



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie
Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master dans le domaine SNV
Filière : Sciences Biologiques
Option : Génétique

Thème

**Etude comparative du pouvoir mutagène de substances
pharmaceutiques à base d'hormones impliquées dans la croissance
cellulaire chez les souris NMRI**

Présenté par :

Soutenu le : 18/09/2023

**BEZARI Chiraz
BEKNOUNOU Lilia**

Devant le jury :

AMOKRANE A.	MCA /USDB1	Présidente
ZETRA Y.	MCB/USDB1	Examinatrice
MEZGHICHE S.	Pharm. D résidente en pharmacologie /ANPP– Université d'Alger I	Promotrice
EDDAIKRA A.	MCB/USDB1	Co-promotrice

Année universitaire : 2022/2023

Remerciements

Nous remercions tout d'abord Allah le Tout-Puissant de nous avoir donné la force, la patience, la santé et la volonté nécessaires pour réaliser ce modeste travail.

Nous adressons nos remerciements les plus sincères aux membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre travail et pour avoir accepté de l'examiner et de l'enrichir de leurs connaissances.

Nous exprimons notre gratitude à notre encadrante, Madame MEZGHICHE S, docteure en pharmacie résidente en pharmacologie pharmaceutique à l'Université d'Alger 1 | Faculté de pharmacie, pour nous avoir accompagnées tout au long de la réalisation de ce projet. Elle a été constamment disponible, à l'écoute de nos nombreuses questions et toujours intéressée par l'avancement de nos travaux. Nous la remercions pour l'aide qu'elle nous a apportée, sa patience et ses encouragements. Son regard critique a été très précieux pour structurer notre travail et améliorer la qualité des différentes sections, jusqu'à la finalisation de notre mémoire. Nous sommes réellement reconnaissantes de l'avoir eue comme directrice de thèse.

Nous voudrions remercier notre co-promotrice, Mme EDDAIKRA A, MCB au département de biologie pour ses judicieux conseils qui ont contribué à nourrir notre réflexion et nous ont grandement aidées dans la réalisation de notre travail.

Un grand merci également au Dr AMMI pour ses conseils et son aide qui ont grandement facilité notre travail. Nous remercions également l'ANPP et les résidents en pharmacologie pharmaceutique de l'Université d'Alger 1.

Enfin, nous tenons à remercier tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Dédicace

À ma mère Hayet, pour son soutien, son amour, sa patience et sa contribution tout au long de ma vie et de mes études. Car sans elle, je n'aurais pas réussi. Je t'aime.

À mon père Brahim, pour m'avoir apporté son soutien dès le premier jour, tant sur le plan financier que moral. Ses conseils et son éducation ont été parmi les meilleurs.

À mes frères Redha et Mustapha, qui me donnent de l'amour et du courage.

À mes sœurs Madina et Chahd, pour leur encouragement et leur soutien moral.

À toute ma famille et mes grands-parents.

Et bien sûr, à ma princesse, ma petite chatte Anoucheka.

À toutes les personnes proches de mon cœur.

Chiraz.

"À mes parents, pour leur amour, leur soutien inconditionnel et leur encouragement constant tout au long de mon parcours universitaire. Votre confiance en moi m'a donné la force et la motivation nécessaires pour mener à bien ce travail de mémoire.

À mes sœurs Nesrine et Nassima, vous avez été mes piliers de soutien tout au long de ma vie. Votre amour, votre écoute et votre présence ont été une source de réconfort et d'inspiration.

À mon neveu Abde El ghafour, et mes nièces Hania et Naila, vous êtes des étoiles brillantes dans ma vie. Votre joie de vivre, votre curiosité et votre douceur sont une source d'inspiration constante.

Lilia.

Résumé

La génotoxicité est la capacité de certains agents à induire des dommages à l'ADN pouvant conduire à des mutations. La transformation des cellules normales en cellules cancéreuses, caractérisées par une croissance cellulaire anormale et incontrôlée, peut découler de l'action d'agents génotoxiques.

Notre objectif était donc d'explorer et de comparer le potentiel génotoxique de certaines hormones impliquées dans la croissance, à savoir la somatropine et l'insuline.

Afin de répondre à notre objectif, nous avons réalisé dans un premier temps le test des micronoyaux sur quatre lots de souris NMRI. Chaque lot a reçu une substance d'essai : le cyclophosphamide (40mg/kg), la somatropine (80UI/kg), l'insuline (10UI/kg) et l'eau pour préparation injectable (0.20ml). La fréquence des érythrocytes immatures micronucléés a ensuite été mesurée sur la base de l'examen d'environ 1000 érythrocytes immatures par animal. Dans un deuxième temps, nous avons recherché par un test *in silico* les gènes liés aux voies métaboliques ciblées par la somatropine et leurs éventuelles mutations.

Les données obtenues montrent que la somatropine augmente significativement la fréquence d'apparition des érythrocytes immatures micronucléés dans le sang périphérique comparée au témoin négatif et à l'insuline. Les gènes SOCS1, SOCS2 et SOCS3 impliqués dans la synthèse, la sécrétion et l'action de la somatropine peuvent être sujets à plusieurs types de mutations et sont impliqués dans le développement de certains cancers.

En conclusion, les hormones impliquées dans la croissance cellulaire peuvent présenter des effets génotoxiques. Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de mieux comprendre ce phénomène et de consolider les résultats obtenus.

Mots clés : somatropine, insuline, génotoxicité, test des micronoyaux, croissance cellulaire.

Abstract

Genotoxicity is the ability of certain agents to induce DNA damage that can lead to mutations. The transformation of normal cells into cancer cells, characterized by abnormal and uncontrolled cell growth, can result from the action of genotoxic agents.

Therefore, our objective was to explore and compare the genotoxic potential of certain hormones involved in growth, namely somatropin and insulin.

To address our objective, we first conducted the micronucleus test on four groups of NMRI mice. Each group received a test substance: cyclophosphamide (40mg/kg), somatropin (80UI/kg), insulin (10UI/kg), and injectable water (0.20ml). The frequency of micronucleated immature erythrocytes was measured based on the examination of approximately 1000 immature erythrocytes per animal. In a second phase, we looked for the genes associated with the metabolic pathways targeted by somatropin and their possible mutations.

The obtained data indicate that somatropin significantly increases the frequency of micronucleated immature erythrocytes in peripheral blood compared to the negative control and insulin. Genes such as SOCS1, SOCS2, and SOCS3, which are involved in the synthesis, secretion, and action of somatropin, may be subject to various types of mutations and are implicated in the development of certain cancers.

In conclusion, hormones involved in cell growth may have genotoxic effects. However, further studies are needed to better understand this phenomenon and to consolidate the obtained results.

Keywords: Somatropin, Insulin, Genetic Toxin, Micronucleus test, Cellular growth.

ملخص

التوكسينية الجينية هي قدرة بعض العوامل على تسبب أضرار في الحمض النووي يمكن أن تؤدي إلى حدوث طفرات). يمكن أن تنشأ تحول الخلايا العادية إلى خلايا سرطانية، التي تتميز بنمو خلوي غير طبيعي وغير قابل للتحكم، من تأثير المواد الجينوتوكسية). لذلك كان هدفنا هو استكشاف ومقارنة القدرة الجينوتوكسية لبعض الهرمونات المشاركة في النمو، وهي هرمون السوماتروبين والأنسولين.

من أجل تحقيق هدفنا، قمنا في المرحلة الأولى بإجراء اختبار المايكرونويوس على أربع مجموعات من فئران

تلقت كل مجموعة مادة اختبارية: سيكلوفوسفاميد (40 مجم/كغ)، سوماتروبين (80 وحدة دولية/كغ)، أنسولين (10 وحدات دولية/كغ)، وماء للحقن (0.20 مل). ثم تم قياس تردد الكريات الحمر المتعددة النوى الغير ناضجة استناداً إلى فحص حوالي 1000 كرية حمراء غير ناضجة لكل حيوان.

في المرحلة الثانية، توجهنا نحو تفاصيل أعمق بخصوص الجينات المرتبطة بالمسارات التي تستهدفها السوماتروبين وطفرتها أظهرت البيانات المتحصل عليها أن هرمون السوماتروبين يزيد بشكل ملحوظ من تردد ظهور الكريات الحمر المتعددة النوى الغير ناضجة في الدم مقارنةً بالسيطرة السلبية والأنسولين.

الجينات التي تشارك في تخليق وإفراز وعمل السوماتروبين، قد تكون معرضة لأنواع متعددة من الطفرات وتشتبك في تطور بعض أنواع السرطان

وفي الختام، يمكن أن تظهر الهرمونات المشاركة في نمو الخلايا تأثيرات جينوتوكسية. ومع ذلك، هناك حاجة إلى إجراء مزيد من الدراسات لفهم هذه الظاهرة بشكل أفضل وتوطيد النتائج المحصلة

الكلمات المفتاحية: سوماتروبين، أنسولين، التوكسيكية الجينية، اختبار المايكرونويوس، النمو الخلوي

Liste des figures

Figure 1 : effets génotoxiques, mutagènes et cancérogènes (Fardel et al., 2010).....	4
Figure 2 : différents types de mutation génique (Benhacine & Sahil, 2016)	5
Figure 3 : schéma représentant une insertion chromosomique – à gauche - et une délétion chromosomique – à droite - (Bellout & Bourouissa, 2018).	5
Figure 4 : représentation schématique d’une inversion chromosomique – à gauche- et d’une translocation réciproque – à droite- (Benhacine & Sahil, 2016).....	6
Figure 5 : Les deux mécanismes possibles de formation d’un micronoyau par un agent génotoxique (Foltete, 2010).	8
Figure 6 : les 4 étapes du cycle cellulaire (Pocock Gillian, 2019).....	10
Figure 7 : Structure tridimensionnelle de l’hormone de croissance GH (Slater, 2021).	12
Figure 8 : Structure de l’insuline (Bitil, 2015).	14
Figure 9 : Structure moléculaire d’un hexamère d’insuline (Bitil, 2015)	15
Figure 10 : Structure du récepteur de l’insuline IR (<i>Pharmacologie</i> , 2014)	16
Figure 11 : photo représentant l’administration par voie intrapéritonéale	21
Figure 12 : représentant un prélèvement par voie rétrobulbaire	21
Figure 13 : Frottis sanguin montrant un érythrocyte micronucléé coloré au May-Grünwald-Giemsa (Balmus et al., 2015)	23
Figure 14 : Formation des différents types d’érythrocytes durant le processus d’érythropoïèse.	23
Figure 15 : Analyse qualitative des résultats de la mise au point du test des micronoyaux (grossissement $\times 100$).....	26
Figure 16 : résultats du test des micronoyaux (grossissement $\times 100$)	27
Figure 17: boîtes à moustache représentant la distribution des valeurs de la variable f_{MN-PCE} mesurées dans les groupes TP, TN, ST et In.....	30
Figure 18 : Structure 3D de la somatropine.	34
Figure 19 : Voie métabolique JAK STAT ciblée par la somatropine et les gènes qui y sont liés.	35
Figure 20 : différents stades de l’érythropoïèse (Sinclair, 2013).	45
Figure 21 : courbes de densité de la variable poids mesurée dans le lot TP au cours de la période de stabulation.....	49
Figure 22 : courbes de densité de la variable poids mesurée dans le lot TN au cours de la période de stabulation.....	49

Figure 23 : courbes de densité de la variable poids mesurée dans le lot ST au cours de la période de stabulation.....	50
Figure 24 : courbes de densité de la variable poids mesurée dans le lot In au cours de la période de stabulation.....	50
Figure 25 : courbes de densité de la variable poids mesurée dans le lot TP au cours de l'essai	51
Figure 26 : courbes de densité de la variable poids mesurée dans le lot TN au cours de l'essai	51
Figure 27 : courbes de densité de la variable poids mesurée dans le lot ST au cours de l'essai	52
Figure 28 : courbes de densité de la variable poids mesurée dans le lot In au cours de l'essai	52
Figure 29 : Evolution pondérale des souris du lot TP au cours de la période de stabulation...	55
Figure 30 : Evolution pondérale des souris du lot TN au cours de la période de stabulation ..	55
Figure 31 : Evolution pondérale des souris du lot ST au cours de la période de stabulation...	56
Figure 32 : Evolution pondérale des souris du lot In au cours de la période de stabulation	56
Figure 33 : Evolution pondérale des souris du lot TP au cours de l'essai.....	57
Figure 34 : Evolution pondérale des souris du lot TN au cours de l'essai.....	57
Figure 35 : Evolution pondérale des souris du lot ST au cours de l'essai.....	58
Figure 36 : Evolution pondérale des souris du lot In au cours de l'essai	58

Liste des tableaux

Tableau I : Modalités d'administration des différents produits d'essai	20
Tableau II : Tableau de suivi de l'évolution pondérale des souris au cours de la période de stabulation.	28
Tableau III : Tableau de suivi de l'évolution pondérale des souris au cours de l'essai.	28
Tableau IV: tableau récapitulatif des paramètres de tendance centrale, de position et de dispersion des données recueillies.....	31
Tableau V : Résultats du test d'analyse de la variance ANOVA.....	32
Tableau VI : Résultats de l'ANOVA post-hoc.....	32
Tableau VII : différents types de mutations des gènes SOCS1, SOCS2 et SOCS3 répertoriés dans le catalogue COSMIC.	36
Tableau VIII : classification des insulines (Battu, 2013).....	46
Tableau IX : tableau récapitulatif du matériel non biologique utilisé au cours des différentes étapes de l'essai.....	47
Tableau X : tableau récapitulatif du matériel utilisé au cours du test in silico.....	48
Tableau XI : Tableau de suivi de l'évolution pondérale des souris au cours de la période de stabulation.	53
Tableau XII : Tableau de suivi de l'évolution pondérale des souris au cours de l'essai.	54
Tableau XIII : Tableau récapitulatif des résultats de l'ANOVA post-hoc relatifs à l'évaluation pondérale au cours de la période de stabulation (de J1 à J5)	59
Tableau XIV : Tableau récapitulatif des résultats de l'ANOVA post-hoc relatifs à l'évaluation pondérale au cours de l'essai (de J1 à J4)	60
Tableau XIV : Taux et fréquence des érythrocytes immatures micronucléés dans les différents groupes d'étude.	61
Tableau XV : résultats du test de normalité de Shapiro-Wilk	62
Tableau XVI : résultats du test d'homogénéité des variances de Levene	62

Liste des abréviations

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ADN : Acide désorxyribonucléique

SIDA : Syndrome de l'Immunodéficience Acquise

IGF- : Insuline-like growth factor

GH : Hormone de croissance

hGH-N : Human growth hormone normal

GHR : Growth hormone receptor

ARNm : Acide ribonucléique messenger

IR : Insulin Receptor

NMRI : Naval Medical Research Institute

EPPI : Eau Pour Préparation Injectable

EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra-acétique

IP : voie intrapéritonéale

SC : voie sous-cutanée

TP : témoin positif

ST : somatropine

TN : témoin négatif

In : insuline

MN-PCE : érythrocytes immatures micronucléés

PCE : érythrocytes immatures

ddl : degré de liberté

Sommaire

Liste des figures	7
Liste des tableaux	9
Liste des abréviations	10
Sommaire	11
INTRODUCTION.....	1
I. Synthèse bibliographique	3
I.1. Généralités sur la génotoxicité des médicaments	3
I.1.1. Définition de la génotoxicité.....	3
I.1.2. Différents types d'agents génotoxiques	3
I.1.3. Mécanismes de mutagénicité :	4
I.1.4. Méthodes d'étude de la génotoxicité	7
I.2. Généralités sur les hormones impliquées dans la croissance cellulaire :	9
I.2.1. Définition d'une hormone :	9
I.2.2. Physiopathologie de la croissance humaine.....	9
I.2.3. Généralités sur la somatotropine	12
I.2.4. Généralités sur l'insuline	14
II. Matériel et Méthode	18
II.1. Matériel.....	18
II.1.1. Matériel utilisé au cours du test des micronoyaux.....	18
II.1.2. Matériel utilisé au cours du test in silico	18
II.2. Méthode	19
II.2.1. Test des micronoyaux	19
II.2.2. Test in silico.....	25
III. Résultats et discussion.....	26
III.1. Test des micronoyaux.....	26
III.1.2. Test in silico	34

CONCLUSION	37
REFERENCES	38
ANNEXES	45

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Un médicament est une substance ou un produit utilisé pour prévenir, diagnostiquer ou traiter des maladies chez les humains ou les animaux en agissant sur leurs fonctions physiologiques (Dangoumau, 2006; Kaâda, 2018).

Les médicaments peuvent être classés de différentes manières (Dangoumau, 2006). Selon leur origine, ils sont subdivisés en médicaments d'origine minérale, végétale, animale, chimique et biotechnologique.

Les médicaments issus de la biotechnologie (biomédicaments) sont tout médicament dont la substance active est une macromolécule thérapeutique produite par le vivant (Allain, 1996). Ils peuvent être subdivisés en 2 catégories :

- Les biomédicaments substitutifs : qui permettent de corriger des déficits.
- Les biomédicaments modificatifs : qui provoquent des modifications physiologiques par diverses actions.

Les biomédicaments, qui sont principalement des protéines, comprennent des vaccins, des anticorps thérapeutiques, des enzymes, des hormones protéiques et des facteurs de croissance. Par exemple, la somatropine qui est utilisée pour traiter les troubles de la croissance et l'insuline qui est utilisée pour le traitement du diabète sont des hormones impliquées dans la croissance considérées comme des biomédicaments substitutifs (Manon & Hervé, 2015).

Les hormones jouent un rôle important dans la régulation de nombreux processus physiologiques tels que la croissance, la reproduction et l'homéostasie énergétique. De ce fait, un dysfonctionnement hormonal peut même contribuer au développement du cancer (Lacour, 2016). D'ailleurs, certaines hormones impliquées dans la croissance ont été associées à la prolifération des cellules cancéreuses (Rapaport & Moghaddas, 2001).

