Les insectes se sont adaptés à ce xénobiotique en induisant l'expression d'une déchlorinase qui soustrait un ion chlore du DDT, ce qui en permet l'inactivation et le catabolisme (Figure 22).

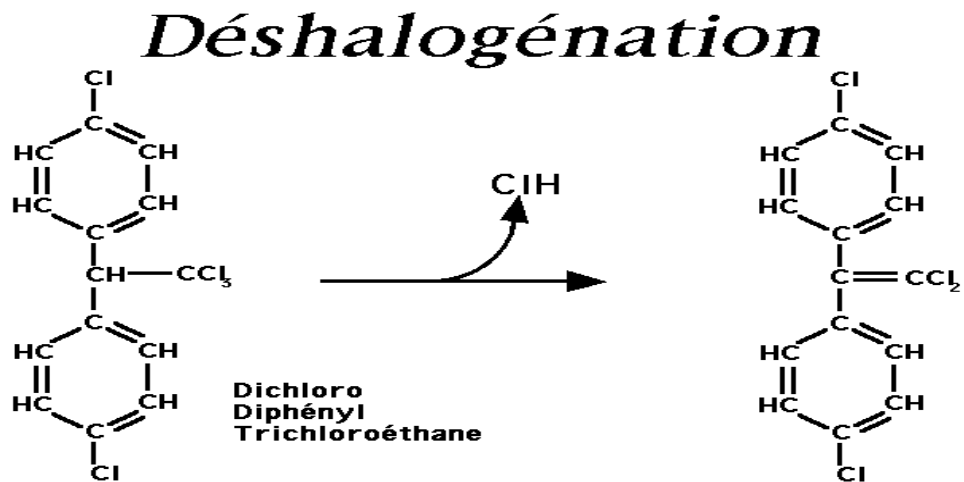


Figure 22 : Les réactions déshalogénéation.

➤ Les réactions d'hydrolyse

Les hydrolases sont très nombreuses dans toutes les voies métaboliques : lipases, peptidases, nucléases... De nombreux médicaments ou xénobiotiques sont des esters ou des amides dont l'hydrolyse aboutit à la perte de l'activité ou de la toxicité. La procaine est hydrolysée par la pseudochoolinestérase en acide paraaminobenzoïque (PAB). Le produit de cette réaction est incompatible avec les sulfamides, qui sont des analogues structuraux du PAB. Ainsi apparaît un effet secondaire (antagonisme vis-à-vis des sulfamides) qui est la conséquence du métabolisme du médicament (Figure 23).

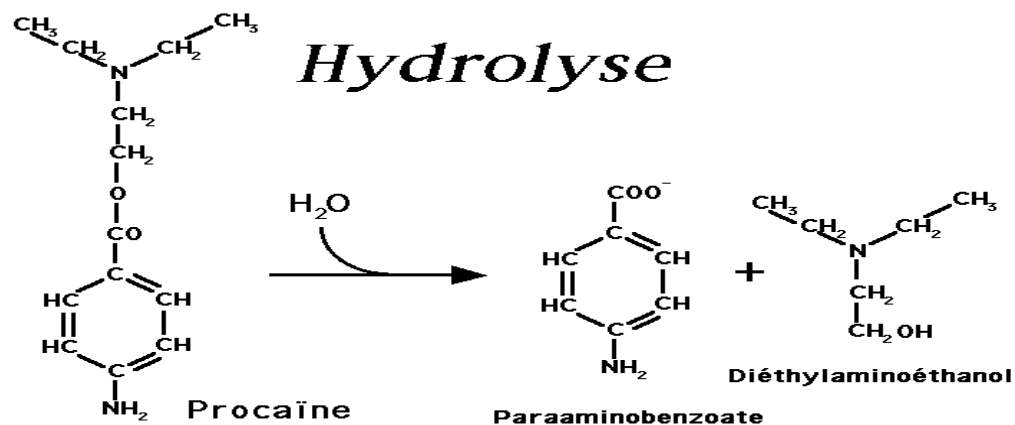


Figure 23 : Les réactions d'hydrolyse.

5.2. Les réactions de la phase II

Au cours de la détoxification des xénobiotiques, des modifications chimiques ou des condensations de molécules permettent de modifier (en général augmenter) la solubilité de ces molécules, donc leur excrétion. Ces réactions sont les réactions de phase II. Ce sont en général des conjugaisons avec des substrats hydrophiles : acide glucuronique le plus souvent, mais aussi sulfurique ou acétique ; ou bien avec des acides aminés : glycolle, glutamine, ou bien encore d'autres substrats : glutathion, carnitine, ... Il arrive que ces réactions conduisent à des composés moins solubles qu'au départ, mais ces réactions dangereuses sont rares : esters de la carnitine, composés méthylés, ...

➤ Les réactions glucuroconjugaison

La conjugaison des xénobiotiques avec l'acide β -glucuronique est la plus fréquente des réactions de la phase II. L'acide β -glucuronique est un dérivé du glucose (voie du glucuronate, dans le tome Réserves énergétiques). La glucuroconjugaison intervient dans le métabolisme de la bilirubine (UDP-glucuronosyl transférase). La bilirubine libre, insoluble, doit être transportée dans le plasma par la sérumalbumine. Une fois conjuguée par le glucuronate elle devient soluble et peut être éliminée par les reins. Le paracétamol est éliminé en majorité sous la forme d'un glucuroconjugué. La morphine est partiellement glucuroconjugée en 6. Cette conjugaison ne la rend pas inactive, mais facilite son élimination urinaire et empêche son passage à travers la barrière hémato-méningée (Figure 24).

Glucuroconjugaison

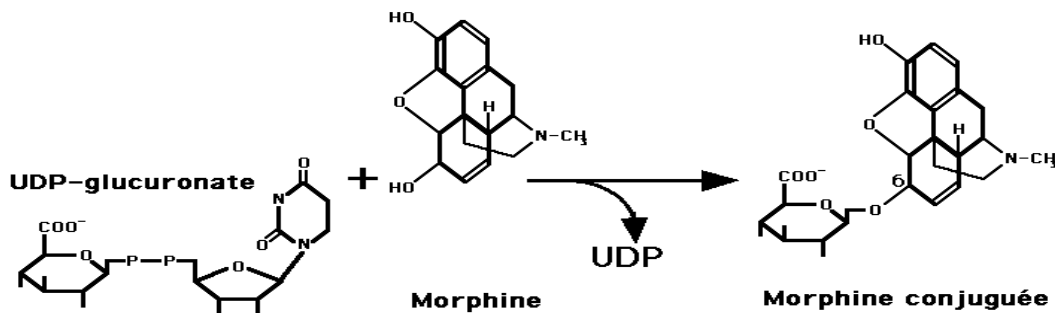


Figure 24 : Les réactions glucuroconjugaison.

➤ Les réactions sulfoconjugaison

La sulfatation est une réaction de conjugaison que nous avons rencontrée dans le métabolisme des acides biliaires (sulfolithocholate) et dans celui des androgènes surrénaliens (sulfate de DHEA). Le coenzyme qui permet le transfert de l'ion sulfate et le PAPS ou phosphoadénosine phosphosulfate, dont nous avons vu la formation dans le métabolisme des acides aminés soufrés. Le paracétamol est sulfaté sur la fonction phénol, comme les stéroïdes. Ce sulfate peut être ensuite substitué par un glutathion comme nous allons le voir. La méthyl-DOPA, analogue structural de la dihydroxyphénylalanine et ses dérivés sont sulfatés sur le noyau catéchol (Figure 24).

Sulfoconjugaison

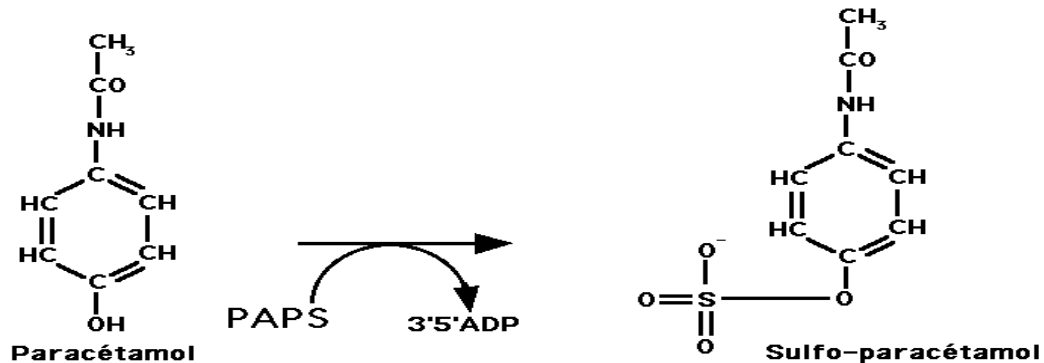


Figure 24 : Les réactions sulfoconjugaison.

➤ Les réactions de méthylation

Les réactions de méthylation sont des réactions de détoxification qu'on rencontre dans certaines voies métaboliques comme le catabolisme des catécholamines, catalysée alors par la catechol-O-méthyl transférase (COMT). Le coenzyme qui permet le transfert du radical méthyl est la S-adénosylméthionine, dont nous avons vu la formation dans le métabolisme des radicaux monocarbonés. La méthylation de la nicotine est une des voies de détoxification de cet alcaloïde du tabac (Figure 25).

Méthylation

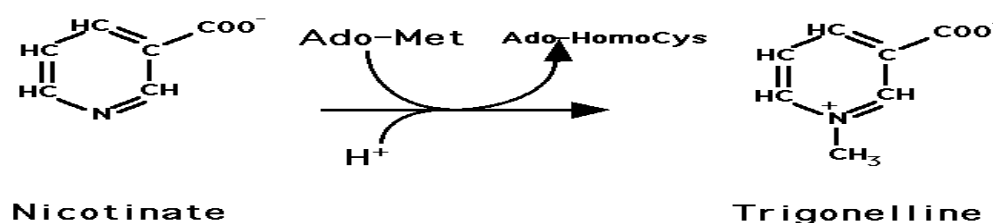


Figure 25 : Les réactions de méthylation.

➤ Les réactions d'acétylation

Des réactions d'acétylation se rencontrent dans le métabolisme : synthèse de la N-acétylglutamine pour la régulation du cycle de l'urée. L'isoniazide est acétylée par une acétyltransférase hépatique dont l'activité est génétiquement déterminée. L'acétyl se substitue à un des hydrogènes d'une fonction amine. Les sulfamides sont aussi éliminés par acétylation (Figure 26).

