



Physiopathologie



Physiopathologie

2. Mécanismes de développement des pathologies :

Action cancérogène de l'amiante



L'amiante possède une activité cancérogène mais les mécanismes de développement de ces pathologies ne sont pas totalement connus.

2.1. Méthodes d'évaluation du potentiel cancérogène des fibres

Dans ce premier paragraphe, nous développerons les principaux modèles d'études utilisés, leurs intérêts, leurs limites et les premiers résultats obtenus.

2.1.1. Importance des modèles expérimentaux [67-70]

☞ Etude des mécanismes moléculaires et cellulaires de toxicité de l'amiante

De nombreux modèles expérimentaux ont été développés pour étudier la pathogénèse des affections liées à une exposition à l'amiante (voir table 11). Les études animales, principalement réalisées chez le rat et le mouton, ont utilisée plusieurs voies d'exposition,

comme l'inhalation, l'injection intra-pleurale ou intra-péritonéale, l'instillation intra-trachéale. [67]

MODELES	Etude <i>in vitro</i>		Etude <i>in vivo</i>	
	<i>Cellules isolées</i>	<i>Populations cellulaires</i>	<i>Modèles animaux à court terme</i>	<i>Modèles animaux à long terme</i>
ETAPE ETUDIEE	Dommages à l'ADN Peroxydation lipidique	-Toxicité cellulaire et apoptose -Libération des médiateurs inflammatoires -Génotoxicité -Transformation cellulaire -Prolifération cellulaire -Métabolisme -Expression génique -Communication intercellulaire	Dépôt des fibres Inflammation Prolifération cellulaire Transformation préneoplasiques	Charge en fibre du poumon et de la plèvre Fibrose Altérations moléculaires et cytogénétiques

Table 11 : Modèles développés pour l'étude de la pathogénèse des maladies dues à une exposition à l'amiante [67]

➤ *Evaluation des fibres de substitution*

Les futures études épidémiologiques sur l'exposition des travailleurs aux fibres récemment développées vont se heurter aux facteurs suivants, justifiant l'utilisation de modèle et la compréhension des mécanismes en jeu pour évaluer leur toxicité. D'abord, le délai de latence rend difficile toute étude épidémiologique ; ensuite les niveaux d'exposition des individus aux fibres artificielles seront certainement inférieurs à ceux des expositions passées ; et enfin le nombre de ces travailleurs exposés sera tout autant diminué. Par

conséquent, il est nécessaire de s'appuyer sur les données expérimentales issues des modèles dans les futures évaluations des fibres, naturelles et artificielles.

➤ *Extrapolation des résultats*

L'une des principales limites de ces modèles réside dans la difficulté d'extrapoler la dose (exprimée en nombre de fibres plutôt qu'en masse) délivrée aux cellules cibles de ces modèles expérimentaux à la dose délivrée aux individus exposés aux fibres (naturelles et artificielles). Il est par exemple important de tenir compte des variabilités inter-espèces dans l'interprétation des études d'inhalation. Ainsi :

- certaines fibres susceptibles d'atteindre le poumon profond chez l'homme ne sont pas inhalables chez le rat.

- les lésions pulmonaires observées sont différentes chez l'homme et le rat, du fait d'une anatomie différente de l'arbre respiratoire dans ces deux espèces : chez l'homme les dépôts et les lésions primitives se produisent aux intersections bronchiques, alors que chez le rat elles sont observées sur les bifurcations débouchant directement dans les sacs alvéolaires ;

- le parenchyme pulmonaire du hamster est particulièrement résistant à l'induction des cancers par des fibres. Il présente en revanche une propension importante à la formation de mésothéliome.

2.1.2. Potentiel cancérigène des fibres : premières données [42, 68-70]

Les premières données épidémiologiques révèlent le potentiel cancérigène de l'amiante dès 1955 [14]. Les preuves expérimentales du potentiel cancérigène des fibres naturelles, amiante et asbestiformes, ont été évaluées par l'International Agency for Research on

Cancer en 1977 et 1987. Toutes les variétés d'amiante, les fibres contenant de l'érionite et du talc sont considérés comme des cancérigènes connues pour l'homme (groupe I). D'autres silicates fibreux naturels ont été placés dans le groupe III (non classifiable). Depuis, des observations de mésothéliomes malins ont été effectuées en présence d'une exposition professionnelle aux fibres d'anthophyllite [71]. Le potentiel cancérigène de cinq types de fibres artificielles vitreuses (MMVF) a été évalué en 1988 : La laine de verre, la laine de roche, les fibres céramiques et la laine de scories ont été classées dans le groupe IIB (possible cancérigène chez l'homme). Les filaments de verre ont été placés dans le groupe III (non classable).

Agent	Preuves chez		Critère d'évaluation : Classe de risque
	Homme	Animaux	
<u>Amiante</u>			
Toutes les variétés	Suffisantes	Suffisantes	1
<u>Silicates</u>			
Wollastonite	Insuffisantes	Limitées	3
Attapulgite	Insuffisantes	Limitées	3
Sepiolite	Pas de données	Insuffisantes	3
Talc :			
*Ne contenant pas de fibres asbestiformes	Insuffisantes	Insuffisantes	3
*Contenant des fibres asbestiformes	Suffisantes	Insuffisantes	1
Erionite	Suffisantes	Suffisantes	1
<u>Fibres artificielles vitreuses (MMVF)</u>			
Laine de verre	Insuffisantes	Suffisantes	2B
Filaments de verre	Insuffisantes	Insuffisantes	3
Laine de roche	Limitées	Limitées	2B
Laine de scories	Limitées	Insuffisantes	2B
Fibres céramiques	Pas de données	Suffisantes	2B

Table 12 : Evaluation par l'IARC des données expérimentales et chez l'homme du caractère cancérigène des fibres [68]

L'identification des pathologies associées à une exposition aux fibres d'amiante rend préoccupant le potentiel cancérigène des autres fibres. Mais depuis 1989, de nombreux types de fibres synthétiques ont été développés et depuis les premières études de l'IARC, de nouvelles données expérimentales ont été obtenues sur les potentiels mécanismes cancérigènes de l'amiante. La somme de données expérimentales disponibles a considérablement explosé depuis 1989 mais il est important de noter que ces études ont permis de montrer que toutes les fibres, naturelles ou synthétiques, sont capables d'induire des effets pathogènes à condition de posséder certaines des caractéristiques physico-chimiques détaillées ci-dessous. Ces paramètres ont une influence sur la toxicocinétique et les réponses cellulaires et moléculaires aux fibres (toxicodynamie).

Paramètres influant....sur...	Impact	Paragraphe
Forme et dimension	la pénétration	Toxicocinétique	2.2.1
	la migration, épuration	Toxicocinétique	2.2.2
	la division cellulaire	Toxicodynamique	2.3.2
Composition chimique	la réactivité de surface	Toxicodynamique	2.3.1
	la dissolution	Toxicocinétique	2. 2.3

Table 13 : Principales propriétés responsable de l'activité des fibres et leurs cibles.

(Tableau de synthèse)

2.2. Toxicocinétique: pénétration, distribution, épuration

Certains paramètres physico-chimiques conditionnent la pénétration et la persistance des fibres d'amiante dans l'appareil respiratoire et l'organisme.

2.2.1. Pénétration, Dépôt. [7, 69, 72-73]

2.2.1.1. Pénétration par inhalation

Libérées dans l'atmosphère, les particules d'amiantes restent en suspension dans l'air suffisamment longtemps pour que le risque d'inhalation soit important.

➤ Importance de la taille et la forme des particules.

La taille et la géométrie des fibres sont les principaux facteurs qui déterminent la pénétration de l'amiante et sa distribution dans les voies respiratoires.

Selon l'OMS, une fibre est définie par sa longueur supérieure à $5\mu\text{m}$ (L), son diamètre inférieur à $3\mu\text{m}$ (D) et le rapport $L/D > 3$. [7] La longueur fut la première propriété associée au potentiel cancérogène de l'amiante et des fibres. En raison de leur forme fibreuse, des fibres de plusieurs dizaines de micromètres de longueur peuvent pénétrer dans les voies aériennes par inhalation. Il n'en est pas de même pour d'autres particules, puisque les mécanismes d'épuration ne permettent pas la pénétration.

Le diamètre aérodynamique d'une particule dans l'air est le diamètre d'une particule sphérique de densité théorique 1 dont la vitesse limite de chute dans l'air serait identique à celle de la particule. Chez le rat, les fibres de diamètre aérodynamique inférieur ou égal à $3\mu\text{m}$ pénètrent jusqu'au poumon profond, même si leur longueur est comprise entre 100 et $200\mu\text{m}$ [72].

➤ Dépôt : sites préférentiels

Chez l'animal, les fibres inhalées se déposent dans les voies respiratoires selon leur taille : les plus grandes dans les voies aériennes supérieures, préférentiellement au niveau des bifurcations bronchiques, les plus petites, qui peuvent passer par la trachée et les bronches,

aux bifurcations des canaux alvéolaires; le dépôt alvéolaire atteint son maximum pour un diamètre aérodynamique moyen d'environ 2 μm [72, 73].

Chez l'homme, le site préférentiel de dépôt se situe au niveau des bifurcations des plus grandes voies respiratoires bronchiques [72].

2.2.1.2. Autres voies de pénétration [69]

La pénétration des fibres par d'autres voies a été étudiée chez l'animal. La migration des fibres à travers la paroi gastro-intestinale n'a pas été démontrée. Après injection intrapleurale chez le rat, le chrysotile radiomarké est retrouvé dans le foie (22 %), le cœur, les poumons, le diaphragme et les muscles thoraciques. Après injection intra-péritonéale, la migration des fibres chez le rat est inversement proportionnelle à leur longueur, elle est nulle pour des fibres > 20 μm . Injectées par voie intraveineuse, les fibres migrent vers le foie et les poumons ; le chrysotile passe la barrière placentaire et apparaît dans le foie et le poumon du fœtus

Après leur pénétration, les fibres d'amiante sont distribuées dans tout l'organisme.

2.2.2. Devenir des fibres inhalées : Distribution (migration, translocation),

Elimination [67-82]

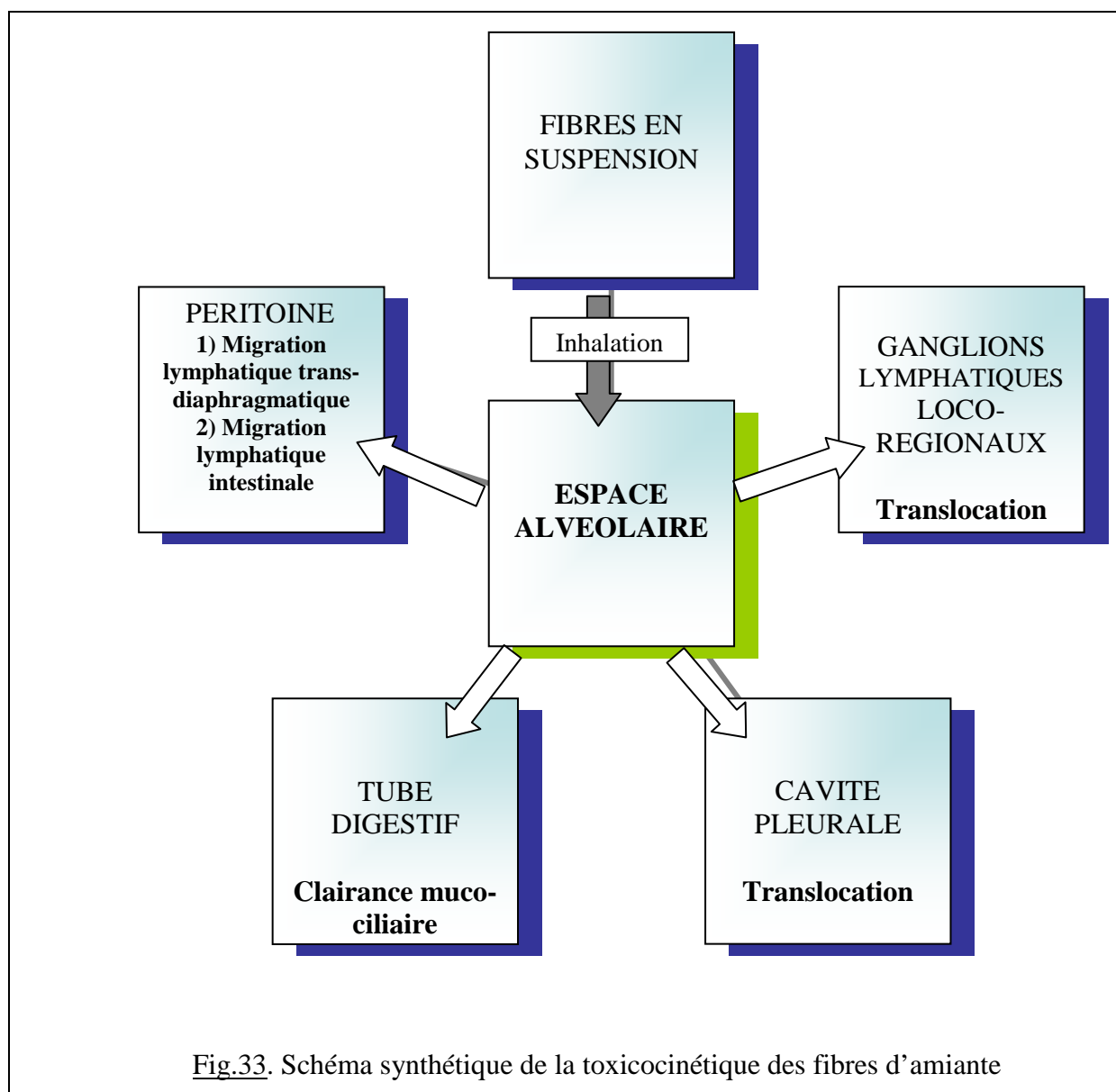
2.2.2.1. Existence d'une migration

Une partie des fibres déposées dans l'espace alvéolaire va migrer vers d'autres compartiments, comme les ganglions lymphatiques loco-régionaux, la cavité pleurale, le tube

digestif et le péritoine. Le compartiment principal de stockage est le parenchyme pulmonaire mais des taux élevés de fibres ont été trouvés dans la plèvre, les ganglions lymphatiques et les reins. [67, 72, 73]

2.2.2.2. Mécanismes

Les voies de transport ne sont pas totalement élucidées ; une fois déposées, les fibres d'amiante sont partiellement éliminées du poumon par des mécanismes physiques (clairance muco-ciliaire, alvéolaire, interstitielle ou lymphatique) et physicochimiques.



➤ *Clairance muco-ciliaire*

La plupart des fibres déposées dans les régions trachéo-bronchiques sont transportées au larynx par le mouvement muco-ciliaire. Au niveau bronchique, les battements ciliaires et la fluidité du mucus induisent l'épuration mécanique des fibres vers le pharynx. Elles ont ensuite avalées ou expectorées, tout comme celles déposées dans la région naso-pharyngée. Ce mécanisme d'épuration est particulièrement efficace pour les fibres longues et de gros diamètre qui se déposent essentiellement dans les voies respiratoires proximales. [74,75]

➤ *Phagocytose par les macrophages alvéolaires et dissolution.*

Les fibres alvéolaires sont phagocytées par les macrophages qui les transportent vers les bronchioles, où elles forment des foyers inflammatoires, vers l'épithélium cilié des bronchioles terminales ou vers la plèvre. En effet les macrophages présents dans le tractus respiratoire phagocytent les fibres qui sont secondairement internalisées dans les phagolysosomes, totalement ou partiellement selon la longueur de la fibre. Du fait de la taille des macrophages pulmonaires, la phagocytose et la migration sont moins importantes pour les fibres de longueur $> 10 \mu\text{m}$. Cependant, plusieurs macrophages peuvent fusionner pour former des cellules géantes et phagocyter des fibres de grande longueur; dans ce cas, la migration sera minimale. [69, 72,73]

L'acidité ambiante dans ces organites intracellulaire (pH des phagolysosomes=4,5) induit la dissolution de certains minéraux comme le magnésium. Les différences de composition chimique des fibres vont donc conditionner leur vitesse de dissolution dans les différents milieux biologiques. (Voir paragraphe 2.2.3)

☞ *Translocation*

Les fibres peuvent aussi passer dans le milieu interstitiel, à travers les cellules épithéliales alvéolaires, puis vers la périphérie pulmonaire et vers des tissus éloignés. On parle alors de translocation. Les fibres seraient transportées vers la plèvre et les ganglions par des mécanismes directs, systémiques ou lymphatiques, via les vaisseaux intercostaux et diaphragmatiques. [76] On peut ainsi en retrouver jusque dans les reins et l'urine [69, 72, 73].

Bien que les particules déposées dans les poumons soient en parties épurées vers des structures lymphoïdes des bronches et vers les ganglions lymphatiques du médiastin, il n'a pas été mis en évidence d'excès de tumeur lymphoïdes en relation à une exposition à l'amiante. [67]

La présence de fibre d'amiante dans la plèvre a été démontrée. [77] L'hypothèse la plus vraisemblable est la migration des fibres inhalées vers la périphérie du poumon puis le passage de celles-ci à travers la plèvre viscérale vers l'espace pleural. Les études par inhalation ou instillation intra-trachéale de fibre d'amiante chez le rat déposées dans le poumon profond ont montré leur migration vers la périphérie du poumon induisant des zones sous-pleurale d'alvéolite avec afflux de macrophage [78-80]. Chez l'homme cette migration pourrait expliquer la prédominance des lésions asbestosiques en périphérie du poumon et les manifestations pleurales. La fibrose pleurale est le plus souvent localisée au niveau de la plèvre pariétale. Des études en microscopie électronique ont montré la présence de fibres de chrysotile et d'amphibole particulièrement au niveau de zones dites « points chauds » ou « black spots » ; cette présence pourrait correspondre à l'accumulation de fibres, les plus longues et les plus persistantes, au niveau de pores du système de drainage lymphatique, faisant communiquer la cavité pleurale avec les lymphatiques sous-pleuraux de la pari thoracique et du diaphragme [81]

Les propriétés des fibres des chrysotile sembleraient pouvoir expliquer et faciliter leur migration pleurale (elles sont fragmentés par les macrophages et dont leur dimension se réduit), et Sébastien [82] a ainsi montré que ce sont très souvent des fibres courtes de chrysotile qui sont retrouvées dans la plèvre. Les amphiboles, à l'inverse, gagnent rarement cette localisation mésothéliale.

Plusieurs hypothèses sont envisagées pour expliquer la localisation péritonéale des fibres inhalées, au décours de fortes expositions. La première est une contamination de la cavité péritonéale par voie trans-intestinale par les fibres inhalées et secondairement dégluties, résistant à l'acidité gastrique. La deuxième est le transfert de fibres par des lymphatiques trans-diaphragmatiques dans la cavité péritonéale. [67,68, 81]

Le passage vers les reins implique un transport passif par le sang sous forme de particules libres ou phagocytées. [72-74]

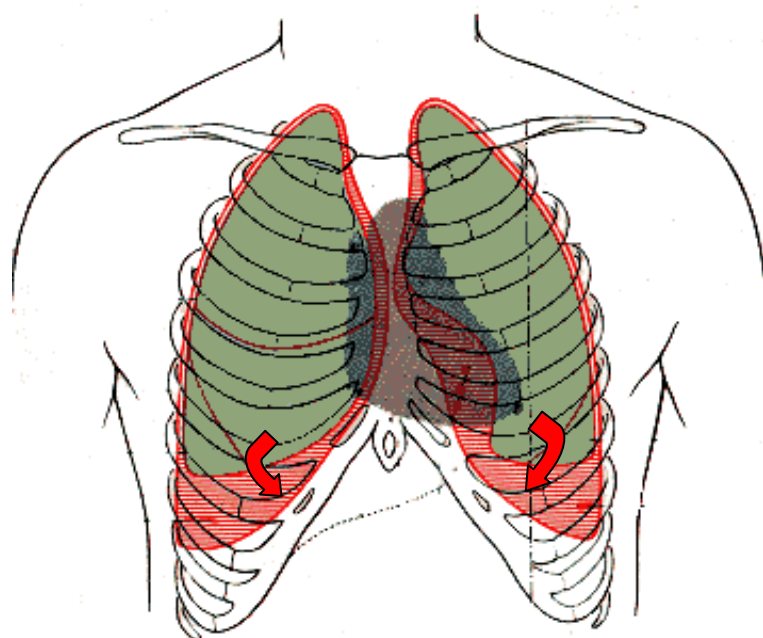


Fig.34. Translocation des fibres d'amiantes vers la cavité pleurale

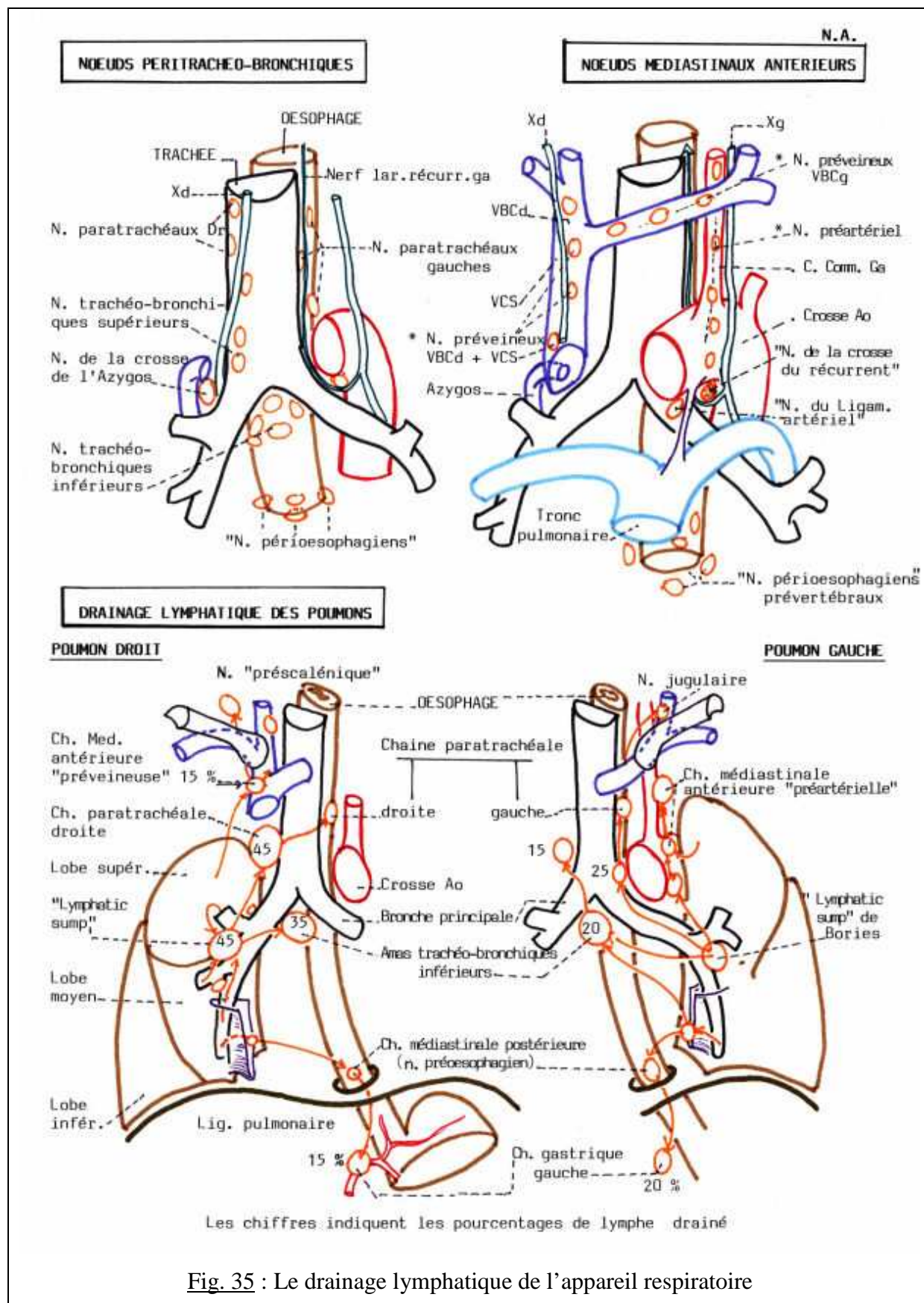
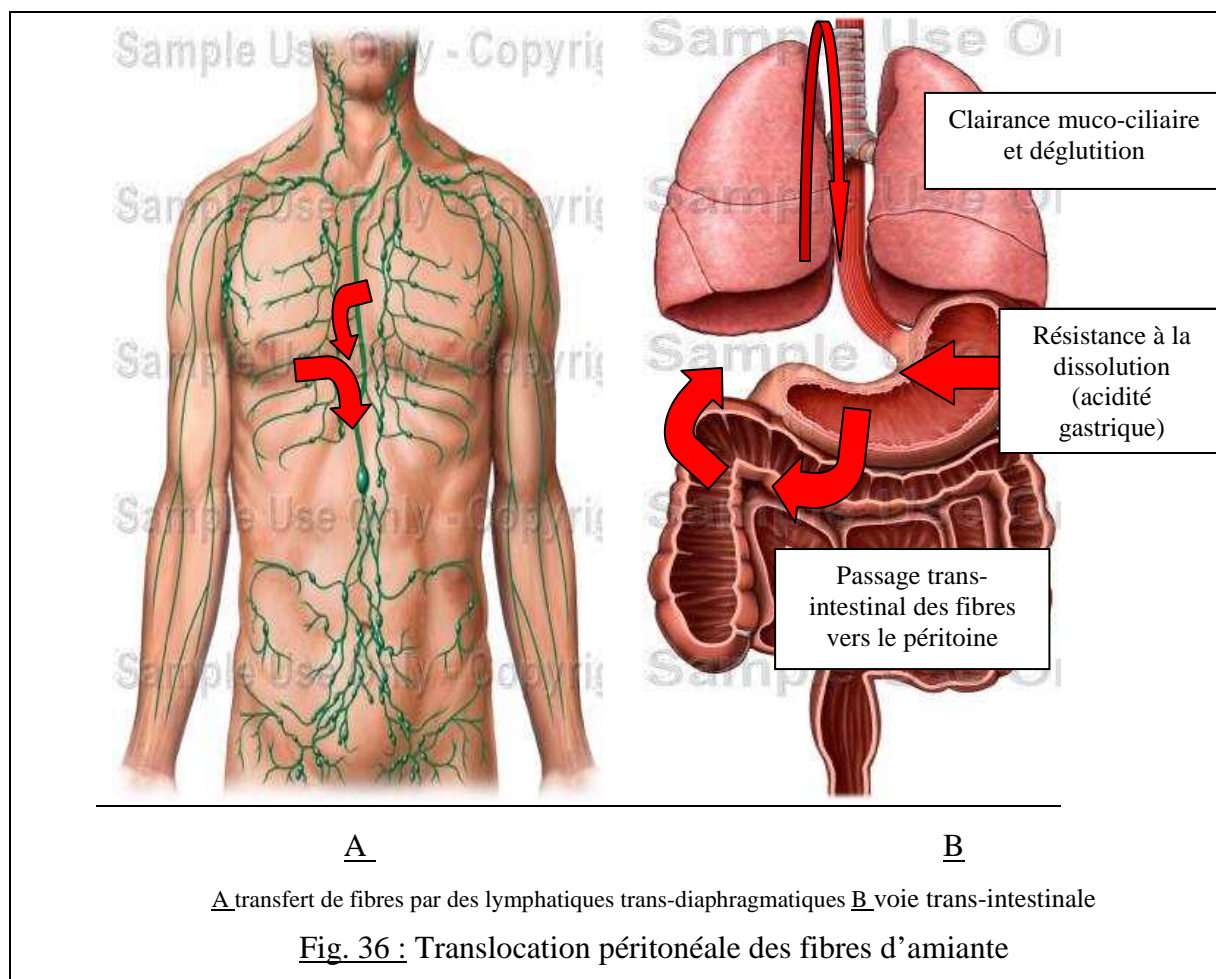


Fig. 35 : Le drainage lymphatique de l'appareil respiratoire



2.2.3. Notion de biopersistance [67-68, 83-95]

La biopersistance peut se définir comme la durée de rétention des fibres dans le poumon. Cette notion dépend de plusieurs facteurs comme la dimension, la solubilité dans les milieux biologiques, la capacité à transformer la structure fibrillaire des fibres, ainsi que la capacité d'épuration intrinsèque de l'hôte. [67, 68]

2.2.3.1. Données expérimentales

Plusieurs études [35] ont montré que les amphiboles présentent une biopersistance supérieure à celle du chrysotile. Ceci s'explique notamment par la résistance supérieure à l'acidité des phagolysosomes. [83] Chez l'homme, cette différence de durabilité dans l'organisme, entre amphibole et chrysotile a été confirmé par des études biométopologiques. [84] En effet, le comptage des fibres présentes dans le parenchyme pulmonaire de mineurs québécois décédés, exposés au chrysotile, a montré des concentrations constantes de chrysotile, reflet de leur dernière exposition, tandis que la concentration en trémolite, amphibole contaminant en faible quantité le minerai, était proportionnelle à la durée d'exposition. Les amphiboles s'accumulent donc dans les poumons plus que le chrysotile. Quelques études de contenu pulmonaire après arrêt de l'exposition professionnelle indiquent que la charge pulmonaire en amphiboles augmente avec la durée de l'exposition [86] ; une élimination progressive des fibres du poumon a été montrée avec la trémolite et le chrysotile [87]. Cependant, des fibres, courtes et longues, de chrysotile ont été trouvées dans le parenchyme distal sous la plèvre [86].

La biopersistance pulmonaire augmente rapidement avec la longueur des fibres (à partir de 2-5 μm avec un maximum à 10 μm) et leur diamètre (à partir de 0,15 μm , avec un maximum à 0,5 μm) [85]. Les fibres d'amiante les plus longues trouvées dans les poumons humains mesurent 360 μm [73].

On admet actuellement que la demi-vie moyenne des fibres de crocidolite au niveau pulmonaire chez le rat est de 301 jours si 10 % des fibres inhalées ont une longueur > 5 μm [86] ; chez les primates, elle est de 1 530 jours et celle de l'amosite de 540 jours [83]. La demi-vie du chrysotile n'est pas quantifiable du fait de l'augmentation du nombre de fibres par clivage [86, 88, 89].

2.2.3.2. Explications : hypothèses cinétiques

☞ *Solubilité et structure fibrillaire.*

Les études *in vitro* ont montré les différences de solubilité des différentes variétés d'amiante. Ainsi, le chrysotile, sous l'effet de l'acidité des phagolysosomes subit une solubilisation de son magnésium. Le processus biologique macrophagique aboutit à une fragmentation du chrysotile en micro-fibrilles courtes plus facilement épurées. Une étude sur le rat a montré que l'inoculation intra-pleurale de fibres de chrysotile préalablement soumises à un traitement acide entraîne un taux de tumeurs pleurales moindre que dans le lot de rats ayant été inoculés avec des fibres de chrysotile non traitées. [90] Les fibres d'amphiboles sont, par contre, totalement insolubles en milieu acide. Elles conservent donc après leur phagocytose macrophagique leur dimension initiale [83,91]. Elles s'engainent secondairement d'un revêtement protidique riche en fer, formant des entités appelées corps asbestosiques (cf. paragraphe 2.3.) Chez le hamster et le cobaye, les fibres d'amiante forment des corpuscules jaunes similaires à ceux observés chez l'homme ; chez le rat, peu de fibres sont encapsulées et, dans ce cas, la capsule est discontinue et forme des globules presque transparents [73].

☞ *Capacité d'épuration du sujet et dimension des fibres.*

Outre son efficacité intrinsèque qui peut varier selon les sujets (par exemple le tabagisme altère le fonctionnement des cellules ciliées de la muqueuse bronchique), le mécanisme d'épuration muco-ciliaire est particulièrement efficace pour les fibres longues et de gros diamètre. D'autre part, la phagocytose par les macrophages, elle, conditionnée par la nécessité que la fibre soit de taille inférieure à celle des macrophages. Cependant, plus dans le cas du chrysotile que dans celui des amphiboles, des modifications physiques de la fibre elle-même peuvent intervenir pour faciliter la clairance. Les fibres de chrysotile se clivent

longitudinalement en fibrilles de diamètre inférieur qui sont susceptibles de se fracturer et d'être raccourcies donc phagocytées ; les amphiboles ne sont pas clivées dans le poumon du rat. Ce processus est probablement accompagné de modifications chimiques de la fibre [92]. De plus, les mécanismes de migration à l'intérieur du tissu pulmonaire peuvent être responsables de la cassure et de la désintégration partielle des fibres dans le poumon [93]

2.2.3.3. Intérêts de cette notion.

La géométrie des fibres, leur dimension, leur composition chimique, leur réactivité de surface (cf. ci-dessous), et leur biopersistance semblent donc avoir une influence sur les mécanismes de fibrose et cancérogenèse liés aux fibres. La « persévérance » des réponses inflammatoires et prolifératives observées par injection intra-péritonéale de fibres, dépend de la biopersistance des fibres dans ce tissu-cible. [94] Dans cette étude, l'injection intra-péritonéale de fibres de wollastonite induisait rapidement une réponse inflammatoire et proliférative durant 21 jours et seulement 2% de ces fibres subsistait après 6 mois. A l'inverse le nombre de fibres persistantes dans le tissu n'avait pas diminué 6 mois après l'injection de fibres de crocidolite. Ces résultats mettent en relation la réponse inflammatoire et proliférative des cellules mésothéliales avec le nombre et la persistance des fibres dans le tissu. Ils supportent l'hypothèse que les fibres biopersistantes causent une inflammation et une prolifération des cellules mésothéliales chroniques.

Pourtant aucune relation quantitative entre biopersistance et pouvoir tumorigène chez l'animal n'a été clairement établie, mais la biopersistance supérieure des amphiboles pourrait rendre compte de son pouvoir cancérigène plus important. Ainsi, le risque accru de mésothéliome, chez les sujets exposés aux amphiboles, a permis d'émettre l'hypothèse d'un potentiel cancérigène proportionnel à cette biopersistance, au moins pour la plèvre.

L'importance relative de la biopersistance des fibres d'amiante semble moins claire dans la genèse du cancer broncho-pulmonaire.

Cette notion de biopersistance est malgré tout un outil essentiel d'évaluation de la toxicité des fibres de tout type. En effet, parce que la réglementation porte sur le nombre de fibre, alors que le risque est connu pour être lié aux fibres longues, non seulement la dose devraient toujours être exprimé en nombre de fibre et non en masse, mais la distribution des dimensions de ces fibres (longueur et diamètre) devrait être précisée. Les tests de toxicité à court terme peuvent en effet conduire à de faux positifs, dans le cas de longues fibres non-biopersistantes, parce que, bien que susceptibles d'avoir des effets *in vitro*, ils ne persistent pas suffisamment dans le tractus respiratoire à dose suffisante pour pouvoir manifester leurs effets *in vivo*. [95]

La biopersistance des fibres est donc un facteur clé qui doit être connu dans l'interprétation des tests à court terme pour prédire la pathogénicité des fibres.

2.3. Les dommages à l'ADN : l'amiante est un initiateur

Le développement d'un cancer est le résultat d'un processus multifactoriel mettant en jeu une succession d'événements et conduisant à une prolifération cellulaire anormale. L'amiante est un cancérigène complet, se comportant comme un **initiateur** (molécule capable de transformer une cellule en induisant une mutation à l'origine d'une altération irréversible du génome cellulaire, transmise aux cellules filles) mais aussi comme un **promoteur** (permettant l'expression du gène altéré et la prolifération des cellules anormales). Ces mécanismes **génétiques** et **épigénétiques** conduisent à l'acquisition de propriétés particulières, lesquelles conditionnent le développement tumoral. Parmi ces propriétés, citons la capacité angiogénique, l'autosuffisance en terme de signaux de survie, l'insensibilité aux

signaux inhibiteurs de croissance, la résistance à l'apoptose, l'échappement à la sénescence répllicative, et l'instabilité génétique.

2.3.1. Les agent oxydants : inflammation, radicaux libres et NO

Des études semblent montrer que les fibres d'amiante induisent la générations d'espèces radicalaires responsables de l'oxydation et de la nitrosylation des protéines et de l'ADN des cellules. [193-200]

2.3.1.1. Inflammation et radicaux libres dérivés de l'oxygène

L'amiante génère des espèces actives dérivées de l'oxygène (EADO ou ROS pour Reactive Oxygen Species) par au moins deux mécanismes. Le premier met en jeu le contenu des fibres en fer, augmentant la libération de radicaux OH° par des réactions catalysées par le fer. Le second mécanisme met en oeuvre la libération de ROS à travers l'activation de cellules inflammatoires pulmonaires telles que les macrophages alvéolaire et les neutrophiles.