Le cancer est une maladie génétique complexe et mortelle (Hanahan, 2022) causée par une modification des gènes qui contrôlent le fonctionnement cellulaire. Ces modifications génétiques peuvent être la conséquence de :

- D'erreurs produites lors de la division cellulaire (gilllian et al., s. d.)
- De dommages causés à l'ADN par des agents génotoxiques qui endommagent le matériel génétique cellulaire et causent des mutations (Ghram, 2011)
- D'une transmission héréditaire (Mata & Team, 2022)

L'interrelation entre les hormones et le cancer reflète l'importance de bien comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents (Rapaport & Moghaddas, 2001). Cependant, malgré le rôle connu des hormones dans la promotion de certains cancers dit hormonodépendants et malgré leur impact avéré sur le matériel génétique et la croissance cellulaire, il reste beaucoup à explorer quant à leur potentiel génotoxique. Ceci nous amène à notre question de recherche : *les hormones impliquées dans la croissance cellulaire, pourraient-elles représenter des agents génotoxiques initiateurs du cancer ?*

Notre objectif sera donc d'explorer et de comparer le potentiel génotoxique de deux hormones impliquées dans la croissance cellulaire, à savoir la somatropine et l'insuline, grâce au test des micronoyaux. Une étude *in silico* sera réalisée en cas de résultats positifs pour mieux explorer ce potentiel.

Le test des micronoyaux est un test *in vivo* réalisé sur des mammifères afin d'évaluer la génotoxicité d'une substance à travers la détection de lésions chromosomiques ou de l'appareil mitotique d'érythroblastes. Ces lésions se matérialisent par la formation de micronoyaux contenant des fragments de chromosomes retardataires ou des chromosomes entiers dans des érythrocytes prélevés à partir de la moelle osseuse ou du sang périphérique. Les érythrocytes micronucléés sont, par la suite, identifiés et dénombrés. Un accroissement de leur fréquence est le signe d'une lésion chromosomique structurale ou numérique induite (OCDE, 2016).

Synthèse

bibliographique

I. Synthèse bibliographique

I.1. Généralités sur la génotoxicité des médicaments

I.1.1. Définition de la génotoxicité

La génotoxicité est la capacité de certains agents physiques, chimiques ou biologiques à induire des dommages à l'ADN pouvant conduire à des mutations géniques ou chromosomiques (Cachot & Dégremont, 2009) et éventuellement à des tumeurs malignes (Seukep et al., 2014) dans le cas où les modifications causées par ces dommages ne sont pas ou sont mal réparées (Graillet, 2012).

La génotoxicité est souvent confondue avec la mutagénicité car tous les produits chimiques mutagènes sont génotoxiques ; cependant, pas tous les composés génotoxiques sont mutagènes (Seukep et al., 2014).

I.1.2. Différents types d'agents génotoxiques

Un agent génotoxique est un agent endogène ou exogène qui endommage l'ADN cellulaire entraînant des mutations ou un cancer (Saks et al., 2017)

- *Agents chimiques* : ces agents sont des mutagènes électrophiles qui établissent une liaison covalente avec un site nucléophile d'une base azotée (Benhacine & Sahil, s. d.) (Benhacine & Sahil, 2016)
- *Agents physiques* : ce sont principalement les radiations ionisantes hautement énergétiques telles que les rayons X ou gamma et les radiations non ionisantes comme la lumière ultraviolette (Cachot & Dégremont, 2009).
- *Agents biologiques* : ce sont des virus tels que les rétrovirus (sida) et les Filoviridae (Virus d'Ebola). Leur génotoxicité peut aboutir à la cancérogenèse (Cachot & Dégremont, 2009)

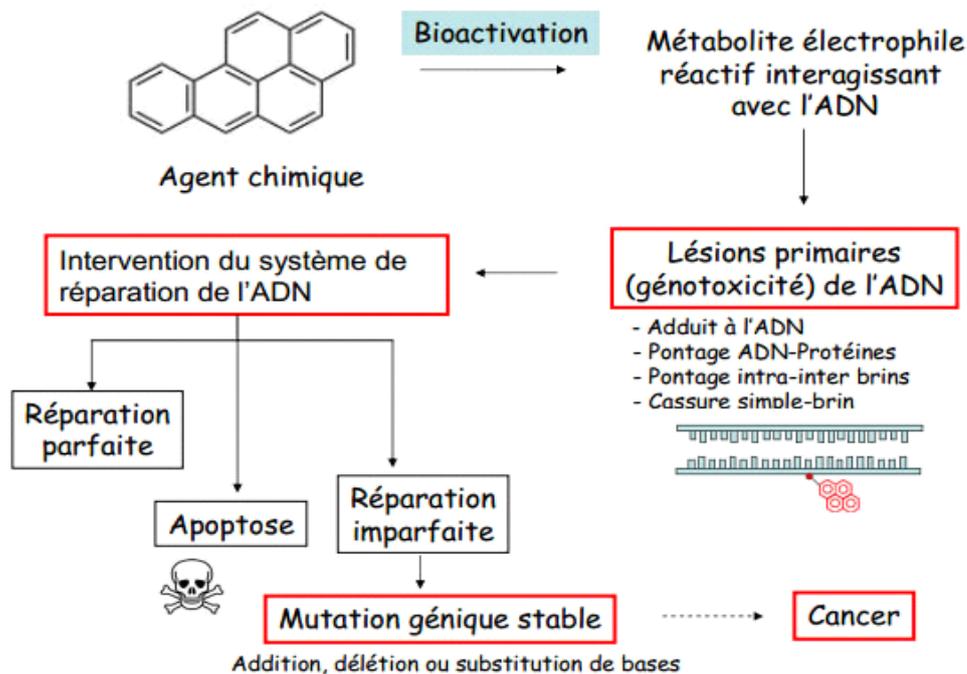


Figure 1 : effets génotoxiques, mutagènes et cancérogènes (Fardel et al., 2010).

1.1.3. Mécanismes de mutagenicité :

Il apparaît que l'accessibilité des sites nucléophiles de l'ADN aux attaques électrophiles des agents génotoxiques n'est pas la même. Par ailleurs, il existe une très grande variété des degrés d'altération de l'ADN. Il est en effet classique de distinguer les lésions primaires à l'ADN, les mutations géniques, chromosomiques (Orsière et al., 2015).

- *Lésions primaires* : elles peuvent se présenter sous forme de :
 - Cassures monocaténaire et double brin dans le squelette de l'ADN
 - Liaisons entre des bases d'ADN
 - Liaisons entre des bases d'ADN et des protéines
 - Modifications des bases de l'ADN (Gupta, 2016).
- *Mutations géniques* : c'est une altération de la séquence nucléotidique de l'ADN qui peut provoquer :
 - L'arrêt complet de la synthèse d'une protéine
 - La modification de la synthèse d'une protéine aboutissant à une forme inactive

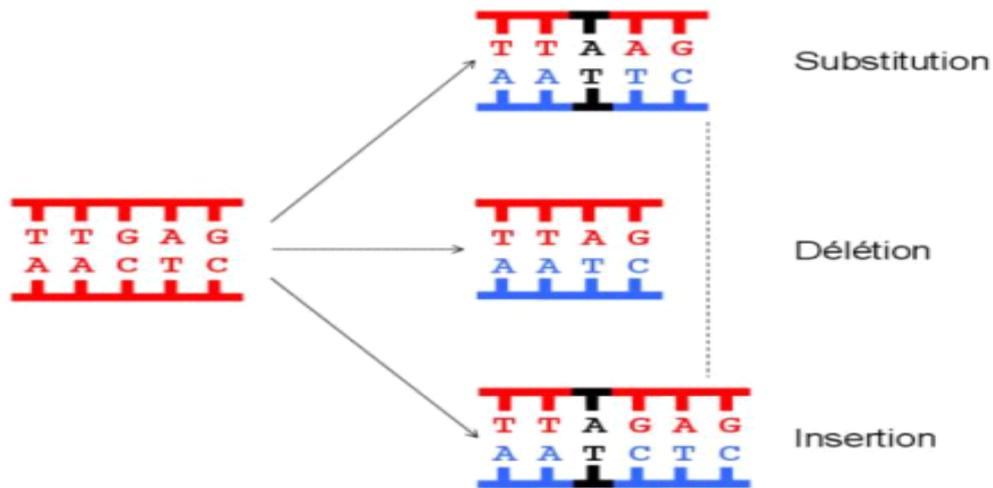


Figure 2 : différents types de mutation génique (Benhacine & Sahil, 2016)

- *Les mutations chromosomiques* : ces modifications peuvent être à l'origine de :
 - La délétion ou l'insertion de fragments chromosomiques
 - L'échange des fragments entre chromosomes non homologues
 - La duplication ou l'inversion d'un segment chromosomique (Dimassi et al., 2017)

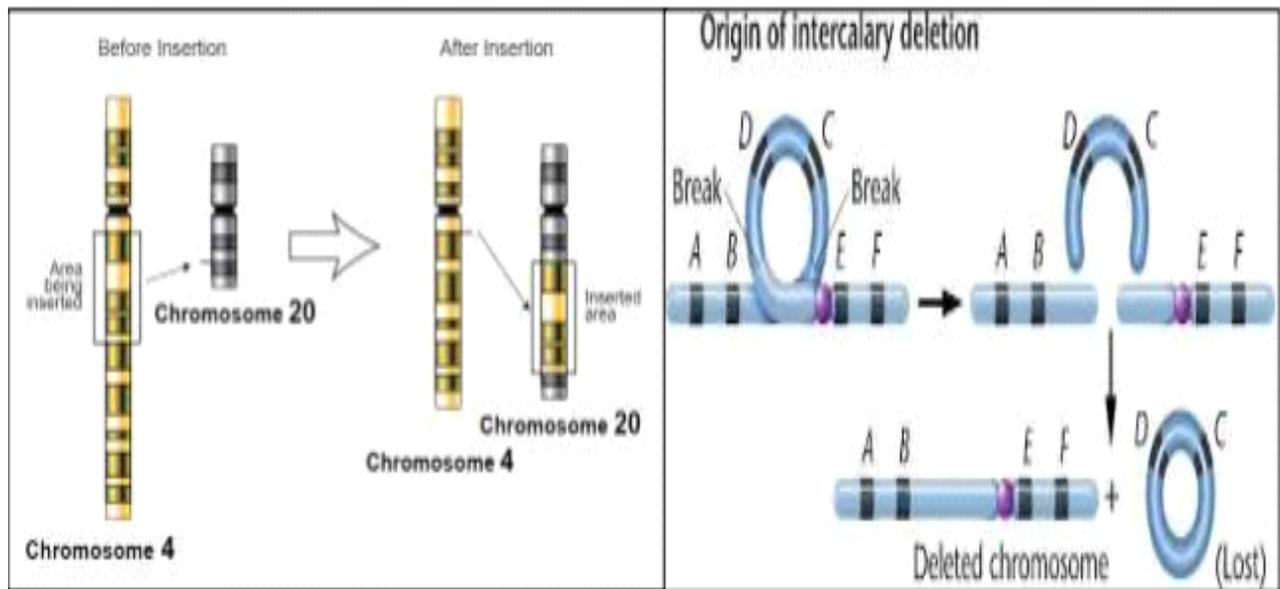


Figure 3 : schéma représentant une insertion chromosomique – à gauche - et une délétion chromosomique – à droite - (Bellout & Bourouissa, 2018).

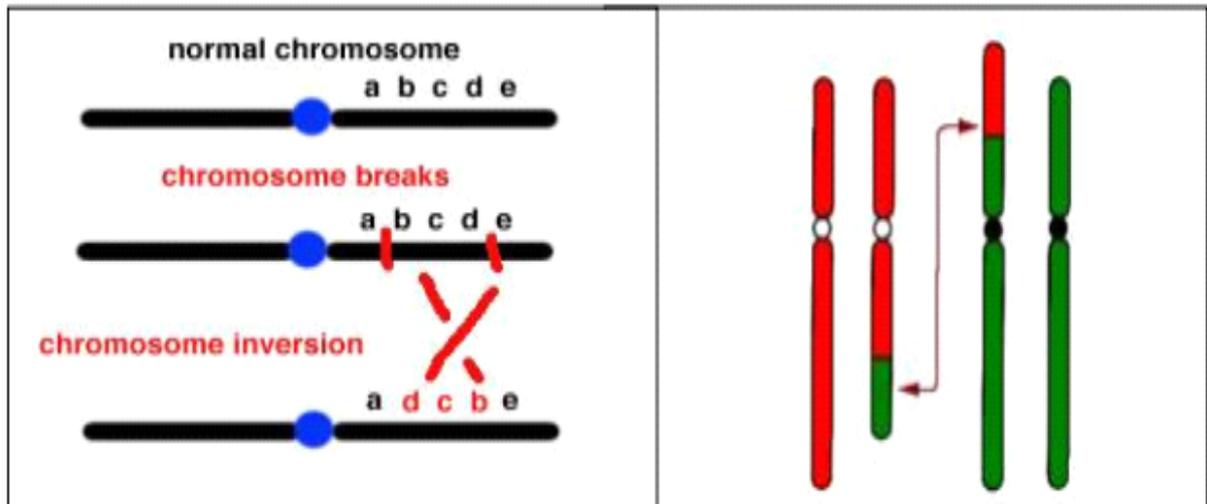


Figure 4 : représentation schématique d'une inversion chromosomique – à gauche- et d'une translocation réciproque – à droite- (Benhacine & Sahil, 2016).

1.1.4. Méthodes d'étude de la génotoxicité

Les tests de génotoxicité sont des essais utilisés pour détecter l'altération du matériel génétique par des composés chimiques ou physique. Parmi ces tests, on trouve :

- *Le test d'Ames* : il consiste à examiner si une substance chimique ou un agent physique est capable d'induire des mutations spécifiques.
- *Le test des comètes* : il détecte les cassures de l'ADN.
- *Le test des aberrations chromosomiques* : il détecte les anomalies de réarrangements des cassures de chromosome, consécutives à des erreurs lors de la division cellulaire.
- *Le test des micronoyaux* : il met en évidence la présence d'ADN extranucléaire.
- *Le test H2AX* : il recherche la présence d'une histone phosphorylée à proximité d'une cassure (Fardel et al., 2009; « Tests de génotoxicité : identifier des biomarqueurs d'effet lors des expositions à des agents cancérigènes », 2021).

❖ *Le test des micronoyaux*

Le test des micronoyaux est un test réalisé *in vivo* sur des mammifères, généralement sur des rongeurs, pour évaluer la génotoxicité d'une substance à travers la détection de micronoyaux.

Les micronoyaux sont des anomalies se présentant sous la forme de fragments chromosomiques ou de chromosomes entiers présents dans le cytoplasme de cellules notamment d'érythrocytes prélevés à partir de la moelle osseuse ou du sang périphérique.

Les érythrocytes immatures micronucléés sont identifiés et dénombrés, une fois les frottis sanguins confectionnés fixés et colorés, par un examen visuel au microscope ou par une analyse automatique. Un accroissement de leur fréquence est le signe d'une lésion chromosomique structurale ou numérique induite. (OCDE, 2016)

Pour une meilleure compréhension du test, se référer au rappel sur l'érythropoïèse figurant à l'annexe I.

La figure 5 présente les deux mécanismes possibles de formation d'un micronoyau par un agent génotoxique soit :

- L'effet clastogène : aberrations chromosomiques à type de ponts ou de fragmentation des chromosomes
- L'effet aneugène : désorganisation du fuseau mitotique à l'origine de délétions chromosomiques (Foltete, 2010).

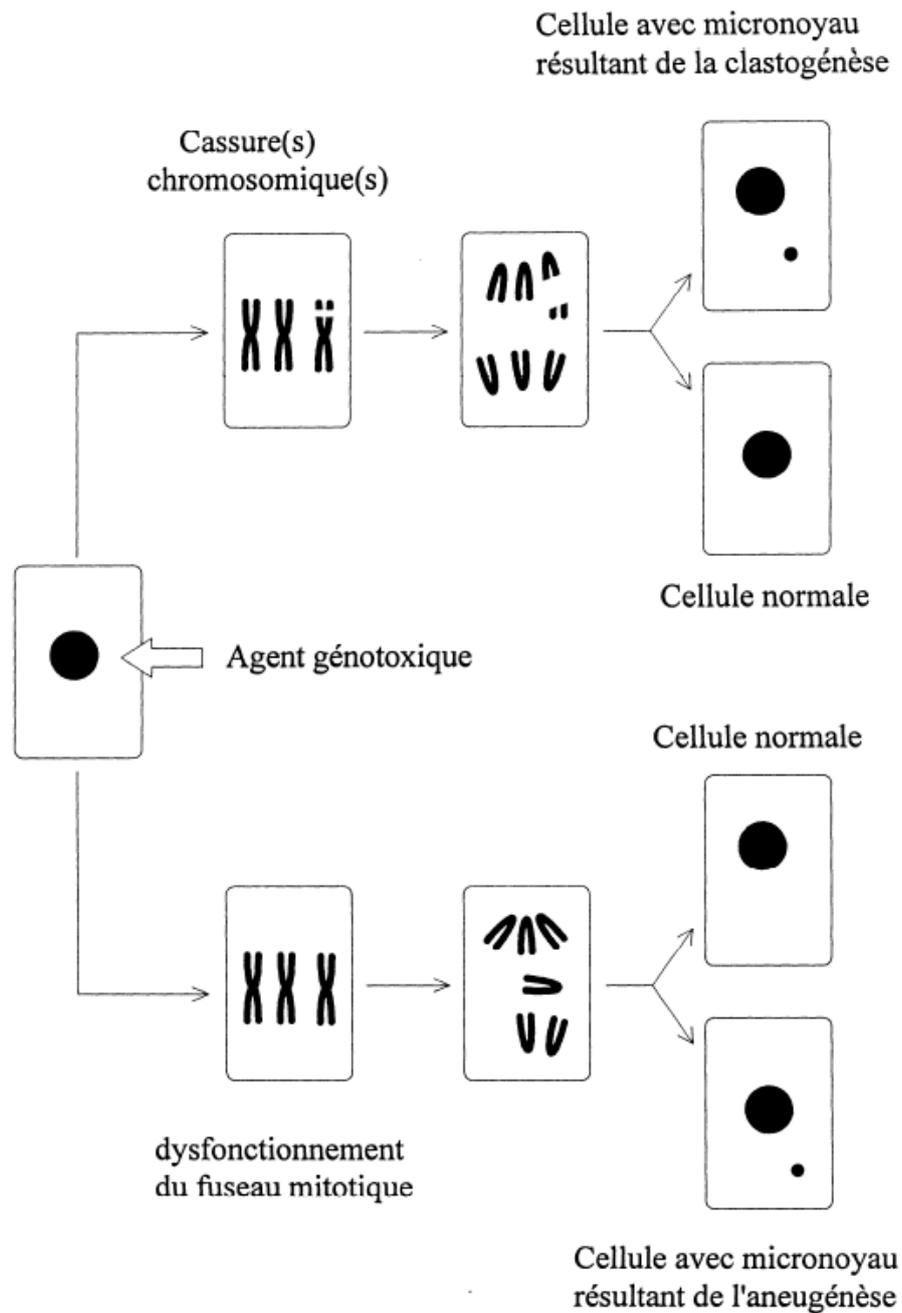


Figure 5 : Les deux mécanismes possibles de formation d'un micronoyau par un agent génotoxique (Foltete, 2010).