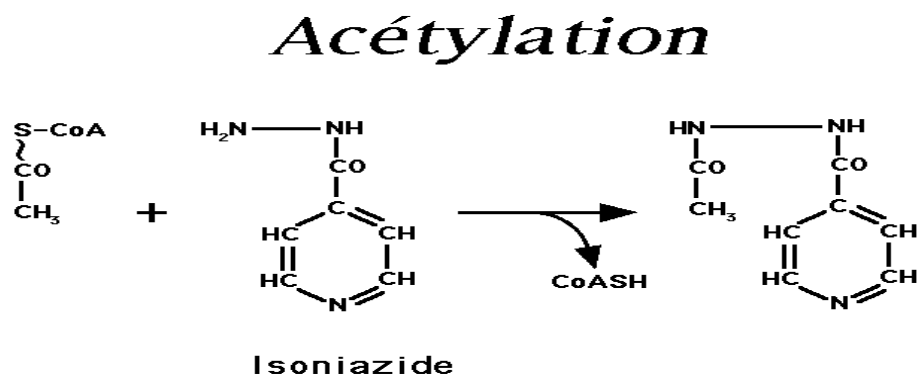


Figure 26: Les réactions d'acétylation

➤ Les réactions de glycoconjugaison

La conjugaison avec le glycolle est une des réactions principales du métabolisme des acides biliaires. De nombreuses substances aromatiques xénobiotiques sont conjuguées avec le glycolle au cours des réactions de détoxification de phase II. L'acide benzoïque est un produit résultant du métabolisme de nombreux xénobiotiques. Après conjugaison avec le glycolle, il donne l'acide hippurique. Ce dernier est fréquemment retrouvé dans les urines des chevaux d'où il tire son nom (Figure 27).

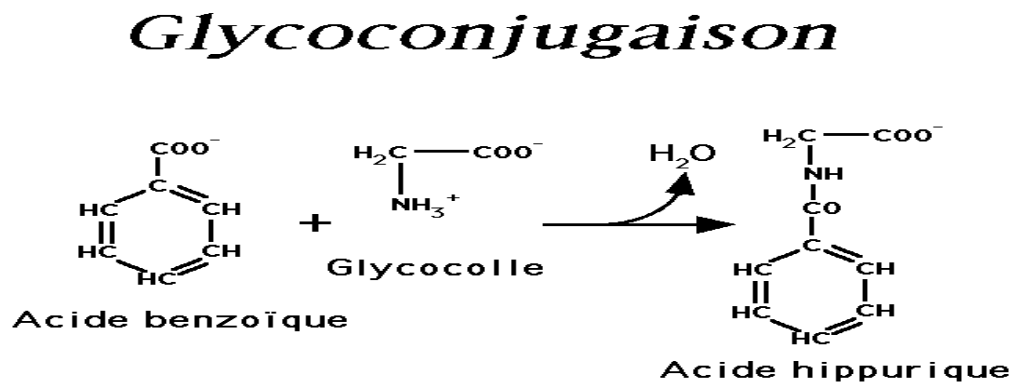


Figure 27 : Les réactions de glycoconjugaison.

➤ Les réactions d'esters de la carnitine

Les acyl-coenzymes A issus du métabolisme des acides gras ou des acides aminés sont transférés sur la carnitine par des acyl-CoA carnitine transférase pour entrer dans les mitochondries et poursuivre leur oxydation. Certains acyl-coenzymes A issus du métabolisme de xénobiotiques se lient avec la carnitine de manière irréversible, entraînant le blocage de ce coenzyme et celui de la β -oxydation qui en dépend. Les hypoglycines sont des acides aminés (graines de plantes exotiques) comprenant un cycle propanique dans leur radical. Ils commencent leur dégradation comme les acides aminés branchés jusqu'à la décarboxylation oxydative qui produit un acyl-CoA. Le passage de ce radical vers la mitochondrie aboutit à une acyl-CoA intramitochondrial qui ne peut pas être oxydé. L'acyl-carnitine intermédiaire ne pouvant plus être transféré, l'entrée des acides gras dans la β -oxydation est rapidement inhibée et le métabolisme énergétique ne peut plus se faire que par la glycolyse. L'hypoglycémie qui en résulte peut être mortelle. C'est cette hypoglycémie qui a fait nommer ces acides aminés les hypoglycines (Figure 28).

Esters de la carnitine

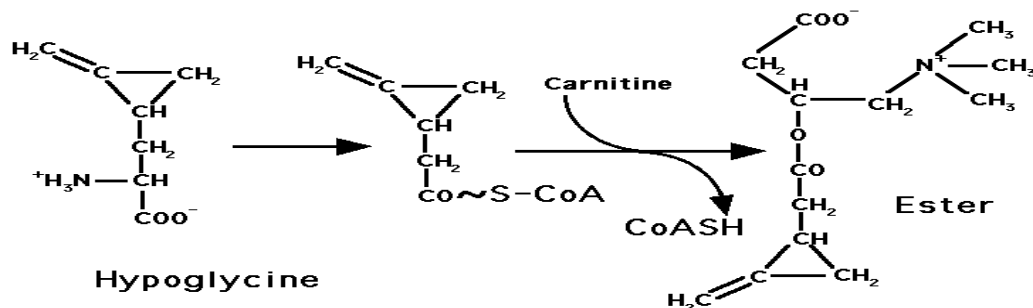


Figure 28 : Les réactions d'esters de la carnitine.

➤ Les réactions de glutamoconjugaison

Certains métabolites comme le phénylacétate, produit final du métabolisme de la phénylalanine lorsqu'elle n'est pas hydroxylée en tyrosine, sont conjugués avec la glutamine au cours des réactions de phase II (Figure 29).

Glutamoconjugaison

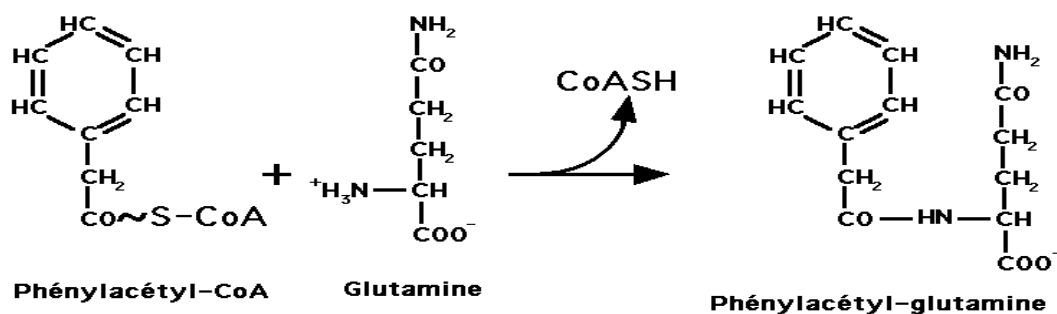


Figure 29 : Les réactions de glutamoconjugaison.

➤ Les réactions de conjugaison au glutathion

La glutathion transférase est une enzyme inductible du cytoplasme du foie qui catalyse la liaison de certaines molécules avec un peptide, le glutathion, afin de favoriser leur diffusion dans le plasma. Parmi les substrats physiologiques de la glutathion transférase on peut citer le leucotriène A₄ qui est conjugué en leucotriène C₄, intervenant dans le processus d'anaphylaxie. Certains xénobiotiques peuvent être transférés sur le glutathion au cours de la phase II de leur détoxification. C'est le cas du paracétamol à fortes doses. Dans l'alcoolisme chronique le taux de glutathion étant profondément diminué, ces réactions sont beaucoup plus difficiles (Figure 30).

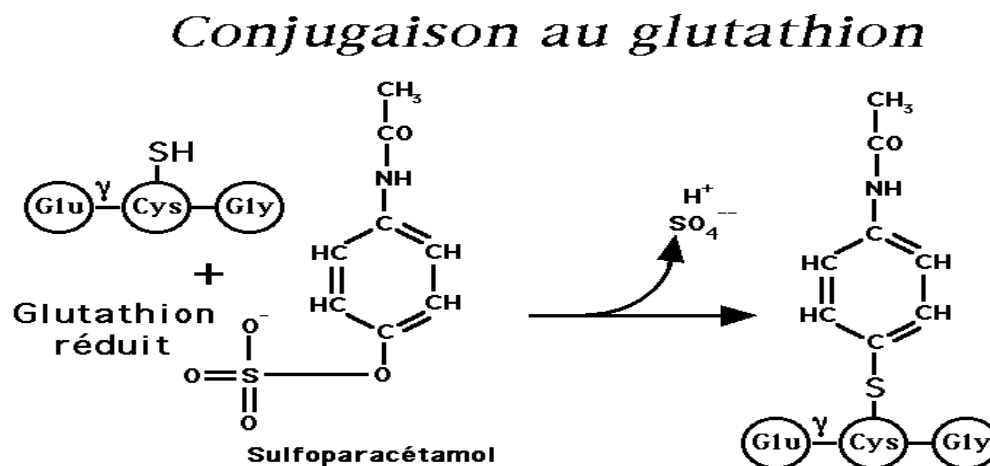


Figure 30 : Les réactions de conjugaison au glutathion.

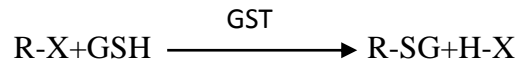
6. Le stress oxydant et mécanismes de la protection cellulaire

6.1. Les types de toxiques

➤ Les toxiques électrophiles

Les électrophiles sont des molécules non-ioniques (exemple des quinoneimines) ou cationiques (exemple des cations ; ion carbonium, ion nitrénium...), contenant un atome

déficient en électron. Ils se forment le plus souvent après oxydation par le cytochrome P450 (CYP). La détoxification des toxiques électrophiles suit un système général reposant sur la réaction de conjugaison au glutathion (GSH). A cet égard, il existe de nombreux systèmes enzymatiques dans les cellules. Un group important de ces enzymes est la glutathion-S-transferase catalysant la conjugaison du glutathion (important composé thiol de faible masse moléculaire) avec les électrophiles réactifs pour former les thioéthers, appelés S-conjugués.



Sur le plan biologique, les intermédiaires électrophilique réactif peuvent être formés dans une variété de voies métaboliques, notamment ceux impliquant le cytochrome P450, et présentent un intérêt en toxicologie et pharmacologie. Il existe également des systèmes spécifiques des détoxification tel les époxydes hydrolases et les aldéhydes déshydrogénases. En cas de surdosage massif par les xénobiotiques notamment les médicaments, les métabolites électrophiliques s'accumulent et forment des liaisons covalentes avec les atomes nucléophiles des macromolécules (protéines, acides nucléiques) induisant ainsi divers effets toxiques (fibrose hépatique, nécrose hépatique et rénale, cancer).