➡ Réactivité de surface des fibres et radicaux libres dérivés de l'oxygène ROS.

C'est essentiellement par leur capacité à produire **spontanément** des espèces actives dérivées de l'oxygène dans les systèmes acellulaires que les propriétés de surface des fibres sont apparues comme un paramètre à prendre en considération dans le mécanisme d'action des fibres d'amiante. [96]

Le rôle du fer a été particulièrement mis en cause dans cette capacité à libérer spontanément des radicaux libres. En effet la teneur en fer dans la structure cristalline des

différentes variétés de fibres est variable (table 14). Par exemple, elle avoisine les 27 % dans les amphiboles, alors que les serpentines (chrysotile) n'en contiennent que 1-6% [97]. De plus la capacité des chélateurs du fer (comme la déferoxamine) à diminuer la toxicité cellulaire des fibres dans les études *in vitro* suggèrent l'importance du rôle joué par le fer. [98,99]

Amiante	Composition
Serpentine	
Chrysotile	3MgO,2SiO ₂ ,2H ₂ O
Amphibole	
Actinolite	2CaO,4MgO,FeO,8SiO ₂ ,H ₂ O
Amosite	11FeO,3MgO,16SiO ₂ ,2H ₂ O
Anthophyllite	7MgO,8SiO ₂ ,H ₂ O
Crocidolite	NaO ₂ ,Fe ₂ O ₃ ,3FeO,8SiO ₂ ,H ₂ O
Trémolite	2CaO,5MgO,8SiO ₂ ,H ₂ O

Table 14: Composition des principales variétés d'amiante[97]

Toutefois la seule présence de fer n'est pas une condition indispensable à leur effet cancérigène : trois situations différentes peuvent être observées [99]

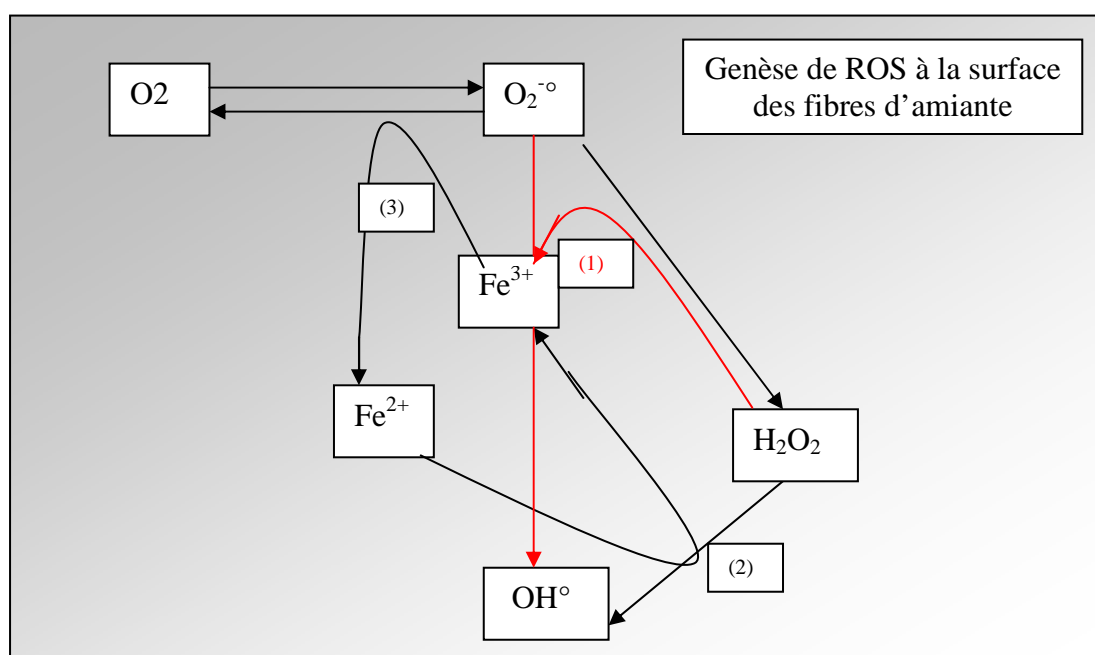
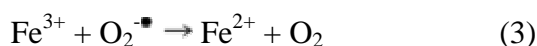
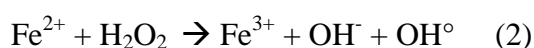
-le fer entre dans la composition de la fibre minérale : c'est le cas pour les amphiboles dont la toxicité est supérieure au chrysotile [100]

- le Fe²⁺ peut se substituer au Mg²⁺ du Chrysotile notamment du fait de la présence de minéraux contenant du fer à proximité du chrysotile [101]

- le fer peut aussi être présent comme impureté des fibres minérales.

Ces deux dernières possibilités expliquent le pouvoir cancérigène des fibres inorganiques naturelles (chrysotile, érionite) ou synthétiques (céramiques réfractaires) qui en sont normalement dépourvues.

Les principaux dérivés impliqués dans la pathogenèse des maladies en relation avec une exposition à l'amiante sont les radicaux hydroxyle OH^\bullet et superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le monoxyde d'azote NO^\bullet . [102-107] L'anion radicalaire superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ formé dans une réaction mono-électronique à partir de l'oxygène est relativement peu réactif et possède une assez longue demi-vie cellulaire. Il subit une dégradation (dismutation) non enzymatique ou enzymatique (catalysée par les superoxydes dismutases) en H_2O_2 . Le peroxyde d'hydrogène, moins réactif que $\text{O}_2^{\bullet-}$, peut être dégradé, en libérant de l'eau, mais peut aussi exercer un effet toxique indirectement en régissant avec d'autres molécules pour libérer des radicaux hydroxyles OH^\bullet . Ces radicaux OH^\bullet peuvent être formés à partir du superoxyde ou du peroxyde d'hydrogène par la réaction de Haber-Weiss (Equation 1) ou à partir du peroxyde d'hydrogène dans la réaction catalysée par les cations divalents (Fe^{2+}) dite réaction de Fenton. (Equation 2)



La réactivité de ce radical hydroxyle est très importante, et ce composé possède donc une durée de vie brève. Il réagit immédiatement avec les macromolécules situées à sa proximité (les fibres peuvent adsorber les protéines, les phospholipides membranaires et l'ADN et ainsi, ces macromolécules biologiques dans l'environnement proche des fibres, sont la cible idéale des métabolites oxydants libérés. [110]).

Du fait de la présence de fer dans la structure des fibres d'amiante, la réaction de Fenton est probablement une étape du développement des pathologies liées à l'amiante. [102-109]

D'autres dérivés, plus stables peuvent également se former du fait de l'agression des acides gras insaturés membranaires par un radical libre. Toutefois l'inhibition de ce mécanisme ne fait pas disparaître la cytotoxicité induite par les fibres d'amiantes, suggérant que cette peroxydation des lipides ne suffit pas à elle seule à expliquer cette cytotoxicité. [111]

Restent des questions sur le rôle du fer dans la libération de radicaux libres. Il n'existe aucune certitude sur la forme « active » du fer (ferrique et/ou ferreuse). De même on ne dispose d'aucune certitude si les chélateurs du fer pourraient réduire les effets catalytiques des fibres d'amiante en séquestrant le fer à la surface des impuretés et/ou dans la structure même des fibres. D'autres métaux présents dans les fibres d'amiante pourraient aussi jouer un rôle catalytique important expliquant les propriétés toxiques des fibres d'amiante. De plus des chélateurs tels que la déferoxamine et l'acide phytique, qui ne laissent au fer aucun site de coordination disponible (stoechiométrie des valences) pour H_2O_2 sont des inhibiteurs efficaces, alors que les chélateurs qui laissent des liaisons de valence possible, tels que l'EDTA, semblent favoriser la libération de radicaux hydroxyle. [107,112-115] Enfin les effets protecteurs de ces chélateurs sont diminués *in vivo*, suggérant soit une dégradation des

chélateurs soit un flux dynamique entre le fer et ces chélateurs (l'un au l'autre diffusant, les équilibres de chélation sont déplacés en permanence et libèrent progressivement le fer).

➡ Cellules inflammatoires et radicaux libres

Les hautes concentrations de fibres peuvent donc générer spontanément des espèces réactives dérivées de l'oxygène dans les systèmes acellulaires. Cependant, cette libération de ROS semble variable dans les études utilisant des fibres à concentrations proches de celles retrouvées habituellement chez les individus. La plupart des études ont cependant montré une libération de ROS par les **cellules inflammatoires** en réponse aux fibres d'amiante. [107]

Le dépôt de fibres dans le poumon s'accompagne d'une phagocytose et d'une activation de la réponse inflammatoire. La phagocytose est vraisemblablement une des étapes importantes dans la génotoxicité des fibres. Il a été observé que les protéines sériques s'adsorbaient sur les fibres [116] et qu'elles facilitaient ainsi les interactions des fibres avec la membrane plasmique des cellules inflammatoires, augmentant ainsi la toxicité [117] et la réponse cellulaire aux fibres (production du radical superoxyde par les macrophages) [118-119].

Boylan et al. ont montré que l'interaction entre la vitronectine *via* l'intégrine $\alpha_v\beta_5$ jouait un rôle dans l'internalisation de fibre de crocidolite par les cellules mésothéliales pleurales de lapin. [120] Une équipe américaine a quantifié le phénomène de phagocytose en comptant le nombre de fibres intracellulaires. Ils ont pu montrer que les fibres de crocidolite enveloppées de vitronectine (VN) faisaient l'objet d'une phagocytose plus importante par une interaction de la vitronectine avec des intégrines, protéines membranaires des cellules phagocytaires. Comme le montrent les données du tableau ci-dessous, la phagocytose des

fibres enveloppées de vitronectine est plus importante en comparaison des fibres non enveloppées. Le blocage de la polymérisation de l'actine avec la cytochalasine (5 µg/ml) diminue l'internalisation des fibres dans les cellules, confirmant la mise en œuvre d'un processus de phagocytose. Enfin, le blocage compétitif des intégrines par des peptides contenant du RGD (0,2 mg/ml) provoque la encore une diminution de la phagocytose des fibres tapissées de vitronectine (et non pas celles qui n'en sont pas pourvues), confirmant la mise en jeu d'une interaction entre ces protéines. [121]

Phagocytose: % de cellules renfermant plus de 4 fibres	Fibres non enveloppées de vitronectine	Fibres enveloppées de vitronectine
Sans inhibiteur	43+/- 5	64+/- 7
En présence de cytochalasine (5 µg/ml)	10+/- 3	20+/- 7
En présence de RGD-peptides 0,1mg /ml 0,2 mg/ml	46+/- 4 45+/- 5	59+/- 2 47+/- 4

Table 15: Phagocytose des fibres de crocidolite[121]

L'oxydation intracellulaire des cellules mésothéliales est provoquée par l'incubation des cellules en présence de fibres enveloppées d'albumine (témoin- BSA: Bovin Serum Albumin) et de fibres tapissées de vitronectine (VT). Elle est plus importante avec les fibres – VT qu'avec les fibres–BSA. (Figure 37A). La cytochalasine inhibe l'oxydation intracellulaire de toutes les cellules, quelques soient les fibres (Figure 37B) Ainsi, un lien est établi entre la phagocytose et l'oxydation intracellulaire. De même, un lien est établi entre exposition cellulaire aux fibres, phagocytose et lésion de l'ADN des cellules. (Figure 38) En somme, cette étude montre que la phagocytose des fibres est une étape importante et peut être nécessaire à l'apparition de un stress oxydatif, de lésion de l'ADN et de l'apoptose des cellules mésothéliales. [121]

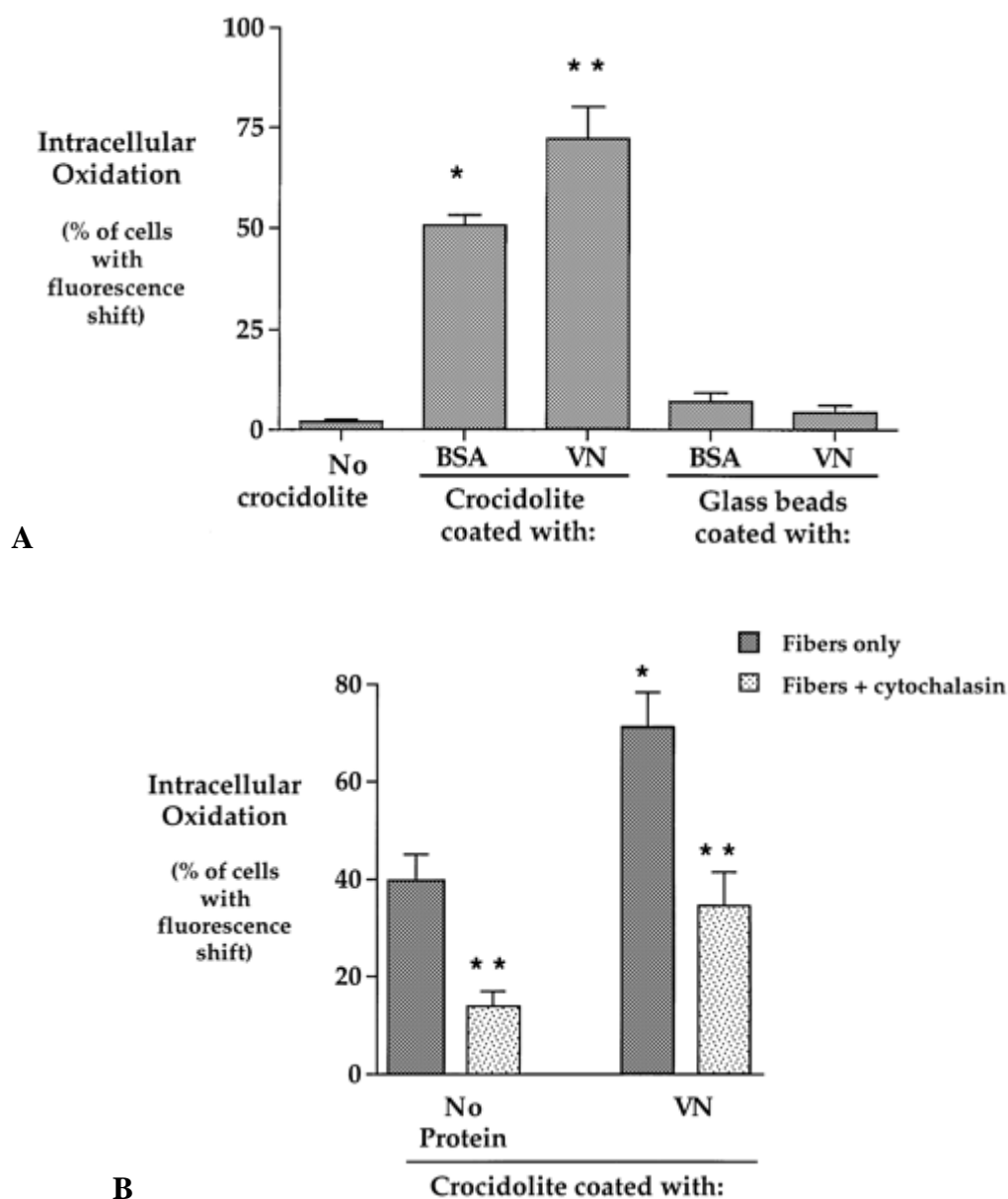


Fig.37: Oxydation intracellulaire des cellules mésothéliales en présence de fibres de crocidolite [121]

VN : Vitronectine ; BSA : Albumine ;

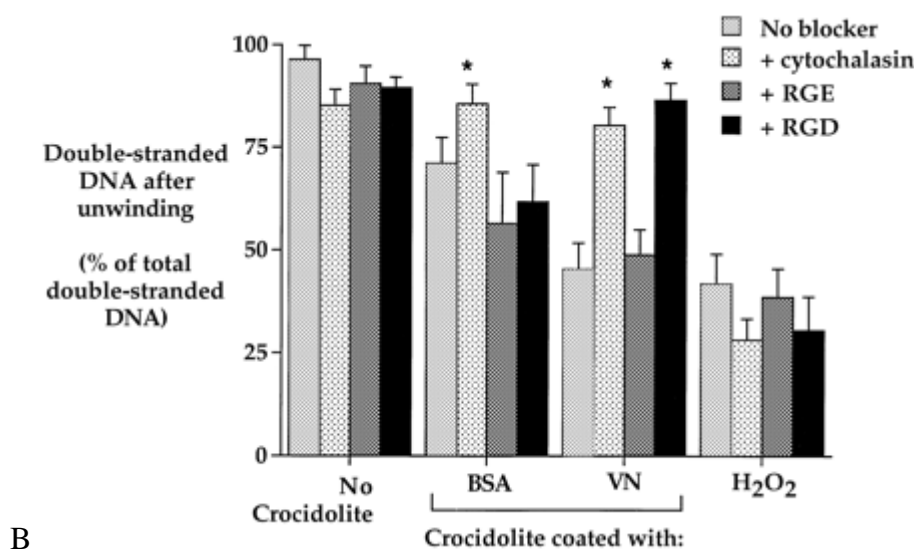
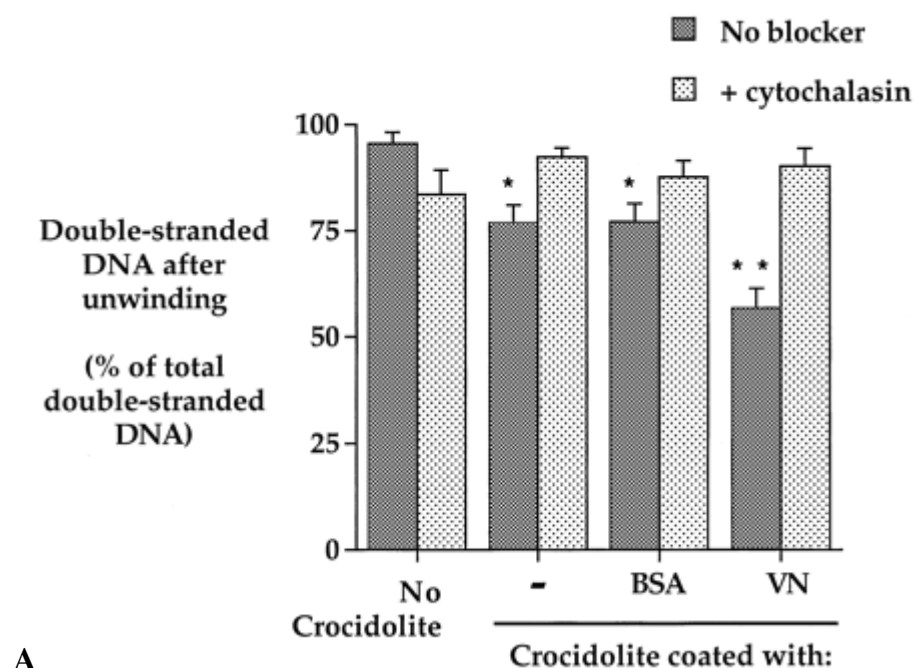


Fig. 38 : Phagocytose et lésions à l'ADN (cassures simples et doubles brins).
%d'ADN double brin [121]

No crocidolite : sans exposition aux fibres (témoin), Crocidolite enveloppée de BSA ou de vitronectine VT ; RGD inhibiteur d'intégrines ; RGE témoin d'inhibition des intégrines ; cytochalasine : inhibiteur de la phagocytose ; No blocker : pas d'inhibiteur

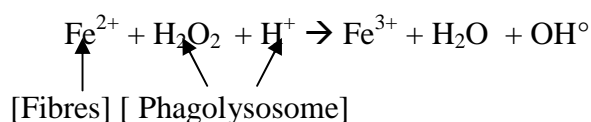
A : * significativement différent des cellules non exposées aux fibres de crocidolite; ** différent des cellules exposées aux fibres non enveloppées, B * significativement différent par rapport aux cellules exposées aux fibres avec la même protéines mais sans inhibiteur, (P < 0,05)

Globalement, les interactions aboutiraient à une activation de la voie de signalisation de la Protéine Kinase C (PKC) et de l'Inositol phosphate (voie des phospholipases C), conduisant à l'activation de la Nicotinamide Adénosine Dinucléotide Phosphate (NADPH) oxydase.

La famille des protéines kinase C regroupe un groupe d'enzymes dont les substrats joueraient un rôle clé dans la régulation des événements cellulaires de la pathogénèse des pathologies prolifératives et l'amiante activerait une cascade de signalisation cellulaire à travers l'activation de PKC. Une étude utilisant un modèle murin d'inflammation et de fibrose induite par l'inhalation d'amiante, évalue l'immunoréactivité des PKC-delta et de son substrat, la phospho-adducine (p-adducine) dans des cellules de poumon. Les PKC-delta et la p-adducine sont essentiellement exprimées dans les cellules épithéliales de type II alvéolaires (ATII) et bronchiolaires et leur expression est augmentée dans ces cellules après inhalation de fibres d'amiante.

L'accroissement fut observé dans le noyau et sur la membrane des cellules. Cette étude montre que l'activation des PKC-delta dans les cellules pulmonaires pourrait être une conséquence de l'inhalation de fibres et pourrait être liée à l'apparition de pathologies. [121]

Les cellules inflammatoires ainsi activées libéreraient alors des espèces réactives dérivées de l'oxygène. [122-125] D'autre part, la phagocytose elle-même est un processus générateur d'EADO : le phagolysosome macrophagique, du fait de l'acidité ambiante et de la présence de H_2O_2 réunit toutes les conditions nécessaires à la formation du radical hydroxyl OH° selon la réaction de Fenton :



Ainsi, on pourrait expliquer que les fibres les plus longues, pour lesquelles la phagocytose est la plus difficile libéreraient plus de radicaux libres et seraient donc plus toxiques que les fibres courtes [35]

La libération locale d'EADO par les fibres et les cellules interagissant avec ces fibres joue également un rôle dans le développement de la réponse inflammatoire chronique. Or, cette réaction inflammatoire, qui s'accompagne de la production de facteurs de prolifération cellulaire, est elle-même aussi un autre élément générateur d'EADO. Ces molécules peuvent, de plus, agir à distance par l'intermédiaire de facteurs plus stables (dérivés de la peroxydation lipidiques par exemple) [96] Dans ce cadre, il est intéressant de noter que les cellules mésothéliales produisent *in vitro* des facteurs cassants stables et que les anomalies chromosomiques ne sont observées dans des lymphocytes *in vitro* qu'en présence de monocytes, générateurs primaires d'EADO et autres espèces clastogènes. [126]

➤ Méthodes expérimentales de mesure des radicaux libres dérivés de l'oxygène et limites

Les principales méthodes utilisées pour mettre en évidence la libération des EADO par l'amiante sont basées sur la formation de dérivés stables, tels que le 5,5 diméthyl-1-pyrroline-

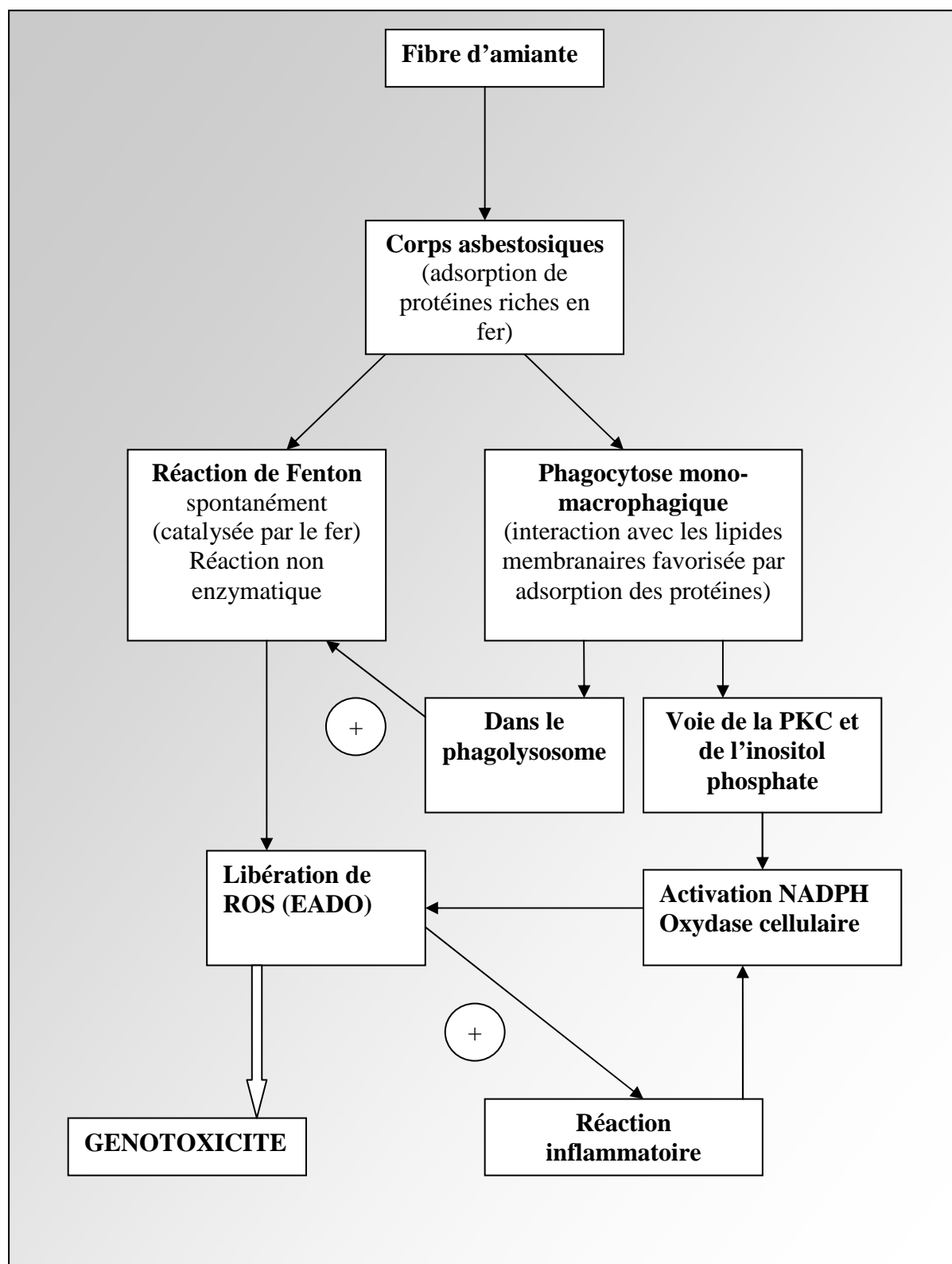


Fig. 39 : Production des Espèces Actives Dérivées de l'Oxygène (schéma synthétique)

N-oxyde (DMPO), ou bien la détection de produits de peroxydation lipidique de l'acide thiobarbiturique, basées sur la chimioluminescence avec le luminol ou la luciférine. La méthode du DMPO a montré que l'amiante induit la libération de radicaux hydroxyles dans les cellules inflammatoires [106, 128-129] mais cette méthode ne permet pas de détecter les radicaux libres dans les cellules mésothéliales humaines exposées à l'amiante. [127] L'amiante provoque des réactions de lipopéroxydation, dans les cellules inflammatoires [128-129] qui peuvent être mise en évidence dans les 10 minutes qui suivent l'exposition. [130] Il faut cependant noter que les produits de peroxydation lipidiques constituent des produits finaux de nombreuses réactions dans la cellule. Le luminol et la luciférine, qui sont utilisés dans des essais de chimioluminescence, permettent de détecter un grand nombre de dérivés oxygénés, raison pour laquelle cette méthode n'est pas spécifique de la libération de radicaux libres. [131] Les fibres d'amiante provoquent un accroissement rapide de la luminescence des macrophages et des leucocytes alvéolaires humains, mais pas dans les cellules mésothéliales. [132-136]

Selon Kinnula, si la génération de ROS n'est pas détectable dans ces cellules-cibles, deux hypothèses sont à prendre en compte :

- soit l'amiante ne provoque aucune libération de ROS dans ces cellules
- soit les ROS sont libérées mais non détectables, car trop rapidement consommés par les anti-oxydants intracellulaires. En effet, les fibres d'amiante libèrent des espèces radicalaires azotées qui ne peuvent être mises en évidence par aucune méthode, lesquelles mesurent tous les métabolites du superoxyde et du peroxyde d'hydrogène. Ceci laisse penser que la libération de tous les radicaux libres est probablement sous-estimée. [97]

Une méthode utilise la dichlorofluorescéine-diacétate (DCFH-DA), composé qui diffuse librement et qui, par des réactions oxydatives diverses dans la cellule, libère un dérivé

fluorescent. Cette méthode est capable de mettre en évidence une légère augmentation de la libération de ROS dans les cellules mésothéliales exposées aux fibres d'amiante. [137]

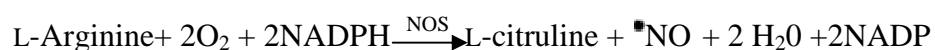
La mesure directe des processus cellulaires conduisant à la libération d'Espèces Actives Dérivées de l'Oxygène (EADO ou ROS) est difficile, et les méthodes ne sont pas spécifiques. Ainsi, les réactions impliquant les ROS dans les cellules exposés aux fibres d'amiante sont relativement peu connues

2.3.1.2. Rôles du NO et des NOS

Comme revues ci-dessous, des études ont récemment montré que les fibres d'amiante pouvaient aussi générer des RNS, Espèces radicalaires azotées, telles que le monoxyde d'azote NO^\bullet et le peroxydinitrite $^\bullet\text{ONOO}$. Bien que des données conflictuelles aient pu être apportées par ces études, la majorité d'entre elles suggèrent que le monoxyde d'azote jouerait un rôle dommageable dans le développement des pathologies liées à une exposition à l'amiante.

➡ La production de NO

Le monoxyde d'azote est une espèce moléculaire radicalaire de signalisation intracellulaire. Il est libérée par la réaction ci-dessous, catalysée par une famille d'enzymes cytoplasmiques, les NO Synthases (NOS)



On distingue parmi cette famille d'enzyme plusieurs isoformes:

- la NOS neuronale (nNOs ou NOS1), présente dans le tissu nerveux, et la NOS Endothéliale (eNOS ou NOS 3), présente dans l'endothélium vasculaire, sont deux isoformes constitutives et calcium/calmoduline dépendantes. Ces formes constitutives libèrent le NO à un faible taux basal et sont impliquées dans la vasodilatation et la neurotransmission.

- une troisième iso-enzyme est induite par des stimuli variés, tels que le lipopolysaccharide LPS des parois bactériennes, l'interféron- γ , et diverses cytokines. Cette forme inducible (iNOS ou NOS 2) est étroitement liée à la calmoduline et est active pour de faibles taux intracytoplasmiques en calcium. Elle est capable de libérer de grandes quantités de NO en relation avec une large variété de réponses biologiques. [138-140]

Ces enzymes ont été mises en évidence dans de nombreux types cellulaires pulmonaires. Dans des conditions basales, eNOS a été retrouvée dans les macrophages alvéolaires, les pneumocytes II et les cellules endothéliales pulmonaires. nNOS est présente dans les neurones, mais pas dans les macrophages ou les pneumocytes II. Enfin, iNOs n'est pas présente dans les macrophages et les pneumocytes non stimulés, mais divers facteurs ont été capables d'induire l'expression de cette isoforme dans les macrophages alvéolaire, les pneumocytes II, les fibroblastes, les cellules musculaires des vaisseaux pulmonaires et les neutrophiles.

☞ Actions du NO : « le yin et le yang »

Bien que le NO soit un radical libre, il est relativement peu réactif. En effet, la littérature est abondante pour suggérer une action protectrice contre les lésions et l'inflammation. Wink et ses collaborateurs évoquent des propriétés anti-oxydantes. [142] De nombreuses études ont rapporté que le NO pouvait réagir avec des intermédiaires radicalaires (peroxydes et autres), mettant ainsi fin à la propagation de la chaîne de réactions radicalaires

des lipides, et finalement, inhibant les réactions de lipopéroxydation. [143-146] D'autre part le monoxyde d'azote est capable d'inhiber la production de l'anion superoxyde par les neutrophiles en inhibant le NADPH Oxydase. [147] De plus, le NO diminue le recrutement des neutrophiles en diminuant leur capacité à se déformer et donc à se déplacer, en diminuant la production de facteurs d'adhésions à l'endothélium et en diminuant la production d'interleukine 8 par les cellules épithéliales.

Cependant, le NO possède malgré tout une faible réactivité et peut se combiner avec le superoxyde pour former un métabolite, le peroxynitrite °ONOO.[144] Cette réaction du NO avec le superoxyde est irréversible. Le peroxynitrite est potentiellement oxydant et ses cibles sont nombreuses.[141] Il initie les réactions de peroxydation des lipides, oxyde les fonctions thiols plus facilement que H₂O₂, il réagit avec les résidus OH des tyrosines pour former des nitrotyrosines. Ces lésions oxydantes résultant du peroxynitrite ont été relié à une augmentation des réaction de lipoperoxydation, mais aussi de lésion à l'ADN, à l'inactivation de protéines et d'enzymes et à une prolifération accrue (et donc une promotion des tumeurs) [146,148,149] De plus le NO semble avoir une action pro-inflammatoire en renforçant l'activation du NF-κB, facteur de transcription de nombreuses cytokines et chemokines inflammatoires et facteurs de croissance. [150,151] Enfin, les NOS sembleraient stimuler la production de prostaglandine E₂ PGE₂, par les macrophages alvéolaires et les fibroblastes *in vitro*. [152]

De ce paragraphe, il semble clair que le NO et les RNS ont été à la fois montrés comme ayant des actions oxydante/ inflammatoire/ dommageable et anti-oxydante/anti-inflammatoire/ protectrice. Il est donc important d'apporter des réponses à ce débat.

☉ Exposition à l'amiante et production de RNS

❶ Données expérimentales *in vitro*

In vitro, Thomas et ses coll. rapportent que l'exposition de macrophages alvéolaires de rats à des fibres d'amiantes (10µg/ml) conduit à une élévation significative de la libération de NO mesurée 48h après l'exposition. [153] Dans cette étude, les fibres de chrysotile avaient un pouvoir de stimulation supérieur aux crocidolites. La production de NO° induite par exposition *in vitro* au chrysotile est aussi rapportée par Iguchi, qui montre que les amphiboles testées (crocidolite et amosite) sont inactives à la dose de 150µg/ml. [154] Toujours *in vitro*, l'exposition pendant 24h de macrophages alvéolaires de rats ou de macrophages péritonéaux de souris à la dose de 10µg/ml conduit à l'induction de l'isoforme inductible des NOS, manifestée par une activation du promoteur du gène codant pour iNOS et une augmentation de son ARNm [155] Le traitement d'une lignée de macrophages alvéolaires de souris avec 25µg/cm² de crocidolite accroît l'activité NOS et la production de NO à la 24^{ième} heure d'exposition. [156] Les fibres de crocidolite (6mg/cm² pendant 24h) augmentent aussi les taux d'ARN messagers (ARNm) des iNOS et donc la production de NO° par les pneumocytes de type II (A549) [157] Le traitement de ces cellules par un inhibiteur des iNOS, l'aminoguanidine, non seulement décroît la production de NO, mais aussi la formation de 8-hydroxydéoxyguanine 8OHdG, suggérant un lien entre libération de NO et dommages à l'ADN dans les cellules exposées à l'amiante. A l'inverse, l'exposition de cellules mésothéliales de la plèvre pariétale de rat à l'amiante (crocidolite et chrysotile), n'a pas permis de mettre en évidence une induction de la libération de NO, mais, lorsque le milieu de culture était enrichi en interleukine 1, (IL-1^β), cette induction était observée, conduisant à une augmentation des taux d'ARNm codant pour iNOS d'une part et de la production de NO° d'autre part. [158]

② Données expérimentales *in vivo*

Des instillation intra-trachéales d'amiante chez le rats ont montré un accroissement de l'activité des NOS du tissu pulmonaire dans les 48 heures suivant l'exposition. [154] Pour des quantités identiques, le chrysotile montrait une activité inductrice supérieure à l'amosite. Dorger rapporte, 24h après l'instillation intra-trachéale de crocidolite (2mg/kg) chez des souris, l'induction des ARNm codant pour les iNOS dans le tissu pulmonaire associée à une augmentation de l'activité iNOS (technique immunohistochimique) et des résidus nitro-tyrosines dans les cellules épithéliales broncho-alvéolaires.[160] Des résultats similaires ont été rapportés 24 heures après l'instillation intra-trachéale de crocidolite (5mg/kg) chez le rat, avec d'une part une augmentation de la teneur en protéines enzymatiques iNOS et de leur ARNm dans le tissu pulmonaire, et d'autre part une relation entre l'induction des iNOS et les résidus nitro-tyrosines dans les macrophages alvéolaire, les cellules épithéliales alvéolaires et dans l'endothélium vasculaire. [161] L'induction de la libération de NO° est aussi observée après exposition de rats par inhalation. Une exposition pendant 3 jours à raison de 6h/j à une atmosphère contenant de l'amiante (7-10mg/m³) conduit une libération plus que doublée de NO° par les macrophages alvéolaires. [155] Cette production de NO° est corrélée, temporairement, à l'inflammation pulmonaire induite, mesurée par l'infiltration des neutrophiles. Une semaine après l'exposition par inhalation de rats à des fibres de chrysotile ou de crocidolite (7-8mg/m³, 6h/j, 5j), l'expression de la protéine iNOS est augmentée dans les macrophages alvéolaires conduisant à une production de NO° deux à trois fois supérieure au niveau basal. La quantité accrue de nitrotyrosine dans les macrophages alvéolaires, les cellules épithéliales bronchiolaires et des bifurcations alvéolaires montrent que ce renforcement de la production de NO° a pour conséquence une formation intense de peroxynitrite et ainsi la formation de lésions. [162]

③ Influence du NO sur la réponse pulmonaire à l'amiante.