Il est important de noter que le test des micronoyaux présente certaines limites :

- Souvent, les anomalies chromosomiques ne sont pas identifiées de manière fiable.
- Un prélèvement cellulaire est impérativement effectué pour sa détection, ce qui implique un certain degré d'invasivité. (Fardel et al., 2009).

I.2. Généralités sur les hormones impliquées dans la croissance cellulaire :

I.2.1. Définition d'une hormone :

Les hormones sont des molécules sécrétées dans le milieu intérieur par des cellules spécifiques, l'action des hormones peut s'exercer de façon paracrine, autocrine ou endocrines (Lacour, 2016)

I.2.2. Physiopathologie de la croissance humaine

I.2.2.1. Croissance cellulaire

Au cours de la vie, la croissance peut résulter de 2 processus différents :

- L'ajout de nouveaux matériaux à des cellules préexistantes
- L'augmentation du nombre de cellules par division

La division cellulaire se produit par l'un des 2 processus suivants :

- La méiose : chaque cellule fille possède la moitié du nombre de chromosomes de la cellule mère. Ceci est observé dans les cellules germinales.
- La mitose : chaque cellule fille porte le même nombre de chromosomes que la cellule mère. Ceci est observé chez la plupart des cellules en division

Le « cycle cellulaire » est essentiellement constitué de 4 phases :

- *L'état de repos G0* : qui est un stade non prolifératif
- *L'interphase* : qui correspond à la phase de réplication de l'ADN. Elle comprend 3 étapes : la première phase de croissance (G1), la phase de synthèse (S) et la deuxième phase de croissance (G2).
- *La phase mitotique (phase M)* : qui correspond à la division du noyau (Pocock Gillian, 2019).

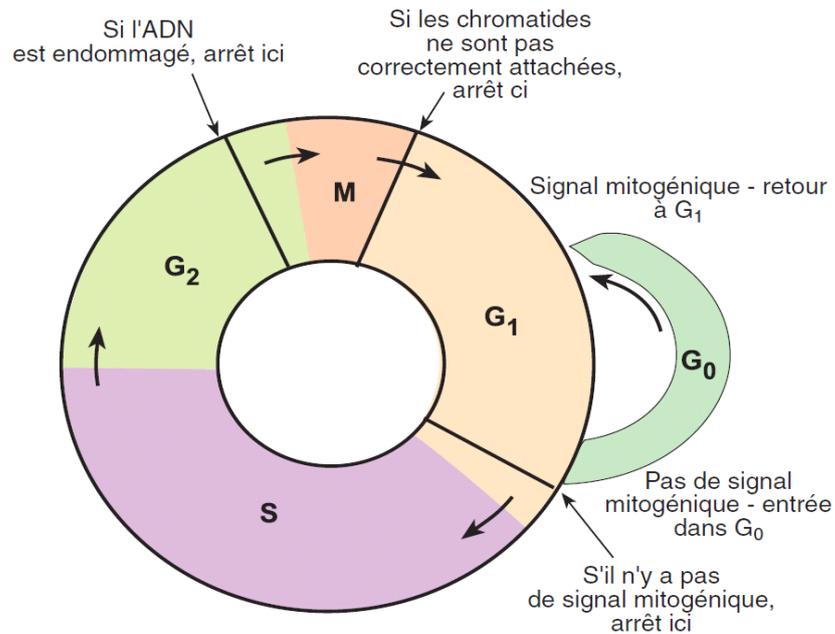


Figure 6 : les 4 étapes du cycle cellulaire (Pocock Gillian, 2019)

1.2.2.2. Contrôle génétique de la croissance

On entend par contrôle génétique de la croissance tous les mécanismes moléculaires et génétiques qui entrent dans la régulation du développement des organismes vivants

Plusieurs gènes interviennent dans la régulation de la croissance (Rosenbloom, 2007) en contrôlant divers processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire (Darmon, 2017)

Ces gènes peuvent être subdivisés en quatre catégories :

- Les gènes de régulation de la croissance : ils contrôlent l'activation ou la désactivation d'autres gènes impliqués dans la croissance.
- Les gènes de signalisation : ils sont impliqués dans la transmission des signaux de croissance entre les cellules. Les hormones font partie de cette catégorie.
- Les gènes de régulation du cycle cellulaire : ils contrôlent les étapes du cycle cellulaire.
- Les gènes de régulation de la taille corporelle : ils sont spécifiquement impliqués dans la régulation de la taille comme c'est le cas du gène IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) (Darmon, 2017)

Parmi les gènes impliqués dans le contrôle de la croissance figurent ceux impliqués dans la production d'insuline, des hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes (Rosenbloom, 2007)

1.2.2.3. Contrôle hormonal de la croissance

Le contrôle hormonal de la croissance implique une interaction complexe entre plusieurs hormones. Les principales hormones impliquées dans ce processus sont l'hormone de croissance (GH), l'insuline-like growth factor 1 (IGF-1), les hormones thyroïdiennes, les hormones sexuelles et les glucocorticoïdes (Rosenbloom, 2007). L'insuline joue également un rôle crucial à différents stades de la croissance.

Dans la croissance intra-utérine, l'absence d'insuline peut entraîner un retard sévère de croissance (Rosenbloom, 2007).

La GH est une hormone sécrétée par l'antéhypophyse et l'IGF-1 est produit en réponse à la stimulation de la GH. Ils jouent un rôle essentiel dans la prolifération et la différenciation des cellules osseuses et musculaires.

Les hormones thyroïdiennes sont impliquées dans le métabolisme et la différenciation cellulaires affectant ainsi la croissance.

Les hormones sexuelles sont notamment responsables de la poussée de croissance rapide pendant la puberté.

Quant aux glucocorticoïdes, ils sont produits par la zone fasciculée de la corticosurrénale et peuvent avoir, en cas de sécrétion excessive, un impact négatif sur la croissance (Sherwood & Ectors, 2015).

1.2.2.4. Anomalies de la croissance cellulaire (cancérogène)

La cancérogène est un processus de transformation néoplasique progressive des cellules par des facteurs ou agents carcinogènes. On distingue 2 stades dans la carcinogène :

- *L'initiation* : c'est l'exposition des cellules aux agents carcinogènes initiateurs. Ces agents sont des mutagènes qui provoquent une altération permanente de l'ADN des cellules cibles, lesquelles en gardent la mémoire. Les agents initiateurs peuvent appartenir à 2 catégories :
 - Les agents initiateurs à action directe (carcinogènes) : ils ne nécessitent pas de transformation chimique pour être actifs
 - Les agents initiateurs à action indirecte (pro-carcinogènes) : ils nécessitent une conversion métabolique in vivo pour produire des carcinogènes
- *La promotion* : c'est l'induction de tumeur dans les cellules déjà initiées suite à leur stimulation par des agents promoteurs. Contrairement aux agents initiateurs, les agents promoteurs ne lèsent pas l'ADN (*Dictionnaire de l'Académie Nationale de Médecine*, s. d.)

1.2.3. Généralités sur la somatotropine

1.2.3.1. Structure de la somatotropine

L'hormone de croissance (GH), également appelée somatotropine, somatotropine ou somatotrophine, est un polypeptide qui joue un rôle important dans la croissance et le développement.

Le gène responsable de la production de la somatotropine normale (hGH-N) est situé sur le chromosome 17. Il produit 2 ARN messagers (ARNm) différents, qui codent pour 2 protéines

- Une protéine monomérique de 22 kDa composée de 191 acides aminés et possédant une structure tertiaire comprenant 2 ponts disulfures et 4 hélices.
- Une protéine monomérique de 20 kDa

Le monomère de 22 kDa est principalement responsable de l'activité biologique, tandis que la forme de 20 kDa présente une activité biologique plus faible. (Lahlou & Roger, 2006).



Figure 7 : Structure tridimensionnelle de l'hormone de croissance GH (Slater, 2021).

1.2.3.2. Propriétés pharmacologiques

❖ Mécanisme d'action

La GH possède deux modes d'actions : l'un direct et l'autre indirect. Son action est nucléaire même si elle ne pénètre pas à l'intérieur de la cellule (Pierre, 2014)

Elle agit directement via ses récepteurs GHR qui activent la protéine Jak2 et stimulent ainsi la croissance des os et des muscles (*Pharmacologie*, 2014).

Son action indirecte passe par la stimulation de la synthèse de la somatomédine, également appelée Insuline-Like Growth Factor (IGF-1 et IGF-2) (Pierre, 2014)

❖ *Effets pharmacologiques*

La GH favorise principalement la croissance osseuse et possède des effets anaboliques et lipolytiques (*Pharmacologie*, 2014) :

- *Effets directs* : la GH elle-même entraîne plusieurs effets dont :
 - La libération d'IGF-1.
 - Une action anabolisante au niveau de l'os et des muscles squelettiques.
 - Une stimulation de la différenciation cellulaire.
 - Une stimulation de la lipolyse.
 - Un effet diabétogène via une action anti-insuline.
- *Effets indirects* : indirectement, la GH agit en stimulant la synthèse de l'IGF-1 qui stimule la croissance via la synthèse protéique et l'incorporation de glucose, d'acides aminés et de sulfate dans les cellules (Pierre, 2014)

En résumé, la GH a des effets sur la croissance de divers tissus, notamment sur la promotion de la croissance des os longs mais également sur le tissu digestif, le muscle cardiaque et le système immunitaire. Elle affecte aussi les métabolismes lipidique, glucidique, protéique et des minéraux (Lahlou & Roger, 2006).

La GH possède également des effets sur la moelle osseuse et a été associée dans certaines études à une augmentation du risque de cancer :

- *Effet de la somatropine sur la moelle osseuse*

La GH et l'IGF-I ont des effets profonds sur l'hématopoïèse, y compris l'augmentation de la production de globules rouges. Pendant le traitement par la rGH, une diminution significative mais transitoire des cellules a été signalée (Rapaport & Moghaddas, 2001)

- *Somatropine et cancers*

Selon une étude post-marketing réalisée sur près de 100 000 enfants, aucun risque de récurrence du cancer chez les patients traités par la GH n'a été montré. Il n'y a pas non plus de preuve concluante indiquant que la somatropine augmente le risque de développer un nouveau cancer ou une leucémie (Poidvin, 2019)

Des interactions entre l'axe de la GH/IGF et le système immunitaire ont également été documentées par certaines études réalisées *in vitro* et *in vivo*, chez l'homme et chez les animaux. D'ailleurs, *in vitro*, des études ont montré que la GH et l'IGF-I peuvent stimuler la production des érythrocytes et la prolifération de lignées cellulaires leucémiques (Rapaport & Moghaddas, 2001).

1.2.4. Généralités sur l'insuline

1.2.4.1. Classification des insulines

Il existe une grande variété d'insulines, permettant d'adapter la prescription à chaque patient selon sa physiologie, son mode de vie ou encore son état clinique (Battu, 2013) . Une classification des différents types d'insulines figure dans l'annexe II.

1.2.4.2. Structure de l'insuline

La structure de l'insuline a été décrite pour la première fois par Sanger en 1955.

L'insuline humaine est un peptide constitué de 2 chaînes d'acides aminés : la chaîne A qui contient 21 acides aminés et la chaîne B qui en comporte 30. Les 2 chaînes sont reliées entre elles par 2 ponts disulfures situés chacun entre 2 cystéines de la chaîne A et B. Il y a également un troisième pont disulfure entre 2 cystéines de la chaîne A.

L'insuline est stockée sous forme d'hexamères dans les granules sécrétoires des cellules bêta des îlots de Langerhans. Ces hexamères se dissocient en dimères puis en monomères par passage dans le sang (Bitil, 2015) .

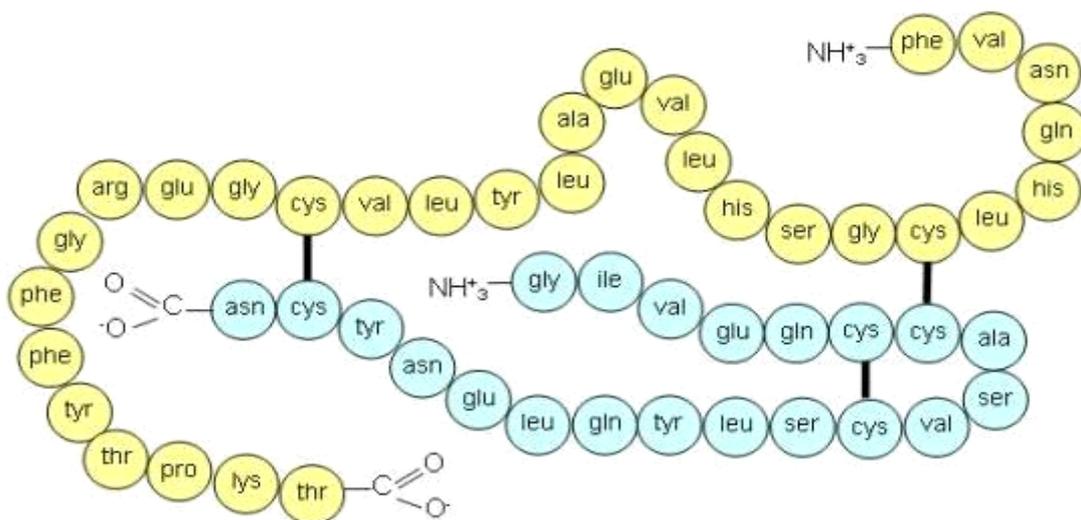


Figure 8 : Structure de l'insuline (Bitil, 2015).

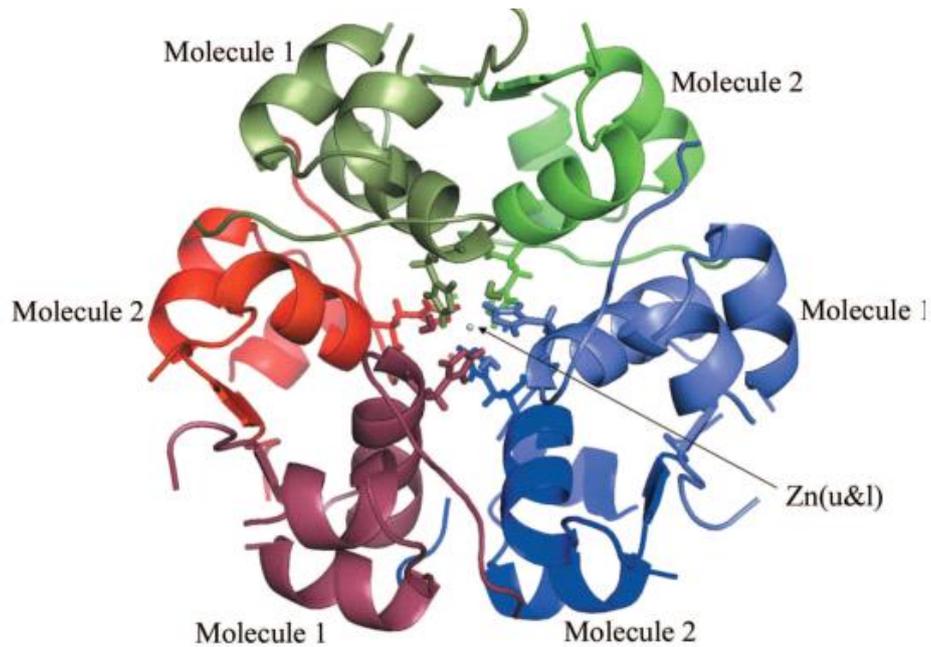


Figure 9 : Structure moléculaire d'un hexamère d'insuline (Bitil, 2015) .

1.2.4.3. Propriétés pharmacologiques

❖ Mécanisme d'action

L'effet hypoglycémiant de l'insuline découle de sa liaison au niveau de son récepteur IR (*Insulin Receptor*). Ce dernier est un récepteur à activité enzymatique intrinsèque de type tyrosine kinase (Figure 10).

Cette liaison entraîne une cascade de signalisation intracellulaire stimulant l'expression membranaire des transporteurs GLUT au niveau des cellules musculaires, hépatiques et adipeuses ce qui permet au glucose présent dans le sang d'entrer dans la cellule (Étienne-Selloum & Faure, 2015).