➤ **Les toxiques sous forme de radicaux libres et d'espèces réactives de l'oxygène (ROS)**

Parmi toutes les espèces radicalaires susceptibles de se former dans les cellules, il convient de distinguer un ensemble restreint de composés radicalaires qui jouent un rôle particulier en physiologie et que nous appellerons radicaux primaires. Les autres radicaux libres, dits radicaux secondaires, se forment par réaction de ces radicaux primaires sur les composés biochimiques de la cellule. Ces radicaux primaires dérivent de l'oxygène par des réductions à un électron tels l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ et le radical hydroxyle OH^{\bullet} , ou de l'azote tel le monoxyde d'azote NO^{\bullet} . D'autres espèces dérivées de l'oxygène dites espèces actives de l'oxygène, comme l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou le nitroperoxyde (ONOOH), ne sont pas des radicaux libres, mais sont aussi réactives et peuvent être des précurseurs de radicaux. L'ensemble des radicaux libres et de leurs précurseurs est souvent appelé espèces réactives de l'oxygène. Il ne faut pas penser que tous les radicaux de l'oxygène sont extrêmement réactifs, cette réactivité étant très variable selon la nature du radical. Ainsi parmi les radicaux formés chez les êtres vivants, l'anion radicalaire superoxyde ($\text{O}_2^{\bullet-}$) et le monoxyde d'azote ($^{\bullet}\text{NO}$) qui ne sont pas très réactifs, mais constituent des

précurseurs d'autres espèces plus réactives. La faible réactivité de ces deux radicaux permet d'ailleurs leur utilisation par l'organisme comme médiateurs régulant des fonctions biologiques telles la vasodilatation capillaire, la prolifération ou le message de neurones. En revanche, des radicaux comme les radicaux peroxydes ($\text{ROO}\cdot$) ou surtout le radical hydroxyle ($\text{HO}\cdot$) sont extrêmement réactifs, et ce avec la plupart des molécules des tissus vivants. Ces radicaux libres de l'oxygène ou de l'azote, même réactifs, ne sont pas uniquement toxiques ; au contraire, ils sont produits par divers mécanismes physiologiques afin de détruire des bactéries au sein des cellules phagocytaires (macrophages, polynucléaires) ou pour réguler des fonctions cellulaires létales telle la mort cellulaire programmée ou apoptose. Les êtres vivants trouvent leur énergie dans la respiration mitochondriale dont la dernière étape réduit par quatre électrons la molécule d'oxygène sans libérer d'espèces radicalaires. Toutefois, au contact entre l'oxygène et certaines protéines du système de la respiration, une production d'anions superoxydes se produit lors du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, production que l'on peut comparer aux inévitables déchets des centrales industrielles d'énergie. Si usuellement cette production de radicaux superoxydes reste faible et ne concerne qu'un faible pourcentage de l'oxygène utilisé par la respiration (environ 2 %), elle peut s'amplifier lorsque la respiration devient plus intense (effort physique, hyperoxie), ou lorsque interviennent des désordres inflammatoires (effet du $\text{TNF } \alpha$) ou nutritionnels (carence en ubiquinone), qui augmentent avec l'âge. L'inflammation est par ailleurs une source importante de radicaux oxygénés produits directement par les cellules phagocytaires activées qui sont le siège d'un phénomène appelé explosion oxydative consistant en l'activation du complexe de la NADPH oxydase, enzyme capable d'utiliser l'oxygène moléculaire pour produire de grandes quantités d'anions superoxydes au niveau de la membrane cellulaire. Ce mécanisme, lorsqu'il est contrôlé, est capital dans la lutte anti-infectieuse car il permet la phagocytose des bactéries et des corps étrangers. Une autre espèce radicalaire, le monoxyde d'azote, est elle aussi produite par les systèmes enzymatiques que sont les différentes NO synthases (ou NOS), à des fins de médiation par les neurones, les cellules endothéliales ou les macrophages. Rappelons que la production concomitante dans un même lieu de $\cdot\text{NO}$ et de superoxyde s'avère très dommageable en donnant naissance au peroxyde nitrite. Des sources importantes de radicaux libres sont les mécanismes de cycles redox que produit dans l'organisme l'oxydation de molécules comme les quinones. Ce cycle redox a lieu soit spontanément, soit surtout lors de l'oxydation de ces composés au niveau du cytochrome P450. Ce mécanisme est souvent incriminé pour expliquer la toxicité de l'alcool, des résidus de la fumée de cigarette, ou de nombreux médicaments ; mais il se produit aussi avec des

composés endogènes comme l'acide lévulinique et surtout les catécholamines. Les métaux toxiques (chrome, cuivre, vanadium), mais aussi le cuivre et le fer libres (existant lors de surcharges générales ou localisées) génèrent des radicaux hydroxyles, très réactifs, à partir de l'espèce peu réactive H₂O₂, par une réaction appelée réaction de Fenton. Les particules inhalées (amiante, silice) sont aussi des sources de radicaux libres, d'une part parce qu'elles exacerbent la phagocytose, d'autre part parce que leur surface est tapissée de sels de fer. Les rayonnements sont capables de générer des radicaux libres, soit en scindant la molécule d'eau lorsqu'il s'agit des rayons ionisants X ou γ , soit en activant des molécules photosensibilisantes lorsqu'il s'agit des rayons ultraviolets qui vont par ce mécanisme produire des anions superoxydes et de l'oxygène singulet.

6.2. Le stress oxydant

6.2.1. Définition du stress oxydant

Dans les circonstances normales, les cellules des êtres aérobies produisent en permanence et en faible quantités des espèces réactives d'oxygène (ERO) à l'issue de nombreux processus cellulaires. Le contrôle rigoureux des systèmes de défense préserve les cellules de leurs effets néfastes, dans ces circonstances on dit que la balance (antioxydant/pro-oxydant) est en équilibre. Quand cet équilibre est rompu par déficit en antioxydant ou une surproduction incontrôlée d'espèces radicalaires et leurs dérivées secondaires il survient un stress oxydant.

6.2.2. Les espèces réactives d'oxygène (ERO)

Un radical libre (RL) est une entité chimique (atome, molécule ou fragment de molécule) capable d'exister sous forme indépendante, contenant au moins un électron célibataire ou non apparié sur sa couche électronique externe (ou contenant deux électrons de même spin dans une case quantique), ce qui augmente considérablement sa réactivité par nécessité de se combiner avec un autre électron pour atteindre la stabilité selon un phénomène d'oxydation. Sa durée de vie est très courte (quelques millisecondes voir quelque nanosecondes) et il est symbolisé par un point qui indique où l'électron libre se situe.

Les radicaux libres peuvent être formés par trois procédés :

- Addition d'un électron libre à un non radical ($NR + e^- \rightarrow R^\bullet$)

- Perte d'un électron par un non radical ($NR - e^- \rightarrow R^\cdot$)
- Scission homolytique d'une liaison covalente ($A:B \rightarrow A^\cdot + B^\cdot$)

Il existe majoritairement deux grandes familles d'espèces réactives :

- ✚ **Les espèces réactives oxygénées** (ERO ou ROS Reactive Oxygen Species) ; également désignées dans la littérature de dérivés réactifs de l'oxygène ou d'espèces réactives de l'oxygène peuvent être définies comme des molécules qui contiennent de l'oxygène mais qui sont plus réactives que l'oxygène présent dans l'air. Les ERO incluent les radicaux libres comme l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$) et des composés réactifs oxydants non radicalaires (sans électrons libres dans leur couche externe) comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'oxygène singulet (1O_2) et l'ozone (O_3).
- ✚ **Les espèces réactives azotées** (ERA ou RNS Reactive Nitrogen Species) ont été définies comme un sous groupe d'oxydants dérivés de l'oxyde nitrique ou monoxyde d'azote ($\cdot NO$). Ceci a poussé certains auteurs à parler de RONS (Reactive Oxygen and Nitrogen Species) au lieu de ROS pour désigner l'ensemble des espèces réactives oxydantes radicalaires ou non radicalaires, que nous désignons par l'abréviation ERO.

6.2.2.1. Formation des espèces réactives d'oxygène (ERO)

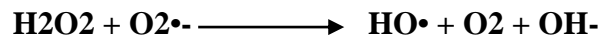
➤ Des espèces réactives d'oxygène radicalaires

✓ L'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$)

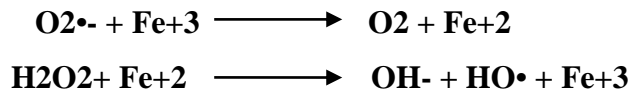
C'est l'une des premières ERO à être formées, l'espèce la plus couramment générée par la cellule ; l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) peut provenir de plusieurs sources cellulaires. Il est formé après réduction d'une molécule d' O_2 par un électron et en présence d'un cofacteur NADPH. Les différentes enzymes permettant cette réaction sont : la NADPH oxydase, la xanthine oxydase, les cyclo-oxygénases ou COX, les lipo-oxygénases, les oxyde nitrique synthases NOS (Nitric Oxyde Synthases), les enzymes du réticulum endoplasmique lisse (cytochrome P450) et celles de la chaîne de transport des électrons dans la mitochondrie.

✓ Le radical hydroxyle (HO^\cdot)

Le radical hydroxyle (HO^\cdot) peut être induit par la réduction de l' H_2O_2 selon la réaction d'Haber-Weiss engendrant alors un ion OH^- inoffensif et un radical hydroxyle HO^\cdot .



Cette réaction est lente et probablement inopérante dans les tissus vivants. Mais en revanche, en présence de métaux de transition (fer, cuivre), l'H₂O₂ donne naissance *in vivo* à la réaction de Fenton à un radical hydroxyle HO• hautement réactif.



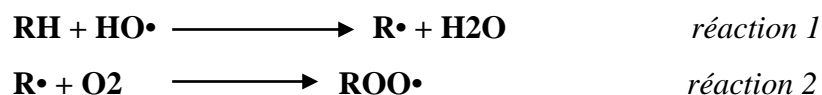
Il est certainement l'ERO la plus destructrice pour la cellule et ses composants. Malgré une durée de vie très brève et l'impossibilité pour lui de franchir les membranes, il possède une très grande réactivité liée à un potentiel oxydant très élevé.

✓ L'oxyde nitrique (NO•)

L'oxyde nitrique est un gaz qui ainsi diffuse bien à travers les membranes. Il est synthétisé par l'enzyme oxyde nitrique synthase (NOS) à partir de l'O₂ et l'acide aminé L'arginine. Il n'est vraiment délétère pour la cellule que lorsqu'il est présent en quantité importante et qu'il génère ainsi une autre ERO : le peroxyde nitrique NO₃•.

✓ Les radicaux peroxydes (ROO•)

Ils font plutôt partie de la « deuxième vague » d'ERO, dans la mesure où leur formation fait suite à une réaction d'oxydation d'acides gras polyinsaturés par d'autres ERO formées préalablement. La partie « R » correspond à un acide gras polyinsaturé. Leur formation comprend 2 étapes principales : la première (réaction 1) correspond à la perte d'un atome d'hydrogène causée notamment par un radical hydroxyle, et la seconde (réaction 2) à la liaison avec une molécule d'oxygène:



➤ **Des espèces réactives d'oxygène non radicalaires**

✓ **L'oxygène singulet (1O₂)**

L'oxygène singulet (1O₂) correspond à une forme excitée de l'oxygène O₂, il possède la même structure électronique que l'oxygène mais « agencée » différemment, à savoir que les électrons de la couche externe initialement non appariés se sont appariés. Il n'est donc pas radicalaire. Son état « excité » lui confère un potentiel oxydant supérieur à celui de l'oxygène.

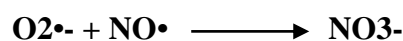
✓ **Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂)**

Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est une molécule stable, mais diffusable et avec une durée de vie compatible avec une action à distance de son lieu de production. Il est généré dans le peroxysome, les microsomes et les mitochondries par une réaction de dismutation.