Ces études apportent la preuve que l'exposition aux fibres d'amiante conduit, à la fois *in vitro* et *in vivo*, à une induction de la production de NO par les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales alvéolaires. Dans certains cas une relation a pu être établie entre le potentiel inducteur des différentes formes d'amiante vis-à-vis de la libération de NO et leur potentiel à provoquer des lésions pulmonaires. [154] Dans d'autres cas, une relation entre la production de NO et inflammation pulmonaire a pu être notée. De plus, la présence de résidus nitro-tyrosine induits par l'amiante semble être un indicateur du rôle du NO et des RNS dans le développement des lésions pulmonaires. [160-162] Plus récemment, Dorger a établi une corrélation plus étroite entre d'une part la production de NO et d'autre part l'inflammation et les lésions induites par l'amiante. [161] Cette étude comparait la réaction pulmonaire aiguë de rats et d'hamsters à l'instillation intra-trachéale de crocidolite (5mg/kg). Cette comparaison rat/hamster s'explique par le fait que les macrophages alvéolaires de rats expriment des formes induites iNOS en réponse à divers stimuli (LPS, interféron γ , TNF α), alors que les macrophages alvéolaires de hamster ne l'expriment pas. [163-165] Vingt quatre heures après l'instillation intra-trachéale de crocidolite, le rat présente les indications suivantes de l'induction de la production de NO :

a- une augmentation de la quantité d'ARNm codant pour iNOS dans le tissu pulmonaire, mesurée par northern blot.

b- une augmentation de la protéine iNOS mesurée par western blot.

c- une accumulation de résidus nitrotyrosines dans des coupes pulmonaires.

A l'inverse, les tissus pulmonaires d'hamsters exposés ne montraient pas ces modifications. Parallèlement, avec cette induction de NO, les poumons de rats montrent des signes

d'infiltration de neutrophiles, d'œdème, de dommages aux parois vasculaires et aériennes, et d'activation des myelopéroxydases MPO dans le tissu pulmonaire, alors que les tissus de hamsters révèlent des signes inflammatoires et de lésions moins prononcés en réponse à l'amiante. Ces indications sont renforcées par des résultats histopathologiques, où l'hémorragie, les cellules inflammatoires alvéolaires et l'épaisseur de la paroi alvéolaire sont modifiés plus dramatiquement dans les poumons de rats que de hamsters.

Espèce	Induction de la iNOS	Réponse pulmonaire
RAT	↑ARNm pour iNOS (tissu pulmonaire)	↓Echanges gazeux - 53%
	↑protéine iNOS	↑Œdème +32%
	↑ résidus de dégradation iNOS	↑Neutrophiles +278%
	↑ résidus nitrotyrosines	↑Protéines et MPO +857%
HAMSTER	Aucune preuve significative de l'induction de iNOS (protéine, messages, produits)	↓Echanges gazeux - 23%
		↑Œdème +1%
		↑Neutrophiles +0 %
		↑Protéines et MPO +50%

Table 15 : Induction de la iNOS dans les poumons chez les rongeurs exposés à l'amiante, et conséquences biologiques [152]

④ Conclusion

Il est aussi récemment admis, par des études *in vitro* et *in vivo*, que l'amiante induit la synthèse de la protéine enzymatique iNOS et la production de NO par les macrophages alvéolaires et les cellules épithéliales. Pourtant, si d'un côté des preuves suggèrent que les RNS jouent un rôle important dans les lésions aiguës induites par l'amiante, probablement par des réactions de nitrosylation cellulaire dépendante du peroxynitrite, d'un autre côté d'autres preuves montrent aussi un rôle protecteur du NO contre l'inflammation aiguë en réponse à l'amiante. Ceci évoque une notion complexe d'équilibre qui nécessite de plus amples

recherches. Selon Castranova, c'est le rapport entre NO et peroxyntrite qui importerait, c'est-à-dire que NO exprimerait des effets protecteurs dans des conditions où la teneur en superoxyde $O_2^{\cdot-}$ est faible alors qu'il serait source de dommage en présence de quantités importantes de $O_2^{\cdot-}$. [168]

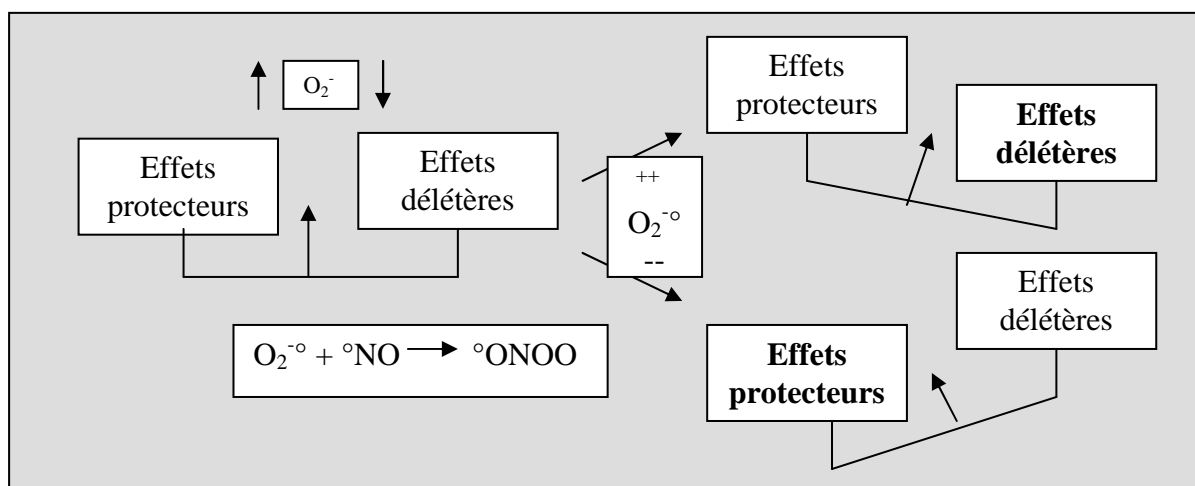


Fig. 40 : Rôle du Monoxyde d'azote et des RNS (synthèse)

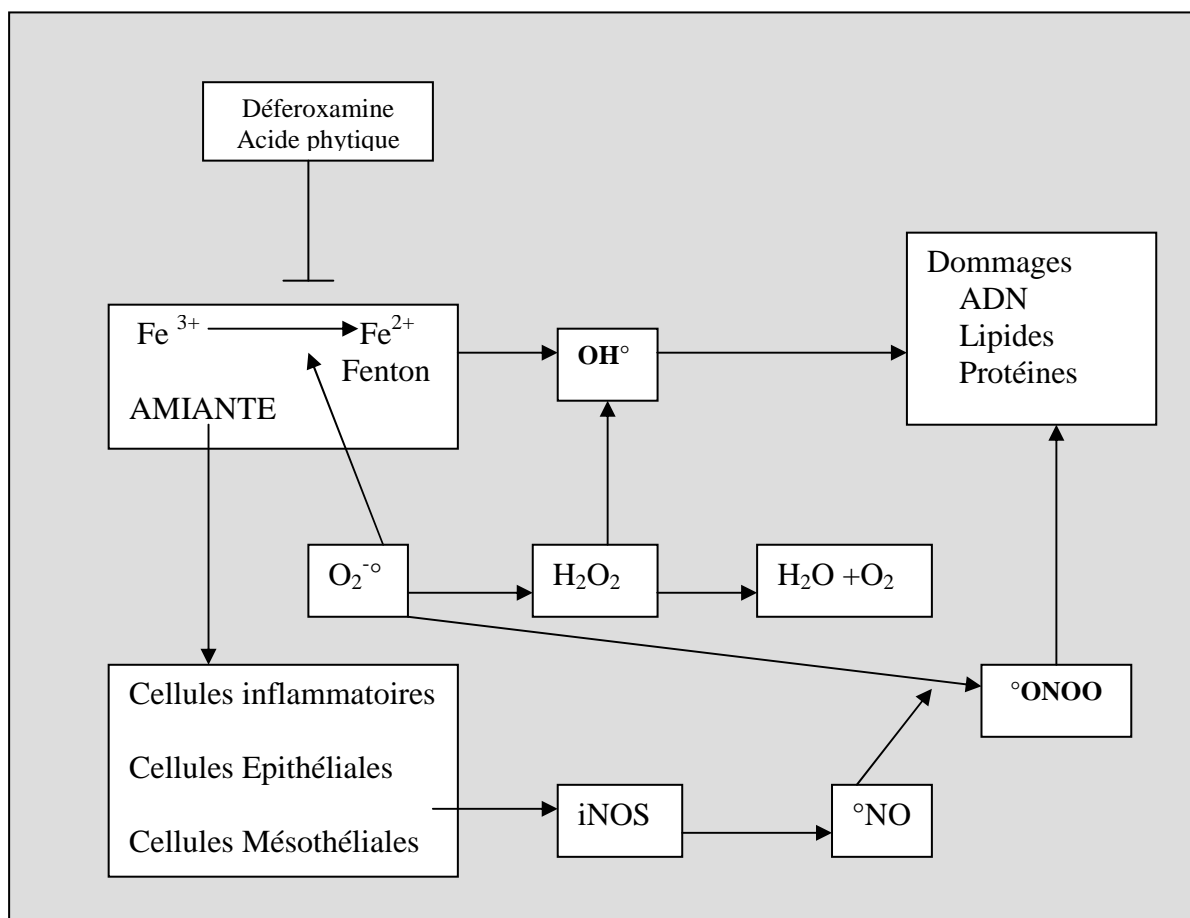


Fig.41 : Voies de libération des radicaux libres (synthèse)

2.3.1.3. Lésions cellulaires et moléculaires

Les tumeurs peuvent se développer à partir de cellules porteuses de mutations ou modifications permanentes du génome mettant typiquement en jeu des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs qui régulent le cycle cellulaire. La génotoxicité est ainsi un événement clef de la transformation néoplasique. Cette génotoxicité est le fruit de l'action d'agents toxiques sur l'ADN, soit directement soit par l'intermédiaire de produits métaboliques.

Les espèces radicalaires dérivées de l'oxygène (et notamment HO°), et de l'azote (particulièrement $^\circ\text{ONOO}$), peuvent altérer les sites nucléophiles des macromolécules biologiques, induisant ainsi des dysfonctionnements cellulaires, des phénomènes de cytotoxicité et de possibles transformations malignes. [107,112,115]

➤ Les espèces radicalaires et leurs cibles cellulaires.

Toutes les cellules du parenchyme pulmonaire (macrophages alvéolaires, cellules épithéliales, cellules mésothéliales, cellules endothéliales, fibroblastes) sont sensibles aux effets toxiques de l'amiante. [107,112, 114, 169]

Il est important de reconnaître que la destruction tissulaire induite par l'amiante (cytotoxicité) peut aussi être causée par des mécanismes indépendants des ROS, tels que les protéases issues des cellules inflammatoires, la fumée de cigarette, et les RNS. Dans ce cas, l'amiante accroît la perméabilité des cellules épithéliales pulmonaires par des mécanismes indépendants des ROS mais, semble-t-il, sous la dépendance d'une voie de signalisation activée par une tyrosine kinase. [170]

☛ ROS, RNS et ADN: génotoxicité

❶ Historique

Longtemps, les fibres d'amiante ont été considérées comme des agents non mutagènes en raison de l'absence de mutation dans les tests d'Ames sur des bactéries, ainsi que dans des essais de mutagenèse sur des cellules eucaryotes détectant des mutations ponctuelles sur plusieurs gènes (Na⁺/K⁺ ATPase notamment) [171-173]

Plus récemment, l'utilisation de nouvelles souches de bactéries plus sensibles aux espèces radicalaires a permis de mettre en évidence des mutations et l'hydroxylation de bases de l'ADN a été observée aussi bien sur des bactéries que sur des cellules eucaryotes. [174] La mesure directe des cassures de l'ADN n'avait, le plus souvent, pas révélé de dommages (pour revue voir [174]), cependant, cela pourrait être dû à la limitation des méthodes d'analyses. Récemment, l'existence de cassures doubles brins a pu être mise en évidence grâce à l'utilisation de mutants déficients en systèmes de réparations pour ce type de lésion. [175]

Ainsi, l'amiante peut notamment manifester sa toxicité cellulaire en endommageant l'ADN, et cette génotoxicité est une étape importante de la transformation néoplasique. Jaurand [174] a récemment publié une revue des différentes techniques utilisées pour tester la génotoxicité de l'amiante.

❷ Une relation désormais établie

L'amiante induit des altérations structurales de la double hélice d'Acide désoxyribonucléique (ADN), probablement par l'intermédiaire des radicaux libres HO[°] et [°]ONOO puisque ces oxydants réagissent classiquement avec l'ADN pour former des bases hydroxylées [176-178] ou des cassures mono-brins. [179] Comme revue par ailleurs [174], l'amiante favorise la formation de 8 hydroxy-désoxyguanosine 8OHdG dans des systèmes

acellulaires. Des dommages à l'ADN provoqués par les radicaux libres HO° issus de l'action catalytique du fer peuvent aussi être mis en évidence dans des cellules avec par ailleurs une action protectrice de la déféroxamine [180] et de l'acide phytique.[181] A l'inverse, Fung et ses collaborateurs ont récemment montré que les fibres de crocidolite (2,5-10mg/cm²) étaient responsables de la formation de 8OHdG dans l'ADN de cellules mésothéliales (de rats et humaines) et ceci indépendamment de l'action catalytique du fer puisque la déféroxamine n'apportait aucune protection. [182] De même, il n'est pas encore réellement établi si le glutathion réduit GSH exerce une action protectrice contre les lésions de l'ADN induites par l'amiante. La formation de 8OHdG induite par les fibres de crocidolite conduit à une mutagénicité 3 à 4 fois supérieure dans le cadre du test d'Ames sur des souches de *Salmonella typhimurium* et ces effets génotoxiques sont prévenus par GSH.[183] Cependant, il a été d'autre part montré que le glutathion réduit GSH et la N-acetyl-L-cystéine (NAC), un agent réducteur et précurseur du GSH, ne pouvaient prévenir la formation de cassures mono-brins de l'ADN dans des cellules A549.[184] L'explication de la variabilité de ces résultats est actuellement inconnue, mais est probablement liée, d'une part, à la relative mauvaise pénétration des ces agents chélateurs du fer ou réducteurs à l'intérieur des cellules au niveau de sites de formation des radicaux libres , et d'autre part à la variabilité des types cellulaires et des tests de détection utilisés [107,115,174]

③ Quelles lésions à l'ADN?

- Rappels des principales lésions à l'ADN induites par les agents mutagènes

Les agents génotoxiques peuvent produire diverses lésions à l'ADN cellulaire, telles que des cassures (mono ou doubles brins), des ponts inter- ou intra-brins et des liaisons de covalence à des bases, des pertes de bases, des intercalations entre des bases. [174] Les cellules sont en permanence soumises à ces lésions et dans la majorité des cas les systèmes

cellulaires de réparation de l'ADN permettent de restaurer la structure physiologique initiale de l'ADN. Dans certains cas, des réparations dites fautives ou insuffisantes conduisent à la fixation de ces lésions dans la structure du génome. Elles sont transmises aux cellules filles au cours des cycles de divisions cellulaires et constituent ainsi des mutations de l'ADN, étape préalable à la transformation des cellules. Des anomalies chromosomiques telles que des délétions ou des réarrangement (translocation, insertions, amplifications) peuvent aussi provoquer des modifications permanentes du génome cellulaire [174].

Le risque génotoxique spécifique aux agents de l'environnement dépend donc d'une part de la nature de l'agent responsable des dommages à l'ADN et d'autre part du mécanisme cellulaire de réparation des lésions induites à l'ADN mis en jeu. (*cf. paragraphe 2.3.3.1.*)

- Le cas de l'amiante : radicaux libres et effets sur l'ADN

L'utilisation de nouvelles souches de bactéries plus sensibles aux espèces radicalaires a permis de mettre en évidence des mutations et **l'hydroxylation de bases** de l'ADN a été observée aussi bien sur des bactéries que sur des cellules eucaryotes (pour revue voir [174])

McBride, à l'aide d'un test de mutation utilisant le phage M13mp2 ainsi pu montré que (i) l'ADN traité par Fe^{2+} contenait 20-80 fois plus de mutation que l'ADN non traité, (ii) que ces effets étaient améliorés par des enzymes anti-oxydantes, catalase et la Superoxyde dismutase SOD, et enfin (iii) que cette mutagenèse est principalement liée à un accroissement de la **substitution des bases** de l'ADN [185]

Ils postulent que les dommages à l'ADN observés ne sont pas liés au hasard mais bien à la présence des radicaux libres d'une part du fait de la fréquence des mutations observées mais d'autre part du fait de la spécificité des dommages observées et des locus atteints (les mutations semblent affecter spécifiquement certaines positions sur les gènes) [185]

Carmichael [186], utilisant une technique de détection des dommages à l'ADN hautement sensible à l'aide du ^{32}P , a pu démontrer qu'un modèle de la réaction de Fenton (avec du cuivre ou du fer) et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 pouvaient causer 10 lésions spécifiques. Ces données suggèreraient que ces lésions résultent **d'un pontage intra-brin** de paires de bases adjacentes et non de la substitution de bases ou la formation d'adduits tels que la 8-OHdG.

Dans un autre système utilisant des cellules A_L (hybrides provenant de la fusion de cellules humaines et de hamster), Hei et ses collaborateurs ont montré que les fibres d'amiante produisaient des mutations à type de **délétions** à de multiples locus.[187] L'intérêt de cette étude est de permettre la détection de ce type de mutation car les autres systèmes dits classiques, basés sur la détection de mutations rendant autonomes ces cellules et donc la sélection de mutants viables, sont inefficaces pour détecter de larges mutations qui peuvent être létales.

Dans ce système, les cellules A_L sont des hybrides homme x hamster qui retiennent le chromosome 11 sur lequel est localisé le gène M1C1 (aussi appelé CD59), codant pour la protéine S1. Cette protéine est un antigène de surface qui, en présence de protéine du complément et d'anticorps spécifiques, permet une lyse cellulaire. Dans l'étude de Hei, c'est l'expression ou non de la protéine S1 qui caractérise la mutagenèse et non la viabilité des cellules.

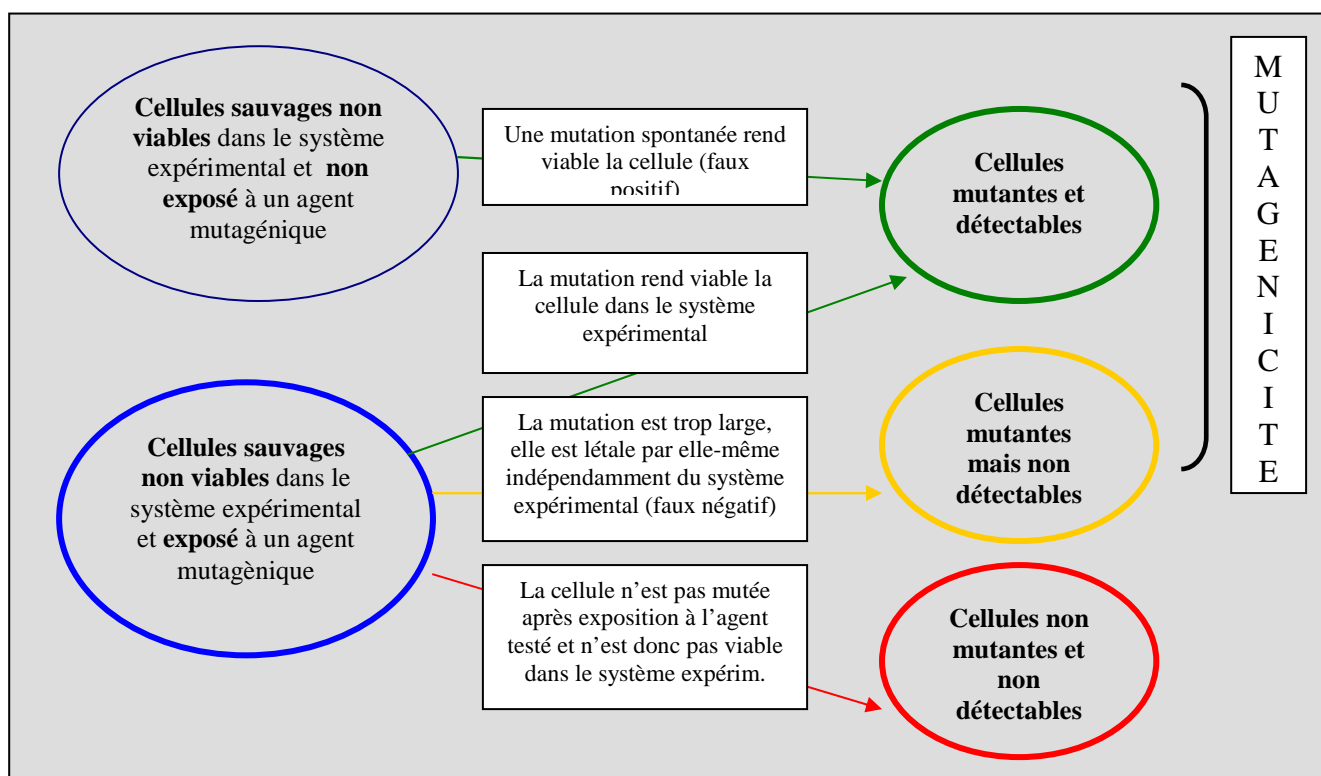


Fig.42 : Inconvénients des systèmes classiques de détections des mutations basés sur la sélection des clones viables (capacité acquise de multiplication) : la corrélation entre exposition, mutagénicité et viabilité n'est pas parfaite.

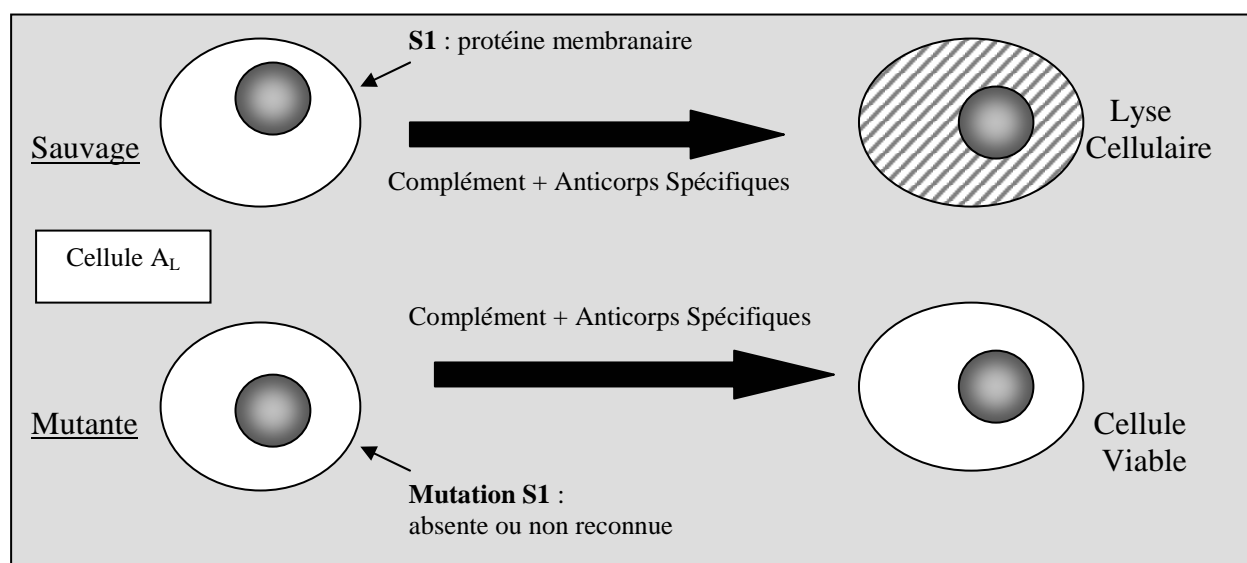


Fig 42bis :Sélection des mutant viable avec détection des mutations ponctuelles sans prolifération .[187]

L'étendue des mutations est, dans cette étude, évaluée par la technique Southern blot. Les mutants spontanés (mutations ponctuelles du gène M1C1) présentaient des bandes attendues après hybridation avec des sondes spécifiques reconnaissant des régions distantes de ce gènes sur le chromosome 11 (APO, D16, FTH), alors que les mutants résultants de l'exposition à l'amiante montraient des délétions pour ces gènes (la fréquence de délétion des 3 locus atteignait 58% chez les mutants exposés aux fibres de chrysotile, alors qu'elle était de 26% chez les mutants spontanés (non exposés) –différence statistiquement significative. Les fibres d'amiante produisent des mutations provoquant des délétions à de multiples locus et les enzymes anti-oxydantes SOD et catalase réduisent ce potentiel mutagène, ce qui suggèrerait le rôle des radicaux libres [187]

L'endommagement de l'ADN a été suggéré de manière indirecte par la mise en évidence de l'activation de systèmes de réparation de l'ADN et de la poly(ADP)ribose polymérase, après traitement *in vitro* de cellules mésothéliales de rat par des fibres [188,189] Une confirmation a été apportée par l' induction de l'AP-endonucléase, une enzyme cellulaire qui coupe l'ADN au niveau de sites apuriniques ou apyrimidiques pouvant résulter de l'hydroxylation de bases [190]

Park et Aust ont utilisé des cellules de hamster n'exprimant pas l'Hypoxanthine-Guanine PhosphoRibosylTransférase (HGPRTase), une enzyme de récupération des bases puriques sous formes de nucléosides, mais exprimant une enzyme, la Guanosine PhosphoTransferase (GPTase). Ainsi dans ces cellules, la seule voie possible de synthèse du GTP est celle utilisant la GPTase. [191]

Dans le modèle de Park et Aust, seule la voie utilisant la GPTase est fonctionnelle et ainsi toute mutation du gène pour cette enzyme conduit à l'absence de GTP dans la cellule. Il ont ainsi montré que les fibres de crocidolite ($6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) entraîne un doublement de la

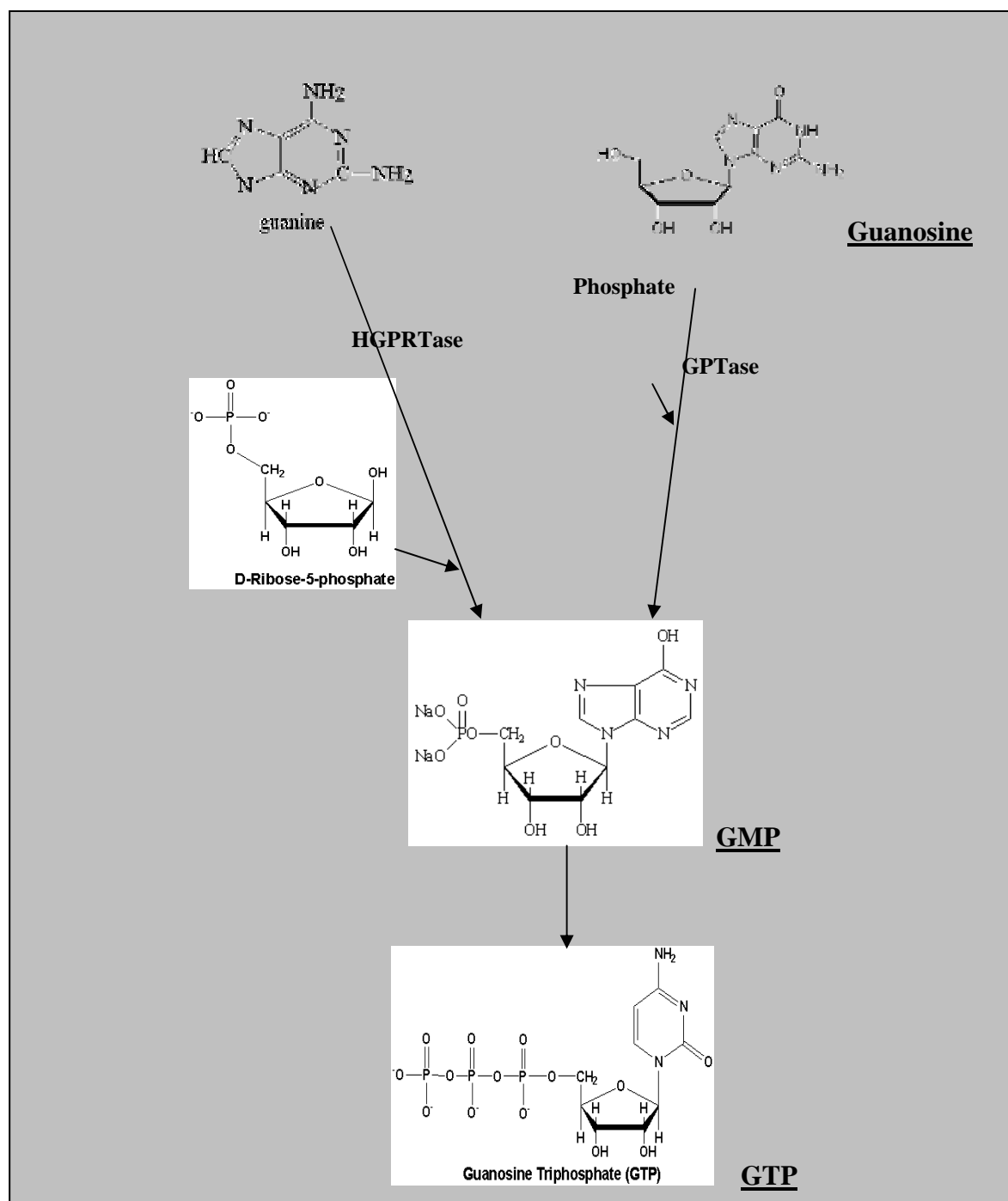


Fig.43 : Les voies de synthèse par récupération du GMP et du GTP dans la cellule.

fréquence des mutation sur le locus du gène codant pour la GPTase, ce qui suggère comme d'autres études auparavant [174] que l'amiante induit des délétions sur de **multiples** locus .

Ces auteurs soulignent le rôle des ROS et du °NO puisque les fibres traitées par la déferoxamine (qui chélate le fer et rend donc impossible la réaction catalytique de Fenton) n'induisent pas de mutation du locus du gène GPT alors que les fibres ajoutées de systèmes générateurs de °NO induisent plus de mutations que les fibres ou les systèmes générateurs de NO seuls. Ceci montre une action synergique des radicaux libres issus du fer de l'amiante et du NO dans la production d'espèces mutagènes. [191]

D'autres études utilisant des cellules épithéliales de poumons A549 ont montré que des fibres de crocidolite induisent la formation de 8OHdG et que l'aminoguanidine, un inhibiteur des NOS, réduit la formation de dérivés azotés par la cellule et protège les cellules de l'hydroxylation des bases de l'ADN. [178]

En conséquence, même si les effets observés *in vitro* ne peuvent être directement retenus comme tels *in vivo* (où les concentrations des fibres sont souvent plus faibles mais leur persistance plus longue), les résultats des expositions aux agents oxydants permettent d'émettre l'hypothèse que le potentiel mutagène de l'amiante est probablement en partie dû aux radicaux libres oxygénés ROS et azotés RNS. D'autres mécanismes semblent aussi responsables de la formation de ces modifications de la structure de l'ADN. Les effets génotoxiques sont multiples et incluent des substitutions de bases, des pontages intra-brins et des cassures mono-brins ; des mutations ponctuelles et de larges délétions chromosomiques.[193-199]

- Une autre cible cellulaire : les lipides

. Les ROS issus de l'action catalytique du fer sont impliqués dans les réactions de peroxydation des lipides induite par une exposition des cellules à l'amiante. Ceci est suggéré

par le fait que le fer, en tant que constituant de l'amiante catalyse la formation de ces produits, et par l'observation de la réduction de cette lipoperoxydation en présence d'antioxydants et de chélateurs de fer. [107,115] De plus des produits de peroxydation lipidique ont été retrouvés dans le plasma de travailleurs exposés à l'amiante (test TBARS) [192] Cependant, le niveau de Substances Réagissant avec l'Acide ThioBarbiturique n'est pas corrélé aux anomalies radiographiques.

Par conséquent, les fibres d'amiante catalysent la formation de produits de peroxydation des lipides, espèces radicalaires à longue vie cellulaire. C'est un des mécanismes possibles de modification structurelle et fonctionnelle des membranes cellulaires exposées aux fibres d'amiante, mais aussi de dommages à l'ADN [192]

2.3.2. Altération de la ploïdie des cellules : Effets sur la mitose

L'amiante manifeste sa toxicité par une multiplicité de mécanismes, et notamment des mutations de bases, des cassures de l'hélice d'ADN mais aussi des aberrations chromosomiques et des échanges de brins de chromatides, et même l'apoptose, mort cellulaire programmée.

2.3.2.1. Des anomalies observées...

☞ Pourquoi s'intéresser au mésothéliome ?

En raison de la spécificité des fibres d'amiantes comme facteur de risque du mésothéliome, l'étude cytogénétique et moléculaire du mésothéliome est particulièrement

intéressante. De plus, contrairement au cancer broncho-pulmonaire, il n'est pas associé à une consommation de tabac. On peut donc considérer avec une certaine confiance que pour cette tumeur certaines altérations moléculaires résultent de la seule action de l'amiante, sans toutefois pouvoir déterminer si elles sont une cause ou une conséquence de la transformation néoplasique.

➤ Les altération génétiques observées dans le mésothéliome ?

Les études visant à préciser les caractéristiques moléculaires et biologiques du mésothéliomes ont été entreprises à partir de fragment de tumeurs (*in vivo*) et de lignées cellulaires (*in vitro*). Barrett a réalisé une revue de ces altérations caractéristiques. [201] Les mésothéliomes ont un caryotype complexe présentant de nombreuses modifications chromosomiques, numériques et structurales (touchant spécialement les chromosomes 1, 3, 5 et 9 chez l'Homme). En revanche, peu de mutations ponctuelles ont été mises en évidence dans des gènes critiques, à la différence de ce qui est retrouvé dans d'autres cancers (liés à des agents chimiques génotoxiques). [202] Ceci supporte donc la thèse d'une action physique et non chimique (qui serait plus ponctuelle) des fibres d'amiante.