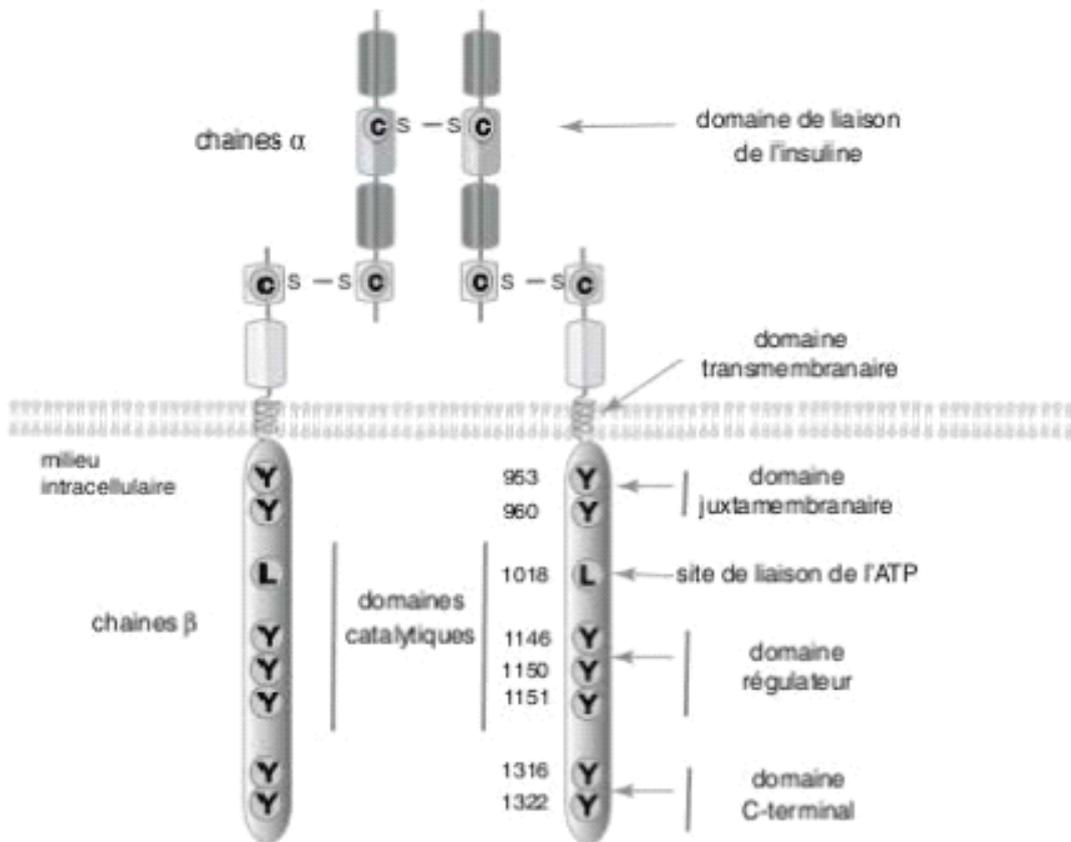


Figure 10 : Structure du récepteur de l'insuline IR (*Pharmacologie*, 2014)

❖ *Effets de l'insuline sur la croissance cellulaire*

L'insuline est une hormone qui agit sur toutes les cellules de l'organisme et qui possède plusieurs effets.

C'est un stimulant métabolique impliqué dans :

- L'influx de glucose dans les cellules musculaires et adipeuses et donc dans la réduction de la glycémie
- Le stockage du glucose sous forme de glycogène dans le foie et les muscles et la réduction de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse.
- La synthèse des acides gras à partir de l'acétyl co-enzyme A et le stockage des lipides par diminution de la lipolyse
- L'influx des acides aminés dans toutes les cellules (*Pharmacologie*, 2014)

C'est aussi un facteur de croissance cellulaire impliqué dans :

- L'augmentation de la synthèse de l'ADN
- La diminution de l'apoptose
- La modification de la transcription génique
- L'augmentation de la synthèse des protéines (*Pharmacologie*, 2014)

L'insuline peut augmenter la croissance, la progression à travers G1/S et la taille des cellules et des tissus. A contrario, elle peut retarder la progression à travers G2/M ce qui ralentie la division cellulaire (Wu et al., 2007) .

En résumé, l'insuline contrôle le nombre de cellules grâce à une balance entre sa capacité à accélérer la progression en G1/S et à retarder le passage en G2/M du cycle cellulaire. Elle régule également la cytokinèse selon une étude réalisée sur des rongeurs(Burnol et al., 2013)

Matériel et méthode

II. Matériel et Méthode

Notre étude a pour objectif d'explorer et de comparer le potentiel génotoxique de deux hormones impliquées dans la croissance cellulaire, à savoir la somatropine et l'insuline.

Afin d'atteindre notre objectif, nous avons réalisé le test des micronoyaux qui est un test effectué *in vivo* sur des souris au niveau du laboratoire de pharmacotoxicologie de l'Agence Nationale des Produits Pharmaceutiques (ANPP).

Nous avons aussi réalisé un test *in silico* à la recherche des gènes liés aux voies métaboliques ciblées par la somatropine et leurs éventuelles mutations.

II.1. Matériel

II.1.1. Matériel utilisé au cours du test des micronoyaux

❖ Matériel biologique

L'étude a été réalisée sur des souris de laboratoire saines, femelles et de souche NMRI en provenance de l'Institut Pasteur d'Algérie (IPA). Les substances pharmaceutiques testées sont :

- L'insuline humaine (100UI/ml)
- La somatropine recombinante (5mg/1.5ml)
- Le cyclophosphamide (500mg).

❖ Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé au cours de l'étude figure à l'annexe III.

II.1.2. Matériel utilisé au cours du test *in silico*

Pour l'analyse approfondie de l'effet de la somatropine, nous avons réalisé un test *in silico* en utilisant les interfaces web et les outils bio-informatiques répertoriés dans le tableau figurant à l'annexe IV.

II.2. Méthode

II.2.1. Test des micronoyaux

Deux essais ont été réalisés :

- Une mise au point du test des micronoyaux sur deux lots uniquement (témoin positif et témoin négatif) afin d'analyser les résultats de façon qualitative et de valider la méthodologie
- L'essai à proprement parler sur quatre lots (témoin positif et négatif, lot somatropine et insuline) afin d'analyser les résultats de façon quantitative

❖ *Conditions d'hébergement et de gestion des animaux de laboratoire*

Les souris ont été hébergées conformément à l'hébergement standard de l'établissement. Elles ont été réparties en groupes de sept, de façon aléatoire, dans des cages à fond plein.

❖ *Constitution des lots et programme de traitement et de prélèvement*

Nous avons utilisé 28 souris femelles réparties en quatre lots de 7 :

- *Un lot témoin négatif (TN)* : ce lot a reçu 0,2 ml du véhicule utilisé pour administrer les substances d'essai à savoir l'eau pour préparation injectable ou EPPI (eau physiologique stérile à 0,9%) car ce groupe d'animaux doit être manipulé de la même façon que les autres groupes mais sans recevoir de substances actives (OCDE, 2016).
- *Un lot témoin positif (TP)* : c'est un groupe d'animaux qui doit recevoir une substance produisant, de façon fiable, un accroissement détectable de la fréquence des micronoyaux par rapport au niveau spontané (OECD, 2016). Par conséquent, une dose de 40mg/kg de cyclophosphamide, un agent clastogène connu, a été administrée aux souris de ce groupe (Bellout & Bourouissa, 2018; OCDE, 2016)
- *Un lot « Somatropine »* : ce groupe a reçu une dose de 80UI/kg de somatropine.
- *Un lot « Insuline »* : ce groupe a reçu une dose de 10UI/kg d'insuline.

Notre choix s'est porté sur ces doses de somatropine et d'insuline car elles représentent les doses maximales qui ne causent aucune mortalité (committee for medicinal products for human use (CHMP°, 2013; Eli, 1983).

Lors de la constitution des lots, la variation du poids des souris doit être minimale et ne doit pas dépasser 20% du poids moyen (OECD, 2016)

Les cages ont été étiquetées et les souris marquées au niveau de leurs queues.

Une durée de stabulation de 5 jours a été respectée avant le lancement du test des micronoyaux et cela en vue de minimiser le stress causé pendant le transport et de permettre aux souris de s'acclimater aux conditions de laboratoire et à leur nouvel environnement (Jain & Pandey, 2019; OCDE, 2016).

Le tableau ci-dessous résume les principales modalités d'administration des produits utilisés au cours de notre essai.

Tableau I : Modalités d'administration des différents produits d'essai

Lot	Substance	Diluants	Voie d'administration	Dose
Lot In	Insuline humaine	EPPI	SC	10UI/kg
Lot ST	Somatropine	/	SC	80UI/kg
Lot TP	Cyclophosphamide monohydraté	EPPI	IP	40mg/kg
Lot TN	Véhicule : EPPI	/	IP	/

TP : témoin positif ; TN : témoin négatif ; ST : somatropine ; In : insuline ; EPPI : eau pour préparation injectable ; SC : voie sous-cutanée ; IP : voie intrapéritonéale

Deux traitements ont été administrés à 24 heures d'intervalle. Par la suite, des échantillons de sang périphérique, d'environ 100µl, ont été prélevés par voie rétrobulbaire sur des microtubes avec anticoagulant EDTA une seule fois 48 heures après la dernière administration (durée totale de l'essai : 4 jours) (OCDE, 2016).

Le choix du programme de traitement et de prélèvement s'est fait selon les recommandations de l'OCDE. L'intervalle de prélèvement découle de la cinétique d'apparition et de disparition des micronoyaux dans le sang périphérique (OCDE, 2016).



Figure 11 : photo représentant l'administration par voie intrapéritonéale



Figure 12 : représentant un prélèvement par voie rétrobulbaire

Nous avons réalisé un prélèvement sanguin et non pas pour un prélèvement de moelle osseuse car la surveillance des micronoyaux dans le sang périphérique offre :

- Une sensibilité équivalente à celle faite dans les frottis de moelle osseuse
- Une plus grande simplicité dans la préparation et l'évaluation des échantillons
- La possibilité de faire des échantillonnages multiples chez les animaux traités (MacGregor et al., 1980).

❖ *Suivi des animaux*

Un suivi pondéral a été réalisé au cours des 5 jours de stabulation et pendant toute la durée de l'essai. Les signes de toxicité pour l'animal ont aussi été consignés (OCDE, 2016)

❖ *Confection des frottis sanguins*

Deux lames de frottis sanguins ont été confectionnées pour chaque souris de chaque lot.

Après un séchage à l'air, les frottis sanguins ont été fixés au méthanol pendant dix minutes puis colorés au Giemsa 10% selon les étapes décrites ci-dessous :

- Immersion des lames pendant 5 min dans de l'eau distillée.
- Immersion des lames pendant 10 min dans une solution de Giemsa à 10%.
- Immersion des lames pendant 5 min dans de l'eau distillée.
- Immersion des lames pendant 5 min dans le tampon de pH 6.8 préparé au préalable.
- Les lames ont ensuite été égouttées et séchées à l'air (Custer et al., 2016)

❖ *Codage et randomisation des lames*

Toutes les lames ont été codées et randomisées avant l'analyse afin que l'analyste ne puisse pas reconnaître le traitement utilisé (OCDE, 2016).

❖ *Analyse des lames*

L'examen des lames de frottis sanguins fixées et colorées au Giemsa 10% a été fait directement de façon manuelle au microscope optique sans l'utilisation de plateforme d'analyse d'image (OCDE, 2016)

Les éléments suivants ont été utilisés pour distinguer entre les différentes cellules présentes au niveau des frottis :

- *Les érythrocytes matures* (globules rouges ou érythrocytes normochromatiques) : ils sont un peu plus petits que les érythrocytes immatures et se colorent en orange clair ou rose orangé (Jain & Pandey, 2019; OCDE, 2016).
- *Les érythrocytes immatures* (ensemble des érythrocytes polychromatiques, des réticulocytes et des érythrocytes positifs aux marqueurs CD71) : ils sont légèrement plus larges que les érythrocytes matures, ils contiennent de l'ARN et se colorent donc en bleu clair ou gris bleu au Giemsa (Jain & Pandey, 2019; OCDE, 2016).
- *Les érythrocytes immatures micronucléés* : les micronoyaux comportent plusieurs caractéristiques :
 - *Taille* : assez grande mais inférieure au tiers de la taille d'un noyau.
 - *Forme* : plus ou moins arrondie avec un contour clairement défini.
 - *Couleur* : profonde et similaire à celle des noyaux des autres cellules.
 - *Positionnement* : dans le même plan focal que celui de la cellule.
 - *Absence de débris* qui ressemblent aux micronoyaux dans la zone entourant la cellule (Custer et al., 2016).

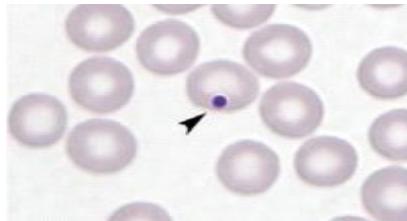


Figure 13 : Frottis sanguin montrant un érythrocyte micronucléé coloré au May-Grünwald-Giemsa (Balmus et al., 2015)

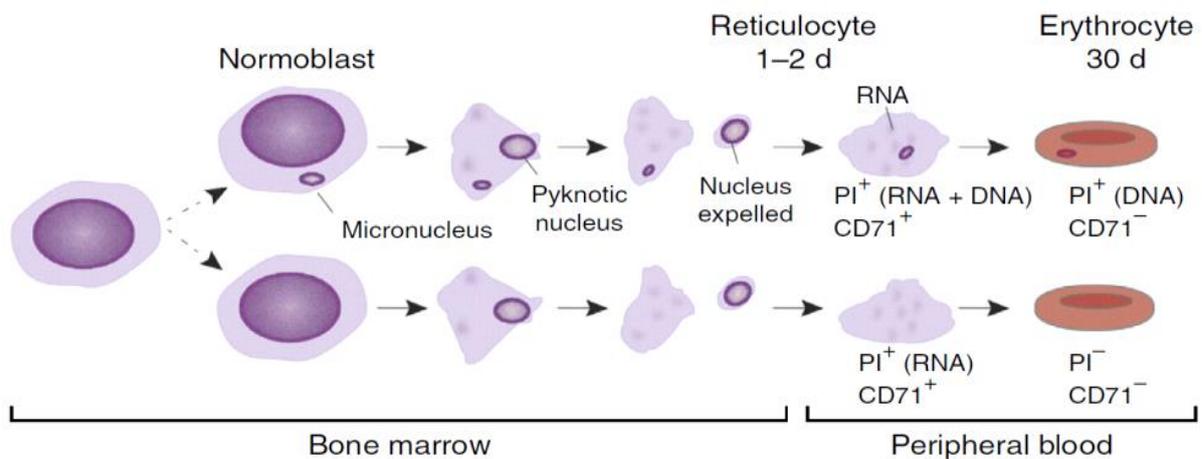


Figure 14 : Formation des différents types d'érythrocytes durant le processus d'érythropoïèse.

❖ *Analyse statistique*

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel JAMOV qui est un programme informatique gratuit et open-source utilisant le langage R pour l'analyse des données et la réalisation de tests statistiques (ŞahiN & Aybek, 2020).

Une évaluation de l'évolution pondérale des souris de chaque lot en fonction du temps a été réalisée par un test non paramétrique sur séries appariées « ANOVA de Friedman » après vérification visuelle de la distribution des données (ANNEXE V et VI). Une valeur P inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

Le critère de génotoxicité mesuré est la fréquence des érythrocytes immatures micronucléés (f_{MN-PCE}). Elle a été calculée sur la base de l'examen d'environ 1 000 érythrocytes immatures par animal (Fusco et al., 1996) selon la formule suivante :

$$\text{Équation 1 : } f_{MN-PCE} = \frac{\text{Nombre de MN PCE}}{\text{Nombre de PCE}} \quad (\text{OCDE, 2016})$$

La ligne directrice actuelle n°474 de l'OCDE propose d'analyser 4000 érythrocytes immatures, soit le double du nombre de cellules demandé dans l'ancienne directive. Cette analyse peut s'avérer laborieuse si l'évaluation est faite manuellement par microscopie optique, d'ailleurs, des alternatives d'évaluation sont proposées comme la cytométrie en flux et l'utilisation de plateformes d'analyse d'image (Hayashi, 2016). En raison de contraintes de temps et de disponibilité du matériel, la f_{MN-PCE} a été mesurée sur la base de l'examen d'environ 1 000 érythrocytes immatures par animal en utilisant la microscopie optique. De plus, notre objectif n'est pas de classer les substances d'essai comme mutagènes mais plutôt d'explorer et de comparer leurs potentiels génotoxiques mutagènes en vue d'ouvrir la voie à des recherches ultérieures plus poussées.

Une comparaison entre les fréquences moyennes des érythrocytes immatures micronucléés des différents lots a ensuite été réalisée grâce au test paramétrique ANOVA après vérification des hypothèses (test de normalité de Shapiro-Wilk et test d'homogénéité des variances de Levene) (Kobayashi & Pillai, 2013). Une valeur P inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative. (Balasubramanyam et al., 2009). En cas de différence significative, une ANOVA post hoc (t-test) sera appliquée.

Le choix des tests statistiques (comparaison des moyennes des f_{MN-PCE} dans les différents lots d'essai par une ANOVA paramétrique suivie d'une ANOVA post-hoc (t-test)) a été inspiré

de la démarche entreprise par plusieurs auteurs (Alcántar-Díaz et al., 2012; Balmus et al., 2015; Berni et al., 2012).

En outre, il faut noter que les tests non paramétriques manquent de puissance lorsque la taille du groupe est limitée et qu'ils doivent être évités lorsqu'un seul sexe et/ou un niveau de dose est examiné (Balmus et al., 2015)

II.2.2. Test in silico

Pour explorer l'action de la somatropine *in silico*, nous avons d'abord téléchargé sa séquence sous format FASTA à partir de la plateforme DrugBank. Nous avons ensuite déposé cette séquence dans Swiss Model afin d'obtenir sa structure 3D.

Après, nous avons utilisé l'encyclopédie des gènes et génomes de Kyoto (KEGG) pour explorer les voies métaboliques ciblées par la somatropine et les gènes qui y sont liés.

Pour finir, nous avons recherché dans le catalogue des mutations somatiques observées dans le cancer (COSMIC) les mutations des gènes précédemment identifiés et leur impact possible sur le cancer.

Résultats et discussion

III. Résultats et discussion

III.1. Test des micronoyaux

III.1.1. Mise au point du test des micronoyaux : analyse qualitative

Le test des micronoyaux est un test réalisé *in vivo* sur des mammifères pour évaluer la génotoxicité d'une substance à travers la détection de micronoyaux.

Comme mentionné précédemment, une mise au point du test a été réalisée afin d'identifier les étapes critiques de l'expérimentation et en vue d'analyser, dans un premier temps, les résultats des lots témoins positif et négatif de façon qualitative.

Les résultats obtenus à partir des lots cités précédemment sont représentés dans la figure ci-dessous.