O₂•- + O₂•- + 2H⁺ → H₂O₂ + O₂ *Réaction de dismutation* La dismutation de O₂•- spontanée ou catalysée par les superoxydes dismutases est la source majeure de l'H₂O₂. L'H₂O₂ n'est pas un radical libre mais a la capacité de générer des radicaux hautement réactifs. En présence de métaux de transition (fer et cuivre), l'H₂O₂ donne naissance via la réaction de Fenton à un radical hydroxyle HO• hautement réactif.

✓ **Le peroxynitrite (NO₃-)**

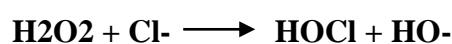
Son apparition est extrêmement rapide, et se produit par une réaction entre deux ERO :



A l'instar du radical hydroxyle, NO₃- est une ERO qui cause beaucoup de dommages aux composants cellulaires.

✓ **L'acide hypochlorique (HOCl)**

Il est formé à partir du peroxyde d'hydrogène. Il passe facilement à travers les membranes biologiques, et peut altérer les constituants protéiques de la cellule à cause de son fort pouvoir oxydant :



Un récapitulatif des principales ERO et de leurs formations est présenté dans la figure 31.

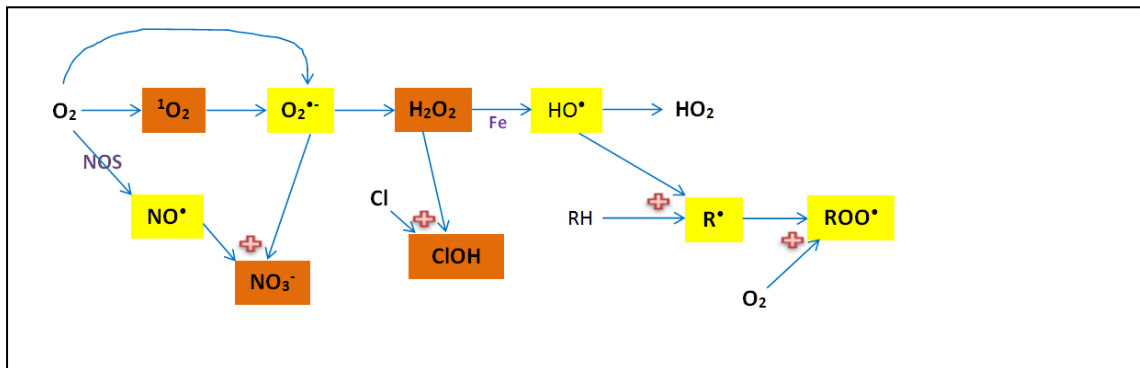
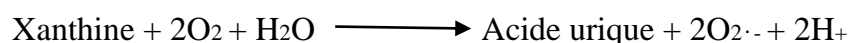


Figure 31 : Cascade de production des principales ERO : en orange ERO non radicalaires et en jaune ERO radicalaires.

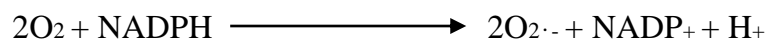
6.2.3. Mécanisme de genèse du stress oxydant

Le stress oxydant survient suite aux mécanismes d'oxydations des composés insaturés biologiques (acides gras, caroténoïdes, polyphénols....) qui sont souvent des réactions radicalaires avec l'oxygène moléculaire. Une vague oxydante peut survenir suite à divers facteurs.

- ✚ Les rayonnements (dont les UV) peuvent conduire à la formation de ROS via la radiolyse de l'eau.
- ✚ L'hypoxémie, c'est-à-dire la présence excessive de dioxygène, accroît la formation naturelle.
- ✚ De même, l'activation du système immunitaire peut conduire à une production locale massive de dérivés réactifs de l'oxygène et d'acide hypochloreux (le plus puissant oxydant physiologique) via la myéloperoxydase des phagocytes.
- ✚ La xanthine oxydase catalyse la dégradation de l'hypoxanthine en acide urique en condition de forte demande d'ATP et de déficit en oxygène. Mais elle peut également catalyser l'oxydation de la xanthine en acide urique, notamment lors d'ischémie-reperfusion ou d'hypoxie. Dans cette réaction, l'oxygène moléculaire agit comme un accepteur d'électron produisant ainsi l' $O_2^{\bullet-}$.



- ✚ La NADPH oxydase joue un rôle fondamental dans la réponse immunitaire et plus précisément dans la lutte contre les micro-organismes. En effet, lors de la phagocytose, cette enzyme présente dans la membrane plasmique des phagocytes, catalyse la formation d'O₂•⁻. Il existe aussi une NADPH oxydase dans des cellules non phagocytaires dont le rôle serait de réguler la croissance cellulaire.



- ✚ Le réticulum endoplasmique lisse contient des enzymes qui catalysent une série de réactions pour détoxifier les molécules liposolubles et d'autres produits métaboliques toxiques. La plus connue de ces enzymes est le cytochrome P450 qui oxyde les acides gras insaturés et les xénobiotiques, produisant ainsi des ROS. Il semble que cette production radicalaire régule certaines fonctions du réticulum.
- ✚ Les peroxysomes sont une importante source de production d'H₂O₂ cellulaire. Toutefois, l'H₂O₂ est utilisé comme substrat de la catalase peroxysomale (enzyme antioxydante) afin de réaliser des réactions de peroxydation d'autres substrats. Ces réactions sont importantes dans le processus de détoxification présent dans le foie et le rein. Seule une faible quantité d'H₂O₂ produit au niveau du peroxysome pourrait échapper à la catalase.
- ✚ Cependant, la principale source de ROS est la mitochondrie par l'intermédiaire de sa chaîne respiratoire. Elle produirait en effet 90% des ROS cellulaires.

La chaîne respiratoire est une source permanente de ROS. Selon certains auteurs, environ 1 à 3% de l'oxygène utilisés par la mitochondrie sont incomplètement réduits et produisent des ROS. Mais ces estimations sont réalisées à partir de mesure *in vitro* sur des mitochondries isolées en présence d'une pression partielle en oxygène non physiologique et de concentration saturante en substrats. Il est vraisemblable que la production mitochondriale de ROS *in vivo* soit beaucoup plus faible (0,4 à 0,8%). Il existe deux sites de production de ROS : les complexes I et III (figure 32).

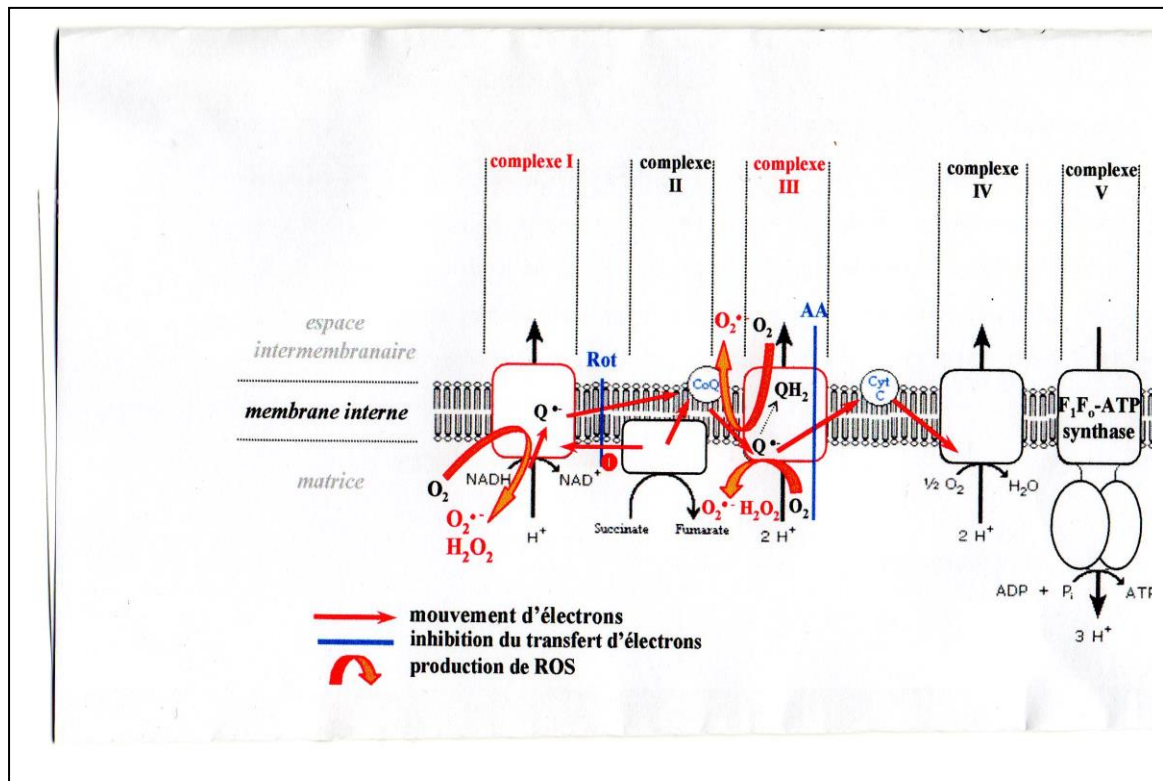


Figure 32 : Sites de production de ROS au niveau de la chaîne respiratoire.

Deux sites de production d' $O_2^{\bullet-}$ sont reconnus : le complexe I et le complexe III. L'utilisation de la roténone (Rot) et de l'antimycine A (AA) a permis de localiser la production de ROS au niveau de ces complexes et de mettre en évidence le flux inverse d'électrons remontant du complexe II au complexe I. Le complexe III a longtemps été considéré comme le plus important site de production d' $O_2^{\bullet-}$ et le complexe I comme un acteur secondaire. Cependant, ces premières études utilisaient comme substrat respiratoire du succinate (fournisseur de $FADH_2$) combiné à de la roténone (inhibiteur du complexe I). Or, en ajoutant successivement le succinate puis la roténone, de récentes mesures ont permis de mettre en évidence l'existence d'un flux inverse d'électrons. Ce flux d'électrons issus de l'oxydation du $FADH_2$ remonte du complexe II vers le complexe I atteignant ainsi le site de production de ROS du complexe I. Il a alors été clairement défini que la source majeure de ROS était le complexe I *via* ce flux inverse d'électrons. Ce flux d'électrons entraîne également la réduction du NAD^+ en $NADH$. Ceci implique que la production de ROS est directement dépendante des équivalents réduits fournis aux mitochondries. La quantité d' H_2O_2 produite en présence de substrat fournissant du $FADH_2$ au complexe II (succinate, flux inverse d'e-) est en effet plus importante qu'avec des substrats fournissant du $NADH, H^+$ au complexe I (glutamate/malate ou pyruvate/malate,

flux normal d'e-). Concernant la production de ROS liée au flux normal d'électrons, elle est plus élevée avec du glutamate/malate qu'avec du pyruvate/malate bien que ces deux substrats fournissent du NADH,H+. Cette différence pourrait s'expliquer par les propriétés antioxydantes du pyruvate.