Dans un travail rapportant l'étude de la transformation des cellules SHE (Syrian Hamster Embryo) par des fibres de chrysotile, Oshimura a observé que la trisomie du chromosome 11 était une étape de la transformation de ces cellules. [203] Dans les cellules mésothéliales pleurales de rat une trisomie 1 a été détectée. [204] Selon une revue de Jaurand, toutes les cellules ne sont pas transformées par une exposition *in vitro* aux fibres d'amiante, mais celles qui sont transformées montrent une aneuploïdie. [126]

L'existence de micronoyaux détectés par la technique FISH (Hybridation In Situ en Fluorescence) à l'aide d'anticorps anti-kinétochores, a permis de montrer la ségrégation anormale des chromosomes isolés. [205] Les études de différentes phases de la mitose ont

révélé que l'amiante provoquait la formation de chromatine retardée (*lagging chromatin*) et de ponts inter-chromosomiques dans les cellules en anaphase/télophase. Ces anomalies ont été notamment observées dans des cellules mésothéliales humaines et de rats. [Pour revue 174] Ces résultats témoignent d'une ségrégation anormale des chromosomes au cours de la mitose. L'altération de la mitose est confirmée, dans le cas des cellules mésothéliales, par l'étude en cytométrie de flux, du cycle cellulaire. On observe en effet une accumulation de cellules ayant un contenu en ADN correspondant à la phase G2. Ce sont en fait, pour une grande partie, des cellules binucléées. Pour de nombreux types cellulaires, la mitose ne peut s'achever par une cytokynèse. [206]

2.3.2.2. ...aux mécanismes d'interférence avec la mitose

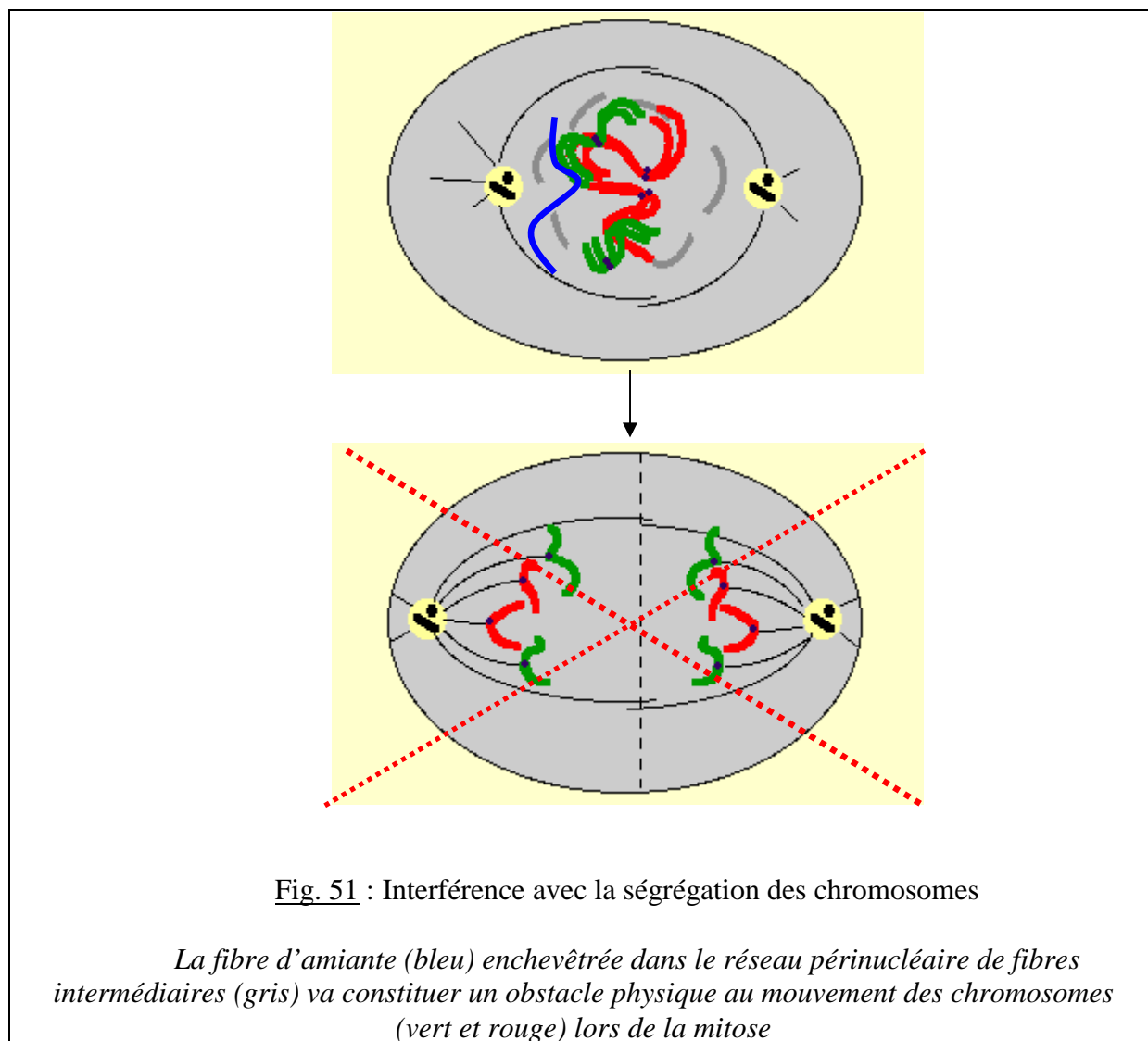
L'exposition des différents types cellulaires conduit *in vitro* à la formation de cellules aneuploïdes, polyploïdes et binucléées.

Il est en effet logique d'attribuer à l'internalisation des fibres par les cellules les anomalies mitotiques observées. Au cours de la mitose, les mouvements d'organites subcellulaires sont plus importants que dans les cellules en interphase ; la présence des fibres d'amiante peut donc entraver le déplacement des organites intracellulaires, et particulièrement des chromosomes, d'autant que les fibres se concentrent dans la zone périnucléaire des cellules interphasiques.

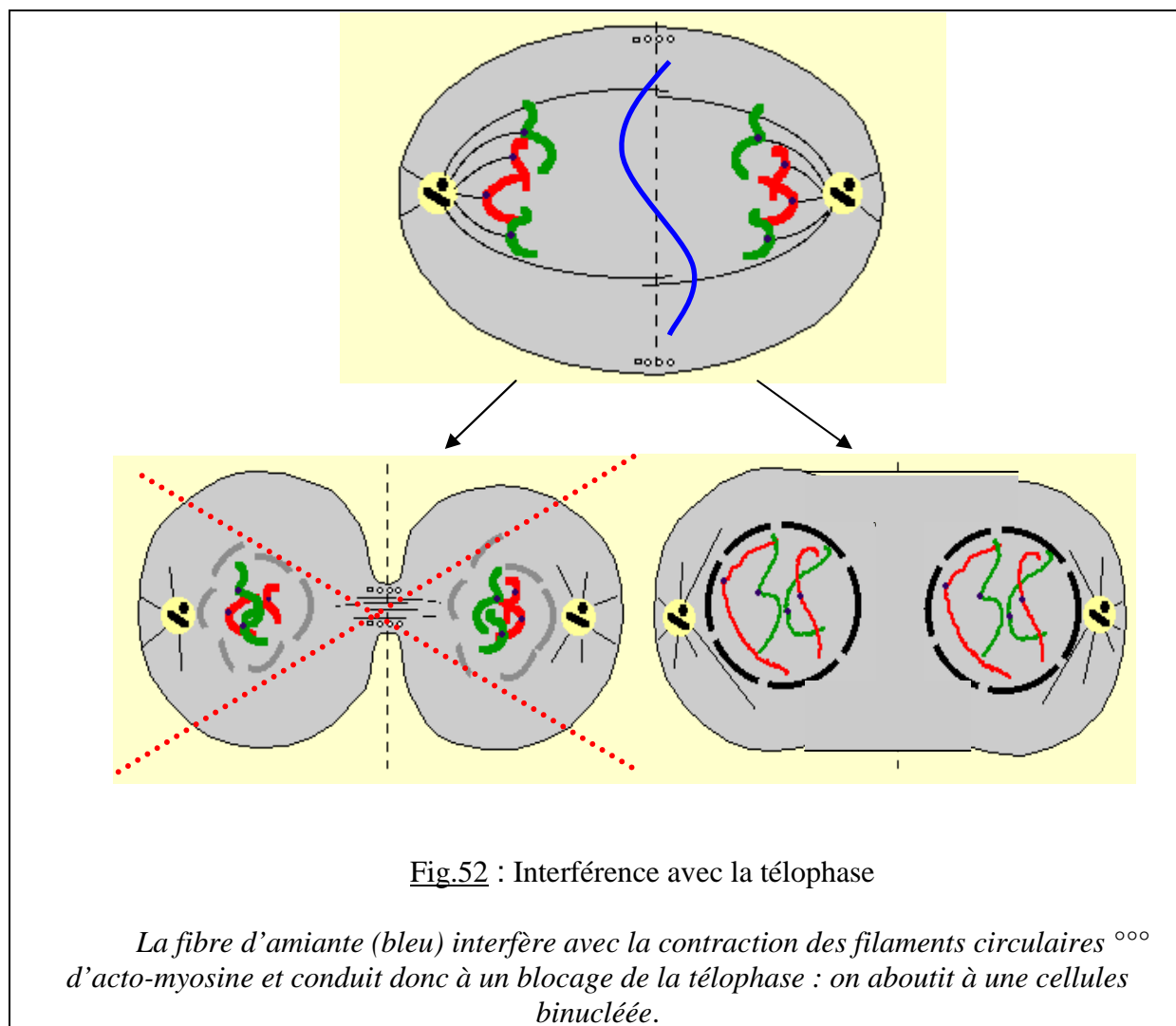
Les premières études réalisées par microscopie optique sur des cellules fixées (et donc à cycle cellulaire bloqué) suggéraient une interférence physique des fibres les plus longues avec le fuseau mitotique et la ségrégation des chromosomes, conduisant, au cours de l'anaphase, à la génération de cellules filles aneuploïdes. [207] Grâce à des observations

ultra-structurales, Wang et ses collaborateurs ont mis en évidence que les fibres longues et fines se trouvent fréquemment au contact des chromosomes dans des cultures de cellules mésothéliales pleurales de rats. [208]

Des études plus récentes, dynamiques, de la mitose de cellules pulmonaires d'amphibiens ont démontré que les fibres longues d'amiante interagissaient avec la cage périnucléaire de filaments intermédiaires (« cage tutoriale ») des cellules épithéliales, empêchant ainsi parfois la migration des chromosomes. [209] Dans la majorité des cas, l'interaction entre ces fibres d'amiantes enchevêtrées et saillantes et les chromosomes n'interférait pas avec la ségrégation normale de ces derniers. Cependant, dans de rares cas, ces fibres constituaient un obstacle à la migration des chromosomes, ou causaient des cassures de ceux-ci. Les auteurs ont émis l'hypothèse que les fibres les plus longues ont une probabilité d'être pris « au piège » de la cage de filaments intermédiaires plus importante que les fibres les plus courtes (ces dernières étant facilement entraînées par les mouvement cellulaire sans provoquer de perturbation notable du déplacement des organites.). D'autre part, les fibres les plus longues sont évidemment les plus à même pour « dépasser » de la surface du réseau de filament et donc pour gêner les mouvement durant la mitose. [209] Enfin, la sensibilité particulièrement importante des cellules mésothéliales à l'interférence physique avec les fibres d'amiante durant la mitose pourrait selon ces auteurs s'expliquer par la structure particulière de la « cage » périnucléaire de filaments intermédiaires.



D'autres mécanismes pourraient être mis en cause dans les anomalies mitotiques observées. L'exposition de cellules mésothéliales humaines à des fibres d'amosite *in vitro* provoquerait, selon Somers, des anomalies dans l'organisation du cytosquelette cellulaire et celles-ci pourraient renforcer la capacité des fibres d'interférer avec le fuseau mitotique. [210] Enfin, les fibres d'amiantes pourraient non seulement engendrer des anomalies quantitatives du caryotype (nombre anormal de chromosomes par atteinte de leur ségrégation mitotique) dites génomiques mais aussi des anomalies qualitatives en divisant le patrimoine génétique des cellules filles en deux (cellules binucléées). Cet effet pourrait être la conséquence d'une interférence physique des fibres avec les filaments acto-myosiques au cours de la télophase. [211]



L'importance de la longueur des fibres a été mise en évidence par l'étude des anomalies anaphasiques dans les cellules mésothéliales pleurales de rat traitées par différents types de fibres. Dans cette étude, des anaphases anormales n'étaient observées que si l'échantillon contenait des fibres longues ($>8\mu\text{m}$) et fines ($<0,25\mu\text{m}$). [212] Il est intéressant de noter que cette étude a permis d'établir une corrélation entre la capacité d'un échantillon de produire une ségrégation anormale des chromosomes *in vitro* et des mésothéliomes expérimentaux chez le rat [212]

2.3.2.3. Préalables à l'interférence sur la ploïdie.

Lorsque les fibres d'amiante se trouvent au contact de cellules, il en résulte donc dans la plupart des cas une phagocytose des fibres et l'une des caractéristiques importantes des fibres d'amiante est leur capacité d'induire des anomalies mitotiques et post-mitotiques. Il y a cependant des conditions importantes que nous évoquerons maintenant.

➤ La phagocytose et cycle cellulaire

Pour interférer physiquement avec l'appareil mitotique, deux conditions doivent être remplies. La première, est le fait que les fibres doivent être internalisées dans les cellules cibles. A l'exception des lymphocytes, la plupart des types cellulaires phagocytent *in vitro* les fibres d'amiante. Cette étape est facilitée par des liaisons spécifiques à des récepteurs membranaires des cellules cibles (cf. p.115, Boylan et al.[120]). La seconde condition réside dans la nécessité que les cellules cibles prolifèrent.

Pourtant, si ces deux conditions sont remplies *in vitro*, il n'a pas encore été établi si les fibres d'amiante étaient susceptibles de remplir ces conditions dans les cellules à l'origine des carcinomes broncho-pulmonaires et des mésothéliomes malin, *in vivo*. Les premières études ont montré que les cellules mésothéliales étaient capables de phagocytose, *in vitro* [213] et *in vivo*. [214] Mais, quelques essais de mesure de la quantité de fibres d'amiante ont été réalisés dans le tissu pleural, et dans deux études, ce sont essentiellement des fibres courtes qui ont été retrouvées, ce qui ne permettait pas d'établir une corrélation avec la charge pulmonaire extracellulaire en fibres.

Des études supplémentaires destinées à préciser la localisation des fibres dans les populations cellulaires cibles (de la plèvre et de l'épithélium broncho-pulmonaire) doivent être effectuées afin de tester cette hypothèse *in vivo*.

En tout cas, *in vitro*, des auteurs [215] ont montré le rôle crucial de l'étape de phagocytose des fibres d'amiante par les cellules mésothéliales pour la manifestation des effets toxiques, parmi lesquels une oxydation intracellulaire (stress oxydant) mais aussi des lésions chromosomiques, un blocage du cycle cellulaire en phase G2/M. En effet, en augmentant cette phagocytose (enveloppe de vitronectine), la toxicité induite par l'amiante augmente ; et inversement en réduisant la phagocytose il a été observé une toxicité moindre. Cette étude est unique par la corrélation qu'elle établit entre un accroissement sélectif de la phagocytose et la variété des manifestations toxiques potentialisées. En effet, dans les études précédentes, il n'était prouvé si la phagocytose des fibres d'amiante, en particulier par des cellules non spécialisées dans ce phénomène (telles que les cellules mésothéliales), était nécessaire à la manifestation des phénomènes toxiques de l'amiante. Cette étude [215] en apporte ainsi la preuve. Ainsi, s'il semble que pour les cellules spécialisées dans la phagocytose les espèces radicalaires aient été identifiées comme agents essentiels, probablement produits par l'inflammation qui accompagne la phagocytose [216,217], pour les cellules non spécialisées pour la phagocytose, l'inflammation aiguë n'est pas une conséquence caractéristique de la phagocytose [217] et l'oxydation intracellulaire est plus difficile à mettre en évidence (plusieurs études n'ont pas réussi à montrer la génération des ROS par les cellules mésothéliales exposées à l'amiante). Enfin, ces mêmes auteurs [215] ont examiné l'altération du cycle cellulaire. Ils ont ainsi pu mettre en évidence un retard au passage G2/M du moins pour les cellules enveloppées de vitronectine. Un tel blocage a été étroitement associé à des lésions cellulaires qui interfèrent le plus souvent avec la mitose (en particulier des cassures doubles brins ou des anomalies de l'appareil mitotique [218] : la phagocytose des fibres d'amiante est une étape indispensable conduisant à l'accumulation de cellules en phase G2/M. La présence des fibres d'amiante, contrairement à d'autres agents génotoxiques tels que l'irradiation, constitue toujours une source de lésion pour les cellules

qui les « ingèrent », et cette phagocytose est nécessaire à la manifestation d'une cytotoxicité induite par l'amiante vis-à-vis des cellules mésothéliales

➡ Devenir des fibres internalisées

Les premières études morphologiques des cellules exposées à l'amiante *in vitro*, utilisant la microscopie optique ou électronique, ont montré une interaction physique directe entre les fibres et le noyau (ou les chromosomes durant la mitose) [208]. Cependant des recherches plus récentes ont montré que les fibres internalisées sont entourées d'une membrane phago-lysosomiale, laquelle devrait donc empêcher toute interaction physique (adsorption notamment) ou chimique directe entre ces fibres phagocytées et les chromosomes. [219]

In vitro, il a été observé l'accumulation de fibres de crocidolite, longues et courtes, dans la région périnucléaire de cellules épithéliales pulmonaires d'amphibiens. Les fibres longues restèrent immobiles, alors que les fibres courtes manifestèrent un mouvement saltatoire le long des microtubules. [220]

Selon Aust, *in vitro*, 10-20 fibres furent internalisées par ces grandes cellules épithéliales sans qu'on ne puisse observer des effets néfastes sur la viabilité et la division de ces cellules. [209]

2.3.3. Lésions de l'ADN et réponses cellulaires:

L'amiante est donc responsable de mutations du génome :

- mutations géniques, affectant la structure intime de l'ADN ;
- mutations chromosomiques affectant « qualitativement » la structure des chromosomes ;
- effets aneugènes affectant « quantitativement » le nombre des chromosomes.

2.3.3.1. Systèmes de réparation et Apoptose

Le fonctionnement cellulaire normal prévoit un ensemble de mécanismes de « sauvegarde » : les dommages à l'ADN doivent être complètement ou du moins suffisamment réparés pour autoriser la cellule au passage en mitose après une « agression » de sa structure génomique ; si ces dommages persistent, la cellule anormale peut alors emprunter une voie apoptotique (« suicide cellulaire ») [221]

❶ Les systèmes de réparation de l'ADN

➡ Rappels : description des systèmes de réparation des lésions de l'ADN

Les mécanismes de réparation de l'ADN ont récemment été passés en revue [222]. Ils sont de trois types :

- la **restauration de la zone endommagée** : c'est le plus simple. Une action enzymatique restaure la structure sans casser le squelette (photoréactivation chez les procaryotes, déméthylation)

- la **réparation de la zone endommagée** : les bases ou le groupe de nucléotides incorrects sont remplacés. (réparation par excision des bases et nucléotides)
- la **tolérance de la zone endommagée** : ce mécanisme fait appel à des polymérases translésionnelles spécifiques récemment décrites

➔ Exposition aux fibres d'amiante et systèmes de réparation de l'ADN [223].

Le mécanisme précis par lequel l'amiante active les voies de réparation de l'ADN dans les cellules eucaryotes est complexe et encore relativement mal connu. La réparation des lésions de l'ADN induites par les agents oxydants met en jeu les voies d'excision de base, de reconstitution directe par apport d'un hydrogène à partir de groupement sulhydrique (réduction des produits d'oxydation), d'excision de nucléotide ou de recombinaison. L'un des principaux produits de dommages à l'ADN induits par les ROS est la formation de sites apurinique/apyrimidinique (AP)

Les sites AP peuvent conduire à une interruption prématurée de la synthèse d'ARNm et d'ADN ou peuvent se comporter comme les lésions non codantes. Les sites AP sont en partie réparés par une AP-endonuclease (APE) qui contient un site sensible à l'état de l'équilibre redox (redox factor 1 [Ref-1]) localisé dans sa partie N-terminale. Ce complexe APE-1/Ref-1 est la principale enzyme de réparation de l'ADN par excision de base qui intervient d'autre part sur la liaison de facteurs de transcriptions tels que AP-1, NF κ B, Pax-5, Pax-8, et HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) à l'ADN. Ainsi, APE-1/Ref-1 joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité du génome et dans la régulation de l'expression des gènes par l'intermédiaire de l'activation redox des divers facteurs de transcriptions. Fung et ses collaborateurs [224] ont montré que les fibres d'amiante induisent une expression accrue de APE-1/Ref-1 dans le noyau et les mitochondries des cellules mésothéliales. Ces données

suggèrent un possible rôle de APE-1/Ref-1 dans la réparation des dommages à l'ADN induits par l'amiante.

La Poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) est une enzyme nucléaire multifonctionnelle de 116-kDa intervenant dans la réparation des lésions de l'ADN. La PARP est activée par la formation de ruptures dans la chaîne d'ADN et joue un rôle important dans la résolution de ces lésions. Ainsi, l'activation de cette enzyme a bien été établie dans les cellules survivantes après le développement de dommages à l'ADN. L'activation prolongée de la PARP peut d'autre part consumer les niveaux de NAD et d'ATP et par conséquent conduire à une mort cellulaire accrue. Enfin, la PARP fonctionne par ADP-ribosylation de diverses protéines, telles que l'ADN polymérase et la topoisomérase I, et en tant que tel joue un rôle critique dans le système de régulation de la prolifération cellulaire en tant que « capteur moléculaire » des brèches de l'ADN [225–229]. Ollikainen a étudié le rôle de la PARP dans les cellules mésothéliales humaines transformées (MeT-5A) et dans des cellules de cultures A549 exposées à des fibres d'amiante en présence et en absence de 3-aminobenzamide (ABA), un inhibiteur de la PARP. Il a ainsi montré que le maintien d'un pool de nucléotide de haute énergie dans la cellule (et donc la haute viabilité des cellules exposées à l'amiante) pouvait contribuer à la survie et la transformation maligne des cellules pulmonaires. Diverses équipes ont aussi montré que l'activation de la PARP induite par l'exposition à l'amiante dans les cellules épithéliales pulmonaires et mésothéliales pouvaient conduire à l'apoptose. Ces résultats suggèrent l'importance de la PARP dans la réponse des cellules exposées à l'amiante face à des lésions de leur génome.

Pourtant, des souris n'exprimant pas la PARP (PARP knockout) ont un développement normal, suggérant que la PARP joue un rôle important mais non central dans la régulation des réparations de l'ADN [230-231]. D'autres enzymes de réparation de l'ADN

ont indubitablement une grande importance dans la correction des dommages de l'ADN induits par l'amiante, mais d'autres études sont nécessaires pour le confirmer et préciser leurs fonctions respectives.

② Une autre voie échappatoire : l'apoptose

☞ Rappels : les mécanismes apoptotiques

1) Qu'est ce que l'apoptose ?

Nos cellules et tissus peuvent donc être soumis à une grande variété d'agressions, physiques (traumatismes, irradiations, hyper ou hypothermie), infectieuses, chimiques (acidose), métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). Soumises à une agression quelconque susceptible d'altérer leur intégrité, les cellules répondent en développant des systèmes de défense et lorsque les dégâts constatés sont trop importants ou que le signal de mort est impératif, un processus de suicide cellulaire est enclenché, l'apoptose.

L'apoptose tire son nom de la chute programmée des feuilles. Elle représente une forme de mort cellulaire résultant de l'activation d'une machinerie interne à la cellule. Elle s'oppose à la mort nécrotique qui suppose une destruction d'origine exogène produisant une rupture membranaire et la dispersion du contenu cellulaire dans l'environnement (exemple d'une agression cellulaire par des toxines microbiennes générant des trous dans la membrane). Ce suicide cellulaire est sous tendu par un programme génétique que la cellule utilisera par

défaut à moins de recevoir les signaux appropriés de survie issus de son environnement. On prend conscience depuis ces dix dernières années que l'apoptose est impliquée dans de nombreux processus pathologiques, soit par activation excessive comme dans les maladies neurodégénératives (sclérose latérale amyotrophique, maladie de Huntington, maladie d'Alzheimer), les lésions neurologiques ou cardiaques faisant suite à un accident ischémique, les hépatites virales ou le sida, soit par défaut d'intervention conduisant au développement de tumeurs malignes.

2) Les manifestations du processus apoptotiques et moyens de mise en évidence

La mort apoptotique est constituée d'un ensemble de processus de digestions internes affectant d'abord le cytoplasme puis le noyau. La dégradation du cytosquelette fait perdre à la cellule sa polarité, la détache de ses voisines, l'arrondit et diminue son volume. De nombreuses protubérances apparaissent à sa surface. La polarité phospholipidique de la membrane cellulaire est perdue, avec passage de la phosphatidylsérine du feuillet interne au feuillet externe. A un stade ultérieur, irréversible, le noyau va être également atteint. Il se condense et devient pycnotique en particulier du fait de la dégradation des lamines, protéines de la face interne de la membrane nucléaire. L'ADN est attaqué par diverses endonucléases, générant, selon les cellules, de grands fragments d'ADN ou des multiples des unités nucléosomiques (fragments d'ADN de 200 paires de bases enroulées autour de protéines histones et non histones).

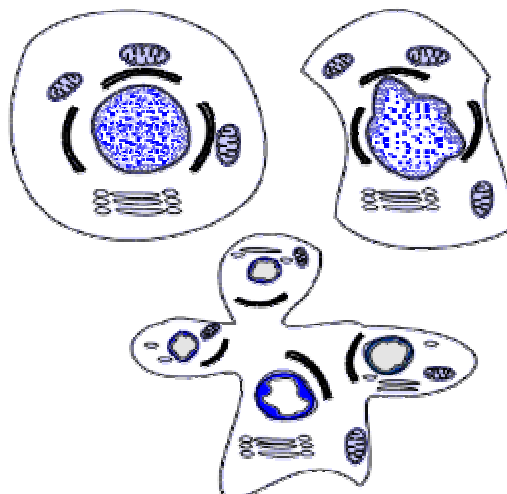


Fig. 57 Aspects morphologiques de l'apoptose

Le point important est que, lors de l'apoptose, la membrane cellulaire reste intacte. Le phénomène se signale, par l'exposition de lipides et de sucres normalement situés à la face interne, à l'attention des phagocytes qui endocytent avec une efficacité remarquable soit la cellule entière soit des fragments de celle-ci mais restant toujours limités par une membrane. L'intégrité membranaire, la rapidité de l'élimination cellulaire font que l'apoptose, même massive, n'induit aucune inflammation contrairement à ce qui peut se produire dans un phénomène nécrotique, où les différents compartiments cellulaires se rompent, déversent leur contenu enzymatique au sein même des tissus. Si la nécrose ressemble à une explosion, l'apoptose s'apparente plutôt à une implosion. A partir de ces données, on présente brièvement les techniques qui permettent d'établir si une cellule est en train de mourir d'apoptose ou de nécrose. Le schéma montre des techniques objectivant les altérations membranaires caractéristiques de la nécrose (libération d'hémoglobine par les globules rouges, d'enzymes par des cellules diverses, de Cr51 , entrée de colorant normalement imperméable aux cellules intactes) ou de l'apoptose (fixation d'annexine V à la phosphatidylsérine). La mise en évidence de l'apoptose utilise également la mesure du contenu en ADN du noyau cellulaire en cytométrie de flux ou la démonstration de ruptures survenues dans la chaîne nucléotidique,

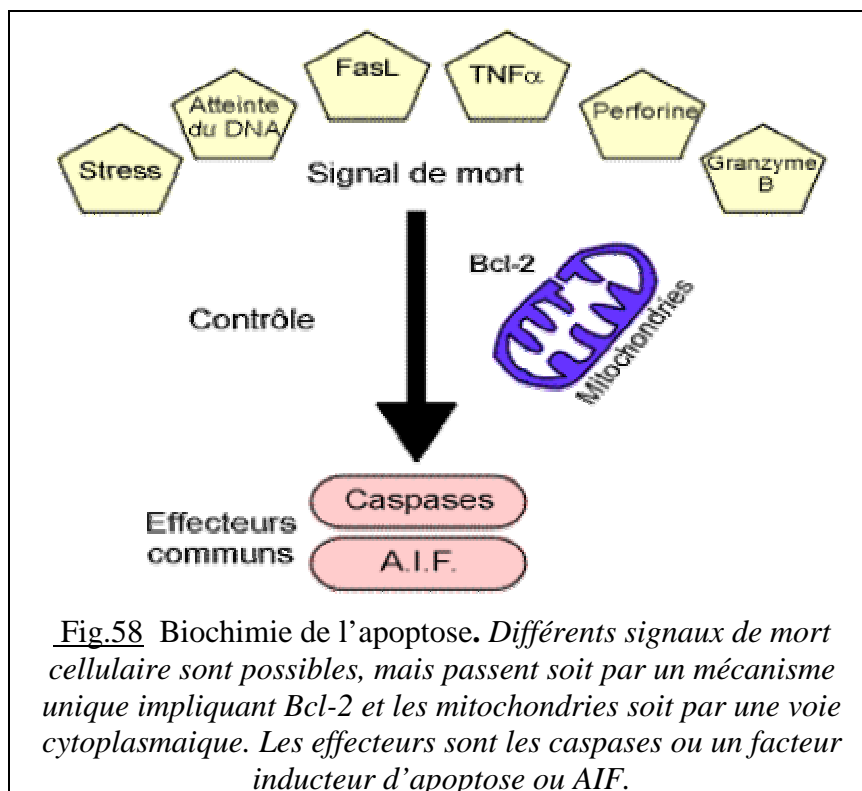
soit par immunomarquage (technique TUNEL, Tdt dependent, dUTP-biotin Nick End Labelling) ou par migration électrophorétique visualisant des fragments d'ADN de tailles variables.

3) La « machinerie » apoptotique

On peut modéliser le processus apoptotique en 3 étapes : la signalisation qui peut se faire par des voies afférentes à la cellule très diverses, la régulation ou phase de décision confrontant des mécanismes pro et anti apoptotiques, enfin, la dégradation ou phase d'exécution commune à toutes les formes d'apoptose.

- La signalisation

Il existe de multiples voies d'initialisation de l'apoptose. Celle-ci peut survenir du fait du retrait d'un signal de survie tel que le tarissement d'une hormone, d'un facteur de croissance ou d'un contact intercellulaire. Ces deux dernières situations seront développées à propos du fonctionnement du système immunitaire. D'autre part, l'apoptose peut être déclenchée par un très grand nombre de stimuli comme la sollicitation de récepteurs membranaires (Fas, TNF-R) ou nucléaires (glucocorticoïdes) ou l'exposition à des stress divers (radiations ionisantes, hypoxie, hyperthermie, xénobiotiques comme les agents anticancéreux).

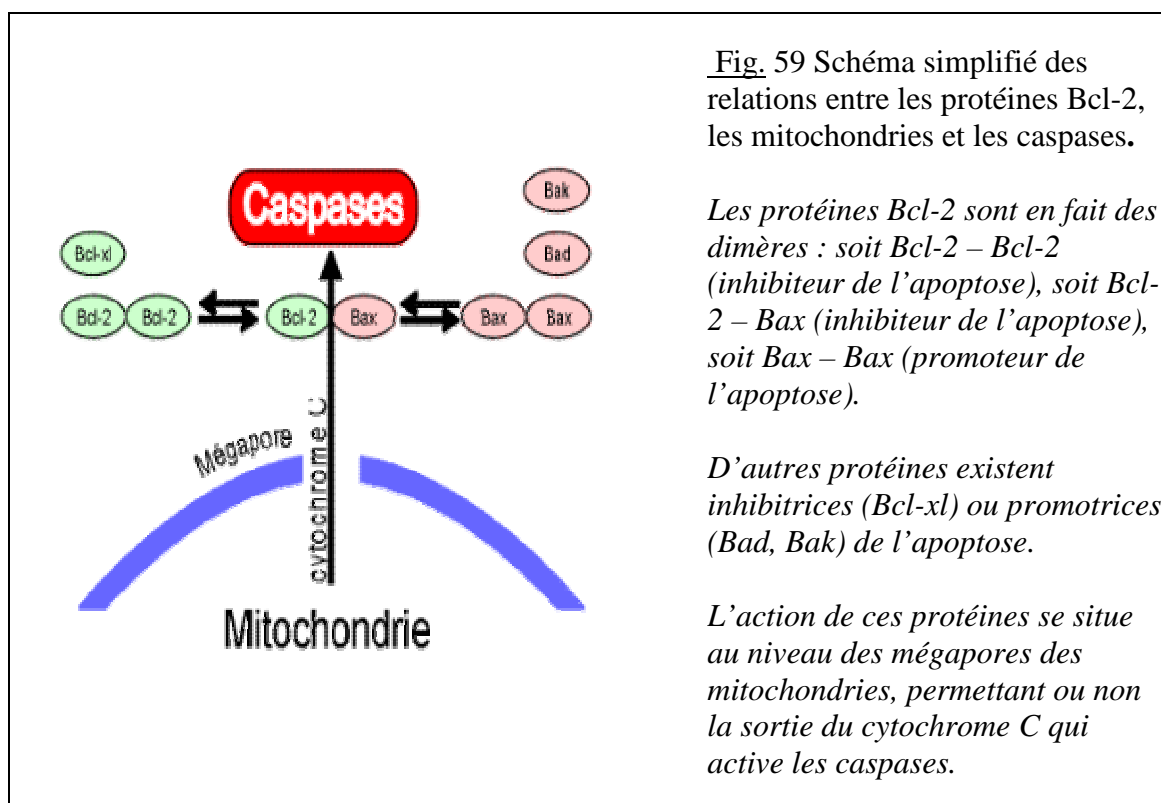


- La régulation

Les cellules d'un tissu ne sont pas également sensibles à un agent apoptogène mais diffèrent selon l'ensemble des signaux issus de leur environnement qu'elles intègrent afin de décider entre les deux options de vie et de mort. Par exemple, les lymphocytes au repos non stimulés par un antigène sont très résistants à l'égard de l'apoptose alors qu'ils y deviennent sensibles après quelques jours d'activation, permettant ainsi la terminaison d'une réponse immune. Les cellules cancéreuses sont d'emblée ou secondairement résistantes à l'effet apoptotique des nombreux médicaments anticancéreux utilisés pour les détruire. Un organe joue un rôle central dans cette régulation, la mitochondrie. On rappelle que celle-ci est un endosymbiote entre les premières cellules eucaryotes apparues sur terre et une bactérie aérobie. Celle-ci lui aurait transmis à la fois l'aptitude de réaliser la phosphorylation oxydative et la possibilité de se suicider en permettant à certains composants de cette bactérie de passer dans le cytoplasme cellulaire. En restant très schématique, la mitochondrie peut

ouvrir dans sa membrane interne des mégacanaux laissant échapper des petites molécules et dissipant le potentiel de membrane que crée l'expulsion permanente de protons hors de la matrice mitochondriale, d'où arrêt de la synthèse d'ATP. De nombreux mécanismes semblent pouvoir provoquer l'ouverture de ces canaux comme l'hypoxie, l'absence d'un facteur de croissance, une attaque de la chaîne respiratoire par des radicaux oxygénés comme NO°. L'accroissement de perméabilité de la membrane interne permet l'entrée d'eau dans le stroma mitochondrial, hyperosmotique, entraînant le gonflement de la mitochondrie et une altération de la membrane externe suffisante pour libérer des produits de l'espace inter-membranaire. Sont libérés ainsi au moins deux produits apoptotiques, le cytochrome c (transporteur d'électron soluble, faisant la navette entre les complexes membranaires CoQ-cytochrome c réductase et cytochrome c oxydase) et l'AIF (Apoptosis Inducing Factor). Si le mode d'action de ce dernier qui agit sur les noyaux n'est pas connu, on connaît par contre celui du cytochrome c. En se liant à une protéine cytoplasmique, APAF-1 (Apoptotic Protease Activating Factor), le complexe peut activer une protéase, la caspase 9 qui active à son tour la caspase 3, l'une des protéases effectrices majeures de l'apoptose. Physiologiquement ces mégacanaux sont étroitement régulés, en particulier par des molécules de la famille Bcl2. Cette grande famille est composée de molécules à effets antiapoptotiques comme Bcl2 et Bcl-xL et proapoptotiques tels que Bax et Bad. Bcl2 et Bcl-xL sont des protéines membranaires du réticulum endoplasmique, du noyau et de la membrane externe mitochondriale. Les autres protéines sont solubles dans le cytoplasme. Ces molécules peuvent se dimériser en homodimères ou hétérodimères, par exemple Bcl2-Bax. Tant que prédominent dans la cellule les homodimères anti apoptotiques ou les hétérodimères contenant un membre antiapoptotique, le résultat net est la résistance à l'apoptose. Au contraire, si les dimères, par exemple Bax-Bax sont prédominants, la voie apoptotique sera ouverte. On pense que les protéines membranaires comme Bcl2 et Bcl-xL inhibent l'apoptose en

contrôlant d'une part l'ouverture des mégacanaux et la fuite des produits tels que le cytochrome c, d'autre part, lorsque celle-ci se produit, en piégeant le complexe APAF-1/Caspase 9 sur la paroi mitochondriale, empêchant l'activation de la protéase.