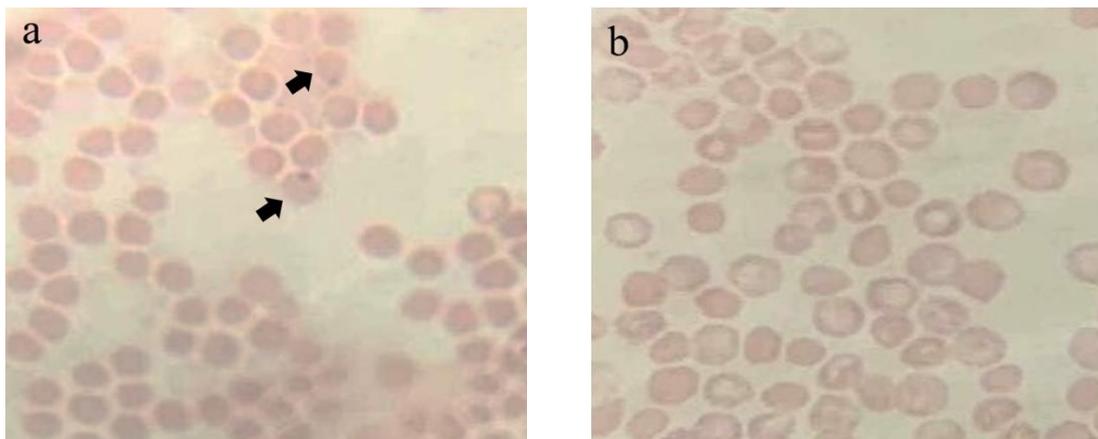


Figure 15 : Analyse qualitative des résultats de la mise au point du test des micronoyaux (grossissement $\times 100$)

(a) Frottis sanguins effectués à partir du sang d'une souris appartenant au lot témoin positif montrant des érythrocytes matures (en rouge orangé) et des érythrocytes immatures micronucléés (cytoplasme en gris avec un micronoyau en violet) ; (b) Frottis sanguin effectué à partir du sang d'une souris appartenant au lot témoin négatif montrant des érythrocytes matures (en rouge orangé) et des érythrocytes immatures (cytoplasme en gris)

Les résultats de la mise au point montrent la présence des éléments suivants :

- Des micronoyaux de couleur violette et à contours nets.
- Des érythrocytes immatures de couleur grise et d'une taille légèrement grande
- Des érythrocytes matures de couleur rose-orangé et d'une plus petite taille.

III.1.2. Test des micronoyaux à proprement parler

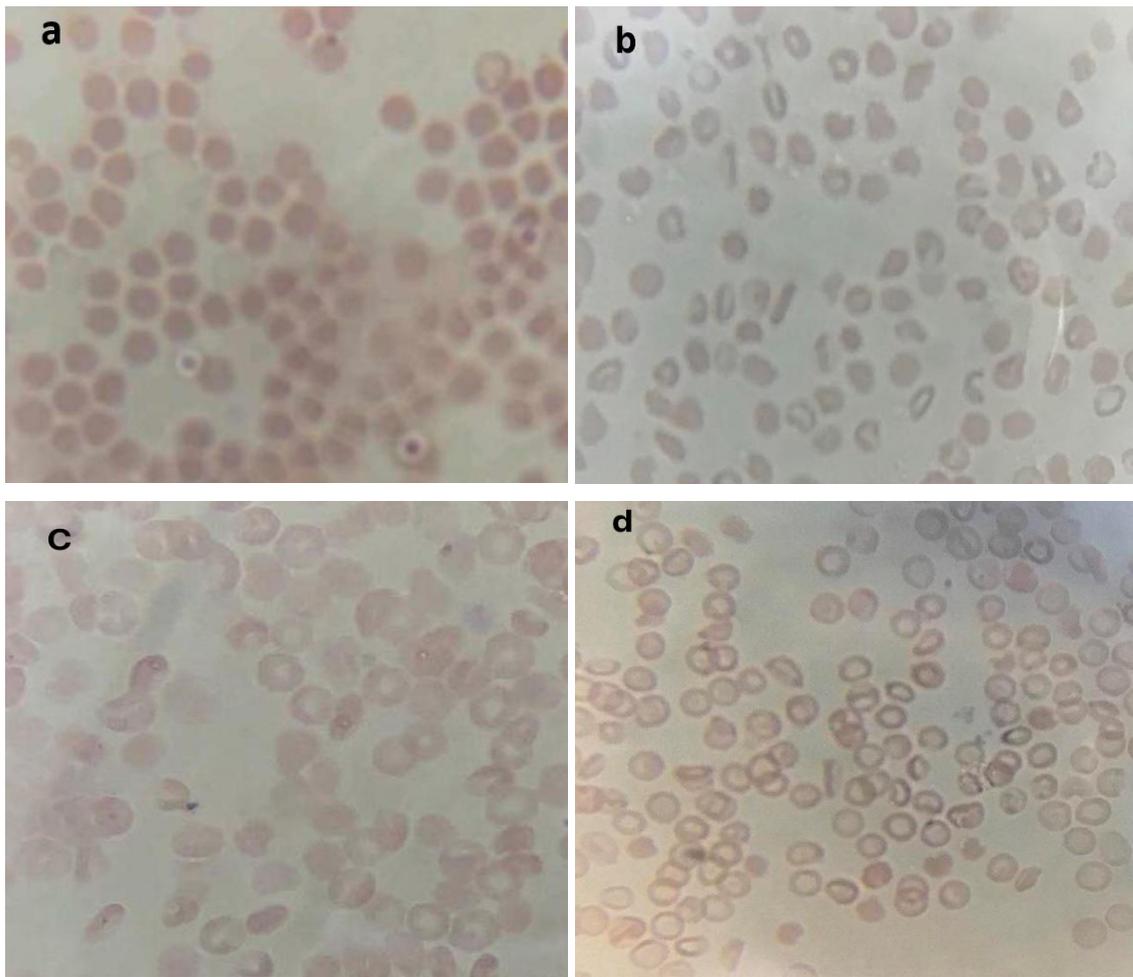


Figure 16 : résultats du test des micronoyaux (grossissement $\times 100$)

(a) Frottis sanguins effectués à partir du sang d'une souris appartenant au lot TP (b) Frottis sanguin effectué à partir du sang d'une souris appartenant au lot TN (c) Frottis sanguin effectué à partir du sang d'une souris appartenant au lot ST (d) Frottis sanguin effectué à partir du sang d'une souris appartenant au lot In

❖ ***Suivi pondéral des animaux de laboratoire durant la période de stabulation et au cours de l'essai***

Le but du suivi pondéral est d'évaluer l'évolution pondérale des souris de chaque lot au cours de la période de stabulation et de l'essai.

Les poids des souris durant la période de stabulation et durant l'essai figurent dans l'annexe VII et VIII respectivement et les courbes de densité de la variable poids durant ces 2 périodes

figurent dans l'annexe V et VI. Visuellement, selon ces courbes, la variable poids ne suit une distribution normale.

Les poids moyens et leurs écart-types au niveau de chaque lot ainsi que les résultats de l'ANOVA non paramétrique réalisée sur séries appariées pour comparer les résultats obtenus au cours de la période de stabulation et durant l'essai figurent dans le tableau II et III respectivement ainsi que dans les annexes IX et X.

Tableau II : Tableau de suivi de l'évolution pondérale des souris au cours de la période de stabulation.

Poids (m ± σ)	J1	J2	J3	J4	J5	ANOVA (p)
Lot TP (g)	21,7 ±1,47	21,7 ±1,13	21,9 ±1,11	22,4 ±0,91	22,8 ±0,92	< 0,001
Lot TN (g)	21,6 ±1,49	21,6±1,48	21,7±1,47	21,9±1,51	22,1±1,45	0,003
Lot ST (g)	21,6 ±1,45	21,6±1,20	21,5±1,27	21,4±1,73	21,6±1,86	0,145
Lot In (g)	21,9 ±1,46	21,9±1,28	22,0±1,21	22,4±1,14	22,6±1,26	< 0,001

TP : témoin positif ; TN : témoin négatif ; ST : somatropine ; In : insuline ; J : jour ; m : poids moyen ; σ : écart-type ; p : degré de signification obtenu après réalisation du test statistique de l'ANOVA non paramétrique de Friedman

Tableau III : Tableau de suivi de l'évolution pondérale des souris au cours de l'essai.

Poids (m ± σ)	J1	J2	J3	J4	ANOVA (p)
Lot TP (g)	22,9±0,93	20,8±1,12	19,7±1,39	19,1±1,56	< 0,01
Lot TN (g)	21,6±1,63	20,1±1,55	19,5±1,43	18,3±1,53	< 0,01
Lot ST (g)	21,5±1,65	19,8±1,80	19,1±1,17	19,1±1,10	0,008
Lot In (g)	22,9±1,26	21,2±1,41	20,9±1,53	20,7±1,31	< 0,01

TP : témoin positif ; TN : témoin négatif ; ST : somatropine ; In : insuline ; m : poids moyen ; σ : écart-type ; p : degré de signification obtenu après réalisation du test statistique de l'ANOVA non paramétrique de Friedman

Les tableaux ci-dessus montrent la présence d'au moins une différence significative entre les poids moyens mesurés aux différents jours pour tous les lots sauf pour celui de la ST durant

la période de stabulation. Une ANOVA post hoc a donc été réalisée et les résultats obtenus figurent dans les annexes XI et XII.

Durant la période de stabulation, les poids moyens des souris du lot TP diffèrent significativement entre le 1^{er} jour et le 4^{ème} / 5^{ème} jour. Cette évolution pondérale est en faveur d'une augmentation. La même évolution est notée pour les lots TN et In (Annexe XI).

Pendant l'essai, on note une différence significative entre les poids moyens mesurés à J1, J2, J3 et J4 et cette différence est en faveur d'une diminution pour les lots TP, TN, ST et In (Annexe XII).

Une perte de poids significative peut être l'un des signes les plus importants de détérioration de l'état de l'animal. Cette perte peut être due à plusieurs facteurs comme le stress provoqué par la manipulation des animaux (CNRS, 2002).

Selon la littérature, les souris traitées par le cyclophosphamide sont sujettes à une perte de poids (Wang et al., 2018). Une étude réalisée sur des souris obèses a montré que la somatropine réduit la prise de poids en augmentant l'oxydation des graisses et en stimulant la lipolyse (Heffernan et al., 2001).

❖ *Suivi des signes cliniques présentés par les animaux de laboratoire durant l'essai et constat de mortalité*

Le suivi des signes cliniques a révélé les éléments suivants : les souris du lot ST ont présenté des signes d'agitation et d'hyperactivité. Certains auteurs ont noté cet effet de la somatropine sur le système nerveux central chez des enfants atteints du syndrome de Prader Willi et traités par l'hormone en question (Wilson et al., 2006).

La souris 3 du lot ST n'a pas survécu à la deuxième administration de somatropine. Ceci pourrait être expliqué par :

- La perte de poids qui a atteint environ 26% du poids initial à J2 de l'essai
- Le stress provoqué par la manipulation
- Les différents effets observés suite à l'administration de somatropine dont : l'apparition de convulsions (Kato et al., 2009) et la difficulté respiratoire observée (Wilson et al., 2006).

❖ *Taux et fréquences des érythrocytes immatures micronucléés dans les différents groupes d'essai*

Les taux d'érythrocytes immatures micronucléés (MN-PCE), d'érythrocytes immatures (PCE) et la fréquence d'apparition des MN-PCE par souris ($f_{\text{MN-PCE}}$) figurent à l'annexe XIII.

Les résultats du tableau figurant à l'annexe XIII montrent la présence de trois valeurs aberrantes correspondant aux souris 3 et 6 du TP et à la souris 7 du TN. Une valeur aberrante est une observation qui s'écarte tellement des autres observations qu'elle laisse penser qu'elle a été générée par un mécanisme différent. Elle peut provenir de 2 sources :

- Les erreurs dans les données
- La variabilité inhérente aux données.

Les valeurs aberrantes peuvent augmenter les taux d'erreur et fausser les estimations statistiques lors de l'utilisation de tests paramétriques ou non paramétriques (Kobayashi & Pillai, 2013). Les valeurs aberrantes identifiées par le logiciel JAMOVI ont été rejetées lors de l'analyse statistique.

La figure ci-dessous reflète la distribution des données de la variable $f_{\text{MN-PCE}}$ mesurées dans les groupes TP, TN, ST et In. On voit que les valeurs aberrantes s'écartent des autres valeurs observées.

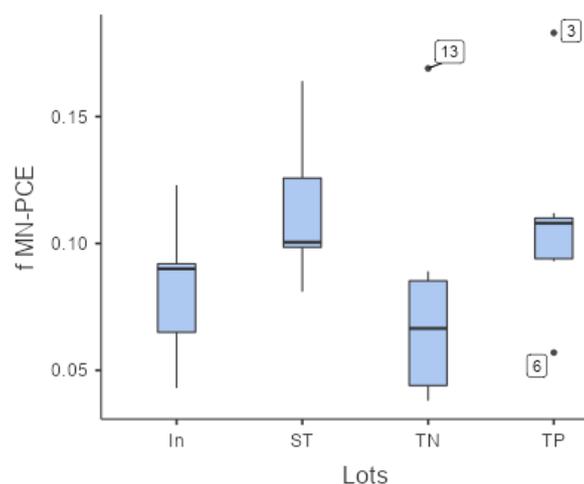


Figure 17: boîtes à moustache représentant la distribution des valeurs de la variable $f_{\text{MN-PCE}}$ mesurées dans les groupes TP, TN, ST et In.

3 : observation n°3 correspondant au TP3 ; 6 : observation n°6 correspondant au TP6 ; 13 : observation n°13 correspondant au TN7

Le tableau IV résume les résultats obtenus : les fréquences des érythrocytes immatures micronucléés dans les différents groupes y sont ordonnées selon un ordre décroissant, de la plus élevée à la moins élevée : ST (0,1130) > TP (0,1080) > In (0,0814) > TN (0,0598).

La valeur maximale a été observée avec le lot ST (0,164) et la minimale avec le lot TN (0,038) (tableau IV).

Tableau IV: tableau récapitulatif des paramètres de tendance centrale, de position et de dispersion des données recueillies.

	N	PCE	MN-PCE	$f_{\text{MN-PCE}} \pm \sigma$	Médiane	Min	Max
ST	6	6236	702	0,1130 \pm 0,0303	0,1005	0,0810	0,1640
TP	5	7462	803	0,1080 \pm 0,0379	0,1080	0,0930	0,1120
In	7	7227	589	0,0814 \pm 0,0266	0,0900	0,0430	0,1230
TN	5	6108	472	0,0598 \pm 0,0222	0,0590	0,0380	0,0890

N : nombre de souris par lot ; PCE : érythrocytes immatures (Polychromatic Erythrocytes); MN-PCE : érythrocytes immatures micronucléés (Micro-nucleated Polychromatic Erythrocytes) ; f : fréquence moyenne des érythrocytes immatures micronucléés ; σ : écart-type ; Min : minimum ; Max : maximum ; ST : somatropine ; TP : témoin positif ; In : insuline ; TN : témoin négatif

Afin de comparer les moyennes des $f_{\text{MN-PCE}}$ des différents lots en utilisant le test paramétrique ANOVA, les hypothèses de normalité et d'homogénéité des variances ont été vérifiées en appliquant le test de Shapiro-Wilk et le test de Levene respectivement.

Les résultats de ces tests figurent au niveau de l'annexe XIV. Une valeur p inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

Le test de normalité de Shapiro-Wilk et le test d'homogénéité des variances de Levene (Annexe XIV) ont donné respectivement des valeurs p de 0,810 (> 0,05) et de 0,190 (> 0,05), par conséquent, les conditions d'application des tests paramétriques sont vérifiées (Kobayashi & Pillai, 2013).

Les résultats du test ANOVA sont présentés dans le tableau suivant. Une valeur p inférieure à 0,05 a été considérée comme statistiquement significative.

Tableau V : Résultats du test d'analyse de la variance ANOVA

	Somme des carrés	ddl	Carrés moyens	F	P
Lots	0,00912	3	0,00304	5,20	0,009
Résidus	0,01111	19	5,84e-4		

Selon le tableau V, le test d'analyse de la variance (ANOVA) a donné une valeur p égale à 0,009 (< 0,05). Donc, il existe au moins une différence significative entre les lots analysés.

Etant donné que la valeur p obtenue est inférieure à 0,05 une analyse post-hoc (t-test) a été effectuée comme le montre le tableau ci-dessous.

Tableau VI : Résultats de l'ANOVA post-hoc

Comparaison						
Lot 1	Lot 2	Différence moyenne	Erreur standard	ddl	t	P
TN	TP	-0,04340	0,0153	19,0	-2,838	0,011
ST	TN	0,05320	0,0146	19,0	3,634	0,002
ST	TP	0,00980	0,0146	19,0	0,669	0,511
In	ST	-0,03157	0,0135	19,0	-2,347	0,030
In	TN	0,02163	0,0142	19,0	1,528	0,143
In	TP	-0,02177	0,0142	19,0	-1,538	0,141

ST : somatropine ; TP : témoin positif ; In : insuline ; TN : témoin négatif ; ddl : degré de liberté

L'analyse post-hoc (tableau VI) a révélé la présence d'une différence significative entre la f_{MN-PCE} des lots TP et TN, ST et TN ainsi qu'entre les lots ST et In.

La f_{MN-PCE} du lot ST diffère significativement de celle du TN avec une différence moyenne de 0,053. Ainsi, selon les résultats obtenus, la somatropine possède un potentiel génotoxique en augmentant la fréquence d'apparition des MN-PCE dans le sang périphérique. Plusieurs études sont en faveur de cette observation :

- Une étude réalisée sur des souris Snell Dwarf a révélée qu'une administration prolongée de somatropine pouvait entraîner une augmentation significative des fréquences d'aberrations chromosomiques dans les cellules de la moelle osseuse, mesurées par le test des micronoyaux (EMEA, 2004).
- Une étude réalisée *in vitro* sur des cellules CHO a aussi montré qu'un traitement par la somatropine pouvait induire des aberrations chromosomiques structurelles (EMEA, 2004).