A ce jour, le site exact de la production de ROS du complexe I reste encore controversé. Trois hypothèses sont émises : cette production aurait lieu au niveau 1°) des quinones (Q) 2°) du groupe des flavines mononucléotides (FMN) ou 3°) du groupe fer-soufre [Fe/S]. Comme ces trois structures sont très proches les unes des autres et interagissent les unes avec les autres, il est difficile de dire laquelle intervient spécifiquement dans la production de ROS.

La production de ROS au niveau du complexe III, quant à elle, résulte de la réduction partielle de l'ubiquinone. L'électron libre provenant du transfert à travers la chaîne respiratoire s'apparie avec l'ubiquinone (Ub) formant le radical semi-ubiquinone (UbH•) qui est instable. Un deuxième électron est donc nécessaire pour le stabiliser et permettre le transfert de proton grâce à l'intermédiaire ubiquinol (UbH₂). Toutefois, il existe une probabilité pour que le radical semi-ubiquinone rencontre une molécule d'oxygène avant libre générant ainsi un anion superoxyde. La production de ROS au niveau du complexe I a lieu uniquement dans la matrice alors que la production au niveau du complexe III a lieu dans l'espace matricielle ainsi que dans l'espace intermembranaire. L'O₂•- généré dans la matrice est éliminé dans ce compartiment par la superoxyde dimutase mitochondriale (Mn-SOD), l'H₂O₂ alors produit peut diffuser rapidement à travers la membrane jusqu'au cytoplasme. L'O₂•- produit dans l'espace intermembranaire est soit : 1°) transformé par l'enzyme antioxydante superoxyde dismutase cytoplasmique (Cu/Zn-SOD, 2°) détoxifié par le cytochrome c, ou 3°) transféré dans la cytoplasme *via* un canal voltage dépendant (VDAC : *Voltage Dependent Anion Channels*), l'O₂•- est alors pris en charge par la Cu/Zn-SOD.

6.2.4. Rôle physiologique des espèces réactives d'oxygènes

De façon physiologique, les ERO existent dans les cellules et dans les tissus à des concentrations faibles mais mesurables. Elles protègent, régulent la cellule et permettent de maintenir une certaine homéostasie de l'état redox de l'organisme. Lorsqu'elles sont produites dans un compartiment cellulaire spécifique, elles peuvent participer au fonctionnement de certaines enzymes, intervenir dans la défense immunitaire (Oxidative Burst ou Flambée Respiratoire), agir en tant que second messenger cellulaire, intervenir dans les voies de transduction du signal et réguler les fonctions cellulaires.

6.2.5. Les Conséquences du stress oxydant

Les radicaux libres peuvent potentiellement réagir avec chaque composant cellulaire et provoquer son oxydation. Cependant, les cibles préférentielles des ROS sont les lipides (acides gras polyinsaturés), suivis par les protéines et les bases constitutives du matériel génétique. L'oxydation de ces composants cellulaires peut induire des dysfonctions du métabolisme cellulaire, telle qu'une modification de la fluidité membranaire causée par la peroxydation lipidique ou encore une diminution de l'activité d'une enzyme suite à son oxydation. Les conséquences biologiques du stress oxydant seront extrêmement variables selon la dose et le type cellulaire. De légers stress augmenteront la prolifération cellulaire, des stress moyen faciliteront l'apoptose, alors que de forts stress provoqueront une nécrose et des stress violents désorganiseront la membrane cellulaire, entraînant des lyses immédiates (Figure 33)

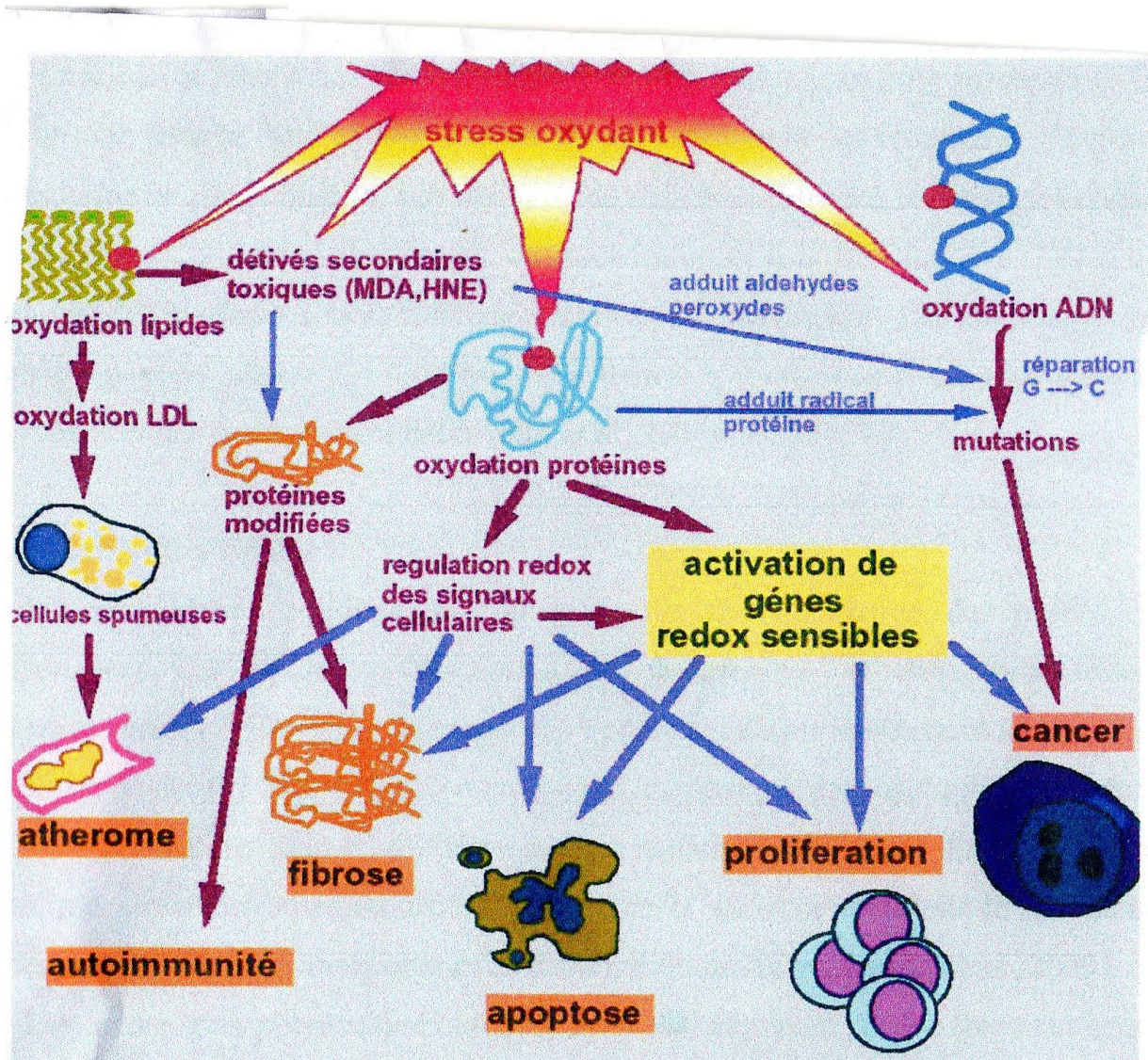


Figure 33 : Conséquences pathogènes du stress oxydant.

- Apoptose ou mort cellulaire programmée

C'est une voie de mort cellulaire en réponse à un signal et qui aboutit à la fragmentation de l'ADN ; elle est physiologique et programmée. L'apoptose est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Dans le cas du développement des gonades, plusieurs perturbateurs endocriniens sont suspectés d'augmenter l'apoptose au sein de la lignée germinale. L'apoptose des cellules germinales conduit à une diminution du nombre des cellules germinales, un processus qui, s'il n'est pas compensé par la prolifération des cellules

survivantes, peut conduire à une diminution du nombre de gamètes et donc à une hypofertilité. Ainsi par exemple des stress génotoxiques tels que les rayonnements ionisants sont connus depuis longtemps pour induire l'apoptose des cellules germinales tant mâles que femelles et peuvent ainsi être cause de stérilité. Plusieurs phtalates ou le DES (diéthylstilbestrol) ont été décrits comme pouvant induire l'apoptose des cellules germinales mâles au cours du développement. Récemment, la génistéine a été montrée capable d'induire de l'apoptose *in vivo* chez le zebrafish traité au cours de la période embryonnaire. L'apoptose est un phénomène physiologiquement impliqué dans le développement des organes et une baisse de l'apoptose peut également avoir des conséquences pathologiques. Les cellules cancéreuses sont fréquemment des cellules dans lesquelles ce mécanisme d'apoptose fonctionne mal et survivent en dépit d'anomalies qui auraient dû conduire à leur élimination. Ainsi, l'apparition ou le développement de lésions « précancéreuses » est souvent attribuée à un défaut dans une voie d'apoptose. Le gène *P53*, un acteur majeur de l'apoptose, est un gène dit suppresseur de tumeur. Dans le cadre des perturbateurs endocriniens, notons par exemple qu'une exposition périnatale au bisphénol A peut diminuer l'apoptose dans la glande mammaire des souris pubères. Par ailleurs, l'effet sur l'apoptose peut varier selon l'âge ou le stade de développement.

- **Prolifération cellulaire**

Un dérèglement de la prolifération cellulaire peut également induire des troubles de la fertilité ou être suspecté dans la survenue de cancers. Notons d'ailleurs que de nombreux gènes contrôlant le cycle cellulaire sont également appelés « suppresseur de tumeurs ». La diminution de l'activité prolifératrice d'un type cellulaire peut être due à la surexpression d'inhibiteur du cycle cellulaire tel que les protéines p16, p21 ou p27 qui inhibent les complexes Cdk/cyclines requis pour la progression à travers les différentes phases du cycle cellulaire. À titre d'exemple, les hormones thyroïdiennes inhibent la prolifération des cellules de Sertoli en augmentant l'expression de p27 dans le testicule postnatal et la conséquence de ceci est une diminution du poids testiculaire à l'âge adulte ainsi que de la réserve spermatique (nombre de spermatozoïdes). Dans le cadre des perturbateurs endocriniens, citons l'exemple des phtalates (DBP) qui sont eux aussi capables de diminuer la prolifération des cellules de Sertoli chez le rat.