- La dégradation

La protéolyse des divers substrats cellulaires évoqués plus haut (filaments d'actine du cytosquelette, lamines), de nombreuses enzymes indispensables à l'intégrité cellulaire (par exemple, PARP, poly ADP ribose polymérase), de protéines régulatrices comme Bcl2, ainsi que la protéolyse limitée conduisant à l'activation par exemple d'endonucléases (CAD, caspase activated DNase), paraît être sous le contrôle sinon exclusif du moins prédominant d'une classe particulière de protéases, les caspases. Il s'agit d'enzymes dont le site catalytique contient une séquence conservée avec une cystéine et coupant la chaîne peptidique au niveau

d'un résidu aspartate. Elles existent sous forme de proenzymes et nécessitent une maturation sous forme d'une coupure catalytique libérant 2 sous unités qui s'associent en 1 hétérodimère, l'enzyme active finale étant formé par l'association de 2 dimères. De part leur structure, il existe en fait 2 catégories de caspases :

- * Caspases initiatrices, comme les caspases 2, 8 et 10. Comme on le verra avec le cas de Fas, elles possèdent l'aptitude de se lier à des protéines cytoplasmiques qui se lient elles-mêmes à la queue intracytoplasmique de récepteurs membranaires. Ces protéines qui placent les caspases à proximité l'une de l'autre, facilitent leur dimérisation et donc leur autoactivation.

- * Caspases effectrices, comme la caspase 3. Elles sont directement ou indirectement responsables des lésions cellulaires. Elles sont obligatoirement activées par les précédentes. La cascade d'activation des caspases est inhibée par l'aptitude de certaines d'entre elles à se lier aux protéines Bcl2 ou Bcl-xL.

☛ L'apoptose des cellules exposées à l'amiante : les preuves et les mécanismes

Lorsque la réparation des lésions est déficiente, l'apoptose est le derniers recours permettant de se protéger contre le développement de cellules anormalement transformées. Au cours du processus de cancérisation, il existe probablement des défauts de mise en route de l'apoptose lorsque surviennent des anomalies de l'ADN (qui devraient mettre en route l'apoptose).

Une accumulation de preuves suggère une relation directe entre l'apoptose des cellules de l'épithélium alvéolaire (AEC) et les troubles pulmonaires [234]. Par exemple, la formation de cassures de l'hélice d'ADN et l'apoptose surviennent après l'exposition à des stimuli nocifs tels que les agents oxydants, l'hyperoxie, les radiations [235-237]. De plus, des patients

souffrant de fibrose pulmonaire montrent des signes de formation de ces dommages à l'ADN et d'apoptose [238]. Ces données suggèrent que l'apoptose est un élément de réponse essentiel de l'épithélium pulmonaire dans la physiopathologie de ces diverses agressions.

Dans le paragraphe suivant, nous allons ainsi mettre en avant les différentes preuves accumulées, impliquant divers mécanismes, notamment les radicaux libres dérivés de l'Oxygène ROS, la voie de signalisation intrinsèque mitochondriale et la voie de signalisation extrinsèque par les récepteurs. (TNF α / TNFR et FAS/FASL). Ces mécanismes ne s'excluent pas les uns les autres mais agissent plutôt conjointement.

1) Les ROS

Les mécanismes par lesquels l'amiante induit la libération de ROS ont été développés ci-dessus et plusieurs éléments semblent confirmer le rôle des ROS dans la manifestation des lésions de l'ADN d'une part et dans l'induction de l'apoptose d'autre part pour les cellules épithéliales alvéolaires et mésothéliales exposées à l'amiante.

Premièrement, les chélateurs du fer et les antioxydants réduisent non seulement les dommages à l'ADN induit par l'amiante mais aussi l'apoptose. [181, 223, 239-242] D'autre part, les chélateurs contenant du fer ne sont pas protecteurs, suggérant un rôle plus spécifique du fer [181].

Deuxièmement, il existe une relation directe entre la charge en fer de la surface des fibres et la formation de cassures de la double hélice d'ADN la surface [241-243].

Troisièmement, rappelons que l'amiante induit la formation de lésions oxydatives de l'ADN telles que la 8-hydroxydesoxyguanosine (8-OHdG) [244-245], que Fung et ses collaborateurs [244] ont montré un accroissement dose-dépendant de la formation de 8-OHdG dans les cellules exposées à l'amiante (crocidolite) et que cette formation de 8-OHdG est

notablement réduite en présence d'anti-oxydants, suggérant un rôle important des ROS. Enfin, Unfried [245], en testant la mutagénicité de l'amianté *in vivo* sur des rats, a montré que le type le plus fréquent de mutation des cellules exposées à l'amianté était la transversion G → T (guanine → thymidine) induite par les lésion pré-mutagènes que sont les adduits à l'ADN du type 8-OHdG. Or, les cellules transfectées avec le gène codant pour une enzyme antioxydante (Mn-SOD) sont résistantes à l'apoptose [246].

Globalement, ces données semblent prouver l'implication des ROS et RNS dans l'apparition de lésions à l'ADN en premier lieu mais aussi dans l'induction d'un phénomène apoptotique en second lieu.

2) La voie de signalisation mitochondriale

L'apoptose est régulée par deux voies de signalisation, l'une intrinsèque (mitochondriale) l'autre extrinsèque (impliquant des récepteurs membranaires). La voie de signalisation mitochondriale, qui apparaît comme un régulateur central de l'apoptose, est directement liée à l'existence de dommages à l'ADN [247]. L'ADN mitochondrial joue un rôle critique dans la régulation des signaux de survie, déterminant ainsi si la cellule doit poursuivre son cycle cellulaire ou entrer en apoptose en réponse à un agent oxydant [248]. L'ADN mitochondrial est en effet plus sensible aux dommages oxydatifs que l'ADN nucléaire avec un taux de mutations pouvant être jusqu'à 10 fois plus élevé pour certains gènes [249]

Par des mécanismes qui ne sont pas totalement éclaircis, un stimulus apoptotique induit un changement du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) dont résulte la libération de protéines apoptotiques telles que le cytochrome c, Smac/DIABLO, les pro-caspases 2, 3, et 9 [250, 251]. La libération mitochondriale du Cytochrome C permet le

recrutement des pro-capsases 9 par l'intermédiaire de Apaf-1, renforçant ainsi l'activation protéolytique du phénomène apoptotique [252,253]. La Caspase 9, ainsi libérée, active à son tour en aval les capsases exécutrices telles que les capsases 3 et 7 [253].

Janssen et ses associés [254] ont étudié la régulation de l'expression des gènes mitochondriaux dans les cellules pulmonaires exposées à l'amiante. Ils ont ainsi élaboré une collection d'ARNm pour élucider la nature des gènes qui sont induits ou réprimés après une exposition de cellules pulmonaires de rats à l'amiante. Ils ont pu montrer que l'amiante accroît les niveaux cellulaires d'ARNm codant pour les ARNr 16S dans les cellules épithéliales pulmonaires, suggérant que les altérations de l'expression de ces gènes mitochondriaux pourraient être impliquées dans la régulation intrinsèques de l'apoptose induite par l'amiante. Driscoll [255] rapporte qu'un inhibiteur de la chaîne de respiration mitochondriale, le thenoyltrifluoroacétone, bloque l'activation par la protéine NF- κ B (Nuclear Factor- κ B) de la Protéine Inflammatoire des Macrophage (MIP-2) après exposition à des fibres de crocidolite.

Plus récemment, il a été montré par technique fluorimétrique standard que l'exposition de cellules A549 à de l'amosite, contrairement à des fibres inertes de verre ou de dioxyde de titane, réduisait le $\Delta\psi_m$ [248, 256]. D'autre part, il a été noté que l'amiante déclenchait la libération de cytochrome C mitochondrial dans le cytoplasme, aboutissant en aval à l'activation de la capsase 9. [256] Inversement, une très faible activation de la capsase 8 (marqueur de la voie de signalisation extrinsèque par les récepteurs membranaires) était détectée. La variation du potentiel mitochondrial $\Delta\psi_m$ était, 4 heures après l'exposition, directement proportionnelle au niveau d'apoptose noté 24h après la même exposition, estimé par l'étude de la morphologie nucléaire et de la fragmentation nucléosomiale de l'ADN. Notons que la surexpression de Bcl-x1, protéine anti-apoptotique de localisation

mitochondriale, prévient largement la variation $\Delta\psi_m$ du potentiel mitochondrial et l'apoptose induits par l'amiante. Enfin, le rôle des radicaux libres fut aussi suggéré par le fait que les chélateurs du fer et les agents piégeant les radicaux libres préviennent les uns et les autres aussi bien de la réduction de $\Delta\psi_m$ que l'activation de la capsase 9. [256]

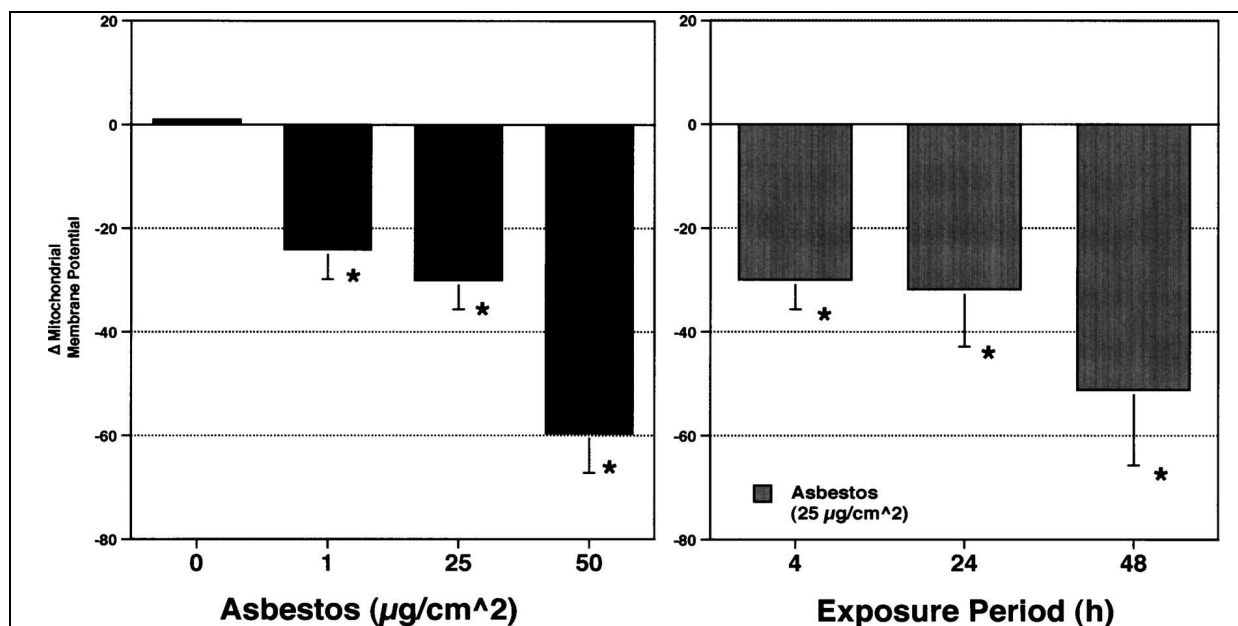


Fig.60 Réduction du potentiel membranaire mitochondrial des cellules A549 par exposition à l'amiante. L'amiante réduit le potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi_m$) de façon dose et temps-dépendante. $n = 6$. * $P < 0.05$ versus témoin contrôle. [256]

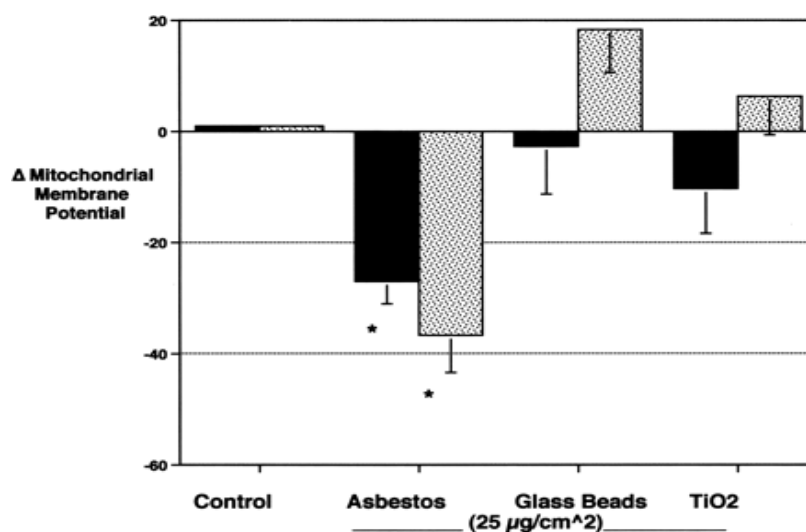


Fig.61 L'amiante, mais pas le verre et TiO_2 , réduit le potentiel des mitochondries $\Delta\psi_m$ des cellules A549 exposées. [256]

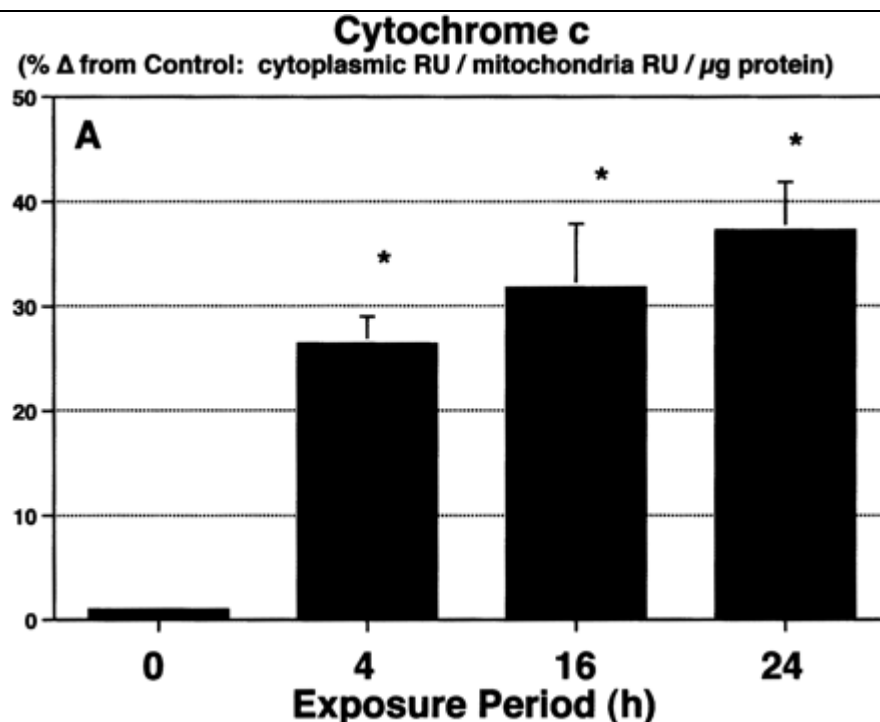


Fig.62 L'amiante (amosite 25 μg/cm²) stimule la libération dans le cytoplasme de cytochrome c à partir des mitochondries dans les cellules A549[256]

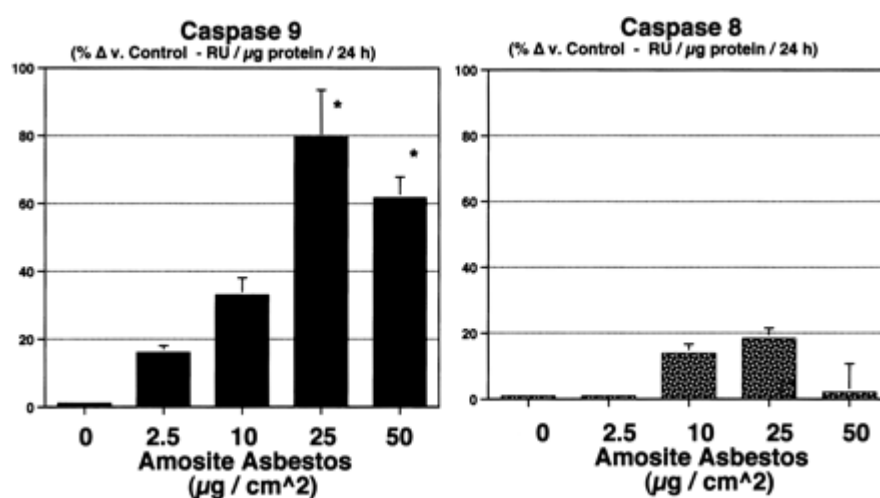


Fig.63 : L'amiante active l'élévation des taux de caspase 9 de façon plus importante que pour la caspase 8 dans les cellules A549 [256]

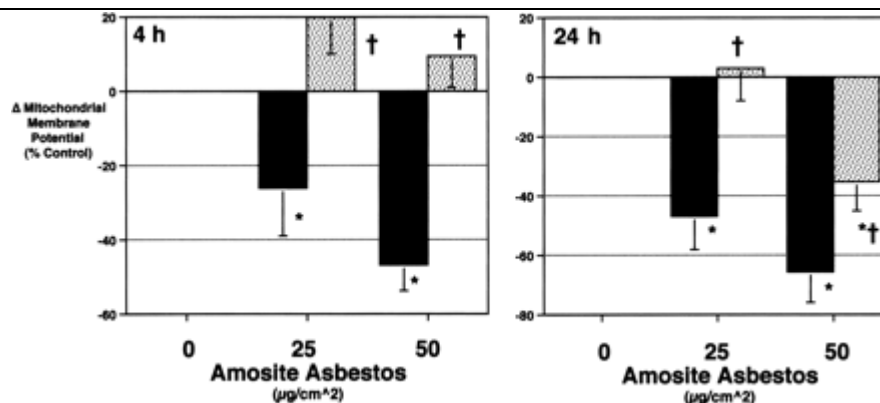


Fig.64 La surexpression de Bcl-X_L réduit la modification du potentiel mitochondrial dans les cellules A549. En noir, le témoin contrôle et en gris les cellules surexprimant Bcl-X_L

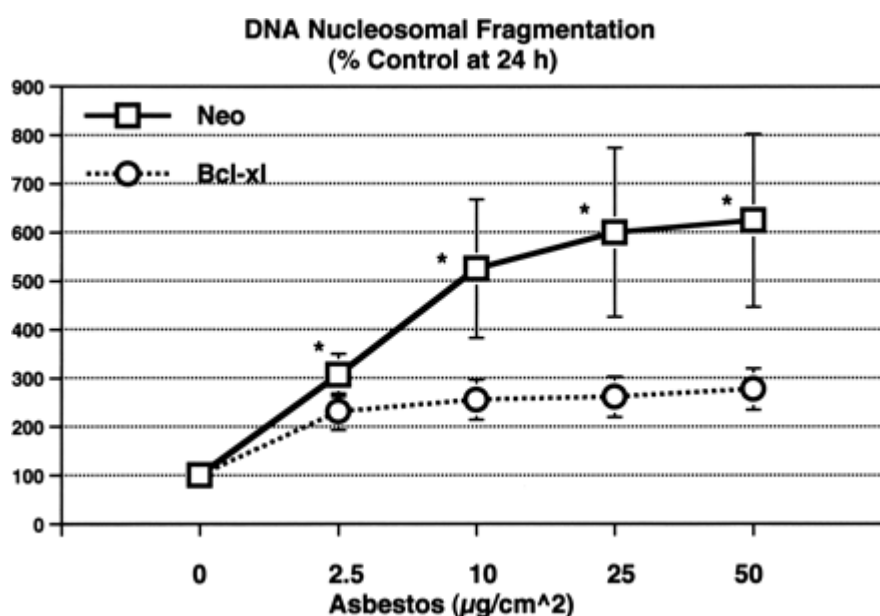


Fig. 65 La surexpression de Bcl-X_L réduit l'apoptose induite par l'exposition des cellules A549 à l'amiante. Bcl-X_L : cellules surexprimant Bcl-X_L ; Neo: témoins contrôles [256]

La pertinence *in vivo* de ces résultats impliquant les ROS et la mitochondrie est appuyée par ces données. Par exemple, l'amiante induit l'apoptose des cellules épithéliales pulmonaires comme le montre le marquage des carrefours broncho-alvéolaires par la technique TUNEL. [240]. L'acide phytique réduit l'inflammation et la fibrose du tissu pulmonaire induits par l'amiante [258]. Alors qu'une exagération de l'apoptose peut promouvoir la fibrose des poumons, une défaillance des mécanismes apoptotique peut à

l'inverse contribuer à la formation de lésion cancéreuses et à la résistance à toute chimiothérapie. Une étude démontre que les mésothéliomes induits par l'amiante sont très résistants aux thérapies en partie à cause de leur résistance à l'apoptose induite par une expression accrue d'une protéine anti-apoptotique, Bcl-2, et l'expression diminuée d'une autre protéine pro-apoptotique, Bax [259]. Globalement, ces données montrent que la voie de signalisation mitochondriale intrinsèque est importante dans la régulation de l'apoptose induite par l'exposition des cellules à l'amiante. A terme, les stratégies visant à réduire les niveaux de ROS induit par le fer et les anomalies mitochondriales dans les cellules pulmonaires pourraient être bénéfiques dans la prévention de la toxicité des fibres d'amiante. D'autre part, de ces mécanismes apoptotiques altérés pourrait émerger une nouvelle stratégie de traitement des mésothéliomes.

3) La voie extrinsèque des récepteurs membranaires

La seconde voie de régulation de l'apoptose inclue la signalisation par les récepteurs, qui sont activés lorsque que FasL (Fas Ligant) ou le TNF- α se fixent à leurs récepteurs respectifs à la surface de la cellule cible. Cette voie de signalisation par les récepteurs déclenche l'activation de la caspase 8, qui a son tour active la caspase effectrice 3 et en aval l'apoptose [260]. La caspase 8 peut aussi utiliser une voie alternative qui met en jeu une amplification mitochondriale, via la protéine Bid, un membre de la famille Bcl-2 [260, 261].

Le rôle de cette voie extrinsèque de régulation de l'apoptose induite par l'amiante est encore peu clair. Certains auteurs montrent que l'expression des deux médiateurs Fas et TNF- α est accrue après exposition à l'amiante [262-264]. Aikoh et coll.[262] ont montré que les fibres de chrysotile activent la voie apoptotique médiée par le récepteur Fas dans les lymphocytes du sang périphérique. Le TNF- α est libéré à partir des macrophages alvéolaires et les cellules inflammatoires après phagocytose des fibres d'amiante. L'instillation intra-

trachéale de fibres de crocidolite chez le rat accroît la production de TNF- α par les leucocytes dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire [263].

Les effets cellulaires du TNF- α sont signalés par deux types de récepteurs (TNFR). Notons que l'amiante n'induit aucune inflammation ni fibrose discernable chez les souris n'exprimant aucun des deux récepteurs TNFR, mais à l'inverse cause une inflammation et une fibrose considérable chez les souris de phénotype sauvage [264]. Les ROS sont cruciaux pour la libération initiale de TNF par les macrophages alvéolaires. Les chélateurs du fer et les agents piégeant les radicaux libres empêchent la libération de TNF, alors que les inhibiteurs de la catalase ou le sulfate de fer (qui favorisent les ROS) promeuvent la libération de TNF- α [265]. D'autre part, deux groupes ont montré que les cellules transfectées avec le gène codant pour la Mn-SOD (une enzyme anti-oxydante) sont résistantes à l'apoptose induite par le TNF- α , H₂O₂, et les irradiations [266, 267]. Ces données montrent que le TNF- α et que les ROS jouent un rôle important dans la manifestation des effets toxiques de l'amiante, en partie en activant la voie de signalisation extrinsèque de l'apoptose. Les moyens de défense contre les agents oxydants dans les mésothéliomes malins pourraient ainsi en partie expliquer la résistance de ces cellules malignes à l'apoptose.

Ces dernières années, nombreuses sont donc les études qui se sont révélées d'un intérêt considérable dans la connaissance des mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'apoptose induite par l'amiante [174, 268, 269]. Plus que Bcl-2, c'est l'analogue Bax qui pourrait être responsable de cette insuffisance de répression des anomalies de l'apoptose. Bax semble être sous la dépendance de la protéine p53, qui entraîne l'apoptose lorsque la réparation de l'ADN n'est pas possible.

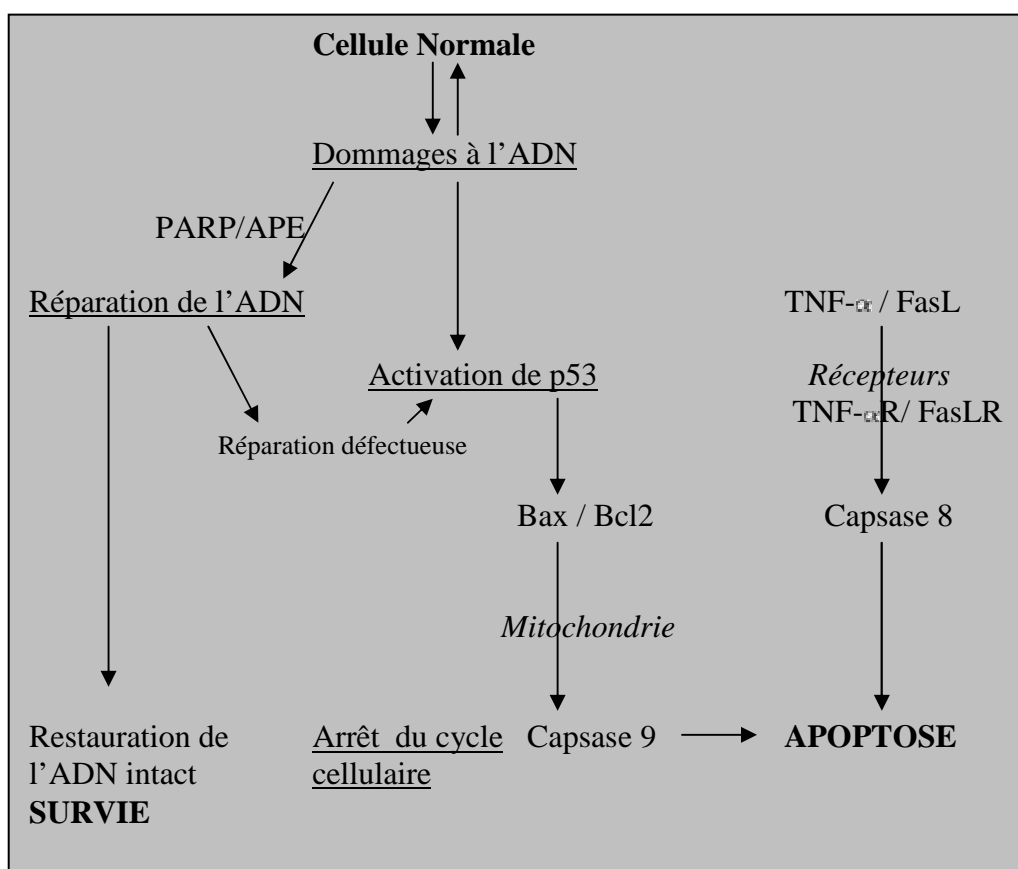
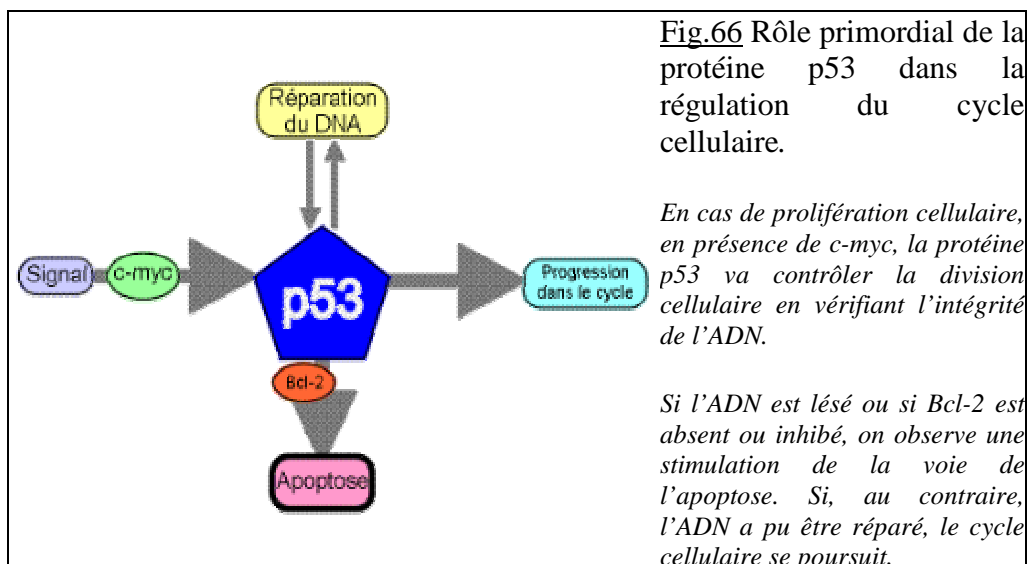


Fig. 67 Les mécanismes moléculaires de l'apoptose induite par les lésions de l'ADN après exposition à l'amiante. L'équilibre entre mécanismes oxydants et antioxydants maintient l'intégrité cellulaire. Après exposition à un stress oxydant, divers mécanismes de réparation de l'ADN peuvent restaurer et régénérer l'ADN. Mais, quand ces mécanismes de réparation échouent, une activation séquentielle de la voie apoptotique incluant p53, Bax, les récepteurs mitochondriaux et la caspase 9, peut conduire à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose. D'autre part, l'activation des facteurs de transcription de E2F1, ATM kinases, AP-1, et NF κ B peuvent, en partie, promouvoir la réparation de l'ADN et si cette réparation est inefficace peut activer la voie apoptotique

2.3.3.2. Anti-oxydants

Puisque les radicaux libres sont considérés comme l'une des hypothèses probable pouvant expliquer le mécanisme de développement de pathologies induites par les fibres d'amiante, l'un des paramètres essentiels pour juger de ce potentiel pathogène est la capacité anti-oxydante des cellules pour lutter contre les effets délétères de ces radicaux libres.

☛ Effet des antioxydants exogènes sur les lésions cellulaires reliées à l'amiante

Des marqueurs indirects des effets des radicaux libres sur les cellules regroupent notamment les effets des chélateurs du fer, des antioxydants exogènes et des inhibiteurs de la NOS sur la protection des cellules contre le développement de dommages cellulaires causés par les fibres. La plupart de ces études sont soit des études d'inhalation *in vivo* chez l'animal soit des études *in vitro* sur cultures cellulaires

La deferoxamine réduit la libération de radicaux libres, la formation de ruptures de la double hélice d'ADN et des autres lésions et dommages cellulaires induits par les fibres d'amiante *in vitro* dans la majorité des études. [100, 107, 270, 271] Les antioxydants tels que le glutathion, la N-Acétylcystéine (NAC) atténuent la toxicité de l'amiante sur les cellules [107,272-274]

Les lésions de cellules mésothéliales humaines conduites en présence de neutrophiles activés par les fibres d'amosite peuvent aussi être limitées par des pièges à H₂O₂. [275]

Pourtant, les dommages cellulaires induits par l'amiante ne se limitent pas à ceux liés aux radicaux libres, c'est pourquoi ces effets délétères n'ont pu être diminués par les agents antioxydants que dans la majorité – et non la totalité- de ces études.

Les tissus contiennent trois types de superoxyde-dismutases (SODs) qui transforment le radical superoxyde en H₂O₂ et protègent ainsi les poumons de la haute tension en oxygène. [276] Ces SODs sont les MnSOD (Manganèse-SOD) dans les mitochondries, les CuSOD (Cuivre-SOD) dans le cytosol et les EC-SOD (Extracellular-SOD) dans la matrice extracellulaire.[277, 278] Les plus importantes enzymes piégeant le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ sont les glutathion-peroxydases (GPx) et la catalase. La GPx intracellulaire est principalement localisée au niveau du cytosol des cellules épithéliales, et la GPx extracellulaire fonctionne au moins au niveau de la ligne épithéliale de la surface des conduits aériens. [279] La γ -glutamylcystéine synthétase (γ -GCS) est l'enzyme limitante de la synthèse du glutathion. Les glutathion-S-transférases (GSTs) sont une super famille d'enzymes du métabolisme de phase II qui catalysent la conjugaison du glutathion réduit avec un groupement électrophile d'une grande variété de composés. En général, ces réactions catalysées par les GSTs protègent la cellule des agents cytotoxiques et cancérigènes. Les isoenzymes de cette super famille de GST peuvent être classées en quatre classes principales (α , μ , θ et π) dont la répartition varie en fonction des tissus ; et de nombreuses GST, en particulier du groupe des π -GST, ont été détectées dans les poumons humains.[280] Enfin, à côté de ces enzymes, la ligne de surface des épithélium aériens contiennent des antioxydants de bas poids moléculaires tels que le glutathion. [281]

Les métabolites réactifs de l'oxygène et les cytokines induisent l'expression des enzymes anti-oxydantes dans les poumons des animaux d'expérimentation et dans les cellules issues de divers tissus animaux, et la plus importantes de ces enzymes est la MnSOD. [232-233] Cette enzyme est induite par les changements du potentiel redox des cellules, par les cytokines inflammatoires, telles que le TNF- α , les interleukines et l'interféron IF- γ [283-300] et par la haute tension en oxygène dans les poumons d'animaux en hyperoxie. [301-305]

Dans les cultures de cellules de l'épithélium de conduits aérien humains, cette même enzyme MnSOD semble induite par les mêmes cytokines mais pas par l'hyperoxie.[306-307] L'induction des enzymes anti-oxydantes dans les poumons humains par les cytokines et les agents oxydants s'est montrée plus variable et moins importante en intensité que celle de la MnSOS dans les études réalisées. [306-309]

Les fibres d'amiante induisent les Enzymes Anti-Oxydantes (EAO), la plus importante étant encore la MnSOD. [310-313] Les résultats obtenus avec les fibres d'amiante sont équivalents avec les cellules animales et humaines, ce qui suggère que l'effet de l'amiante sur l'expression des enzymes anti-oxydantes est moins intense que l'effet des cytokines, telles que le TNF- α . [314, 315] Janssen et ses collaborateurs [316] ont comparé l'induction du gène de la MnSOD dans des cultures de cellules mésothéliales pleurales humaines et de fibroblastes pulmonaires humains, exposées à des fibres d'amiante (crocidolite ou chrysotile), à un analogue non fibreux de la crocidolite, la riebeckite et enfin au système xanthine/xanthine oxydase (X/XO). A l'état de base, les niveaux d'ARNm de la MnSOD sont élevés dans les cellules exposées à l'amiante et au système X/XO et l'induction de la MnSOD est équivalente pour les deux types d'amiants. Les deux fibres et le système X/XO causent un important accroissement du niveau d'ARNm de la MnSOD dans les cellules, mais l'élévation du niveau de la protéine immunoréactive elle-même reste relativement modeste. La même étude montre que la riebeckite non fibreuse ne cause pas d'induction de la MnSOD. Les différents types cellulaires peuvent répondre différemment : les fibres d'amiante ne cause aucune élévation du niveau d'ARNm ou de la protéine de la MnSOD dans les fibroblastes, contrairement aux cellules mésothéliales, alors que le système X/XO induit l'expression du gène de la MnSOD dans les deux types cellulaires. *In vivo*, l'inhalation chez le rat de minéraux fibrogènes non-asbestiformes et de particules de dioxyde de titane TiO₂ causant une inflammation pulmonaire, sont responsables d'un accroissement significatif des niveaux

d'ARNm de la MnSOD, alors que les minéraux non-fibrogènes non-inflammatoires échouent à induire la MnSOD [317]

Les effets de l'amiante sur les autres EAOs, telles que les CuZnSOD, les GPx et catalase sont soit inexistantes soit beaucoup moins intenses que ceux observés pour la MnSOD [317,318] D'autre part, l'exposition aux fibres non abestiformes (fibrogènes ou non) ne cause aucune induction significative de ces EAOs [317]. *En conséquence, l'inflammation joue un rôle moins évident dans l'induction des CuZnSOD, GPx et catalase en association avec l'amiante ou d'autres fibres minérales.*

L'hème oxygénase (HO) a des propriétés anti-oxydantes puisqu'elle convertit l'hème en bilirubine et que l'hème est connu pour fonctionner comme un pro-oxydant. Or il semble que cette enzyme HO soit régulée vers une induction par le stress oxydant ; c'est ainsi que cette enzyme peut aussi être utilisée comme un marqueur indirect des effets oxydants de l'amiante sur les cellules. L'HO est induite par les fibres de crocidolite et de chrysotile dans les cellules mésothéliales humaines, mais comme c'est le cas pour la MnSOD, cette induction pourrait être spécifique de certains types cellulaires puisque les fibres d'amiante ne causent aucune induction de l'HO dans les fibroblastes pulmonaires humains. [315]

En conséquence, les fibres d'amiante causent une induction significative de la MnSOD et des autres EAOs mais l'amplitude de cette induction apparaît plus être en relation avec la réaction inflammatoire causée par les fibres qu'avec les espèces oxydantes elles-mêmes.