Par contre, d'autres études affirment qu'aucun effet mutagène n'a été observé suite à la réalisation de tests de mutagénicité avec des préparations de somatropine (Flodh, 1986).

Aucune différence significative n'a été détectée par le test ANOVA post-hoc entre la f_{MN-PCE} du lot In et celle du TN ou celle du TP. Notons que la f_{MN-PCE} de l'In se situe entre les fréquences des lots TN et TP. Nous ne pouvons donc pas conclure quant à son potentiel génotoxique. Selon certains résumés des caractéristiques des produits pharmaceutiques (RCP) à base d'insuline humaine, les données issues des études de génotoxicité et de cancérogenèse ne révèlent pas de risque particulier pour l'homme (Novo Nordisk A/S, 2002). Par contre, dans la littérature, le lien entre l'hyperinsulinisme et l'apparition de mutations de l'ADN a été décrit et serait dû à une augmentation du stress oxydatif (Eman Da'as Awad, 2018).

Le test a révélé aussi une différence significative entre le lot In et le lot ST. Nous pouvons conclure que la fréquence d'apparition des érythrocytes immatures micronucléés est plus importante avec la somatropine qu'avec l'insuline.

Ainsi, les résultats de cette étude et les résultats de la recherche bibliographique nous indiquent que les hormones impliquées dans la croissance cellulaire, dont la somatropine, peuvent présenter un potentiel génotoxique par induction de mutation de l'ADN.

Mais notre recherche n'a porté que sur deux hormones impliquées dans le processus de croissance cellulaire. L'exploration du potentiel génotoxique d'autres hormones telles que les hormones thyroïdiennes permettrait d'élargir notre perception du sujet. L'analyse de 1000 érythrocytes immatures par lame constitue aussi une limite à cette étude.

III.1.2. Test in silico

❖ Séquence FASTA et structure 3D de la somatropine

La séquence FASTA de la somatropine est la suivante : >DB00052 sequence
FPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSES IPT
PSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDL EE
GIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETF
LRIVQCRSVEGSCGF.

La structure 3D de la somatropine obtenue à partir de Swiss Model est représentée dans la figure ci-dessous.

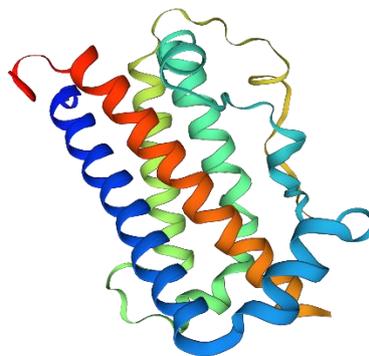


Figure 18 : Structure 3D de la somatropine.

❖ Voies métaboliques ciblées par la somatropine et les gènes qui y sont liés

Dans l'encyclopédie KEGG, on trouve 3 voies métaboliques ciblées par la somatropine :

- La voie : JAK-STAT
- La voie : Cytokine-cytokine receptor interaction
- La voie : Neuroactive ligand-receptor interaction

Comme la voie JAK STAT est très impliquée dans le cancer, nous avons décidé de l'explorer plus en détail (figure 16). Parmi les gènes liés à cette voie, seul le SOCS (SOCS1, SOCS2 et SOCS3) est lié à la somatropine.

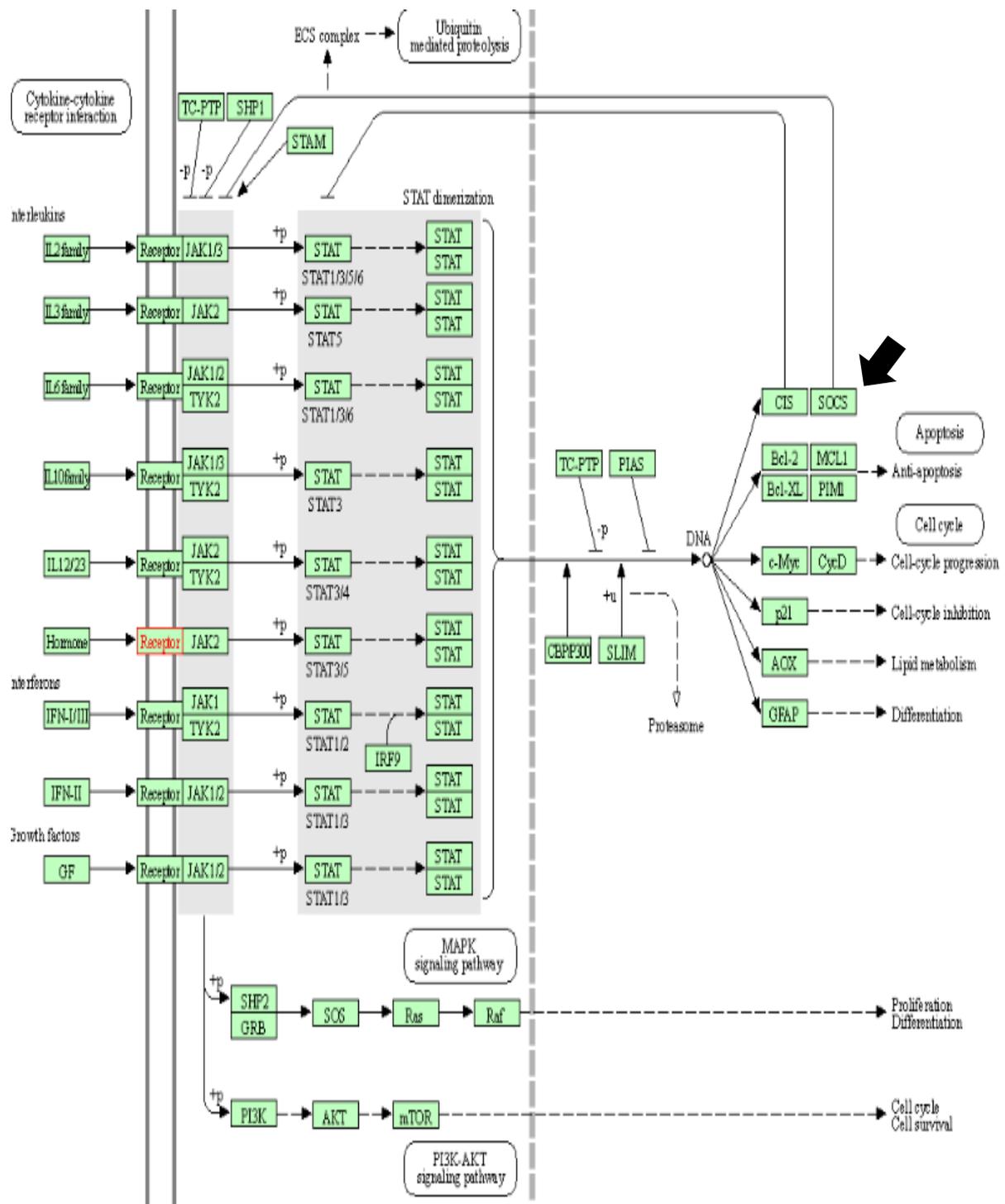


Figure 19 : Voie métabolique JAK STAT ciblée par la somatotropine et les gènes qui y sont liés.

❖ *Mutations des gènes identifiés*

Le tableau ci-dessous résume les différents types de mutations des gènes SOCS1, SOCS2 et SOCS3 répertoriés dans le catalogue COSMIC.

Tableau VII : différents types de mutations des gènes SOCS1, SOCS2 et SOCS3 répertoriés dans le catalogue COSMIC.

	SOCS1	SOCS2	SOCS3
Substitution non-sens	64 (11,74%)	3 (1,85%)	6 (3,45%)
Substitution faux-sens	366 (67,16%)	71 (43,83%)	86 (49,43%)
Substitution synonyme	57 (10,46%)	21 (12,96%)	42 (24,14%)
Insertion sans décalage	9 (1,65%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
Insertion avec décalage	15 (2,75%)	4 (2,47%)	1 (0,57%)
Délétion sans décalage	34 (6,24%)	0 (0,00%)	1 (0,57%)
Délétion avec décalage	113 (20,73%)	0 (0,00%)	7 (4,02%)
Mutation complexe	9 (1,65%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
Autres	66 (12,11%)	34 (20,99%)	33 (18,97%)
Total des échantillons	545	162	174

En résumé, l'étude *in silico* nous a permis d'identifier les voies métaboliques ciblées par la somatropine et les gènes qui y sont liés.

Parmi ces voies, il y a la voie JAK STAT qui est très impliquée dans la physiopathologie du cancer (Brooks & Putoczki, 2020). Les gènes identifiés comme étant liés à cette voie et à la somatropine sont le SOCS1, SOCS2 et SOCS3. Ces gènes peuvent être sujets à différents types de mutations comme le montre le tableau X. Dans la littérature, plusieurs auteurs citent la relation entre les anomalies observées avec ces gènes et le développement de cancers, notamment : le cancer du sein, de l'ovaire (Sutherland et al., 2004).

CONCLUSION

CONCLUSION

Le cancer est la conséquence de la transformation de cellules normales en cellules tumorales caractérisées par une croissance cellulaire anormale et incontrôlée. D'un côté, cette transformation cellulaire implique la présence possible d'agents génotoxiques. La génotoxicité étant la capacité de certains agents à induire des dommages à l'ADN pouvant conduire à des mutations. De l'autre, le contrôle de la croissance cellulaire implique plusieurs processus complexes, notamment d'ordre hormonal et génétique.

Afin de mieux comprendre la complexité du sujet et d'explorer et de comparer le potentiel génotoxique de certaines hormones impliquées dans la croissance (somatotropine et insuline), nous avons réalisé le test des micronoyaux.

Cette étude nous a permis de montrer que la somatotropine augmente la fréquence d'apparition des érythrocytes immatures micronucléés dans le sang périphérique comparée au témoin négatif et à l'insuline. De plus, plusieurs gènes liés aux voies métaboliques ciblées par la somatotropine (SOCS1, SOCS2 et SOCS3) sont sujets à des mutations et sont impliqués dans la survenue de certains cancers.

Aucune conclusion ne peut être prise quant au potentiel génotoxique de l'insuline. En conséquence, des études plus poussées sont nécessaires pour appuyer et compléter les résultats de cette recherche.

REFERENCES

- Alcántar-Díaz, B. E., Gómez-Meda, B. C., Zúñiga-González, G. M., Zamora-Perez, A. L., González-Cuevas, J., Álvarez-Rodríguez, B. A., Sánchez-Parada, M. G., García-Bañuelos, J. J., & Armendáriz-Borunda, J. (2012). Genotoxic evaluation of pirfenidone using erythrocyte rodent micronucleus assay. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(8), 2760-2765. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.05.049>
- Allain, pierre. (1996). *Pharmacologie Les Médicaments*-. troisième édition.
- Balmus, G., Karp, N. A., Ng, B. L., Jackson, S. P., Adams, D. J., & McIntyre, R. E. (2015). A high-throughput in vivo micronucleus assay for genome instability screening in mice. *Nature Protocols*, *10*(1), 205-215. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.010>
- Battu, V. (2013). Les insulines. *Actualités Pharmaceutiques*, *52*(530), 55-59. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2013.09.013>
- Bellout, C., & Bourouissa, nabila. (2018). *Evaluation de la génotoxicité et du stress oxydatif induits par le valsartan : Un antagoniste de l'angiotensine II* [université Med-Seddik Benyahia]. <http://dspace.univ-jijel.dz:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/536/M-S.PHA.%2012-19.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Benhacine, L., & Sahil, N. (2016). *Etude de la génotoxicité des extraits de Pistacia lentiscus par le test d'Ames*.
- Berni, A., Grossi, M. R., Pepe, G., Filippi, S., Muthukumar, S., Papeschi, C., Natarajan, A. T., & Palitti, F. (2012). Protective effect of ellagic acid (EA) on micronucleus formation induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in mammalian cells, in vitro assays and in vivo. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *746*(1), 60-65. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2012.03.007>
- Bitil, A. (2015). *Les insulines, médicaments actuels et évolution dans la prise en charge du diabète insulino-dépendant*.

- Breda, L., & Rivella, S. (2014). Modulators of Erythropoiesis. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 28(2), 375-386. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2013.12.001>
- Brooks, A. J., & Putoczki, T. (2020). JAK-STAT Signalling Pathway in Cancer. *Cancers*, 12(7), 1971. <https://doi.org/10.3390/cancers12071971>
- Burnol, A.-F., Morzyglod, L., & Popineau, L. (2013). Dialogue entre les voies de signalisation de l'insuline et les voies de prolifération cellulaire. *Annales d'Endocrinologie*, 74(2), 74-78. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2013.02.003>
- Cachot, J., & Dégremont, C. (2009). *Quel risque pour les espèces aquatiques ?*
- CNRS. (2002). *Le « point limite » en expérimentation animale*. https://ciepal-azur.unice.fr/E_ANI_Externe_11_Point%20limite%20notion%20CNRS.pdf
- committee for medicinal products for human use (CHMP). (2013). *Assessment report-Somatropin Biopartners* (EMA/CHMP/002196/0000; p. 88). agence européenne des médicaments (EMA). https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/somatropin-biopartners-epar-public-assessment-report_en.pdf
- Custer, L., Doherty, A., Bemis, J. C., & Proudlock, R. (2016). The In Vivo Rodent Micronucleus Assay. In *Genetic Toxicology Testing* (p. 269-322). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800764-8.00008-2>
- Dangoumau, J. (2006). *PHARMACOLOGIE GENERALE*.
- Darmon, M. (2017). *Biologie moléculaire de la cellule* (6e éd). Lavoisier-Médecine sciences.
- Dictionnaire de l'Académie Nationale de Médecine*. (s. d.). Consulté 8 juillet 2023, à l'adresse [http://dictionnaire.academie-medecine.fr/search?titre=Anomalies%20de%20la%20croissance%20cellulaire%20\(cancer%20progen%20se\)](http://dictionnaire.academie-medecine.fr/search?titre=Anomalies%20de%20la%20croissance%20cellulaire%20(cancer%20progen%20se))

- Dimassi, S., Tilla, M., & Sanlaville, D. (2017). Anomalies chromosomiques. *Journal de Pédiatrie et de Puériculture*, 30(5-6), 249-270.
<https://doi.org/10.1016/j.jpp.2017.09.007>
- Eli, L. (1983). *HUMULIN R* (technique 245812; (30 % d'insuline injectable et 70 % d'insuline humaine biosynthétique [source ADN_r] isophane) Suspension pour injection à 100 unités/mL Code ATC : A10AD01 insuline à action intermédiaire ou à longue durée d'action combinée à l'insuline à action rapide, p. Page 1 de 64). Eli Lilly Canada Inc.
- Eman Da'as Awad. (2018). *Modulation of insulin-induced genotoxicity in vitro and genomic damage in gestational diabetes* [Dissertation for Submission to a Doctoral Degree at the Graduate School of Life Sciences, Julius-Maximilians-University Würzburg, Section: Biomedicine].
https://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus4-wuerzburg/frontdoor/deliver/index/docId/16186/file/Awad_Eman_Theses.pdf
- EMEA. (2004). *SCIENTIFIC DISCUSSION : NutropinAq*.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/nutropinaq-epar-scientific-discussion_en.pdf
- Étienne-Selloum, N., & Faure, S. (2015). *Du mécanisme d'action des médicaments à la thérapeutique : Sciences du médicament*. Elsevier Masson.
- Fardel, O., Vernhet, L., & Nouvel, V. (2009). *Utilisation des tests de génotoxicité pour la surveillance de l'exposition des travailleurs dans l'industrie du traitement et recyclage des déchets*.
- Flodh, H. (1986). Human growth hormone produced with recombinant DNA technology : Development and production. *Acta Paediatrica Scandinavica. Supplement*, 325, 1-9.
<https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1986.tb10356.x>
- Foltete, A.-S. (2010). *Effets génotoxiques et systèmes de détoxification chez Vicia faba (Fabaceae) dans le cadre de l'évaluation des sols pollués* [Thèse en vue de l'obtention

- du grade de Docteur ès sciences mention Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes, Lorraine]. <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752919/document>
- Fuscoe, J. C., Afshari, A. J., George, M. H., DeAngelo, A. B., Tice, R. R., Salman, T., & Allen, J. W. (1996). In vivo genotoxicity of dichloroacetic acid : Evaluation with the mouse peripheral blood micronucleus assay and the single cell gel assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 27(1), 1-9. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(1996\)27:1<1::AID-EM1>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(1996)27:1<1::AID-EM1>3.0.CO;2-L)
- Graillot, V. (2012). *Appréciation quantitative de l'exposition alimentaire à des mélanges de pesticides et mécanismes de génotoxicité*.
- Gupta, P. K. (2016). *Fundamentals of toxicology : Essential concepts and applications*. BS Publications ; Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier.
- Hayashi, M. (2016). The micronucleus test—Most widely used in vivo genotoxicity test—. *Genes and Environment*, 38(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s41021-016-0044-x>
- Heffernan, M. A., Thorburn, A. W., Fam, B., Summers, R., Conway-Campbell, B., Waters, M. J., & Ng, F. M. (2001). Increase of fat oxidation and weight loss in obese mice caused by chronic treatment with human growth hormone or a modified C-terminal fragment. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders: Journal of the International Association for the Study of Obesity*, 25(10), 1442-1449. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801740>
- Jain, A. K., & Pandey, A. K. (2019). In Vivo Micronucleus Assay in Mouse Bone Marrow. In A. Dhawan & M. Bajpayee (Éds.), *Genotoxicity Assessment* (Vol. 2031, p. 135-146). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9646-9_7
- Kaâda, D. E. (2018). *Correspondant au 29 juillet 2018*.
- Kato, K., Suzuki, M., Kanno, H., Sekino, S., Kusakabe, K., Okada, T., Mori, T., Yoshida, K., & Hirabayashi, Y. (2009). Distinct role of growth hormone on epilepsy progression in

- a model of temporal lobe epilepsy. *Journal of Neurochemistry*, 110(2), 509-519.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06132.x>
- Kobayashi, K., & Pillai, K. S. (2013). *A handbook of applied statistics in pharmacology*. CRC Press/Taylor Francis Group ; Science Publishers.
- Lacour, B. (2016). *Physiologie humaine*.
- Lahlou, N., & Roger, M. (2006). Hormone somatotrope. *EMC - Endocrinologie - Nutrition*, 3(2), 1-16. [https://doi.org/10.1016/S1155-1941\(06\)38684-2](https://doi.org/10.1016/S1155-1941(06)38684-2)
- MacGregor, J. T., Wehr, C. M., & Gould, D. H. (1980). Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. *Environmental Mutagenesis*, 2(4), 509-514. <https://doi.org/10.1002/em.2860020408>
- Manon, broutin, & Hervé, watier. (2015). *Les biomédicaments Ire partie : Cadre généra.*
- Novo Nordisk A/S. (2002). *RÉSUMÉ DES CARACTÉRISTIQUES DU PRODUIT : Insulatard*.
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/insulatard-epar-product-information_fr.pdf
- OCDE. (2016). *Essai n° 474 : Test du Micronoyau sur Érythrocytes de Mammifères*. OECD.
<https://doi.org/10.1787/9789264264779-fr>
- Orsière, T., Sari-Minodier, I., Decome, L., Botta, C., Iarmarcovai, G., & Botta, A. (2015). *De la génotoxicologie à la biosurveillance*.
- Pharmacologie : Des cibles à la thérapeutique : cours et fiches thérapeutiques*. (2014). Dunod.
- Pierre, A. (2014). *Les médicaments* (4e édition). Cdm Editions.
- Pocock Gillian. (2019). *Physiologie humaine et physiopathologie : Les fondements de la médecine / Gillian Pocock,... Christopher D. Richards,... et David A. Richards,... ; traduction de l'anglais par Jean-Paul Richalet,... Henry Vandewalle,... Elsevier Masson*.