- **Différenciation cellulaire**

Dans les tissus, des cellules souches, multipotentes ou progénitrices, se différencient; la perturbation de ces processus de différenciation peut être cause de troubles de la fertilité ou de cancer. Dans la lignée germinale, les cellules mitotiques (cellules germinales primordiales, gonocytes, ovogonies ou spermatogonies) expriment de nombreux marqueurs de cellules souches tels que OCT4, un facteur de transcription. Au moment de la différenciation de ces cellules, celles-ci perdent leurs marqueurs de multipotence. Le blocage de la différenciation de cellules germinales fœtales est corrélé à la survenue de tumeurs testiculaires. Ainsi l'invalidation du gène *Dmrt1* chez la souris induit le maintien de l'expression de Oct4, Sox2 et Nanog dans les cellules germinales dans le testicule foetal et la survenue de tératome dans le testicule des souris adultes (fond génétique SV129). Ainsi, pour les perturbateurs endocriniens, il a été proposé que certains phtalates (DBP) bloquent ou retardent la différenciation des cellules germinales foetales mâles chez le rat en maintenant l'expression d'OCT4 dans de petits groupes de cellules qui auraient échappé au processus de différenciation. Cependant, il n'a pas été retrouvé de cancers testiculaires chez les rats exposés aux phtalates peut-être du fait que ce type de cancer est très peu fréquent chez les rongeurs en dehors de certains fonds génétiques très spécifiques. Dans le cas des tissus stéroïdogéniques, cellules de la granulosa ou cellules de Leydig, la sécrétion d'hormones stéroïdes en réponse à une stimulation par des gonadotropines est couramment utilisée comme un paramètre permettant de juger de l'état de différenciation. Ainsi, la sécrétion de testostérone par les cellules de Leydig en réponse à la LH est un paramètre permettant de mesurer la différenciation des cellules de Leydig. Dans le cas des cellules de la granulosa, c'est la sécrétion de progestérone et/ou d'oestradiol qui est mesurée. Par exemple, il a été montré que le bisphénol A diminue la production de progestérone des cellules de la granulosa porcines.

6.2.6. L'interaction des radicaux libres avec les macromolécules biologiques

L'équilibre entre les effets positifs et négatifs des radicaux libres est particulièrement fragile. La production de ces radicaux peut être régulée par notre organisme. Les systèmes de régulation se composent d'enzymes, de protéines, de molécules antioxydantes de petite taille et d'oligoéléments indispensables pour l'activité des enzymes. Un déséquilibre de la balance

antioxydante en faveur de la production des ERO constitue le stress oxydant. Le stress oxydant va dénaturer les lipides, les protéines, l'ADN et provoquer des pathologies.

➤ Les lipides

Les premières cibles privilégiées de l'attaque radicalaire sont les lipides et principalement leurs acides gras polyinsaturés, qui sont très sensibles à l'oxydation en raison de leur degré élevé d'insaturation.

La peroxydation lipidique débute par une phase d'initiation qui implique l'attaque des espèces réactives surtout le radical hydroxyle ($^{\circ}\text{OH}$), entraînant l'arrachement d'un hydrogène du l'acide gras (LH), ceci aboutit à la formation d'un radical diène conjugué, qui après addition avec l'oxygène moléculaire donne le radical peroxyde (LOO°). Ensuite, ce radical peut réagir avec un autre acide gras polyinsaturé et former un hydroperoxyde (LOOH), c'est la phase « Propagation » de la peroxydation lipidique. Ces hydroperoxydes appartiennent à la famille des peroxydes lipidiques qui peuvent soit être réduits et neutralisés « phase de Terminaison » par la glutathion peroxydase et la vitamine E intercalée dans la bicouche lipidiques des membranes (figure 34). Ou, continuer à s'oxyder et à se fragmenter en produits secondaires c'est-à-dire en aldéhydes très réactifs, pouvant être considérés comme des messagers secondaires toxiques qui augmentent les dommages initiaux dus aux radicaux libres. Parmi ces aldéhydes formés lors de la peroxydation lipidique, l'isoprostane, le malondialdéhyde (MDA), et le 4-hydroxynonéal (4-HNE), qui sont très étudiés comme marqueurs de la peroxydation lipidique, ces deux derniers produits (MDA, 4-HNE) réagissent avec les protéines et l'ADN, une fois fixé à la molécule d'ADN, le MDA semble être le produit le plus mutagène, alors que le 4-HNE est le plus toxique pour la cellule.

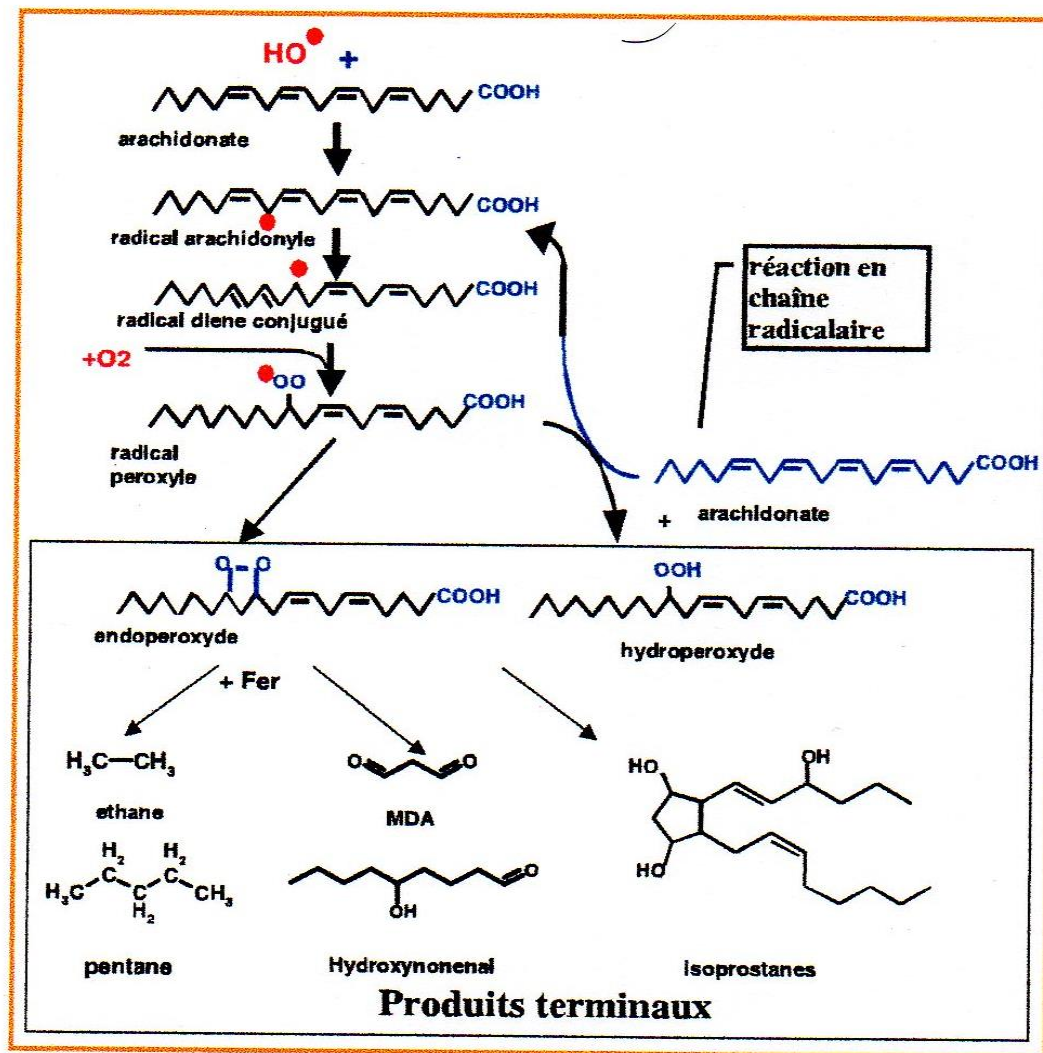


Figure34 : Réactions de la peroxydation lipidique.

➤ Les protéines

Tout comme les lipides, les protéines peuvent également être la cible des réactions radicalaires ou oxydatives et subir des modifications, ces modifications provoquent l'introduction d'un groupe carbonyle dans les protéines. Ces réactions d'oxydations, fréquemment influencées par les cations métalliques comme le Cu^{2+} et le Fe^{2+} . Nous pouvons classer les réactions d'oxydations des protéines en deux catégories : D'une part, celles qui cassent les liaisons peptidiques et modifient la chaîne protéique. Et d'autre part, les modifications des peptides par l'addition des produits issus de la peroxydation lipidiques comme le 4-HNE. Ces changements sont elles qui conduisent généralement à une perte de la fonction catalytique, ou structurale des protéines affectées (figure 35). Les protéines comportant un pont sulfhydryque sont les plus sensibles aux attaques radicalaires, c'est le cas

de nombreuses enzymes antioxydantes et les protéines de transport, qui contiennent très souvent des groupements thiols (SH). Les protéines modifiées par l'oxydation, vont être prises en charge par des protéines spécifiques dites protéines de stress (Heat Shock Protein, HSP) connues pour leur rôle cytoprotecteur, où elles prennent en charge les protéines dénaturées et participent à la restauration de la fonction de ces protéines. Les HSP permettent à la cellule de répondre à des stress de façon rapide, et la synthèse des HSP pourrait ainsi compléter les capacités de défenses antioxydantes lorsque les protéines intracellulaires sont endommagées par les ROS.

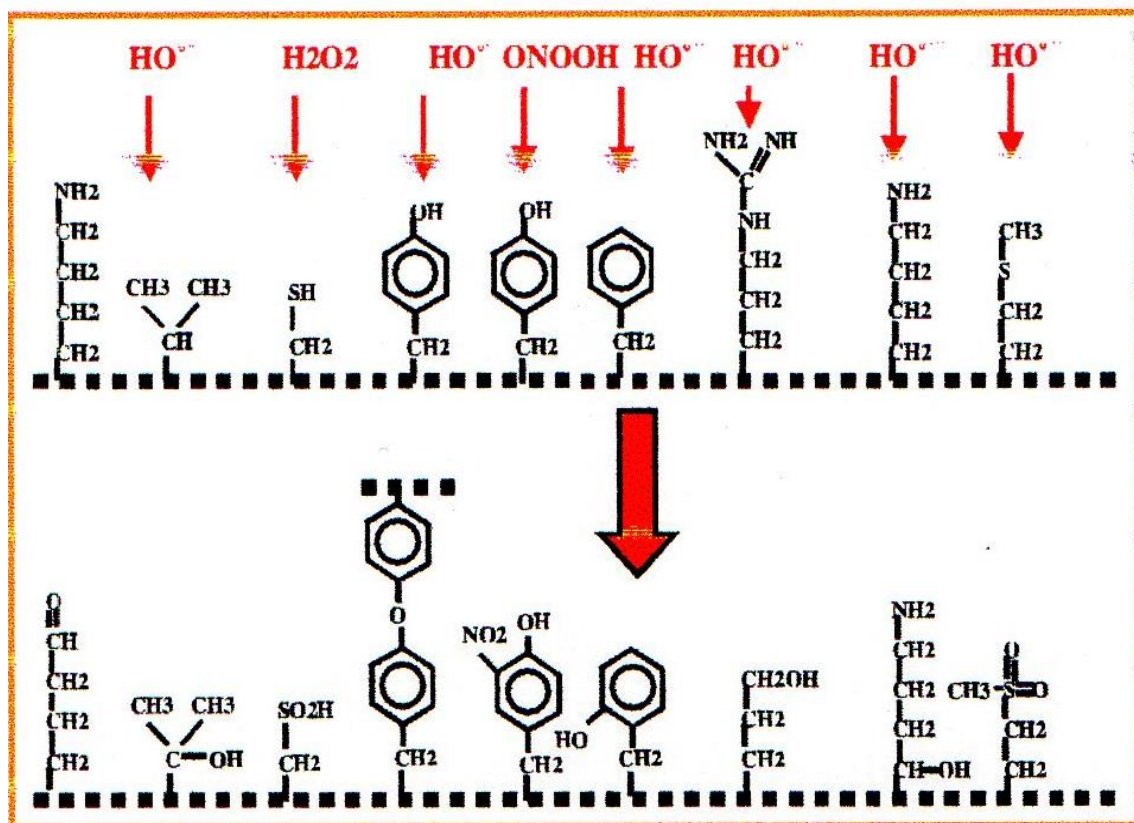


Figure 35 : Nature de quelques modifications des chaînes latérales, d'acides aminés des Protéines après attaque radicalaire.