☉ Les enzymes anti-oxydantes dans les tumeurs pulmonaires en relation avec l'amiante

On ne connaît que peu d'éléments à propos de l'expression de ces EAOs dans les pathologies pulmonaires associées à une exposition à l'amiante. L'un des facteurs

déterminants à la prédisposition individuelle à l'apparition de pathologies liées à des agents oxydants résulte probablement dans l'existence d'une susceptibilité génétique avec des variations inter- et intra-individuelles des niveaux de ces diverses EAOs. Les GST ont fait l'objet d'études pour leur variabilité génétique et le risque de pathologies malignes induites par l'amiante. [319, 320] Des variations interindividuelles de l'activité des GST ont été rapportées à la fois dans des tissus sains et dans des tissus malins, apparaissant donc plus être en relation avec une variabilité génétique qu'avec le processus pathologique (les niveaux variables observés de l'activité de la GST serait plus la cause de la pathologie et la conséquence d'un polymorphisme génétique que la conséquence de la pathologie). Le polymorphisme de GST- μ semble avoir été associé à un risque accru de cancer du poumon [321-322] A côté des GST, d'autres enzymes sont associées au métabolisme détoxifiant des composés exogènes, l'une d'entre elle étant la N-acétyl transférase (NAT). Des études plus récentes ont montré que certains génotypes de la NAT2 associés à des expositions individuelles à des hauts niveaux de fibres d'amiante renforçaient la susceptibilité à des troubles pulmonaires liés à l'amiante. [320-321] Par ailleurs, les individus ayant un génotype « nul » pour la GST- μ combiné à un génotype de la NAT2 conduisant au phénotype « Acétyleur lent » (faible niveau de NAT2 donc réaction d'acétylation catalysée par la NAT2 ralentie) présentait un risque doublé de développer un mésothéliome malin. Peu d'études sont en réalité disponibles actuellement sur le polymorphisme des enzymes anti-oxydantes (et en particulier de la MnSOD) et de leurs conséquences sur le risque de développer des pathologies pulmonaires après exposition à l'amiante. Les variabilités individuelles des EAOs et les facteurs génétiques combinés avec le niveau d'exposition ont probablement un rôle significatif dans le développement des pathologies liées à l'amiante et il convient d'étudier cette piste.

Les premières études ont montré que l'une des plus importantes enzymes anti-oxydante, la MnSOD, pourrait se comporter comme un gène suppresseur de tumeur. En effet, ces études ont été conduites sur des cellules tumorales transfectées du gène de la MnSOD et ont montré une réduction du caractère malin des cellules et une réduction de la viabilité des cellules malignes avec des taux élevés de MnSOD. Cependant, la situation est différente *in vivo*, où les diverses EAOs peuvent être induites simultanément. Les hauts niveaux des ARNm et de la protéine immunoréactive correspondant à la MnSOD ont été mis en évidence dans les mésothéliomes malins humains et dans les lignées cellulaires malignes comparées aux cellules de mésothéliome pleural sain ou non malin. D'autre part, de nombreux groupes de recherche ont montré de hauts niveaux de MnSOD dans d'autres localisations tumorales [323-325]

Janssen et son équipe ont plus récemment montré que les hauts niveaux cellulaires de MnSOD sont associés à une faible survie des patients atteints d'un carcinome du colon. Cette découverte est en accord avec le rôle protecteur de cette enzyme pour les cellules et les tissus contre les radicaux libres exogènes et endogènes. En effet, la résistance à de hautes tensions en oxygène et aux oxydants apparaît être corrélée avec l'induction des SOD et de hauts niveaux de MnSOD dans les cellules. D'autre part, de nombreuses substances cytotoxiques sont aussi connues pour causer l'activation du NF- κ B, qui conduit à son tour à une induction de l'enzyme MnSOD. Cependant, des études récentes ont montré que l'induction ou la transfection de SOD sans induction simultanée des autres EAOs ne pouvait apporter qu'une protection minimale, voire nulle ou bien même être délétère en provoquant un accroissement de la libération de H₂O₂, des lésions cellulaires et de l'apoptose. [326,327]

La balance entre les différentes enzymes anti-oxydantes est probablement plus importante que l'activité des différentes enzymes prises isolément. Finalement, les cellules épithéliales des conduits aérifères, les cellules mésothéliales, les cellules endothéliales vasculaires, chez

l'Homme et le rat, par exemple, consomment les oxydants exogènes par divers mécanismes et l'importance de ces divers mécanismes est supporté par la découverte que l'induction de la MnSOD causée par les fibres d'amosite n'offre pas de protection pendant une exposition ultérieure à un agent oxydant ou des fibres. De même pour le mésothéliome humain, qui est extrêmement résistant à la radiothérapie et à la chimiothérapie. Ainsi, l'une des questions essentielles dans ces pathologies tumorales est de savoir si la résistance de la tumeur est associée à de hauts niveaux de MnSOD, en lien avec une induction de multiples EAOs ou autres mécanismes qui peuvent protéger de la mort cellulaire, tels que la prolifération ou l'apoptose par des mécanismes non-oxydants.

Les niveaux et les activités des autres EAOs dans les mésothéliomes sont variables. Par exemple, les cellules résistantes de mésothéliome semblent contenir non seulement de hauts niveaux en MnSOD, mais aussi des activités significativement élevées de catalase, de GPx et des concentrations accrues en glutathion. [328] Parmi quatre lignées de cellules tumorales étudiées, la plus résistante contenait les plus grandes concentration en MnSOD, catalase, GPx et glutathion ; De plus, la déplétion en glutathion de ces cellules les rend plus vulnérable aux agents oxydants exogènes et aux drogues cytotoxiques [328]

L'expression de la GST- π est considérée comme un marqueur tumoral prénéoplasique. Des taux élevés de GST dans une tumeur peuvent être associé à une résistance primaire aux antinéoplasiques. Dans les mésothéliums humains, presque toutes les biopsies non néoplasiques, se sont montrées positives pour GST- α et GST- π et la moitié d'entre elle pour GST- μ . [329] L'expression des GST- μ et π est aussi corrélée à la survie. [329] L'activité de la γ -GCS est corrélée avec le glutathion intracellulaire. Le glutathion est requis non seulement pour la glutathion peroxydase, mais aussi pour la réaction de la GST et enfin pour le fonctionnement de la pompe de résistance multi-droqueMRP située sur la membrane plasmatique des cellules et glutathion dépendantes. Une étude a pu, par une technique

immuno-histochimique avec des anticorps spécifique de la MRD, mettre en évidence l'expression de cette pompe dans les mésothéliomes malins. Cette découverte suggère un peu plus l'importance du métabolisme du glutathion dans la résistance des cellules mésothéliales non seulement vis-à-vis des oxydants mais aussi des drogues cytotoxiques *in vitro* et probablement *in vivo*. [330]

Très peu données sont connues sur la susceptibilité génétique au développement de pathologies liées à l'amiante mais des données récentes telles que celles obtenues avec les GST suggèrent qu'une variabilité individuelles des mécanismes anti-oxydants de détoxification jouerait un rôle dans le développement de ces pathologies. L'induction des défenses pulmonaires, telles que la MnSOD, par les cytokines et les fibres, est bien élucidées mais le rôle de cette inductibilité des divers EAOs dans la protection des cellulaires et la prévention des mécanismes de cancérogenèse est moins clair. Les mésothéliomes malins associés à une exposition à l'amiante révèlent une expression accrue des EAOs, plus particulièrement de la MnSOD, mais l'importance de cette expression dans l'évolution des pathologies malignes, les mécanismes de résistance des cellules tumorales contre les thérapies chimique et radiques, et le pronostic des patients reste peu clair.

Au moins deux mécanismes responsables des effets génotoxiques et initiateurs de tumeurs des fibres d'amiante ont ainsi été proposés : (i) des lésions de l'ADN indirectement médiées par les radicaux libres, et (ii) l'interférence physique directe avec l'appareil mitotique. Ces mécanismes restent probables mais les questions suivantes doivent trouver des réponses précises afin de valider ces hypothèses : les tests de génotoxicité utilisés *in vitro* sont-ils représentatifs de la cancérogenèse médiée par les fibres *in vivo*? Les doses d'exposition utilisées *in vitro* sont-elles équivalentes en effet aux doses d'exposition *in vivo* ?

2.4. Prolifération cellulaire stimulée : l'amiante est un promoteur

Le développement d'un cancer est, nous le savons, le résultat d'un processus multifactoriel mettant en jeu une succession d'événements et conduisant à une prolifération cellulaire anormale. Si l'amiante se comporte comme un initiateur (molécule capable de transformer une cellule en induisant une mutation à l'origine d'une altération irréversible du génome cellulaire, transmise aux cellules filles), il s'agit d'un cancérigène complet par son action promotrice (permettant l'expression du gène altéré et la prolifération des cellules anormales) de tumeur.

Nous verrons qu'il existe deux grandes hypothèses pour expliquer la prolifération autonome des cellules initiées : l'activation de systèmes de transcription sous l'effet du stress oxydant, et la réaction inflammatoire chronique conduisant à une libération prolongée de cytokines et de facteurs de croissance dans les poumons.

2.4.1. Notion de facteurs de croissance

2.4.1.1. Qu'est ce qu'un facteur de croissance ?

Les facteurs de croissance sont des polypeptides de poids moléculaire peu élevé (6-30 kDa) qui régule la croissance et les fonctions des cellules, grâce à une fixation sur des récepteurs spécifiques cellulaires de grande affinité. L'activation de la cellule se traduit par une activation de signaux transmembranaires, puis par une cascade de phénomènes cytoplasmiques et aboutit à la transcription des gènes spécifiques d'une ou de plusieurs protéines.

A la différence des hormones sécrétées à distance du tissu effecteur (sécrétion endocrine), la plupart des facteurs de croissance agissent sur les cellules toutes voisines

(sécrétion paracrine), et leur concentration plasmatique est très faible. Certaines cellules ont des récepteurs pour les facteurs de croissance qu'elles produisent (sécrétion autocrine).

Le sérum est la source principale de facteurs de croissance, et ce fait explique la nécessité d'utiliser une concentration de sérum dans les milieux de culture cellulaire (en général, 10%). Seules, les cellules qui produisent elles-mêmes *in vitro* leur(s) facteur(s) de croissance sont capables de se développer sans sérum, notamment les cellules cancéreuses.

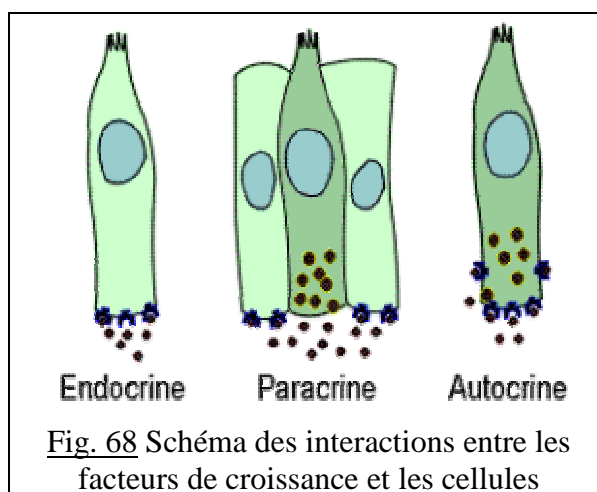


Fig. 68 Schéma des interactions entre les facteurs de croissance et les cellules

Les principales familles de facteurs de croissance sont regroupées dans la table ci-dessous.

Famille des PDGF (Platelet derived growth factor)

- PDGF1
- PDGF2, retrouvé dans certaines tumeurs mammaires,
- VEGF (facteur de croissance vasculaire), rôle mitogène important pour la vascularisation,
- VPF (facteur de perméabilité vasculaire)

Famille de l'EGF (Epidermal Growth Factor)

- EGF, individualisé au niveau des gencives, et de nombreuses cellules épidermiques,
- l'urogastrone (URO) sécrété par les cellules gastriques, le rein et les glandes sous-maxillaires,
- le TGF α ou Transforming Growth Factor α ,
- l'amphiréguline détectée dans le placenta, le tissu mammaire et ovarien

Famille des FGF (Fibroblast Growth Factor)

- numérotés de 1 à 6, et pouvant être complexés par l'héparine.

Famille de l'insuline

- IGF-1
- IGF-2

Facteurs neurotropes (NGF)

Fig. 66 les principales familles de facteurs de croissance

Le Facteur transformant β TGF- β est le prototype d'une famille de molécules (activines, inhibines, protéines morphogénétiques osseuse) exerçant une activité inhibitrice sur la cellule. Il se lie à un récepteur membranaire utilisant ensuite l'activation des kinases sérine thréonine comme les facteurs de croissance. Il serait l'agent arrêtant la repopulation tissulaire après une agression. D'autres rôles physiologiques semblent lui être dévolus : différenciation cellulaire, chimiotactisme, stimulation des récepteurs d'intégrines (adhésion intercellulaire).

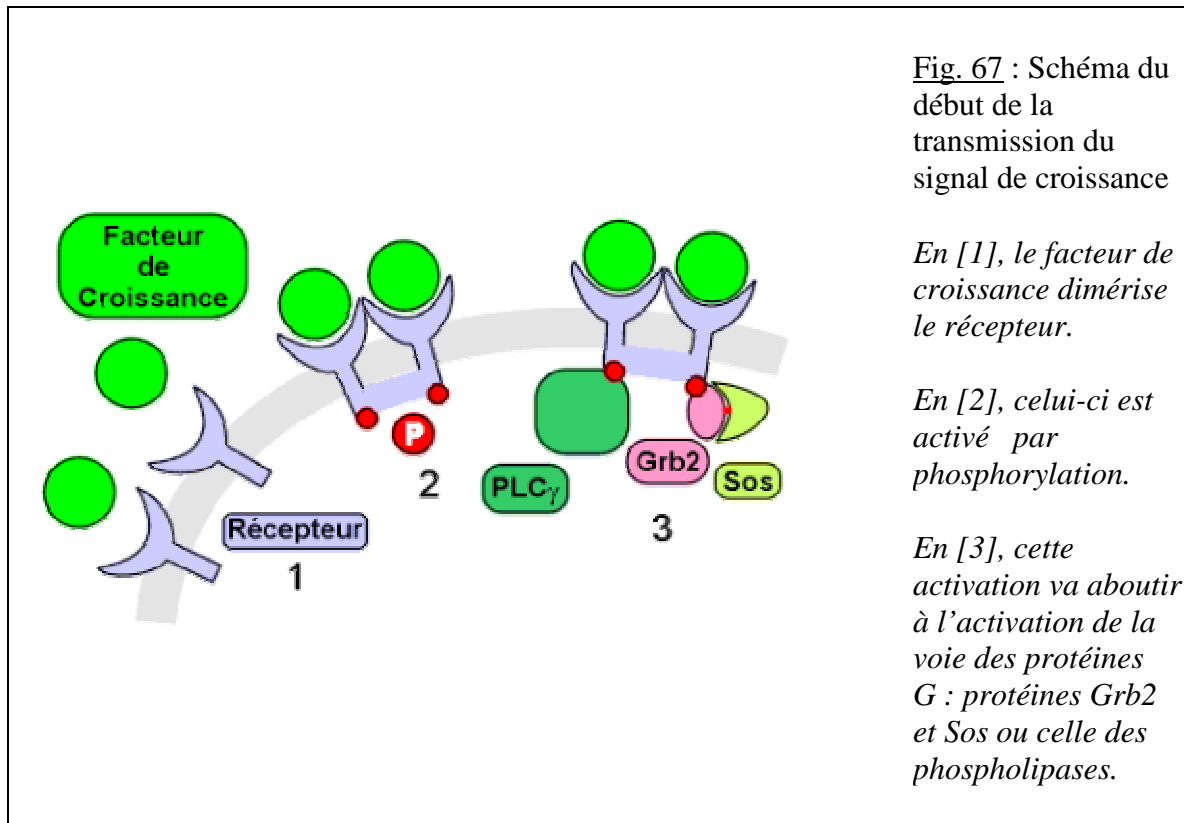
On peut citer d'autres facteurs de mécanisme cellulaire mal connu

- la mammatatine (peptide régulateur de la croissance de l'épithélium mammaire normal),
- les interférons (toute une famille très complexe dans leur composition et leurs actions),
- le facteur de nécrose des tumeurs (Tumor Necrosis Factor ou TNF).

2.4.1.2. La transmission du signal : rappel des voies de signalisation

La stimulation des récepteurs aboutit à la transmission d'un signal vers le noyau, par l'intermédiaire de cascades de phosphorylation.

Il existe plusieurs voies selon le type de récepteurs, le type de cellules, mais le produit final d'activation près du noyau est une catégorie de protéines appelées MAP kinase (pour mitogen activating protein), dont la mission est de phosphoryler les gènes de transcription de l'ADN.



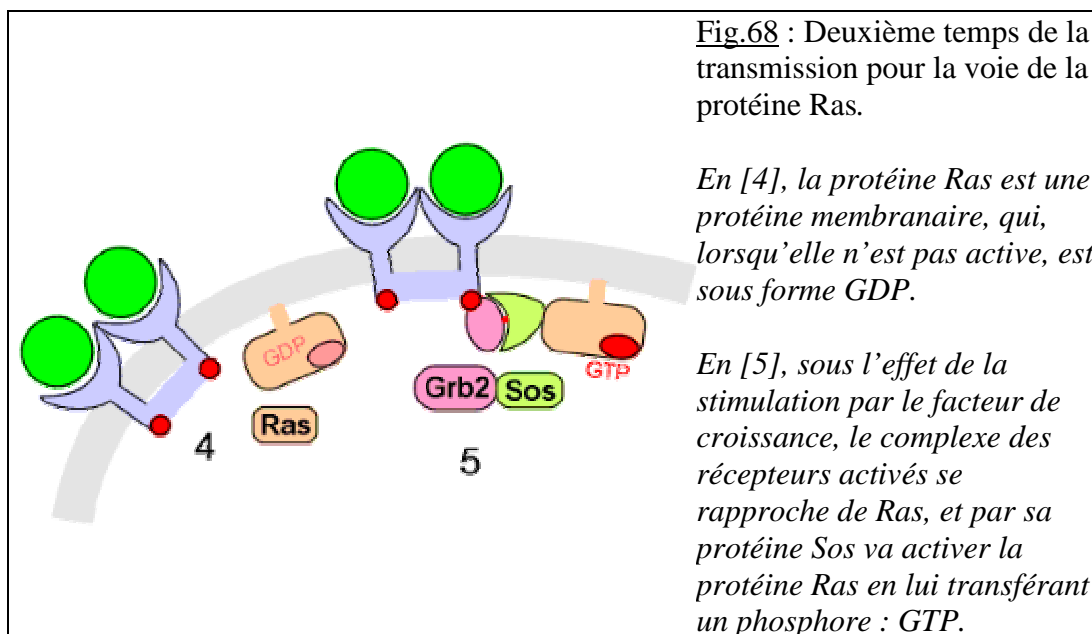
Deux voies principales aboutissent à cette activation

- Les protéines G
- Les phospholipases

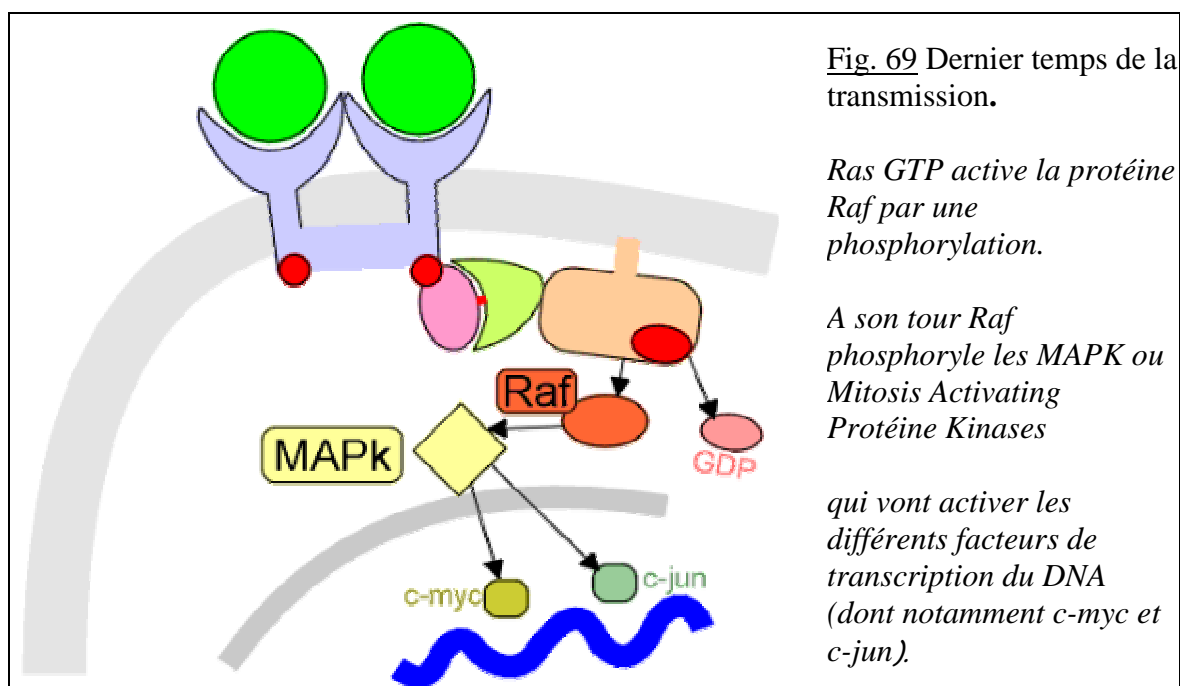
• Les protéines G

La stimulation de nombreux récepteurs membranaires est retransmise par une classe de protéines spécifiques, liant le GTP (Guanine Tri - Phosphate), appelées les G Protéines. Elles couplent les récepteurs avec les effecteurs intracellulaires, et à ce titre exercent un contrôle important de la transmission du signal.

La plus étudiée des protéines G est la protéine Ras, une des protéines intermédiaires entre les récepteurs et les facteurs de transcription du DNA. D'un poids moléculaire de 21 kDa, il existe trois protéines Ras différentes H-Ras, K-Ras et N-Ras (cf. oncogènes pour l'explication de ces noms). On connaît les deux formes de la protéine Ras (encore appelée $p21^{\text{Ras}}$) : celle liée au GTP (forme active), celle liée au GDP (forme inactive).



Après sa synthèse par le ribosome, la protéine Ras acquiert un résidu hydrophobe C terminal qui lui permet de s'arrimer à la membrane cytoplasmique où elle va jouer un rôle essentiel ; stimulée par des facteurs d'échange liés aux récepteurs (Sos, Grb2), elle transmet la phosphorylation jusqu'aux facteurs de transcription du DNA par l'intermédiaire d'une cascade de facteurs.



Ainsi, la protéine Ras joue un rôle essentiel entre le stimulus externe provoqué par les facteurs de croissance et la transcription génétique. On comprend facilement que toute altération du gène Ras, provoquant une stimulation non contrôlée de cette protéine puisse jouer un rôle essentiel dans la cancérogenèse.

● La voie des phospholipases

La phospholipase C (PLC-g) est activée soit par l'intermédiaire d'une protéine G soit directement par phosphorylation d'un résidu tyrosine. Son action consiste à hydrolyser les phospholipides contenant de l'inositol, et en particulier le phosphatidylinositol en deux seconds messagers : l'inositol triphosphate et le diacylglycérol.

L'inositol triphosphate permet la liaison Ca/Calmoduline qui active de nombreuses protéines kinases, phosphatases et phosphodiesterases.

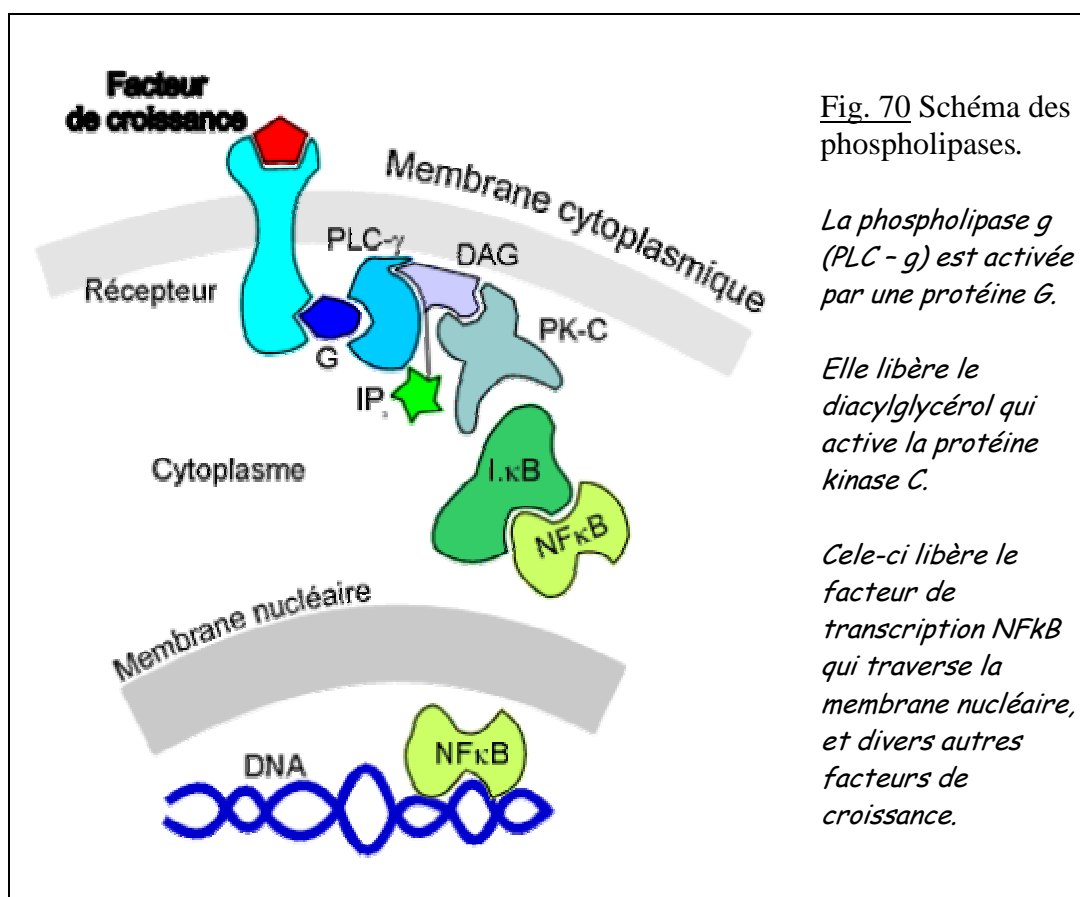


Fig. 70 Schéma des phospholipases.

La phospholipase g (PLC - g) est activée par une protéine G.

Elle libère le diacylglycérol qui active la protéine kinase C.

Cele-ci libère le facteur de transcription NF κ B qui traverse la membrane nucléaire, et divers autres facteurs de croissance.

Le diacylglycérol active spécifiquement la protéine kinase C ou PKC. La protéine kinase C active les facteurs de transcription NF-kB, c-fos et c-jun, et CREB/ATF. Des formes anormales de PKC ont été démontrées dans certaines tumeurs

2.4.2. Hypothèse n°1 : Activation des systèmes de transcription
sous l'effet du stress oxydant

La prolifération cellulaire est nécessaire pour « fixer » les mutations induites par les agents génotoxiques. L'expansion clonale de population cellulaires initiées ou pré-néoplasiques est accélérée par un environnement stimulant la croissance des cellules. Une accélération du rythme de croissance cellulaire conduit à une augmentation du niveau de mutations spontanées. La prolifération cellulaire est en équilibre avec la différenciation cellulaire et la mort cellulaire par apoptose.

Sous l'effet de différents stimuli, incluant les radicaux libres, les cellules soumises à des situations de stress répondent par une activation de systèmes de régulation nucléaire qui permet à la cellule de s'organiser et de contrôler son fonctionnement par l'intermédiaire de protéines régulatrices. Ainsi, l'exposition à de des fibres d'amiantes sous certaines conditions est accompagnée de l'expression de facteurs de transcriptions permettant l'expression de gènes contrôlant la prolifération cellulaire et la réparation de l'ADN.

2.4.2.1. Observations expérimentales

☛ L'exposition à l'amiante conduit à une prolifération cellulaire accélérée

In vitro et à de hauts niveaux d'exposition, les fibres d'amiante sont toxiques pour une large variété de population cellulaires. Nous l'avons vu précédemment, on suppose que cette

toxicité est le fruit de la libération de radicaux libres ou de l'inhibition de la prolifération cellulaire par interférence physique directe avec la mitose. Pourtant, dans le respect de certaines conditions *in vitro*, les fibres d'amiante induisent la prolifération de cellules épithéliales trachéo-bronchiques de hamster [123], de fibroblastes pulmonaires chez le rat [424] et de cellules mésothéliales pleurales de rats. [418] La prolifération cellulaire de ces populations-cibles dans le poumon et la plèvre a pu aussi être observée après instillation intra-trachéale [425-426], après inhalation [427] ou injection intra-péritonéale de fibres d'amiante. [428] Ces réponses précoces surviennent sur les populations cellulaires susceptibles de donner lieu à une transformation néoplasique maligne, à savoir l'épithélium bronchique, les cellules épithéliales alvéolaires de type II et les cellules mésothéliales. Cependant, la prolifération de macrophages, de fibroblastes interstitiels et de cellules endothéliales vasculaires a pu aussi être observée dans ces modèles animaux *in vivo* [429] : ces réactions prolifératives sont associées à l'angiogénèse et à la fibrose caractéristiques d'une réponse inflammatoire permettant la cicatrisation d'une lésion.

➡ Altérations cellulaires caractéristiques expliquant cette prolifération

Dans les cellules pré-néoplasiques, la prolifération mise en évidence est le fruit d'un équilibre entre facteurs favorisant la croissance cellulaire (facteurs de croissance et proto-oncogènes) et facteurs protégeant les cellules d'une telle prolifération (gènes suppresseurs de tumeur)

❶ Les facteurs de croissance et les voies de transduction du signal et proto-oncogènes

Comme les autres agents génotoxiques et les ROS, l'amiante modifie le fonctionnement cellulaire en stimulant les cascades de transduction du signal. Par exemple,

les cellules exposées à divers stimuli tels que les rayonnements UV, les irradiations, ou H₂O₂ peuvent chacun, rapidement, accroître l'activation membranaire de tyrosine kinase (TK), la protéine kinase C (PKC), la *mitogen activated protein kinase* (MAPK), qui par des cascades de signalisation, activent des facteurs de transcription tels que AP-1 et le facteur NFκB (*nuclear transcription factor kappa-B*).[331-335] Les membres de la famille des MAPK, telles que les kinases activée par un signal extracellulaire (ERK1 and ERK2), l'extrémité NH₂-terminale de la protéine kinase *c-jun* /protéine kinase activée par le stress (JNK/SAPK), et p38 sont activées par une très grande variété de stimuli extracellulaires.[334] L'équilibre critique entre les voies d'activation de ERK et de JNK/p38 pourraient jouer un rôle essentiel en promouvant la survie cellulaire ou l'apoptose. [336] Zanella et ses coll.[337] ont montré que l'amiante, mais pas ses analogues non fibreux, stimule la phosphorylation prolongée de ERK1 et 2 et augmente l'activité de ERK2 dans les cellules mésothéliales pleurales de rat. Ils ont aussi découvert que l'activation de MAPK induite par l'amiante est atténuée par un inhibiteur de la protéine kinase associée au récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF-R). Ces données montrent que l'amiante peut activer la voie de signalisation de la MAPK par l'intermédiaire de EGF-R de façon équivalente aux rayonnements ionisants et à H₂O₂. [338] D'ailleurs, Faux [339] montre que l'amiante stimule la cascade de la Protéine kinase C dans les cellules pleurales de rat après autophosphorylation du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGF-R). En examinant la capacité de différentes matières minérales (cancérogènes ou non) à sur-exprimer ce récepteur EGF-R dans ces cellules mésothéliales, il a été observé que les fibres cancérogènes induisent une expression accrue du récepteur EGF-R, et initient la cascade de signalisation conduisant à la prolifération cellulaire et à la cancérogenèse. Manning et coll [340] démontrent que des souris exprimant un récepteur EGF-R mutant négatif (transfection d'un gène dominant conduisant à un récepteur d'activité diminuée ou nulle) manifestaient une prolifération des cellules épithéliales

pulmonaires diminuées . Jimenez [341] a démontré que l'amiante pouvait induire l'apoptose des cellules mésothéliales pleurales de rat par l'activation de ERK, et non de JNK/SAPK, alors que H_2O_2 induit l'apoptose par activation des deux voies. D'ailleurs, le rôle des ROS est suggéré par l'observation de la réduction de l'activité de ERK en présence de catalase, NAC, ou d'un traitement des fibres par le chélateur du fer (déferoxamine). Cependant la régulation des signaux de la prolifération ou de la mort cellulaire est complexe. Par exemple, $O_2^{\bullet-}$ peut intervenir dans la progression du cycle cellulaire contrôlée par la protéine Ras indépendamment de MAPK et JNK/SAPK.[342] Cependant, la surexpression de MnSOD, responsable d'une diminution de une $O_2^{\bullet-}$ atténue l'apoptose des cellules par des mécanismes qui sont directement corrélés à une réduction de l'activation MAPK, JNK/SAPK et NF κ B.[343]

NF κ B est un facteur de croissance hautement régulé impliqué dans l'activation d'un grand nombre de gènes, incluant ceux des cytokines, facteurs de croissance, molécules d'adhésion, ou encore des proto-oncogènes – par exemple, *c-myc* – impliqués dans la prolifération cellulaire et l'apoptose.[344] La régulation de l'expression des gènes des cytokines par NF κ B est un fait essentiel puisque les cytokines accumulées dans les cellules. NF κ B est un dimère de deux protéines de la famille Rel (p50 et p65) qui est activé dans le cytoplasme par phosphorylation de ses inhibiteurs (I κ B α , etc.) conduisant à la dégradation par protéolyse de I κ B et à la translocation vers le noyau du dimère où il se lie à l'ADN. Trois lignes de données expérimentales suggèrent que les ROS régulent l'activation de NF κ B: (1) les oxydants tels que H_2O_2 activent NF κ B, (2) les agents activant NF κ B , tels que le TNF α , l'IL-1 β , les radiations et les endotoxines génèrent un stress oxydatif, et (3) les anti-oxydants (endogènes ou exogènes) et les chélateurs du fer, réduisant la libération des ROS, diminuent l'activation de NF κ B.[344]

L'amiante active les facteurs de transcription dans une grande variété de populations cellulaires. Janssen et ses collègues,[345] en utilisant des technique de transfection dans des cellules épithéliales trachéales de hamster, ont montré que l'amiante crocidolite cause une activation prolongée et dose dépendante de l'activation de la transcription des gènes dépendants de NF κ B. Le rôle des ROS est suggéré par la diminution de la liaison de NF κ B à l'ADN en présence de NAC. Plus récemment, ces mêmes auteurs ont exposé des rats pendant cinq jours à des fibres de crocidolite ou de chrysotile inhalées et ont démontré par immunofluorescence un accroissement de p65 dans les cellules épithéliales des conduits bronchiolaires et au niveau des sites de dépôt. [346] Contrairement aux cellules épithéliales, à aucun moment il ne fut noté d'activité dans les cellules mésothéliales.