- Poidvin, A. (2019). *La morbidité à long terme des enfants traités par hormone de croissance synthétique.*
- Rapaport, R., & Moghaddas, R. (2001). Growth hormone therapy and immune function. In *NeuroImmune Biology* (Vol. 1, p. 403-408). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S1567-7443\(01\)80037-5](https://doi.org/10.1016/S1567-7443(01)80037-5)
- Rosenbloom, A. L. (2007). Physiologie de la croissance. *Annales Nestlé (Ed. française)*, 65(3), 99-110. <https://doi.org/10.1159/000141031>
- ŞahiN, M., & Aybek, E. (2020). Jamovi : An Easy to Use Statistical Software for the Social Scientists. *International Journal of Assessment Tools in Education*, 6(4), 670-692. <https://doi.org/10.21449/ijate.661803>
- Saks, M., Upreti, S., Sv, R., & Dang, R. (2017). Genotoxicity : Mechanisms, Testing Guidelines and Methods. *Pharmaceutical Sciences.*
- Seukep, A. J., Noumedem, J. A. K., Djeussi, D. E., & Kuete, V. (2014). Genotoxicity and Teratogenicity of African Medicinal Plants. In *Toxicological Survey of African Medicinal Plants* (p. 235-275). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800018-2.00009-1>
- Sherwood, L., & Ectors, F. (2015). *Physiologie humaine* (3e éd). De Boeck.
- Sinclair, A. (2013). Erythropoiesis stimulating agents approaches to modulate activity. *Biologics: Targets and Therapy*, 161. <https://doi.org/10.2147/BTT.S45971>
- Slater, G. (2021). HGH and Cartilage. *Journal of Regenerative Biology and Medicine.* [https://doi.org/10.37191/Mapsci-2582-385X-3\(4\)-077](https://doi.org/10.37191/Mapsci-2582-385X-3(4)-077)
- Sutherland, K. D., Lindeman, G. J., Choong, D. Y. H., Wittlin, S., Brentzell, L., Phillips, W., Campbell, I. G., & Visvader, J. E. (2004). Differential hypermethylation of SOCS genes in ovarian and breast carcinomas. *Oncogene*, 23(46), 7726-7733. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207787>

- Suzuki, N., Mukai, H. Y., & Yamamoto, M. (2015). In Vivo Regulation of Erythropoiesis by Chemically Inducible Dimerization of the Erythropoietin Receptor Intracellular Domain. *PLOS ONE*, *10*(3), e0119442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119442>
- Tests de génotoxicité : Identifier des biomarqueurs d'effet lors des expositions à des agents cancérogènes. (2021). *MISE AU POINT*.
- Wang, S., Huang, S., Ye, Q., Zeng, X., Yu, H., Qi, D., & Qiao, S. (2018). Prevention of Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression in Mice with the Antimicrobial Peptide Sublancin. *Journal of Immunology Research*, *2018*, 4353580. <https://doi.org/10.1155/2018/4353580>
- Wilson, S. S. I., Cotterill, A. M., & Harris, M. (2006). Growth hormone and respiratory compromise in Prader–Willi Syndrome. *Archives of Disease in Childhood*, *91*(4), 349-350. <https://doi.org/10.1136/adc.2005.086090>
- Wu, M. Y. W., Cully, M., Andersen, D., & Leever, S. J. (2007). Insulin delays the progression of *Drosophila* cells through G2/M by activating the dTOR/dRaptor complex. *The EMBO Journal*, *26*(2), 371-379. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601487>

ANNEXES

ANNEXE I : Processus d'érythropoïèse

L'érythropoïèse est le processus qui permet la formation des érythrocytes matures à partir des cellules souches hématopoïétiques (CSH) en réponse aux stimuli d'une hormone appelée érythropoïétine. Ce processus se déroule au niveau de la moelle osseuse.

Dans un premier temps, les CSH se différencient en proérythroblastes, qui se transforment à leurs tours en érythroblastes basophiles, polychromatophiles et acidophiles. Dans un second temps, on note une condensation des érythroblastes acidophiles suivie d'une expulsion de leurs noyaux aboutissant à la formation des réticulocytes. Enfin, il y a une maturation des réticulocytes en érythrocytes matures, dépourvus de noyau (Breda & Rivella, 2014; Suzuki et al., 2015).

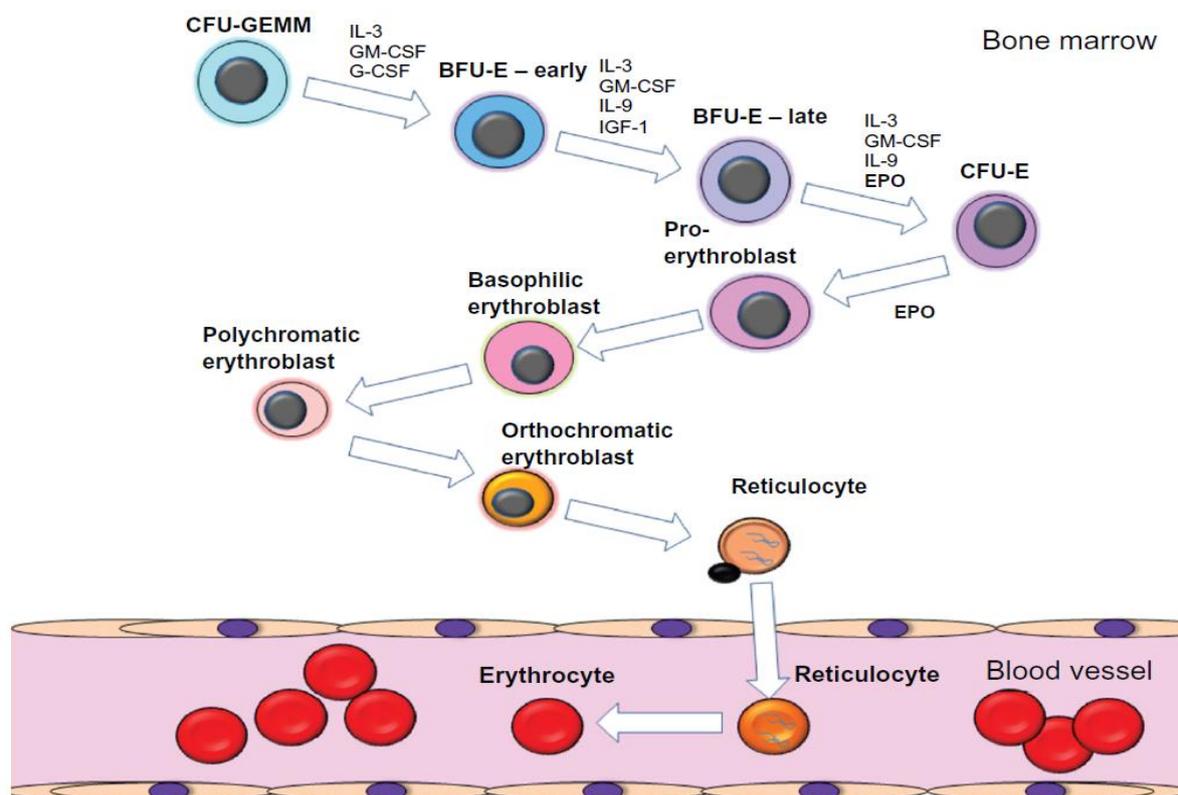


Figure 20 : différents stades de l'érythropoïèse (Sinclair, 2013).

BFU-E, burst forming unit-erythroid; CFU-E, colony forming unit-erythroid; CFU-GEMM, colony forming unit-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte; EPO, erythropoietin; G-CSF, granulocyte colony stimulating factor; GM-CSF, granulocyte monocyte colony stimulating factor; IL-3, interleukin 3; IL-9, interleukin 9, IGF-1, insulin-like growth factor 1.

ANNEXE II : Classification des insulines

Tableau VIII : classification des insulines (Battu, 2013)

Insulines	Caractéristiques	Délai d'action	Temps d'action (en théorie)	Injection
D'action rapide	Insulines pures en solutions limpides	Environ 15 minutes	6 à 8 heures	15 à 30 minutes avant le repas
D'action très rapide	Insulines pures en solutions limpides	Immédiat	4 heures	Au moment des repas
D'action intermédiaire	Action retardée par l'ajout de zinc et de protamine Suspension : agiter avant l'emploi	45 minutes à 1,5 heure	Environ 12 heures	En même temps que l'insuline à usage rapide (déjeuner et souper), ou au coucher
Mélanges d'insulines	Suspension : agiter avant l'emploi	15 minutes ou immédiatement	Environ 12 heures	15 à 30 minutes avant le repas ou au moment du repas
D'action prolongée	Suspension : agiter avant l'emploi	1 à 4 heures	20 à 30 heures	Au couché

ANNEXE III : matériel non biologique utilisé au cours des différentes étapes de l'essai.

Tableau IX : tableau récapitulatif du matériel non biologique utilisé au cours des différentes étapes de l'essai

Etapes	Consommable	Réactifs	Equipements / instruments
Administration des substances d'essai aux souris	Marqueurs, gants, seringues de 1ml, coton, compresses stériles	Eau physiologique à 0,9% EPPI Ethanol à 70°	Portoirs, grille.
Prélèvements sanguins	Pipettes pasteur, gants, Seringues de 1ml, coton, compresses stériles, micro-tubes avec anticoagulant EDTA	/	Portoirs
Confection des frottis sanguins	Lames, gants, pipettes pasteur, coton, compresses stériles	Ethanol à 70°	Portoirs, Micropipettes
Fixation et coloration des lames de frottis sanguins	Gants, étiquettes	Giemsa 10% Tampon phosphate de pH 6,8 Méthanol.	Portoirs, balance de précision, Réfrigérateur.
Lecture des lames de frottis sanguins	Etiquettes	Huile à immersion	Microscope optique

EPPI : eau pour préparation injectable ; EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique

ANNEXE IV : matériel utilisé au cours du test in silico.

Tableau X : tableau récapitulatif du matériel utilisé au cours du test in silico

Bases des données	But d'utilisation	URL
DrugBank	Récupération du format FASTA	www.go.drugbank.com/drugs/DB00052
Swiss Model	Structure protéique + ligand	www.swissmodel.expasy.org
KEGG	Somatropine	KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
COSMIC	Les mutations COSMICs	https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/

ANNEXE V : Courbes de densité de la variable poids mesurée dans les différents lots d'essai au cours de la période de stabulation (de J1 à J5)

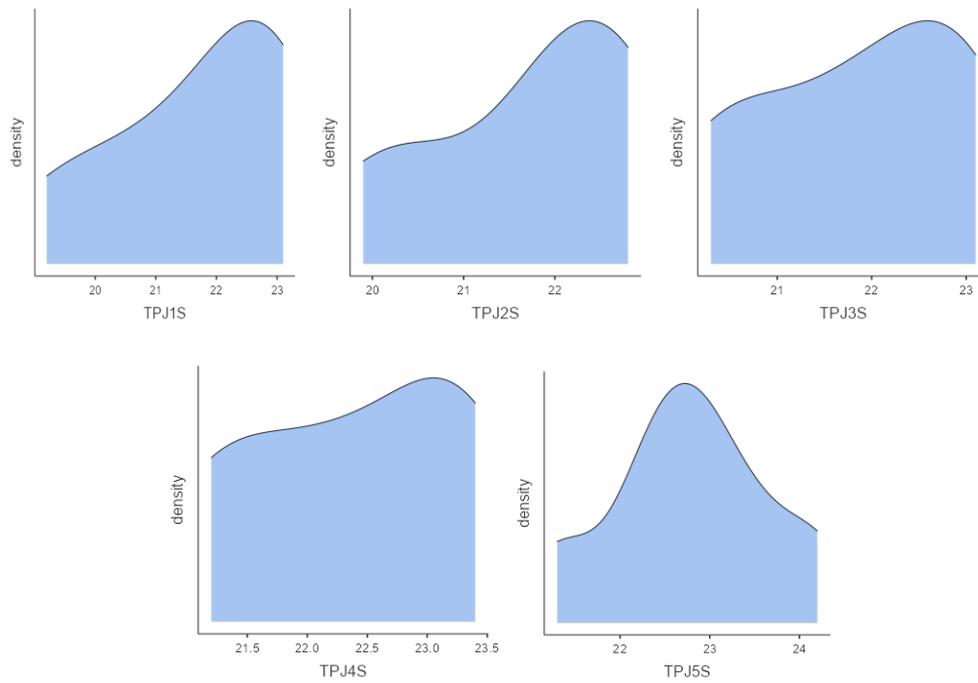


Figure 21 : courbes de densité de la variable poids mesurée dans le lot TP au cours de la période de stabulation

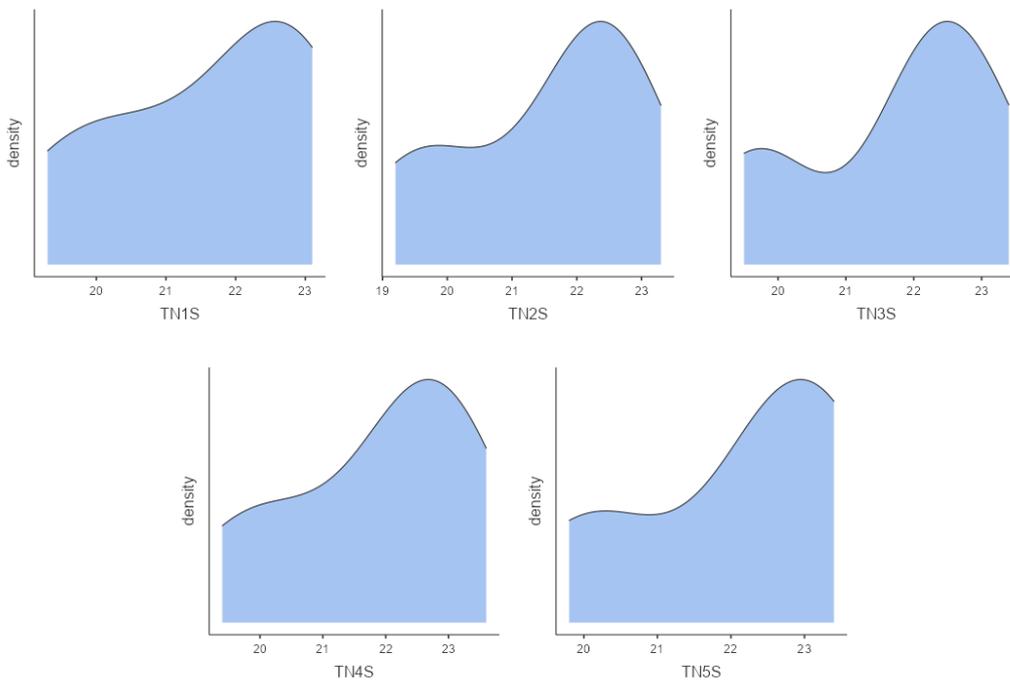


Figure 22 : courbes de densité de la variable poids mesurée dans le lot TN au cours de la période de stabulation

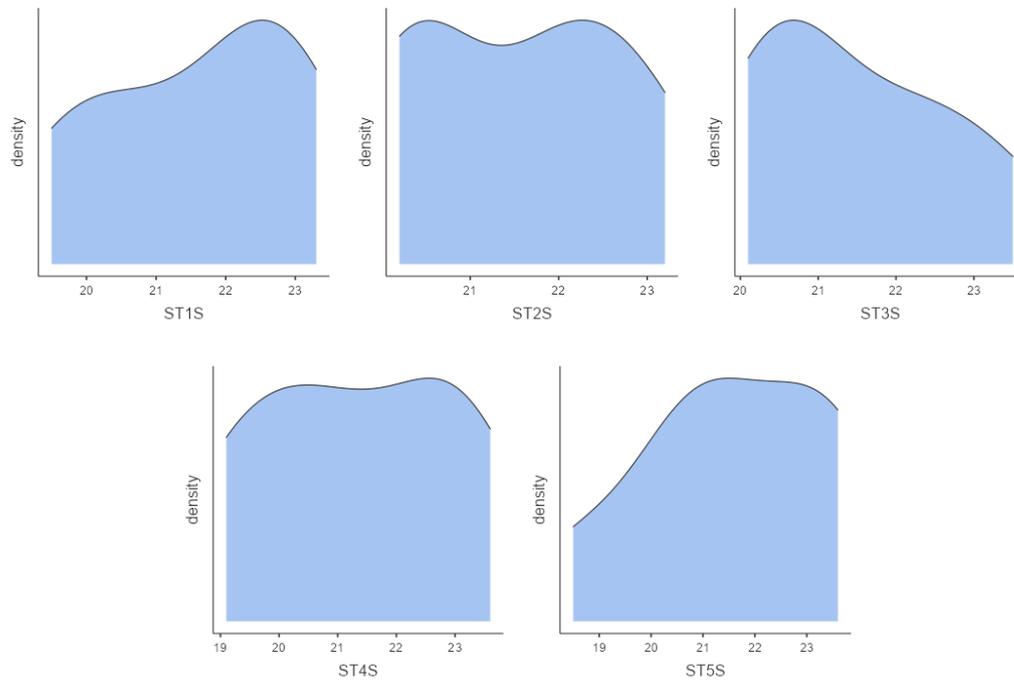


Figure 23 : courbes de densité de la variable poids mesurée dans le lot ST au cours de la période de stabulation