➤ Les acides nucléiques

L'ADN nucléaire et ADN mitochondrial. Ce dernier est la cible privilégiée des oxydations par les ROS, du fait sa proximité directe de l'une des principales sources de ROS cellulaires : la chaîne respiratoire mitochondriale.

Les réactions d'oxydation de l'ADN créant un grand nombre de dommages de l'ADN, et on peut noter quatre classes principales des dommages : les coupures simples et doubles brins, les bases modifiées comme la 8-OHdG (qui est un marqueur des dommages oxydatifs de l'ADN), les pontages ADN-ADN et les pontages ADN-protéines (figure 36). Les bases puriques sont plus sensibles aux ROS (surtout l' $^{\circ}\text{OH}$ et le peroxydant), en particulier la guanine (base qui présente le potentiel d'oxydation le plus bas), qui est facilement transformée en 8-hydroxy-2-déoxyguanosine (8-OHdG) qui est normalement éliminée par des enzymes de réparation de l'ADN. Si ces systèmes sont défaillants, La 8- OH dG s'accumulera au sein de l'ADN. Les aldéhydes réactifs issus de la peroxydation lipidique dont le MDA et le 4-HNE peuvent s'ajouter au groupe amine des bases de l'ADN et constituer ainsi une autre classe de dégâts oxydatifs de l'ADN.

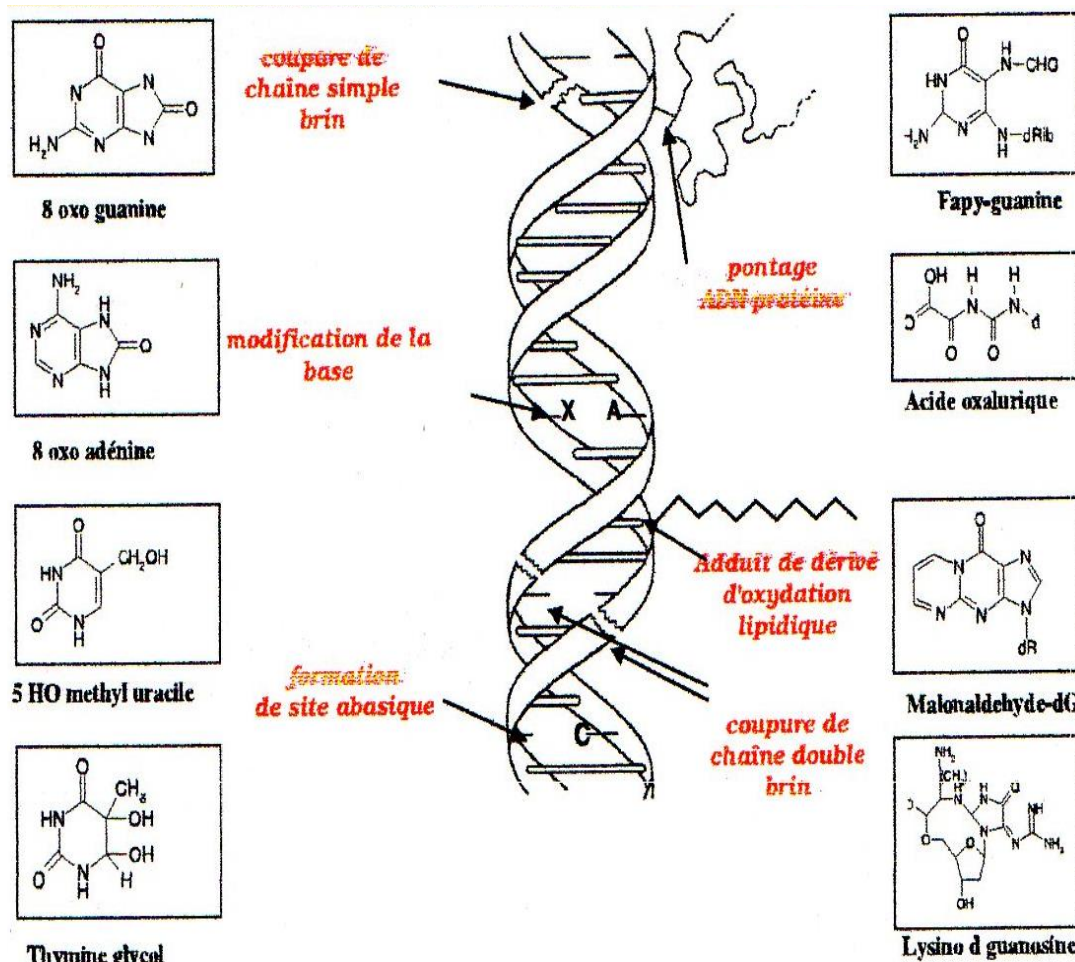


Figure 36 : Types de lésions de l'ADN provoqués par les attaques radicalaires.

➤ Oxydation des glucides

Les cibles glucidiques sont essentiellement le glucose et les protéoglycanes du cartilage. L'oxydation au sens large du glucose est aussi appelée « glycosoxydation » et regroupe en fait 2 mécanismes possibles (figure 37) :

- Soit oxydation au sens strict du glucose, donnant des dérivés carbonyles susceptibles de réagir avec une protéine, pour aboutir à la formation de « produits finaux de glycosylation » ou PFG (AGEs en anglais pour « *advanced glycation end-products* ») ;
- Soit formation d'une liaison covalente entre un ose et les groupements aminés libres d'une protéine : on parle de « glycosylation non-enzymatique des protéines ». Cela forme une protéine glyquée, qui peut être attaquée par des ERO telles que HO• ou NO₃• pour former des PFG.

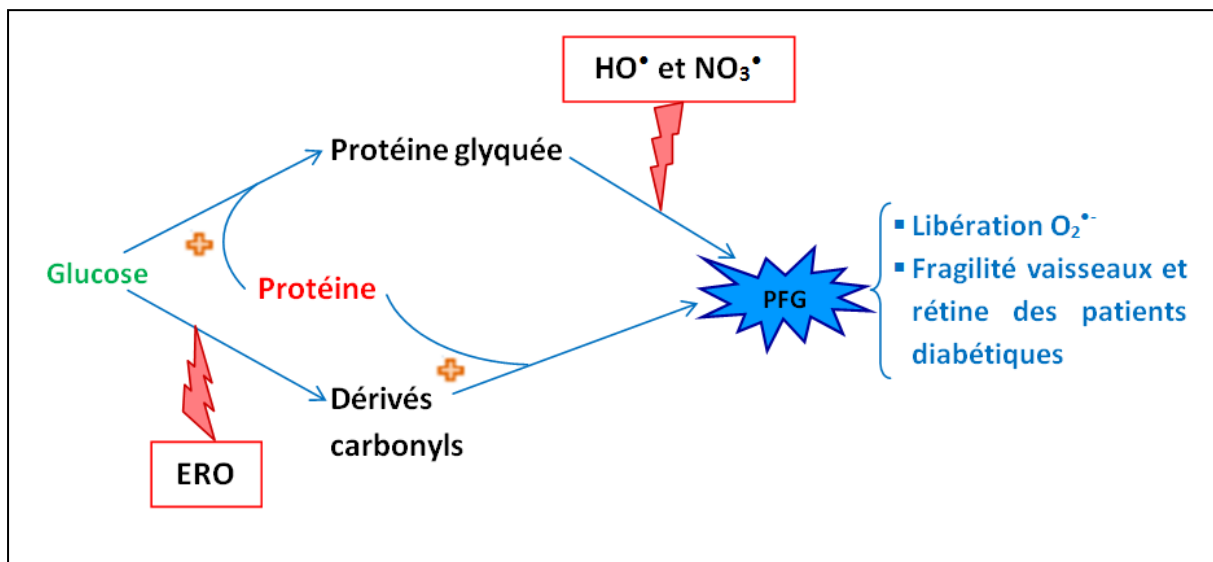


Figure 37 : Oxydation au sens large du glucose ou « Glycosoxydation », selon les 2 voies principales : glycosylation non enzymatique des protéines en haut, et oxydation au sens strict du glucose en bas. PFG : produits finaux de glycosylation.

Ces PFG sont d'une importance capitale, car en présence de métaux de transition ils favorisent la libération d'O₂•-, et fragilisent les parois vasculaires et la rétine chez les patients diabétiques.

6.2.7. Le stress oxydant et les pathologies

Le stress oxydant est potentiellement impliqué dans de nombreuses maladies comme facteur déclenchant, ou associé à des complications lors de leur évolution. Ces pathologies peuvent découler d'intoxications chimiques et médicamenteuses, d'exposition à des rayonnements, d'un syndrome d'hyperoxygénation, de phénomènes inflammatoires. La multiplicité des conséquences médicales de ce stress oxydant vient du fait que de nombreux organes ou tissus peuvent devenir la cible d'un stress oxydant. Le stress oxydant est impliqué dans le développement des maladies comme : le cancer, les maladies neurodégénératives et le vieillissement accéléré. Il est admis que le stress oxydant est un facteur potentialisant l'apparition de maladies multifactorielles comme les maladies cardiovasculaires, le diabète, et la maladie d'Alzheimer. Si le stress oxydant est réellement un facteur déclenchant ou participant au déclenchement de ces pathologies, il est logique de penser que la prise d'antioxydant peut retarder, prévenir l'apparition de telles maladies. De même, des études ont montré que le vieillissement s'accompagne d'une diminution des défenses antioxydantes, d'une augmentation de la production des ROS, et d'une diminution des systèmes de réparation et de dégradation des constituants oxydés. Une étude épidémiologique a montré très clairement que la consommation régulière des antioxydants permet de diminuer l'incidence de l'apparition d'un stress oxydant et ces maladies.