Simeonova [347,348] a montré que l'amiante et H₂O₂ activaient tous les deux NF κ B et NF-IL-6 dans les cellules A549 et cellules épithéliales bronchiques humaines normales, qui, à leur tour, activent l'expression des gènes et la libération des protéines IL-8 et IL-6. Là encore, le rôle des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) était suggéré par l'observation que les « pièges » à HO[•] et NAC atténuaient tous les deux l'activité des facteurs NF κ B et NF-IL-6 et l'expression des IL-8 et IL-6 induites par l'amiante ou H₂O₂. Par ailleurs, la libération de l'IL-8 induite par l'amiante – de même que activité des facteurs NF κ B et NF-IL-6 – est réduite par des inhibiteurs de la PKC (staurosporine) et de la tyrosine kinase (génistéine ou herbimycine A), ce qui suggère que l'importance de ces deux cascades de phosphorylation pour ces facteurs de transcription. Lounsbury [349], en examinant l'immunoreactivité de la PKC et de son substrat, l'adducine-phosphorylée (P-adducine), dans des cellules pulmonaires, montre que l'activation de la PKC dans les cellules épithéliales pulmonaires est une conséquence de l'inhalation de fibres d'amiante et peut expliquer l'activation de la prolifération cellulaire

Gilmour [350] remarque de son côté que les longues fibres d'amiante amosite accroissent l'activité transcriptionnelle de NF κ B et AP-1 dans les macrophages alvéolaires de rats, par un mécanisme directement en corrélation avec la libération des radicaux libres par les fibres (testée par l'analyse des lésions à l'ADN). Faux et Howden [351] ont noté que l'activation par l'amiante de ces facteurs de transcription (NF κ B et AP-1) est réduite par la vitamine E, un inhibiteur de la peroxydation des lipides, ou par l'acide-5,8,11,14-eicosatétraénoïque, un inhibiteur de la lipoxigénase, mais pas par l'indométhacine, un inhibiteur de la cyclo-oxygénase. Ces données suggèrent que l'amiante induit la libération de radicaux libres, notamment de radicaux de type HO[•] et/ ou de lipoperoxydes, activant les facteurs de transcription NF κ B, NF-IL-6, et AP-1 dans les cellules cibles, qui, à leur tour, augmentent la réponse inflammatoire et fibrotique aux fibres.

L'amiante et les radicaux libres libérés peuvent aussi agir comme un promoteur de tumeur en augmentant considérablement la prolifération cellulaire, développant ainsi un clone de cellules. Divers gènes sont surexprimés dans les tissus pré-néoplasiques de rats traités par des fibres d'amiante. La surexpression de proto-oncogènes *c-myc*, *fra-1* et de *egfr* est démontrée à différentes étapes de la cancérogenèse induite par l'amiante. Un rôle possible de Fra-1, une protéine dimérique libérant le facteur de transcription AP-1, est avancé par l'observation de son expression dose-dépendante dans des cellules mésothéliales exposées *in vitro* à des fibres d'amiante. [352] Les ROS sont connues pour induire notamment l'expression précoce des gènes *c-fos* and *c-myc*. [353] L'amiante active la famille des facteurs de transcription AP-1, incluant des homodimères (Jun/Jun) et des hétérodimères (Fos/Jun), dérivés des proto-oncogènes de la famille des *c-fos* et *c-jun*. [335,350,351]

② Les gènes suppresseurs de tumeur

A l'inverse des facteurs de croissance, les gènes suppresseurs de tumeur tels que *TP53*, *Rb1*, *p16INK4a*, *p15INK4b*, *WT1*, *ATM*, et *NF2* gardent l'intégrité du matériel génétique des cellules en prévenant l'expansion clonale, la croissance cellulaire et la métastase de cellules dont l'ADN est altéré, en libérant le temps nécessaire à la réparation de l'ADN ou à l'apoptose.[354] Il n'y a que peu d'informations sur le rôle de la plupart de ces gènes suppresseurs de tumeurs dans la pathogenèse des affections liées à l'amiante. Aucune altération du gène du Retinoblastome *Rb* n'a pu être retrouvée dans les cellules de mésothéliome humain. *WT1* serait tout autant exprimé dans les cellules mésothéliales humaines normales ou malignes. Néanmoins de plus en plus d'éléments suggèrent que les altérations ponctuelle de *TP53* seraient importantes. Les mutations ponctuelles des exons 5-8 du gène de p53, qui est localisé sur le locus p13 du chromosome 17, sont présentes dans plus de 50% des cancers humains, et particulièrement dans les cancers du poumon. [354] Démontrée, et en conflit avec les fréquentes mutations de gène de cette phosphoprotéine, l'accumulation de la protéine p53 dans les carcinomes pulmonaires humains est directement corrélée au contenu en fibres d'amiantes, suggérant un allongement de sa demi-vie mais la relation entre mésothéliomes et p53 reste confuse.[355,356] p53 induit les gènes impliqués dans l'apoptose, incluant Bax, aussi bien que les gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire(p21^{WAF1}, Cip-1, GADD 45), l'autorégulation de p53 (MDM2). [354] La surexpression de p53, qui signale généralement le dysfonctionnement de cette protéine, intervient aussi dans les troubles fibrotiques pulmonaires.[357,358] Misra [359] a démontré une expression augmentée de la protéine p53 au niveau des sites de déposition des fibres inhalées (bifurcations des conduits bronchiolo-alvéolaires) chez le rat. Cette immunoréactivité expérimentale de p53, qui se manifeste d'abord dans les macrophages alvéolaires et les

cellules épithéliales des conduits aériens, atteint son apogée huit jours après l'exposition et retrouve son niveau de base après 30 jours.

Les taux d'ARNm de p53 sont généralement corrélés avec l'étendue des lésions de l'ADN, alors que les taux de la protéine p53 elle-même peuvent aussi être augmentés par des mécanismes de régulation post-transcriptionnelle.[354] Bien que les mécanismes moléculaires régulant l'expression de p53 après les dommages subis par l'ADN ne soient pas encore bien établis, des protéines reconnaissant l'ADN lésé sont tout autant impliquées que des mécanismes dépendant du potentiel redox et du stress oxydatif dans la cellule. [354] L'une des protéines régulant potentiellement p53 est PARP puisque les fibroblastes V79 déficients en PARP ne peuvent induire l'ARNm de p53 et sont incapables de subir l'apoptose.[362] Puisque l'amiante induit des dommages à l'ADN et l'activation de la protéine PARP dans les cellules mésothéliales et les cellules épithéliales alvéolaires en culture, l'activation de p53 pourrait être responsable de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose, qui se manifestent aussi dans les cellules cibles.[360,363] Dans cette optique, les fibres de chrysotile induisent un arrêt du cycle cellulaire des cellules mésothéliales, qui est en relation avec une expression accrue de p53 et une accumulation de cellules en phase G0/G1 du cycle. [363] Il est aussi noté que les fibres de chrysotile sont plus efficaces sur ce point que les fibres de crocidolite, et que chacune des deux types de fibres induit un faible taux d'apoptose ($\leq 3\%$), suggérant que les mécanismes de réparation de l'ADN restent relativement et suffisamment efficaces pour que la survie cellulaire soit maintenue. Comme le rappelle Broaddus,[364] le "choix" de la survie ou du suicide cellulaire après exposition à l'amiante dépend probablement des caractéristiques de la cellule exposée (par exemple, des capacités anti-oxydantes et de réparation de l'ADN de la cellule), de l'étendue des lésions et de facteurs externes tels que les signaux de croissance cellulaire.

L'état d'oxydation de la cellule (statut redox) module aussi l'activité p53 mais le rôle de l'amiante dans cette hypothèse n'a pas encore été suffisamment évalué. Hainaut et Milner [365] ont montré que la liaison de p53 à l'ADN est inhibée par un chélateur du fer (catalyseur de la libération des espèces radicalaires oxydantes) et augmentée par les agent réducteurs. Le rôle d'un éventuel équilibre rédox dans l'expression de p53 dans les cellules transformée est aussi suggéré par la découverte que les antioxydant contenant des groupement sulfhydryle tels que NAC, et non les antioxydant interrompant la réaction en chaîne, tels que la vitamine E, induisent l'apoptose de ces cellules transformée, sous l'action de p53.[361] La thymidylate-synthétase, qui est une protéine enzymatique régulée par le statut rédox de la cellule, a la capacité de se lier, dans certaines conditions, à l'ARNm de p53 et ainsi de diminuer sa synthèse en empêchant la traduction de cet ARNm.[366] D'avantage d'investigations nous fourniront sans doute une meilleur visibilité sur ce point, notamment en définissant précisément la nature des gènes impliqués dans l'expression de p53 induite par l'amiante, ou en déterminant les conséquences d'une interaction avec le virus SV40 dont l'antigène grand T est capable de lier et d'inactiver p53.

L'une des grandes cibles en aval de p53 est l'induction de p21. L'expression de p21 peut aussi être induite par des mécanismes indépendants de p53. La protéine p21 se lie à un grand nombre de cyclines et des kinases dépendantes des cyclines (CDK pour cyclin dependent kinases), et de ce fait, inhibant l'activité kinase de ces protéines, bloquent la progression du cycle cellulaire au niveau du point de contrôle en phase G1. [367] En effet, la prolifération cellulaire est contrôlée par l'expression de ces cyclines et CDK, qui sont activées et désactivées selon une séquence temporelle du cycle cellulaire. La surexpression de ces cyclines conduit à une stimulation continue du cycle cellulaire et une prolifération cellulaire accrue. La cycline D1 est un régulateur essentiel de la phase G1 et sa surexpression a été rapportée dans plusieurs lignées de cellules tumorales humaines, incluant notamment des

lignées de cellules mésothéliales. L'un des important inhibiteur de la croissance est p16 ; il s'agit d'un inhibiteur de la CDK-4, qui est mutée ou délétée dans un grande majorité des lignées cellulaires cancéreuses humaines, dont des cellules de mésothéliome malin. Ces données apportent des explications à l'activation autocrine d'au moins deux facteurs de croissance (PDGF et TGF- α), qui semble jouer un rôle non négligeable dans la prolifération autonome et incontrôlée des cellules mésothéliales malignes.

Alors que les mécanismes d'expression de p21 dépendant de p53 sont étroitement associés à des lésions de l'ADN, les mécanismes d'expression de p21 indépendant de p53 mettent en jeu une variété de voies incluant la sénescence, TGF β , et les ROS.[368-370] Le blocage de la prolifération des cellules alvéolaires de type II induite par l'hyperoxie semble liée à un mécanisme dépendant de p53.[371,372] Le rôle pathogénique de p53 et p21 dans la fibrose pulmonaire est évoquée par l'expression accrue de ces deux protéines dans l'épithélium bronchiolaire de patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique. D'autre part, l'expression de p21 induite par les fibres de chrysotile et de crocidolite dans les cellules mésothéliales provoque une pause dans la prolifération cellulaire.[363] Johnson et Jaramillo[370] notent que l'amiante crocidolite cause un arrêt du cycle de cellules A549, en corrélation avec l'expression de p53, p21, et GADD153. Une étude montre que l'expression accrue de p21 se manifeste dans 73% des carcinomes pulmonaires humains et avec une corrélation directe avec la survie à cinq ans, indépendamment du stade de la tumeur ou de l'expression de p53.[373]

Ces données soulignent la complexité de l'interaction entre p53 et p21 dans la pathogenèse des atteintes fibrotiques et tumorales pulmonaires. D'autres recherches sont nécessaires pour déterminer le rôle exact des radicaux libres issus de l'exposition des cellules à l'amiante dans l'altération de l'expression de p21 et la manifestation de ces conséquences sur la prolifération cellulaire. [374]

2.4.2.2. Mécanismes globaux responsables de la prolifération cellulaire

Les preuves expérimentales permettent de mettre en évidence quatre mécanismes potentiels de stimulation cellulaire en réponse aux fibres d'amiante: (i) la stimulation cellulaire compensatoire en réponse à la toxicité, (ii) la stimulation des voies intracellulaires de transduction du signal, (iii) la stimulation du cycle cellulaire et de la mitose, et (iv) l'induction de l'expression des facteurs de croissance et de leurs récepteurs. [68]

D'abord l'agression des cellules cibles a été démontrée à la surface du mésothélium pariétal après injection intra-péritonéale directe de fibres d'amiante (crocidolite) chez la souris. Ces agressions localisées de l'épithélium favoriseraient la translocation des fibres et des facteurs de croissance dans l'interstitium pulmonaire, soit après inhalation, soit après instillation intra-trachéale des fibres d'amiante. La prolifération cellulaire réactionnelle serait alors déclenchée dans ces zones d'agression localisée.

Un second mécanisme conduisant à la stimulation de la prolifération cellulaire par les fibres serait le déclenchement de voies de transduction intracellulaire du signal de prolifération. Quelques-unes des étapes biochimiques de cette voie sont communes aux fibres d'amiantes et aux autres promoteurs de tumeurs connus. Il y a une importante preuve expérimentale de cette action promotrice de tumeur de l'amiante, en particulier sur l'épithélium trachéo-bronchique. [159] Par exemple, B.T. Mossman a pu, dès 1991, mettre en évidence les événements suivants : expression accrue de l'ornithine décarboxylase, activation de la protéine kinase C, hydrolyse des phospholipides contenant de l'inositol et ces éléments semblent être initiés par les ROS [112] Depuis, les preuves venues renforcer cette hypothèses sont nombreuses

Un troisième mécanisme conduisant à la stimulation de la prolifération cellulaire est le déclenchement direct de la mitose en l'absence de toxicité cellulaire. Cette action exige soit la

liaison des fibres à la surface des cellules soit leur phagocytose. Il semble que ce mécanisme soit lié à l'instabilité génétique et à l'induction des proto-oncogènes c-fos et c-jun, la stabilisation/inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs, conduisant à la disparition du point de contrôle du cycle cellulaire en phase G1.

Enfin, les fibres d'amiante pourraient aussi déclencher la prolifération cellulaire en induisant l'expression des facteurs de croissance et de leurs récepteurs, activant ainsi la voie de croissance par stimulation autocrine. Le lien entre l'exposition à l'amiante et l'induction de l'expression de ces gènes, a longtemps été inconnu mais il semble qu'il s'agisse de la libération des ROS, responsable de l'activation des facteurs de transcription nucléaire et notamment du facteur NF- κ B.

Ces hypothèses reposent sur la nécessité d'une interaction directe avec ou de la phagocytose des fibres d'amiante par les cellules cibles de la prolifération. De façon alternative, un mécanisme indirect, n'exigeant pas un contact direct entre les fibres et les cellules cibles, conduisant à la libération de cytokines et de facteurs de croissance par les cellules inflammatoires est avancé par certains auteurs. [68] Cette deuxième hypothèse, qui n'exclut pas la première, sera détaillée dans le paragraphe suivant. En tout cas, rappelons que la stimulation de la prolifération cellulaire renforce l'instabilité génétique des cellules et multiplie ainsi les altérations génétiques et épigénétiques observées dans les cancers pulmonaires et les mésothéliomes. [112]

2.4.3. Hypothèse n°2 : réaction inflammatoire chronique

Les modèles animaux ont permis une meilleure compréhension de ces mécanismes. Plusieurs voies d'exposition ont été utilisées, comme l'instillation intra-trachéale ou l'inhalation, plus proche de la réalité de l'exposition chez l'homme.

2.4.3.1. Une inflammation en deux temps

Le dépôt de fibres d'amiante dans le territoire alvéolaire induit deux types de réponse qui se succèdent en deux temps : [68]

1. une alvéolite macrophagique caractérisée par un afflux de macrophages dans l'interstitium et l'espace alvéolaire. Les macrophages sont la cible cellulaire initiale des fibres et autres particules qui se déposent dans les poumons, les espaces péritonéaux et pleuraux. La phagocytose des fibres d'amiante est accompagnée de l'activation des macrophages, dont résulte une libération accrue de radicaux libres, de médiateurs pro-inflammatoires (cytokines et protéases) dont la quantité est proportionnelle au nombre de fibres déposées. Ces médiateurs chimiques amplifient la réaction inflammatoire locale.

2. cette inflammation est le préalable à l'installation progressive d'une fibrose dont le siège initial est péri-bronchiolaire. Les observations anatomopathologiques [375] suggèrent une extension de la fibrose à l'ensemble de l'interstitium, en rapport avec une migration des fibres vers les lobules périphériques sous-pleuraux.

Les mécanismes responsables de ces réactions inflammatoires, locales puis diffuses et chroniques, seront brièvement exposées dans les paragraphes suivants.

2.4.3.2. Le recrutement des cellules inflammatoires

Il a ainsi été montré que les dépôts de fibre d'amiante au niveau des canaux alvéolaires induisaient chez le rat, dans un délai de 12 à 24 heures, un afflux de macrophages alvéolaires. Cet afflux des macrophages au niveau des sites de déposition des fibres d'amiante est obtenu par l'intermédiaire de l'activation de facteurs chimiotactiques. Ainsi, au niveau de poumons, le facteur chimiotactique C5a (fraction du complément) semble jouer un rôle essentiel dans le recrutement des macrophages. [376] Les macrophages ainsi activés libèrent des agents chimiotactiques, telles que le leucotriène B₄, dérivé de l'acide arachidonique, qui favorise

l'afflux des neutrophiles ; mais aussi les interleukines IL-1 et IL-8, MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein 2) et le TNF- α (Tumor Necrosis Factor α). Ces cytokines qui favorisent la neutrophilie et la pérennisation de l'afflux macrophagique avec sécrétion de facteurs favorisant pro-inflammatoires et fibrosants (fibronectine-1 et Smooth Muscle Actin) [377] La stimulation directe par phagocytose des fibres ou indirecte par les cytokines déclenche la synthèse et la libération de médiateurs additionnels. Les polynucléaires neutrophiles et les macrophages libèrent, comme décrit auparavant, des espèces radicalaires dérivées de l'oxygène, responsable de lésions de l'ADN. Par ailleurs, des enzymes protéolytiques et hydrolytiques peuvent être libérés, atteignant la membrane basale et le tissu conjonctif des poumons. Des facteurs de croissance pour les fibroblastes et les cellules épithéliales (alvéolaires et pleurales), tels que *Transforming Growth Factor β* (TGF- β), l'*Insulin Growth Factor* (IGF-1) et le *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) sont aussi libérés.[377] La libération de ces médiateurs est une réponse non spécifique à l'agression pulmonaire ; malgré tout, il existe un équilibre entre ces cytokines et facteurs de croissance, qui restaurent normalement le poumon dans sa structure et sa physiologie originale. On suppose que c'est le déséquilibre entre ces médiateurs qui contribueraient aux effets pathologiques des fibres d'amiante. [378]

2.4.2.3. Effets biologiques de ces médiateurs inflammatoires.

La libération incontrôlée ou persistante de ces médiateurs inflammatoires peut conduire à des lésions tissulaires, avec fibrose, prolifération de cellules épithéliales et mésenchymateuses. En effet, les études animales ont permis de mettre en évidence les notions de susceptibilité individuelle et d'effet seuil (les expositions doivent être suffisantes pour entraîner des lésions) ainsi que le rôle aggravant de la poursuite des expositions sur les lésions

constituées. Les effets toxiques de l'amiante sont amplifiés par la présence de neutrophiles *in vitro*. Selon Rom, les lésions de l'épithélium alvéolaire et de la membrane basale sont particulièrement dangereuses car elle permet l'accès des fibres d'amiante et des cytokines à l'interstitium pulmonaire [376]

Concernant les données chez l'homme, les techniques de prélèvement du liquide de lavage broncho-alvéolaire ont permis de retrouver chez les personnes exposées aux fibres d'amiante une alvéolite macrophagique [376] ainsi qu'un afflux de polynucléaires (3 à 5% du total cellulaire) attribué à la production de leucotriène B4 par le macrophage alvéolaire. Inconstamment, une éosinophilie locale est observée. Une lymphocytose alvéolaire est observée chez 30% des patients avec une augmentation du rapport CD4/CD8. [378] Mais le pronostic et l'évolution clinique de ce sous groupe comparé à l'ensemble des personnes exposées sont actuellement inconnus [379] Le lymphocyte T semble jouer également un rôle important pour ses effets essentiellement inhibiteurs sur la fibrose par l'intermédiaire de la production d'interféron γ . [380]

La fibrose pulmonaire est fréquemment accompagnée d'une prolifération des cellules alvéolaire de type II [380]. La relation entre prolifération cellulaire épithéliale subie, la fibrose pulmonaire interstitielle diffuse et le carcinome bronchique reste pourtant controversée. La prolifération des cellules mésothéliales, en particulier de la plèvre viscérale, est aussi une réponse précoce à l'instillation intra-trachéale de fibres d'amiante. Pourtant, à ce moment précoce de la période d'exposition ou de post-exposition, aucune fibre n'a pu être observée dans la plèvre viscérale et la prolifération cellulaire semble donc être indirectement liée à l'action de cytokines et des facteurs de croissance libérés par les macrophages interstitiels. [381] La relation entre libération chronique ou persistante de ces cytokines et facteurs de croissance, prolifération chronique des cellules mésothéliales et développement de mésothéliome malin n'est cependant toujours pas établie.

Les études expérimentales animales ou sur les modèles cellulaires ainsi que les analyses de liquides de lavage bronchoalvéolaire de patient atteints de fibrose asbestosique ont permis une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la fibrose. Les effets, parfois contradictoires, de certaines cellules et de certaines cytokines, avec des effets tantôt pro-fibrosants, tantôt protecteurs, montrent la complexité extrême de ces mécanismes et la nécessité de poursuivre les études pour compléter la connaissance de ce processus inflammatoire.

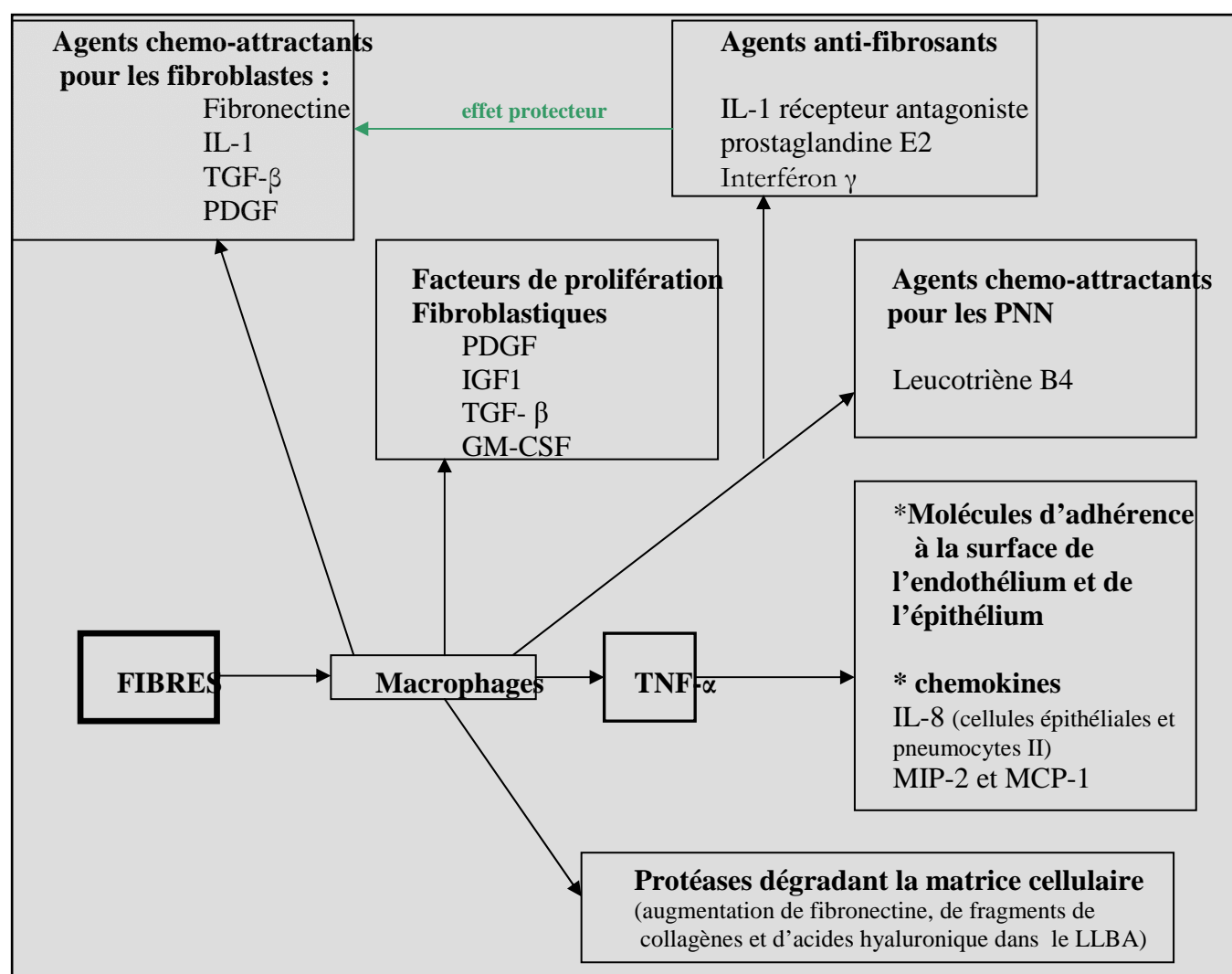


Fig. 71 : Représentation schématique de la réponse inflammatoire aux fibres.

PNN : polynucléaire neutrophiles, LLBA : liquide de lavage broncho-alvéolaire ; MIP-2 : macrophage inflammatory protein ; MCP-1 : monocyte chemotactic peptide

Liu a démontré que des souris hétérozygotes C57BL/6–129, dont les gènes codant pour les deux récepteurs 55kd et 75kd du TNF- α sont « désactivés », sont incapables de développer une réaction fibro-proliférative après exposition à l’amiante. Ces données supportent l’hypothèse selon laquelle le TNF- α jouerait un rôle majeur dans le déclenchement de la fibrose interstitielle pulmonaire. Même si l’expression du gène codant pour le TNF- α et la production de cette protéine était augmentée dans les poumons de souris hétérozygotes exposées à l’amiante, le manque de récepteur protège ces souris du développement de cette fibrose. L’expression des gènes codant pour le TGF- α (transforming growth factor) et la chaîne A du PDGF (platelet-derived growth factor) est réduite dans les cellules de souris hétérozygotes par rapport aux animaux-contrôles, ce qui confirme que le TNF- α génère cet effet fibro-prolifératif au travers de l’activation d’autres facteurs tels que TGF- α et PDGF qui contrôlent la croissance cellulaire et la production de matrice extracellulaire. [382]

Dans les poumons et la plèvre, l’inflammation chronique et la fibrose sont des réactions courantes à l’exposition à des fibres d’amiante. Une question mécanistique importante reste sans réponse convaincante : y a-t-il des liens entre inflammation, fibrose et cancer induits par les fibres ?

2.5. Discussion : des connaissances très hypothétiques

2.5.1. Synthèse des hypothèses mécanistiques de cancérogenèse

A ce stade du développement, nous pouvons dans la figure ci-dessous tenter de faire une synthèse des différentes hypothèses permettant d’expliquer le mécanisme d’action cancérigènes des fibres d’amiante. Cependant, cette synthèse ne saurait être exhaustive, et il

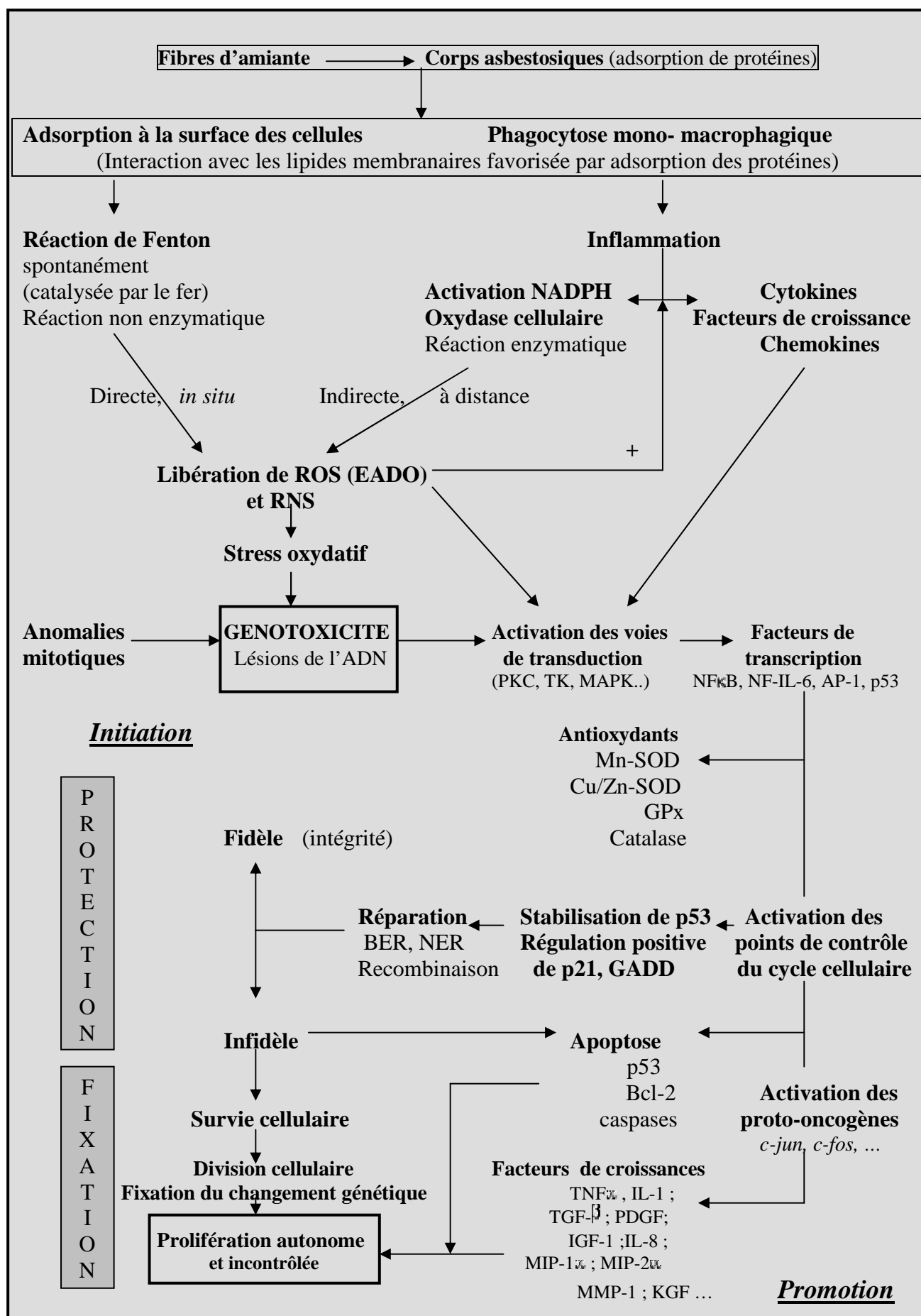
convient de garder en tête la complexité de chacune des étapes décrites dans les pages précédentes.

Le mécanisme le plus souvent mis en avant est celui de la formation d'EADO (ou ROS). Un second mécanisme repose sur l'altération de la ploïdie de certaines cellules.

Les fibres qui se déposent dans le poumon sont susceptibles d'interagir localement, et après migration, avec les macromolécules (protéines, phospholipides), et d'être internalisées par les cellules (macrophages, cellules bronchiques alvéolaires, cellules mésothéliales). Il en résulte un stress oxydatif associé à une phagocytose par les macrophages et les cellules épithéliales. Pour certaines cellules, une activation de la PKC et d'autres cascades de signalisation déclenchent un signal en réponse à l'interaction fibres-cellules. Les oxydants et les facteurs clastogènes susceptibles d'être produits au cours de ces réactions provoquent alors différentes réponses, dont l'endommagement de l'ADN et l'activation de facteurs de transcriptions (NF κ B, AP-1...). Il résulte de l'endommagement du génome l'activation des systèmes de réparation et, pour les cellules en cycle, un déclenchement des systèmes activant les points de contrôle du cycle cellulaire.

Abréviations de la figure de synthèse ci-dessous

ROS = reactive oxygen species; RNS = reactive nitrogen species; H₂O₂ = Péroxyde d'hydrogène; O₂⁻ = anion superoxide; HO[•] = radical hydroxyle; [•]NO = oxide nitrique; [•]ONOO = peroxynitrite; ADN = acide désoxyribonuclease; MAPK = mitogen activated protein kinase; PKC = protéine kinase C; TK = tyrosine kinase; FAK = focal adhesion kinase; I κ B = inhibitory protein kappa-B; NF κ B = nuclear factor kappa-B; AP-1 = activated protein-1; Mn-SOD = manganese-SOD; Cu/Zn-SOD = cuivre/zinc-SOD; GPx = glutathione peroxidase; TNF α = tumour necrosis factor α ; IL-1 = interleukin 1; TGF- β = transforming growth factor β ; PDGF = platelet derived growth factor; IGF-1 = insulin-like growth factor 1; IL-8 = interleukin 8; MIP-1 α = macrophage inflammatory protein 1 α ; MIP-2 α = macrophage inflammatory protein 2 α ; MMP-1 = matrix métalloproteinase 1; KGF = keratinocyte growth factor.



La stimulation de la réparation de l'ADN et l'arrêt du cycle cellulaire seront mis à profit par les cellules pour restaurer l'intégrité de leur matériel génétique, mais le maintien de cette intégrité dépendra de la qualité et de l'efficacité de la réparation. L'émergence de cellules qui ont échappé au contrôle ou à la réparation sera un élément capital dans la progression néoplasique. L'autre mécanisme suggéré comme capital repose sur des études cytogénétiques qui ont démontré la présence d'anomalies chromosomiques (aneuploïdie, anomalies chromosomiques..) dans les cellules en mitose exposées aux fibres d'amiante, résultant de l'interaction des fibres de grande taille avec les organites cellulaires et de l'entrave à la dynamique cellulaire pendant la mitose. Les effets toxiques et génotoxiques des fibres dépendront non seulement des interactions directes cellules-fibres, mais également de facteurs produits au cours de ce processus. Dans ce domaine, les facteurs chimiotactiques pour les cellules inflammatoires, les facteurs de croissance susceptible de produire à leur tour un stress oxydatif et d'entretenir la prolifération des cellules cibles sont des éléments à prendre en compte.

2.5.2. Propriétés et activité biologique des fibres : questions sans réponses

2.5.2.1. Synthèse

Certaines propriétés physiques et chimiques sont importantes pour rendre compte du potentiel toxique des fibres.

☞ *Forme et dimension*

En raison de leur forme, des fibres de plusieurs dizaines de micromètres de longueur peuvent pénétrer dans les voies aériennes par inhalation. La structure fibreuse augmente le

potentiel inflammatoire, cytotoxique et cancérigène en comparaison de la structure granulaire. [384-385] Cette notion de potentiel toxique lié à la structure fibreuse est particulièrement bien illustrée par l'exemple de la trémolite. Cette amphibole existe sous forme fibreuse et non fibreuse. Seule la forme fibreuse induit des mésothéliome chez le rat. [385]

Schématiquement, les fibres les plus longues et les plus fines induisent le plus grand nombre de tumeurs. Dès 1977, Stanton [386], en implantant des fibres dans la cavité pleurales de rats, trouve une relation entre la probabilité de survenue de tumeurs et la proportion de fibres longues ($>8\mu\text{m}$) et fines ($<0,5\mu\text{m}$). En 1989, Pott démontre l'importance du paramètre longueur dans la cancérogenèse péritonéale. [387] Même si cette conclusion a donné lieu à un débat, par exemple par Dunnigam en 1984 [388], les mécanismes responsables de cet accroissement du risque peut être expliqué par les hypothèses suivantes :

- le paramètre dimension conditionne certes la pénétration et la migration dans le tractus respiratoire mais aussi les mécanismes toxiques.

- cette toxicité résulte d'une part de leur plus grande difficulté à être épurée (par phagocytose et clairance muco-ciliaire), d'autre part par interférence avec des composant du cytosquelette induisant une perturbation de la division cellulaire [389]

➡ *Composition chimique et réactivité de surface*

Les différences de composition chimique des fibres vont conditionner leur vitesse de dissolution et leur réactivité de surface. Leur contenu en fer ferreux va notamment, lors du processus de dissolution (épuration), conduire à la libération de métabolites actifs de l'oxygène à l'origine d'une importante agression oxydante.

Les propriétés d'adsorption des fibres sont un autre aspect de leur réactivité de surface. En effet, elles peuvent adsorber les protéines, les phospholipides membranaires et l'ADN et

ainsi, ces macromolécules biologiques dans l'environnement proche des fibres, sont la cible idéale des métabolites oxydants libérés. [390]

🔄 *Biopersistance*

La durabilité est une des caractéristiques des fibres commercialisées. Elles est évaluée par des essais de dissolution *in vitro*. La biopersistance décrit la rétention des fibres dans le tractus respiratoire. Ce processus complexe dépend de facteurs environnementaux locaux, intra- et extracellulaires, incluant des mécanisme de clairance mécanique (muco-ciliaire), de dissolution et de phagocytose. [68] Les fibres de chrysotile sont susceptibles au cours de la dissolution de se désintégrer en micro-fibrilles, d'où un accroissement du nombre de fibres, mais conduisant à une réduction de leur dimension et une amélioration de la clairance. [68] Les amphiboles persistent plus longtemps que les fibres de chrysotile. [79]

Paramètres influant....sur...	Impact	Paragraphe
Forme et dimension	la pénétration	Toxicocinétique	2.2.1
	la migration, épuration	Toxicocinétique	2.2.2
	la division cellulaire	Toxicodynamique	2.3.2
Composition chimique	la réactivité de surface	Toxicodynamique	2.3.1
	la dissolution	Toxicocinétique	2. 2.3

Table 13 (bis) : Principales propriétés responsable de l'activité des fibres et leurs cibles.

(Tableau de synthèse, rappel)

2.5.2.2. Etudes de la biopersistance d'autres fibres [391-393]

☞ 1) Une revue des données avant 1999

En 1994, Hesterberg et coll. ont montré que la structure et la composition chimique des fibres minérales synthétiques était très altérée après un dépôt chronique dans les poumons de rats. [420] A l'inverse, les fibres céramiques réfractaires semblent beaucoup moins altérées chez les rats et hamster. [421] D'autres fibres, telles les wollastonites ont montré une très courte demi-vie après inhalation unique [422]. Selon Sébastien [423], les fibres de verre seraient plus facilement éliminées que l'amiante (y compris les serpentines).

☞ 2) Une étude expérimentale de 1999 : des données rassurantes [391]

• Objectifs

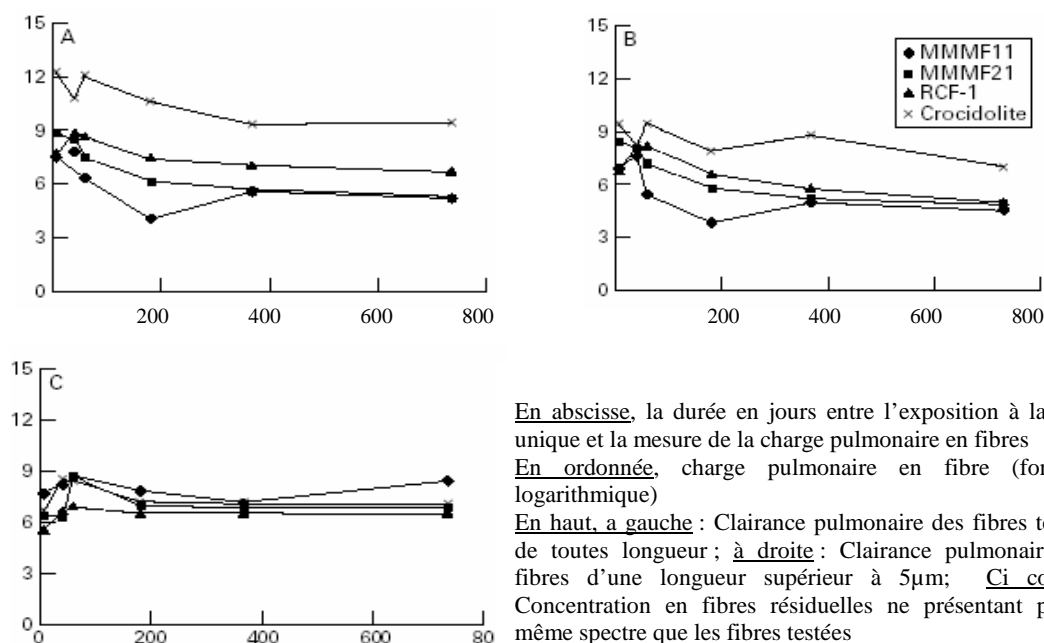
Cette étude expérimentale, menée à long terme *in vivo*, a trois objectifs: le premier est de comparer la clairance de fibres minérales synthétiques vitreuses (MMMFs Minéral Man Made Fibres) - une laine de verre (MMMF11), une laine de roche (MMMF21), une fibre céramique à base de kaolin (RCF-1) - avec des fibre d'amiante (crocidolite), témoin de contrôle. Le second était d'établir le caractère pathogène de ces fibres à des doses connues pour induire une fibrose de grade 1 avec le crocidolite. Le troisième objectif était enfin de tester l'hypothèse selon laquelle ces fibres ne pouvaient persister dans le tissu pulmonaire en comparant la nature chimique et morphologique des fibres résiduelles. Pour cela, une dose unique de chaque type de fibre est administrée à des moutons (dont la taille des poumons est proche de celles des hommes, contrairement aux modèles rat et hamster) et les fibres résiduelles sont extraites, à des dates variables et définies, du parenchyme pulmonaire et

analysées par microscopie électronique à transmission (MET) couplée à une méthode spectroscopique.

• Résultats

Les manifestations pathologiques induites par l'exposition aux fibres consistent en une réaction inflammatoire de l'interstitium alvéolaire, qui régresse significativement dans tous les groupes, et les fibres de crocidolite induisent des lésions péri-bronchiolaires. Ceci suggère qu'aucun phénomène pathologique n'a pu compromettre la clairance pulmonaire des fibres ainsi estimée

Les concentrations de MMMF11, MMMF21, RCF-1, et des fibres de crocidolite décroît en fonction du temps selon deux phase, l'une lente et l'autre rapide. Pour ces quatre types de fibre, il existe une différence significative de la charge pulmonaire en fonction du temps. ($p < 0,001$) (cf. Fig.72.)



En abscisse, la durée en jours entre l'exposition à la dose unique et la mesure de la charge pulmonaire en fibres

En ordonnée, charge pulmonaire en fibre (fonction logarithmique)

En haut, à gauche : Clairance pulmonaire des fibres testées de toutes longueur ; à droite : Clairance pulmonaire des fibres d'une longueur supérieur à 5μm ; Ci contre : Concentration en fibres résiduelles ne présentant pas le même spectre que les fibres testées

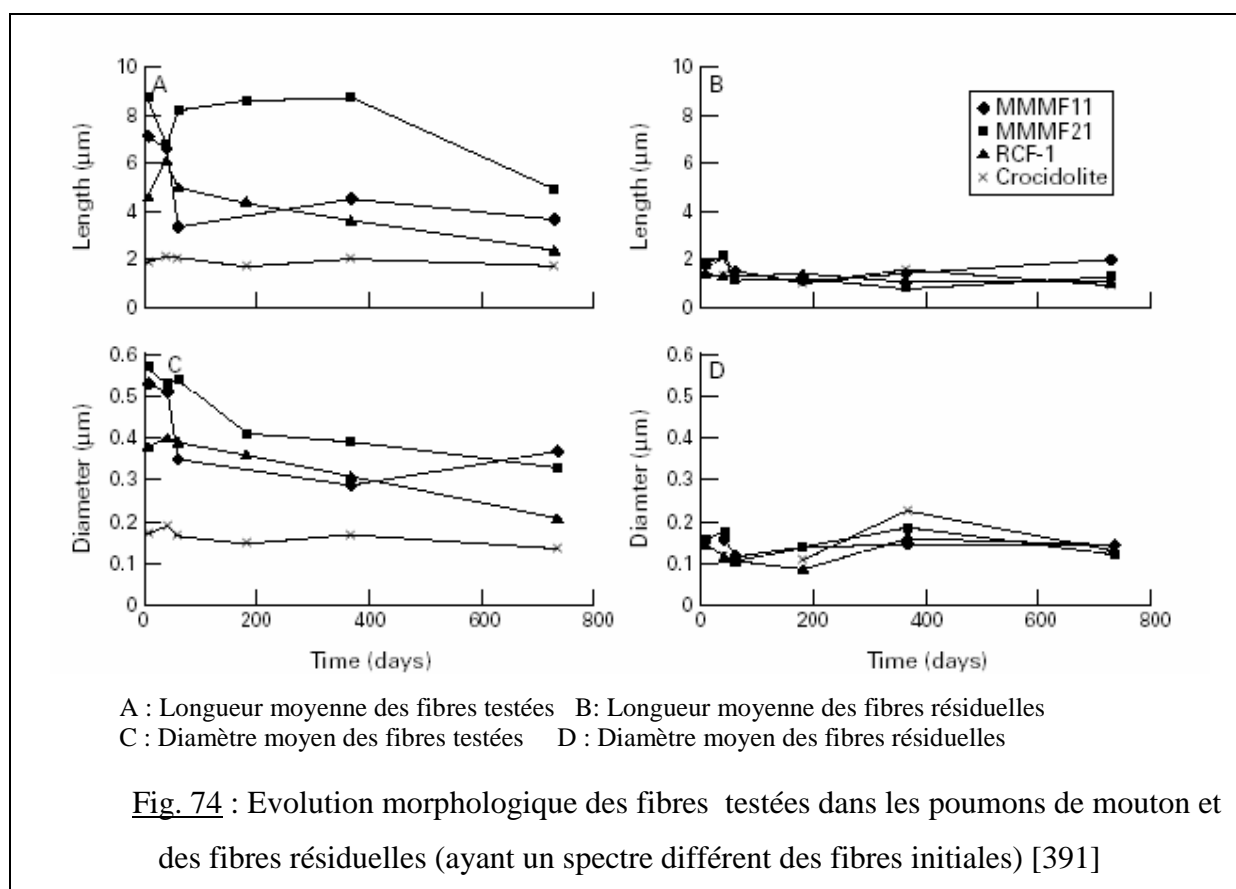
Fig. 72 : Clairance pulmonaire des fibres testées *in vivo* et à long terme[391]

La table ci-dessous montre les demi-vies des chacune des deux phases de l'élimination des fibres testées.

Types de fibre	Fibres de toute longueur		Fibres de longueur >5µm	
	T1/2 phase rapide (jours)	T1/2 phase lente (jours)	T1/2 phase rapide (jours)	T1/2 phase lente (jours)
MMF 11	33	462	31	572
MMF 21	45	433	45	517
RCF 1	67	537	61	254
Crocidolite	69	401	93	340

Fig. 73 : Demi vie d'élimination pulmonaire chez les moutons des fibres testées [391]

Le diamètre des fibres MMMFs décroît au court du temps, alors que les fibres de crocidolite ne montre aucun changement. La figure 25 montre l'évolution du diamètre moyen et de la longueur moyenne des fibres testées et des fibres résiduelles. L'étude statistique montre une différence significative du diamètre des fibres en fonction du temps ($p=0,037$) et du type de fibres ($p<0,001$).



Des corps asbestosiques apparaissent chez les 40 moutons pour lesquels la latence est de 2 ans. Lors d'une exposition aux fibres synthétiques MMMFs, il n'a pas été retrouvé de corps asbestosiques typiques. La concentration moyenne des corps asbestosiques dans le groupe des moutons exposés aux fibres de crocidolite était de 2421 corps/ gramme de tissu pulmonaire (l'intervalle de confiance à 95% a pour limites 385 et 15260)

- Conclusion

Le nombre de fibres initialement déposées décroît en fonction du temps avec une courbe montrant deux vitesses d'élimination, correspondant à deux phases successives, l'une lente et l'autre rapide. MMMF11 et MMMF21 (laines de verre et de roche) ont la même clairance, plus rapide que celles de RCF-1 (fibre céramique) et des fibres de crocidolite. La moyenne géométrique du diamètre et la longueur des fibres MMMF diminuent avec le temps, ce qui n'est pas le cas pour les fibres de crocidolite. Après 2 ans de présence dans les poumons des moutons, il n'est trouvé aucun corps asbestosiques dans les groupes exposés aux fibres synthétiques MMMF, mais ils étaient significativement présents dans le groupe exposé aux fibres d'amiante. Les données sur les fibres résiduelles semblent confirmer l'hypothèse d'une clairance par des mécanismes de dissolution et de translocation, mécanismes qui sont plus rapides pour les 3 fibres synthétiques étudiées que pour les fibres d'amiante (crocidolite). [391]

➤ Les fibres organiques d'aramide [392]

Dans un modèle classique de solubilité *in vitro*, en milieu de Gamble à 37°C, les fibres de KEVLAR (para-aramide), comme les fibres de carbone, apparaissent plus résistantes que les fibres minérales testées. [393] Malgré cette relative insolubilité observée sur ces modèles *in vitro*, des études d'inhalation chez le rat ont récemment comparé la biopersistance des fibres de para-aramide à celle de l'amiante et ont mis en évidence que les fibrilles de p-aramide (les seuls respirables, cf. ci-dessous) sont moins biopersistantes que les fibres

d'amiante. [392] Ces études sont en faveur d'une rétention limitées de ces fibres dans le poumon de rat.

Table 16 : La solution de Gamble : [391]

Elle présente une composition similaire à celle des liquides physiologiques pulmonaires (sans les composants organiques).

Composition chimique	Concentration en g/l
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,212
NaCl	6,171
KCl	0,311
Na ₂ HPO ₄	0,148
Na ₂ SO ₄	0,079
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,255
NaCH ₃ COO.3H ₂ O	1,065
NaHCO ₃	2,571

2.5.2.3. Questions sans réponses

Dans les études chez l'animal par inhalation, et chez les hommes exposés aux fibres, la dimension est un paramètre critique. Mais les dimensions des fibres inhalables varient entre l'homme et les différentes espèces, et cette variation doit être considérée dans l'interprétation des études *in vivo* menées chez l'animal. [68]. D'autre part, Le diamètre nominal des fibres n'est pas un critère suffisant dans l'étude des paramètres pouvant expliquer la toxicité des fibres. Par exemple, dans le cas des fibres de para-aramide, dont l'étude granulométrique révèle un diamètre nominal trop élevé pour que les fibres brutes puissent être respirables, c'est-à-dire pour atteindre le poumon profond, des études plus approfondies ont montré qu'elles pouvaient donner naissance en surface à des fibrilles fines du fait de la faiblesse des interactions entre les chaînes moléculaires. Les fibrilles peuvent alors se détacher lors des opérations d'usinage et, du fait de leurs caractéristiques dimensionnelles, être facilement respirable. [392]

Les propriétés d'adsorption de la surface des fibres pourraient aussi permettre la rétention des molécules endogènes mais aussi exogènes, notamment de composés cancérogènes tels les composés de la fumée de cigarette.

Enfin, la notion de biopersistance est donc un facteur clé qui doit être connu dans l'interprétation des tests à court terme pour prédire la pathogénicité des fibres. La modification des propriétés physico-chimiques des fibres pourrait modifier leur biopersistance et réactivité biologique. Cependant, certaines mises en garde doivent être soulevées contre cette généralisation.

- d'abord, certains sites semblent concentrer les fibres et constituer des « points chauds » de persistance prolongée, sous-estimée par les études mesurant la quantité de fibres hors de ces points-critiques. Ce sont : les sites de drainage lymphatique du feuillet pariétal de la plèvre ; les bifurcations des voies aériennes ; et les zones de fibrose.

- ensuite, différentes variétés de fibres (ou de fibres modifiées, partiellement dégradées) sont susceptibles d'altérer la migration des macrophages et la translocation des autres fibres dans le système de drainage lymphatique, modifiant ainsi la clairance des fibres.

Il est donc nécessaire de prendre en considération ces éléments dans l'interprétation des quantités de fibre mesurées dans les poumons. [201]

Finalement, il reste des questions sans réponses :

- Jusqu'où peut-on utiliser les propriétés physico-chimiques des fibres pour prédire de leur potentiel cancérogène ? Actuellement, la dimension et la durabilité sont reconnues comme des paramètres essentiels. Y a-t-il d'autres paramètres essentiels dont il faut tenir compte ?

- La biopersistance des fibres mesurées par des études chez les animaux reflète-t-elle bien la biopersistance de ces fibres chez l'homme ? Quelle est la valeur des modèles utilisés ?

- La charge en fibre du poumon entier donne-t-elle une estimation exacte du dépôt des fibres, ou bien y a-t-il des zones localisées de rétention des fibres qui seraient mieux en corrélation avec le développement de cancer broncho-pulmonaire ou de mésothéliome ?

2.5.3. Activité de co-cancérigène ou support de co-cancérigènes

Un autre point de discussion de la théorie reposant sur les hypothèses décrites ci-dessus et faisant de l'amiante un cancérigènes complet, initiateur et promoteur des tumeur, est la possibilité que l'amiante agisse comme un co-cancérigène. Nous allons évoquer dans cette partie les éléments qui pourraient permettre de conclure à cette hypothèse nouvelle.

2.5.3.1. Amiante et Tabac

☛ Quel modèle pour l'interaction?

En 1977, Saracci [394] passe en revue cinq études et conclue que le modèle multiplicatif est plus plausible que le modèle additif, alors que les données ne permettent pas de faire une discrimination définitive de l'un ou l'autre de ces deux modèles. Plus tard, Berry *et al* [39-] suggèrent que le risque relatif de cancer du poumon pour l'amiante serait six fois plus important pour les non-fumeurs que pour les fumeurs, mais notait « l'imprécision de ce résultat à cause de probables biais et de la variation des échantillons ».

Steenland et Thun [395] en 1986, considèrent que seules quatre études [396-399] fournissaient suffisamment d'informations pour évaluer l'interaction et que les données sont contradictoires. Une mise à jour de Saracci en 1987 qui considère les données de 11 études qualifie l'interaction sur un mode « plus que multiplicatif », lorsque le risque pour les fumeurs exposés à l'amiante était au moins 25% plus important que prévu par le modèle multiplicatif, à un autre mode « moins qu'additif », lorsqu'il était n'atteignait que 75% de ce que permettait de prévoir le modèle additif, le tout en fonction de la classification adoptée et des scores attribués aux échantillons. Il fut noté que “un modèle d'interaction quelque peu variable était observée entre l'amiante et le tabac”, ce qui fut confirmé plus tard par Saracci et Boffetta [400] et par Vainio et Boffetta [401].

Cependant, une revue de Lee montre clairement que l'exposition à l'amiante accroît le risque de cancer du poumon chez les non-fumeurs et que la relation entre amiante et tabagisme est mieux décrite par un modèle multiplicatif que par un modèle additif. Le risque accru par le tabagisme varie en fonction de la quantité de cigarettes fumées, de la durée du tabagisme, de l'inhalation des fumées, du produit fumé et de la définition donnée au dénominateur « non fumeur ». Le risque accru par l'amiante dépend aussi de nombreux facteurs, non seulement l'importance et la durée de l'exposition, mais aussi le type d'amiante et la nature de l'exposition. Cette notion explique alors pourquoi l'accroissement du risque pour certains groupes de travailleurs est plus élevé que pour d'autres, alors que des différences dans les expositions professionnelles aux cancérigènes peuvent se manifester. [402]

Selon les données de Hammond *et al*, [403] avec un accroissement du risque de cancer du poumon multiplié par 5 pour l'amiante et par 10 pour le tabac parmi les travailleurs exposés à l'amiante qui fument, 90% des cancers pourraient avoir été évités s'ils n'avaient pas fumé et 80% s'il n'avaient pas été exposés à l'amiante.

➔ Comment peut-on expliquer cette interaction ?

Les études sur cultures cellulaires et modèles animaux apportent les preuves que l'amiante accroît distribution vers l'épithélium bronchique de nombreux composés cancérigènes de la fumée de cigarette et leur activation métabolique. La fumée de cigarette ralentit les mouvements ciliaires et retarde la clairance des fibres et des autres particules. Les fibres d'amiante (crocidolite et chrysotile) renforcent l'activation métabolique du benzo[a]pyrène dans les cellules épithéliales trachéales de hamster [404] Sur la base des observations expérimentales, on peut émettre l'hypothèse que la tabac et l'amiante peuvent agir comme co-cancérigènes comme résumé dans la figure 75.[405]

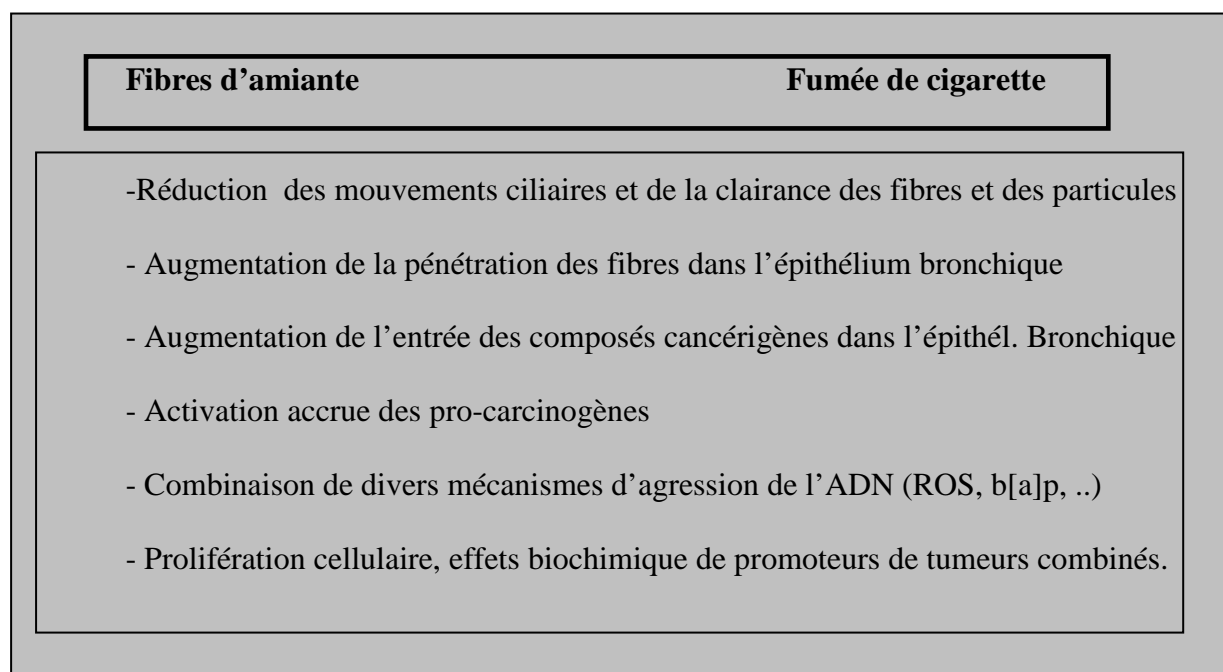


Fig. 75 Action co-cancérigène hypothétique de l'amiante et de la fumée de cigarette.[405]

2.5.3.2. Amiante et Interactions avec les poussières

Les sujets sont couramment exposés à des mélanges de poussières fibreuses ou non, même en environnement non professionnel, et les fibres artificielles sont aussi le mélange de

matériaux fibreux et non-fibreux. La toxicité des particules contenant du quartz est bien connue, mais on ne connaît que peu de chose sur les effets potentiellement synergiques ou additifs entre les fibres et les poussières non fibreuses moins toxiques. L'exposition de rongeurs à des mélanges de poussières par inhalation conduit, selon Oberdorster [378] à un transport accru des fibres jusqu'à la plèvre viscérale et à accroissement des tumeurs pulmonaires et des mésothéliomes. Ces expérimentations sur les rongeurs nécessitent de répondre aux questions suivantes : l'inhalation de mélange de poussières fibreuses et non fibreuses endommage-t-elle la clairance des fibres chez le rat ? Ce mécanisme est-il pertinent chez l'homme ?

2.5.3.3. Théorie de la transfection d'ADN exogène par le virus SV40

☛ Mésothéliome et virus SV40 : une relation étrange....

En 1993, une étude rapporte que des hamsters exposés à une souche sauvage du virus SV40 par voie intra-pleurale ont développé dans 100% des cas des mésothéliomes pleuraux. Les animaux exposés par voie intracardiaque ou par voie intra-péritonéale ont développé des mésothéliomes dans 60% des cas. [406] Aux Etats-Unis, des travaux ont montré que certains cas de mésothéliomes présentaient des séquences d'ADN similaires à celles trouvées dans l'ADN du virus de singe SV 40 [407,408] Ainsi, des séquences d'ADN similaires à celles codant pour la protéine Grand T du virus SV 40 ont été observées dans 60% des 48 cas de mésothéliomes étudiés par Carbone et coll. [407] La majorité des patients avaient été exposés à l'amiante. Ces auteurs suggèrent donc une possible synergie entre exposition à l'amiante et une contamination par ce virus oncogène. Une étude française a montré la présence d'ADN « SV 40-like » dans les prélèvements tumoraux (cancers broncho-pulmonaires et mésothéliomes), mais également dans les prélèvements pulmonaires non tumoraux. Les

auteurs concluent donc que la présence de ces séquences d'ADN « SV40-like » n'est pas spécifique du cancer mais peut constituer un élément indispensable. [409]

L'expression de la séquence d'ADN SV40-like a été retrouvée dans certains types de tumeurs humaines. C'est le cas notamment des tumeurs de l'épididyme, des tumeurs des plexus choroïdes, de mésothéliomes malins et de certaines tumeurs osseuses. Cependant, les études épidémiologiques réalisées à ce jour n'ont pas montré de différence significative dans l'incidence de ces tumeurs entre les groupes de patients vaccinés par les premiers lots de vaccins contaminés par le virus SV40 et les groupes de patients vaccinés ultérieurement par des vaccins non contaminés. Il convient donc de rester prudent quant au rôle réel de ces virus dans la genèse de ces tumeurs.

➤ Origine de la contamination

L'origine de la contamination humaine par ce virus d'origine simienne reste à ce jour très controversée. Certains auteurs avancent l'hypothèse selon laquelle cette contamination aurait pu résulter de la vaccination antipoliomyélitique par un vaccin injectable Salk préparé à partir de cellules rénales de singe et utilisée dans les années 1956 à 1963 aux Etats-Unis. [410] Cependant, la présence d'anticorps réagissant avec le virus SV40 a été retrouvée dans près de 5 à 20% des échantillons de sérum humains prélevés avant l'introduction de ce vaccin ou chez des personnes non vaccinées. Ces résultats suggèrent donc l'existence d'agent SV40-like présents dans la population avant l'introduction de ce vaccin. [411]

L'expression « SV40-like » signifie soit que le virus a été identifié comme tel soit qu'il s'agit d'un virus « SV40-like » avec une séquence virale proche de SV40. Il pourrait alors s'agir soit du virus SV40 lui-même soit d'un virus recombiné, soit d'un virus humain proche de SV40.

➤ Une hypothèse supplémentaire? [412]

A l'occasion d'une rencontre internationale, [411] en 1997, les spécialistes du sujet avaient convenu de la nécessité de confirmer, de façon collégiale et à l'aide de techniques de biologies moléculaires standardisées, la présence de séquence d'ADN SV40-like dans les tissus humains et de déterminer si ces séquences sont soit intégrées dans l'ADN cellulaire soit présentes de manière indépendante.

1) SV40 et cellules mésothéliales: intégration de l'ADN dans le génome cellulaire

Les virus oncogènes à ADN ont évolués pour se répliquer, non pour causer des tumeurs chez leurs hôtes, indispensables. Leur action cancérigène dépend du blocage du cycle viral et de leur capacité à infecter des cellules prolifératives de manière latente pour échapper au système immunitaire. Les papovavirus et adénovirus potentiellement cancérigènes stimulent la synthèse d'ADN de la cellule hôte. L'induction d'une phase S semble essentielle pour l'intégration du génome viral dans le génome cellulaire. L'induction de la prolifération cellulaire hôte en est une conséquence secondaire. Dans les conditions normales, le risque de croissance maligne est compensé par le déclenchement virus oncogène-dépendant de l'apoptose, par exemple, par la voie ARF-p53 et/ou la réponse immunitaire de l'hôte. Les réponses de rejet sont préférentiellement dirigées contre le complexe CMH de classe I-peptides antigéniques de protéines virale.

L'évolution convergente a doué plusieurs virus oncogènes à ADN, tels que le virus simien SV40, les papillomavirus humains associés à des cancer, et les adénovirus oncogènes, de l'aptitude à cibler les protéines cellulaires p53 et pRb (rétinoblastome). Les papillomavirus et les adénovirus utilisent tous les deux des protéines de latence et transformantes à ces fins,

alors que pour le virus SV40 deux domaines différents de la seule protéine grand T peuvent accomplir cette double fonction. Ceci conduit à l'inactivation non seulement de l'arrêt du cycle cellulaire dépendant de la protéine pRb mais encore des mécanismes apoptotiques dépendant de p53.

Les fibroblastes humains (HF) peuvent être transformé mais uniquement dans de faibles proportions. Ceci est confirmé dans une publication de Bocchetta *et al.* [413] Dans cette même publication, il est également, pour la première fois, rapporté que l'interaction du virus avec les cellules mésothéliales humaines (HM) est non-lytique et latente. Ceci conduit à la synthèse de l'antigène grand T dans 100% des cellules. Bocchetta *et al.* attribuent les hautes sensibilité et transformabilité des cellules HM à leur haut niveau de p53 comparativement aux cellules FH. Cette hypothèse est supportée par des essais d'inhibition. La séquence d'ARN antisense de p53 (qui neutralise l'ARNm de p53) augmente la réplication du virus et induit la lyse des cellules HM infectées par SV40.

2) Rôle co-cancérigène de l'amiante

L'exposition à l'amiante montre une étroite association épidémiologique avec des mésothéliomes malins. Bocchetta *et al.* ont alors testé les effets des fibres d'amiantes sur leurs systèmes HM *in vitro*. L'amiante crocidolite cause un accroissement modéré de la fréquence des foyers de HF et de HM, dans les cellules transfectées trois jours plus tôt par les plasmides portant les antigènes grand et petit T (T+t+). Les plasmides T+t- n'induisent pas de foyer HM ou HF mais l'addition d'amiante assure la formation de foyers, en augmentant l'efficacité des plasmides T+t- à des niveaux presque comparables à ceux des plasmides doubles positif (T+t+).

De façon intéressante, les effets relativement peu contributifs de l'amiante à la transformation *in vitro* peut difficilement rendre compte de l'induction des mésothéliomes *in vivo*. Bocchetta *et al.* suggèrent que l'amiante pourrait aussi agir par immunosuppression, ou alternativement ou supplémentairement, que la production de ROS par les macrophages activés par l'amiante pourrait jouer un rôle co-cancérigène. Les deux possibilités sont parfaitement concevables. Les tumeurs induites par SV40 sont très immunogènes chez les rongeurs. Chez les souris et les rats, ces tumeurs se développent rarement, à moins que l'hôte ne soit immunodéficient. Chez les hamsters, elles peuvent passer outre la réponse de rejet, particulièrement chez les animaux inoculés très jeunes. Le développement des tumeurs peut être prévenu par une vaccination préventive, administrée durant la période de latence. Une analyse prochaine du rôle potentiellement immunosuppresseur de l'amiante dans les mésothéliomes humains est par conséquent d'importance à la fois analytique et possiblement immuno-thérapeutique.

D'autre part, le rôle des changements génétiques induits par l'amiante, en temps que requis supplémentaire à la transformation maligne des cellules mésothéliales, induite par le virus SV40, est une autre hypothèse intéressante. Les travaux récents de Hahn *et al.* [413] peuvent être révélateurs dans ce contexte. Ils ont montré que les cellules HF et épithéliales peuvent être transformées et devenir tumorigènes après transfection combinée de la protéine grand T de SV40, de la protéine oncogène H-ras et de la sous unité catalytique de la télomérase. Partant du principe que protéine grand T de SV40 inhibe les deux protéines pRb et p53, Hahn *et al.* suggèrent qu'un minimum de quatre voies de signalisation doivent être affectées pour transformer une cellule humaine normale. Il ne serait pas surprenant que les cellules HM transformées par SV40 de Bocchetta *et al.* nécessitent encore, pour devenir tumorigène, l'action proliférative d'un oncogène proche de H-ras et que l'amiante augmente la probabilité d'un tel changement génétique *in vivo*. [415]

2.5.4. Des mécanismes différents et multiples

Les diverses hypothèses développées ci-dessus ont été proposées pour expliquer le rôle des fibres d'amiante dans le développement de carcinomes bronchiques et de mésothéliomes malins. Nous l'avons vu, les preuves expérimentales supportent chacune de ces hypothèses ; pourtant, il n'y a pas de preuve formelle et décisive en faveur ou contre l'un ou l'autre de ces mécanismes. Pour ces raisons, il faut considérer les nuances suivantes : les différents types de fibres peuvent agir par différents mécanismes ; carcinomes broncho-pulmonaire et mésothéliomes seraient le résultat de différents mécanismes ; et de multiples mécanismes peuvent contribuer conjointement à la cancérogenèse.

2.5.4.1. Différents selon les types de fibres

Les preuves expérimentales montrent un rôle génétique et épigénétique des fibres d'amiante dans la cancérogenèse et l'importance de ces mécanismes génétiques et épigénétiques varie en fonction des différents types de fibres. Les modèles *in vitro* et *in vivo* permettent d'évaluer de façon critique pour chaque type de fibre cette distribution des rôles. Ainsi, la persistance et la biopersistance des fibres peuvent expliquer le problème de la persistance ou non des effets qui sont ainsi plus ou moins aigus ou chroniques.

2.5.4.2. Différents selon les pathologies

L'interaction entre exposition à l'amiante et tabagisme dans le développement des carcinomes broncho-pulmonaires est bien documentée alors que cette interaction n'a aucune

influence sur le mésothéliome. De son côté, le virus simien SV40 pourrait être associé au mésothéliome, ce qui n'est pas le cas des cancers pulmonaires.

2.5.4.3. Multiples pour une pathologie

Comme le fait remarquer Barrett, [417] les fibres agissent à différents stades du développement néoplasique.

Par exemple dans le cas du développement des carcinomes broncho-pulmonaires, les effets co-cancérigènes des fibres d'amiante et du tabagisme ont été présentés dans la figure 72. Sur la base des études moléculaires des cancers pulmonaires associés à la double exposition tabac/amiante, il semble que l'initiation des mutations dans les stades précoces du développement des carcinomes bronchiques reflète selon Nuorva [418] l'activité mutagène des agents présent dans la fumée de cigarette. Puis fibres d'amiante et cigarette agissent comme promoteurs pour stimuler la prolifération clonale des cellules initiées. D'autre part, les fibres d'amiante semblent induire (i) une métaplasie (différenciation cellulaire altérée) dans les cellules épithéliales trachéo-bronchiques, et (ii) altérer l'expression des proto-oncogènes qui régulent la prolifération de ces cellules épithéliales (hyperplasie) *in vitro* [419]

Concernant le mésothéliome [416], les étapes conduisant au développement de ces tumeurs sont plus spéculatives. Les fibres d'amiante pourraient, directement ou indirectement, agresser les cellules par des mécanismes génotoxiques, et stimuler leur prolifération. De façon alternative, la stimulation chronique de la prolifération des cellules mésothéliales (persistance des fibres dans l'interstitium avec relargage chronique de cytokines et de facteurs de croissance à partir des macrophages activés) pourrait aussi conduire à l'acquisition de nouvelles mutations spontanées (d'autant plus nombreuses que le cycle cellulaire est raccourci lors d'une prolifération cellulaire accélérée) qui conféraient, aux populations cellulaires pré-néoplasiques, un avantage prolifératif, autonome et incontrôlé. Enfin, l'action

immunosuppressive des fibres d'amiante évoquée dans le cadre de l'hypothèse faisant intervenir le virus oncogène SV40 n'est pas totalement improbable.

Les étapes ultérieures du développement tumoral sont caractérisées par des altérations génétiques et cellulaires supplémentaires conduisant à une invasion locale puis métastatique. Le rôle exact de l'amiante dans l'acquisition de ces propriétés reste encore inconnu mais l'association de mécanismes génétiques et épigénétiques, d'altération de la différenciation et de la prolifération cellulaire, semble fortement probable.