6.2.8. Les Systèmes cellulaire de protection contre le stress oxydant

Les molécules contrôlant la production des ROS sont désignées par le terme d'antioxydants et désignent toute substance qui présente à faible concentration par rapport à celle du substrat oxydable, retarde ou inhibe significativement l'oxydation de ce substrat. Pour se protéger des effets toxiques de l'oxygène, l'organisme a développé des systèmes de défense antioxydants. Ces protections sont assurées à la fois par des composés naturels endogènes ou apportés par l'alimentation, et par des enzymes spécifiques se comportant comme des piègeurs de radicaux (scavengers). Les systèmes de protection sont composés :

- D'enzymes : superoxyde dismutase (SOD), catalase, glutathio peroxydase (GPx).
- De molécules antioxydantes de petite taille : caroténoïdes, vitamines C et E, glutathion, acide urique, acide lipoiq.

- Et certains oligo-éléments comme le cuivre, le zinc, le sélénium qui sont indispensables pour des enzymes antioxydantes (Figure 38)

Les cellules utilisent de nombreuses stratégies anti-oxydantes et consomment beaucoup d'énergie pour contrôler leurs niveaux d'espèces réactives de l'oxygène. La nature des systèmes antioxydants diffère selon les tissus et les types cellulaires et selon qu'on se trouve dans le milieu intracellulaire ou extracellulaire. Les défenses antioxydantes de notre organisme peuvent se diviser en systèmes enzymatiques et systèmes non enzymatiques.

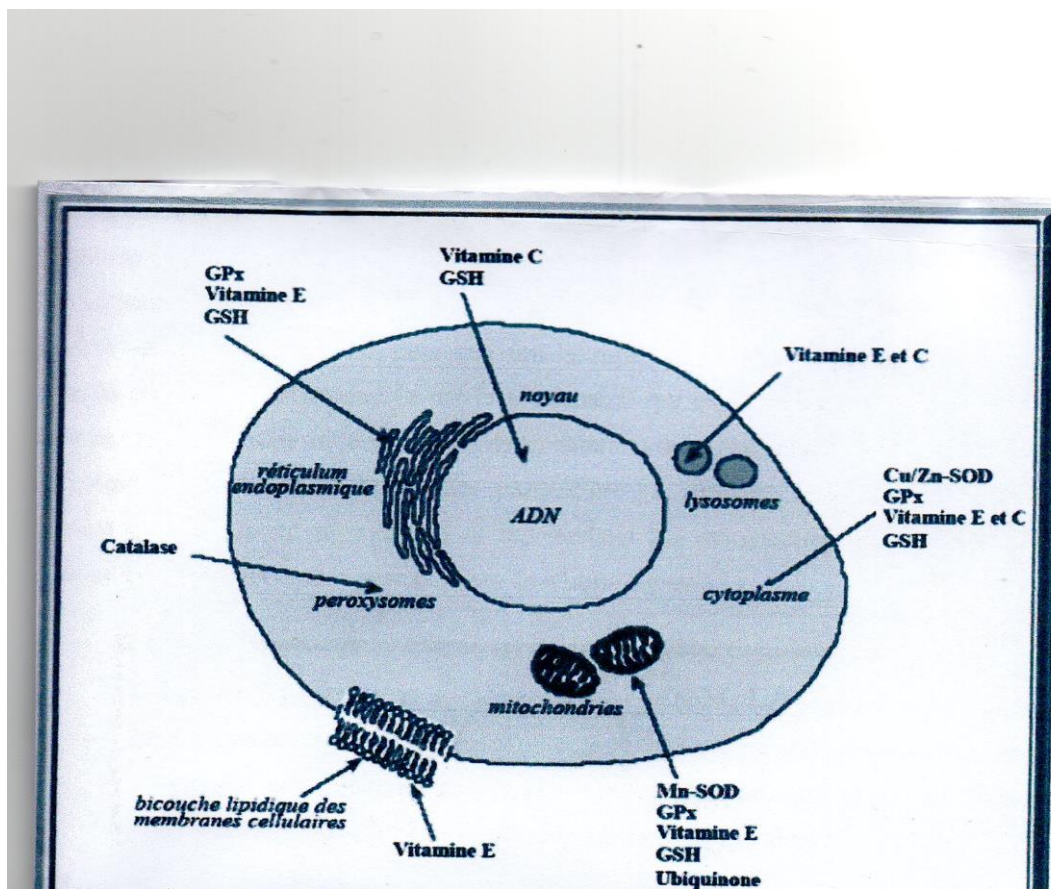


Figure38 : Répartition des principales défences anti-oxydantes dans la cellule.

6.2.8.1. Les systèmes antioxydants enzymatiques

Il s'agit principalement de trois enzymes, (I) la superoxyde dismutase (SOD), (II) la catalase (CAT) et (III) la glutathion peroxydase (GPx). Ces enzymes ont une action

complémentaire sur la cascade radicalaire au niveau du $O_2^{\bullet-}$ et du H_2O_2 , conduisant finalement à la formation de l'eau et de l'oxygène moléculaire.

a) La Superoxyde dismutase

Comme l'indique son nom, la superoxyde dismutase (SOD) accélère la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Il existe plusieurs isoenzymes de SOD ; SOD ferreux (Fe-SOD), SOD à cuivre (Cu-SOD) et SOD à manganèse (Mn-SOD) qui diffèrent selon la localisation chromosomique du gène, leur contenu métallique, leur structure quaternaire et leur localisation cellulaire.

b) La catalase

Présente en particulier dans les hématies et les peroxysomes hépatiques. Elle agit en synergie avec la SOD puisque son rôle est d'accélérer la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène moléculaire.

c) Les glutathions peroxydases et réductases

Ces deux enzymes sont localisées dans le cytosol et dans les mitochondries. La glutathion peroxydase est une sélénoenzyme (Se-GPx) qui joue un rôle très important dans la détoxification du peroxyde d'hydrogène, mais aussi d'autres hydroperoxydes résultants de l'oxydation du cholestérol ou des acides gras en couplant la réduction de ces dérivés réactifs avec l'oxydation de substrats réducteurs comme le glutathion (GSH). La glutathion réductase (GR), quant à elle, a pour rôle de régénérer le GSH à partir du GSSG tout en utilisant le NADPH comme un cofacteur. Au total, le mécanisme réactionnel invoqué dans cette détoxification enzymatique peut être résumé dans le schéma suivant :

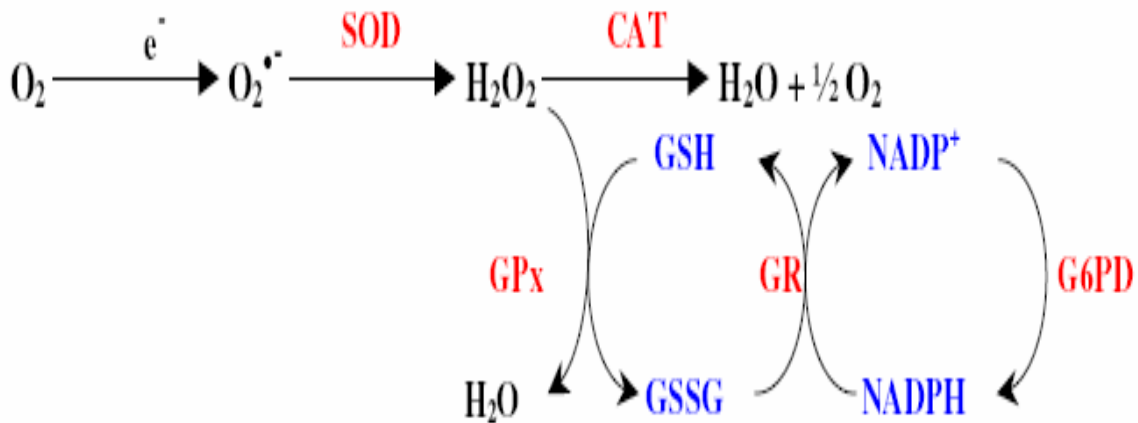


Figure 39 : Schéma résume le mécanisme de détoxification enzymatique.

6.2.8.2. Les systèmes antioxydants non enzymatiques

Contrairement aux enzymes antioxydantes, la plupart de ces composants ne sont pas synthétisés par l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Dans cette catégorie d'antioxydant nous retrouvons les oligoéléments, la glutathion réduit (GSH), l'ubiquinone, le Cytochrome C et les vitamines E et C.

a) Le Glutathion réduit (GSH)

Le glutathion réduit (GSH), réduit le peroxyde d'hydrogène et/ou les peroxydes organiques grâce à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GSH-Px). Il peut aussi réduire les radicaux formés par l'oxydation des vitamines E et C, baissant ainsi les niveaux de peroxydation lipidique. Le rapport glutathion réduit/glutathion oxydé (GSH/GSSG) est souvent utilisé comme un marqueur du stress oxydant car plus le flux d' H_2O_2 est important, plus le glutathion réduit est consommé et le glutathion oxydé augmenté.

b) La Vitamine E

La vitamine E est le nom commun utilisé pour toutes les molécules possédant des activités biologiques identiques à celles de la famille des tocophérols. La forme naturelle de la vitamine E inclut quatre tocophérols isomères α , β , γ , δ , avec une activité antioxydante variable. L' α -tocophérol est la forme la plus active de la classe des tocophérols. Sa structure moléculaire comporte une extrémité hydrophile et une extrémité hydrophobe. Lors de l'initiation de la peroxydation lipidique, suite à une attaque radicalaire, l' α -tocophérol, connu

comme inhibiteur de la propagation de la peroxydation lipidique, cède son hydrogène situé dans le noyau phénolique, réduisant ainsi le radical RO₂.

c) La Vitamine C

La vitamine C (acide ascorbique) n'est pas synthétisée par l'organisme. Elle est hydrosoluble à la concentration physiologique. La vitamine C empêche l'oxydation des LDL produites par divers systèmes générateurs d'espèces réactives de l'oxygène (neutrophiles activés, cellules endothéliales activées, myéloperoxydase). Lors de son oxydation en acide déhydroascorbique, elle prend une forme radicalaire intermédiaire (radical ascorbyl) qui joue un rôle essentiel dans la régénération de la vitamine E oxydée .

d) Les métallothionéines (MTs)

Les métallothionéines sont des protéines intracellulaires de faible poids moléculaire (6000-7000 Da). Ils possèdent une composition spéciale d'acides aminés. En effet, elles ne possèdent pas d'acides aminés aromatiques dont le tiers des résidus sont des cystéines servent comme ligand aux métaux. La synthèse des MTs est induite par des facteurs divers, tels que les métaux, les glucocorticoides et les radiation ionisantes. Les MTs sont supposées jouer des rôles physiologiques multiples, incluant la détoxification des métaux potentiellement toxiques (Pb, Cd, Ni...), la régulation des métaux essentiels à l'état de trace, tels que le zinc, le cuivre et le chrome et la participation dans les systèmes cellulaires de défense antioxydante. A cause de leur teneur élevée en groupements sulfhydriques, les MT peuvent réagir avec les radicaux libres ERO et les électrophiles.

e) Le Sélénium

Le sélénium est un antioxydant qui intervient dans l'activité du système enzymatique protecteur, le glutathion peroxydase qui accélère la transformation des radicaux libres et des peroxydes lipidiques en métabolites non- toxique