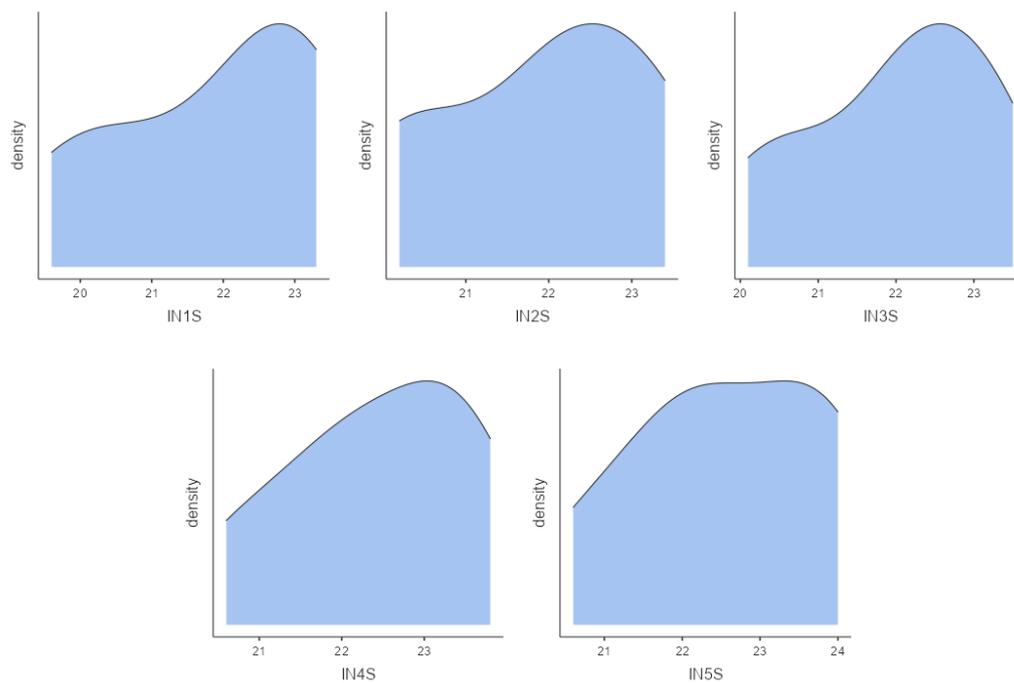


Figure 24 : courbes de densité de la variable poids mesurée dans le lot In au cours de la période de stabulation

ANNEXE VI : Courbes de densité de la variable poids mesurée dans les différents lots d'essai au cours de l'essai (de J1 à J4)

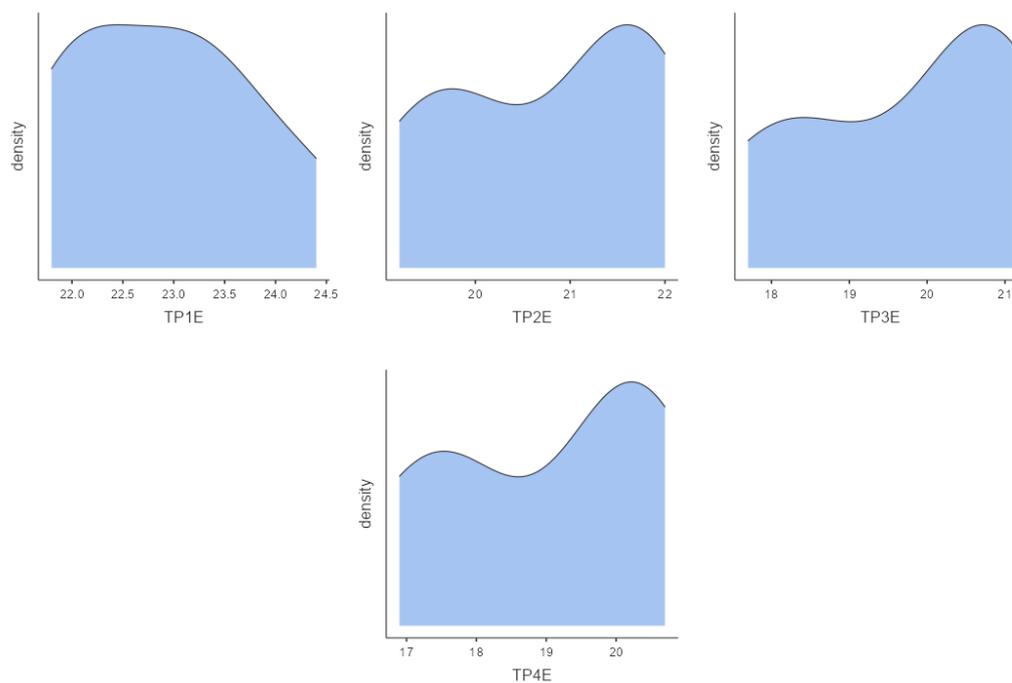


Figure 25 : courbes de densité de la variable poids mesurée dans le lot TP au cours de l'essai

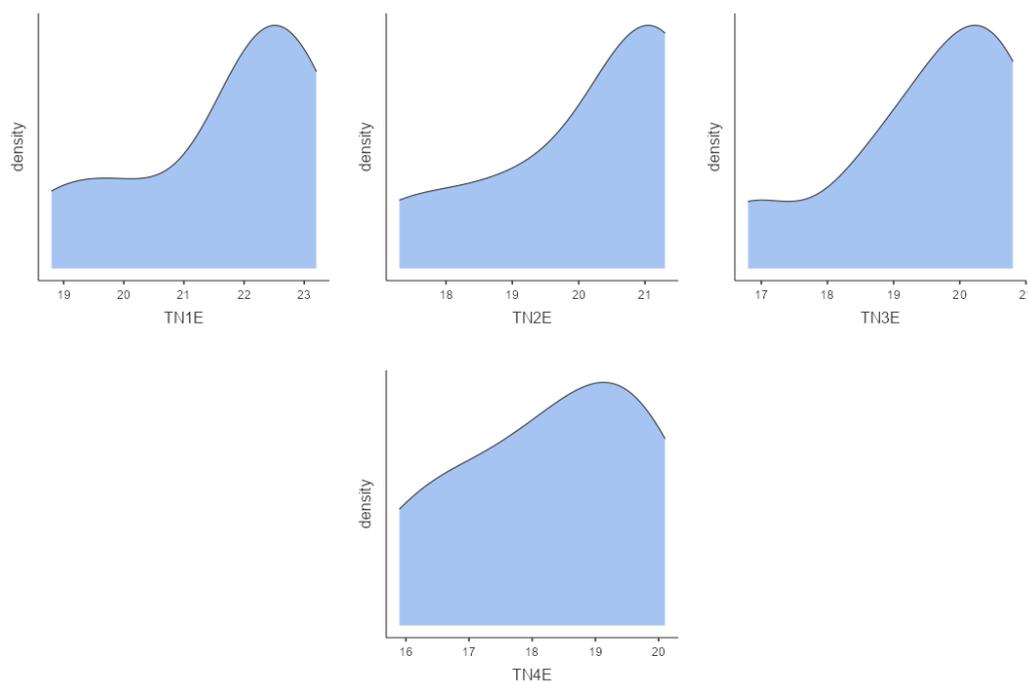


Figure 26 : courbes de densité de la variable poids mesurée dans le lot TN au cours de l'essai

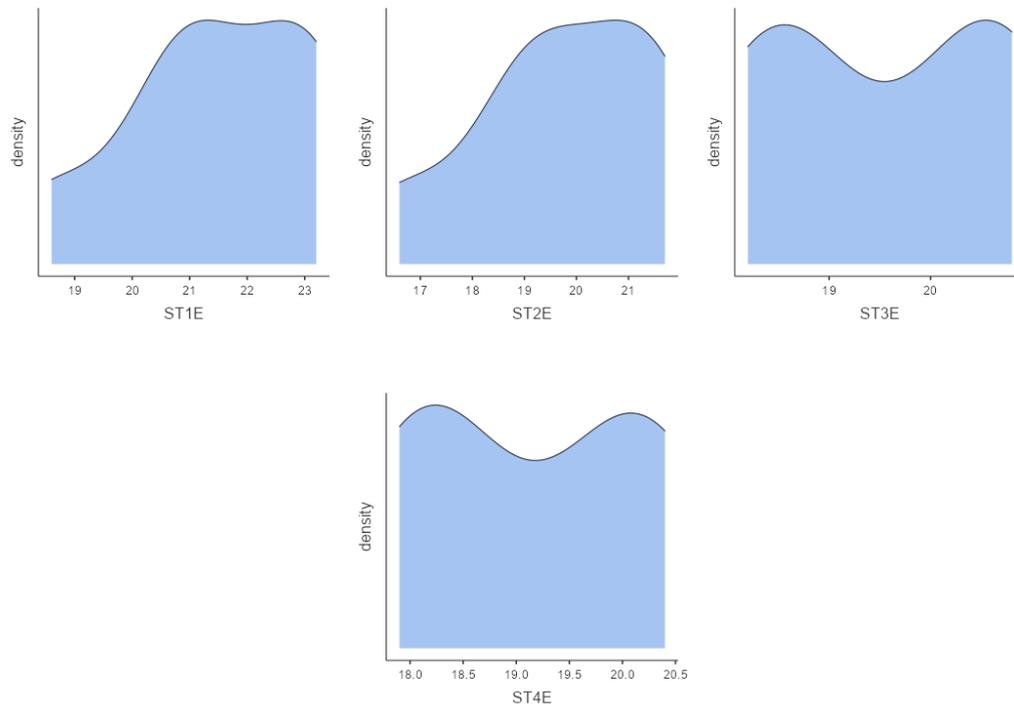


Figure 27 : courbes de densité de la variable poids mesurée dans le lot ST au cours de l'essai

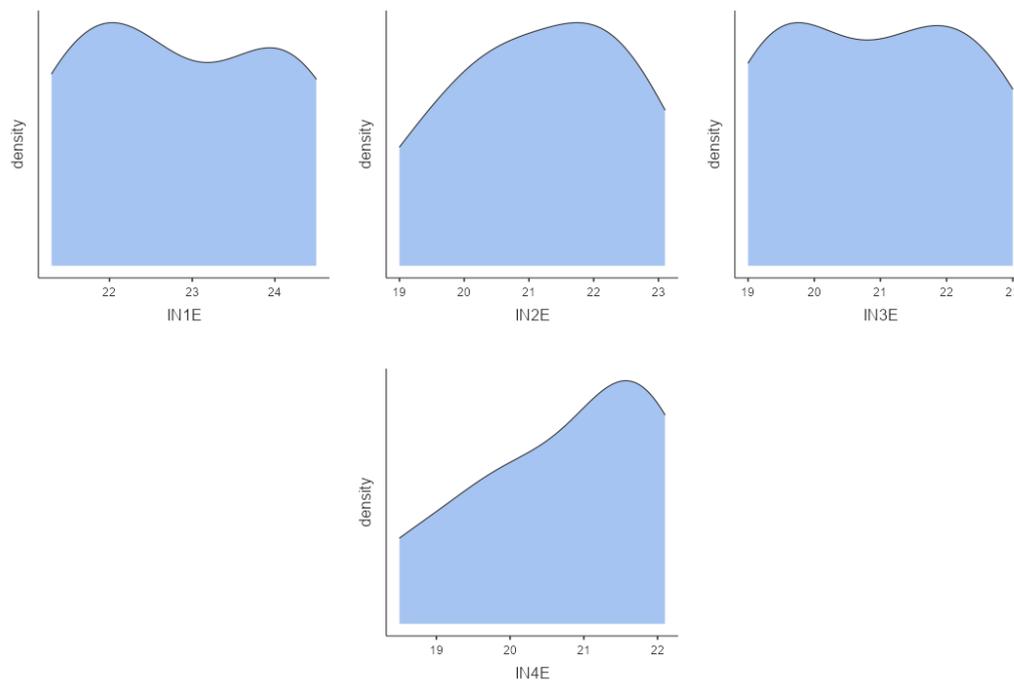


Figure 28 : courbes de densité de la variable poids mesurée dans le lot In au cours de l'essai

ANNEXE VII : Résultats de suivi de l'évolution pondérale des souris au cours de la période de stabulation.

Tableau XI : Tableau de suivi de l'évolution pondérale des souris au cours de la période de stabulation.

		Poids				
		J1	J2	J3	J4	J5
Lot TP	Souris 1	19,2	19,9	20,3	21,3	21,3
	Souris 2	23,1	22,7	22,8	23,4	24,2
	Souris 3	22,8	22,6	22,8	23,2	22,8
	Souris 4	20,4	20,5	20,6	21,2	22,2
	Souris 5	22,1	21,7	21,6	22,1	23,0
	Souris 6	23,0	22,8	23,1	23,2	23,5
	Souris 7	21,4	21,9	21,9	22,4	22,5
	M	21,7	21,7	21,9	22,4	22,8
	σ	1,48	1,14	1,11	0,92	0,93
Lot TN	Souris 1	19,3	19,2	19,5	19,4	19,8
	Souris 2	23,1	23,3	23,4	23,6	23,3
	Souris 3	22,6	22,3	22,7	22,6	23,2
	Souris 4	20,1	20,0	19,9	20,4	20,4
	Souris 5	22,1	22,3	22,3	22,4	22,5
	Souris 6	23,0	22,5	22,5	23,1	23,4
	Souris 7	21,1	21,3	21,8	21,6	22,2
	M	21,6	21,6	21,7	21,9	22,1
	σ	1,49	1,48	1,47	1,51	1,45
Lot ST	Souris 1	19,5	20,2	20,1	19,5	20,6
	Souris 2	23,3	23,2	23,5	23,6	23,6
	Souris 3	22,5	21,9	21,1	19,1	18,5
	Souris 4	20,1	20,5	20,7	21,1	21,4
	Souris 5	22,0	22,0	22,0	22,7	22,8
	Souris 6	22,9	22,7	22,6	22,8	23,6
	Souris 7	21,0	20,4	20,3	20,7	20,8
	M	21,6	21,6	21,5	21,4	21,6
	σ	1,45	1,20	1,27	1,73	1,86
Lot In	Souris 1	19,6	20,2	20,8	21,5	21,6
	Souris 2	23,3	23,4	23,5	23,8	23,9
	Souris 3	22,8	22,5	22,7	23,2	23,4
	Souris 4	20,3	20,3	20,1	20,6	20,6
	Souris 5	22,4	22,1	21,9	22,5	22,4
	Souris 6	23,2	23,2	23,0	23,4	24,0
	Souris 7	21,4	21,7	22,1	22,1	22,2
	σ	21,9	21,9	22,0	22,4	22,6
	Σ	1,46	1,28	1,21	1,14	1,26

TP : témoin positif ; TN : témoin négatif ; ST : somatropine ; In : insuline ; m : poids moyen ; σ : écart-type

ANNEXE VIII : Résultats de suivi de l'évolution pondérale des souris au cours de l'essai.

Tableau XII : Tableau de suivi de l'évolution pondérale des souris au cours de l'essai.

		Poids			
		J1	J2	J3	J4
Lot TP	Souris 1	21,8	19,2	17,7	16,9
	Souris 2	24,4	22,0	21,1	20,7
	Souris 3	23,0	21,3	20,5	20,2
	Souris 4	22,0	19,7	18,2	17,5
	Souris 5	23,6	21,8	20,7	20,2
	Souris 6	23,2	21,5	20,9	20,0
	Souris 7	22,3	20,0	19,1	17,9
	M	22,9	20,8	19,7	19,1
	Σ	0,93	1,12	1,39	1,56
Lot TN	Souris 1	18,8	17,3	16,8	15,9
	Souris 2	22,3	21,3	20,8	18,4
	Souris 3	23,1	20,9	20,2	19,4
	Souris 4	20,1	18,8	19,3	16,8
	Souris 5	22,3	21,3	19,9	19,5
	Souris 6	23,2	21,3	20,8	20,1
	Souris 7	21,7	20,0	18,5	17,9
	M	21,6	20,1	19,5	18,3
	Σ	1,63	1,55	1,43	1,53
Lot ST	Souris 1	21,1	18,8	18,7	17,9
	Souris 2	23,1	21,4	20,4	20,4
	Souris 3	18,6	16,6	/	/
	Souris 4	21,1	19,7	18,6	18,3
	Souris 5	22,7	21,0	20,6	19,8
	Souris 6	23,2	21,7	20,8	20,2
	Souris 7	20,6	19,1	18,2	18,3
	M	21,5	19,8	19,1	19,1
	Σ	1,65	1,80	1,17	1,10
Lot In	Souris 1	21,6	20,1	19,6	19,8
	Souris 2	24,5	22,3	21,7	21,8
	Souris 3	23,8	22,0	22,4	21,6
	Souris 4	21,3	19,0	19	18,5
	Souris 5	22,5	20,5	19,7	20,1
	Souris 6	24,1	23,1	23,0	22,1
	Souris 7	22,3	21,3	21,1	21,3
	M	22,9	21,2	20,9	20,7
	Σ	1,26	1,41	1,53	1,31

TP : témoin positif ; TN : témoin négatif ; ST : somatropine ; In : insuline ; m : poids moyen ; σ : écart-type

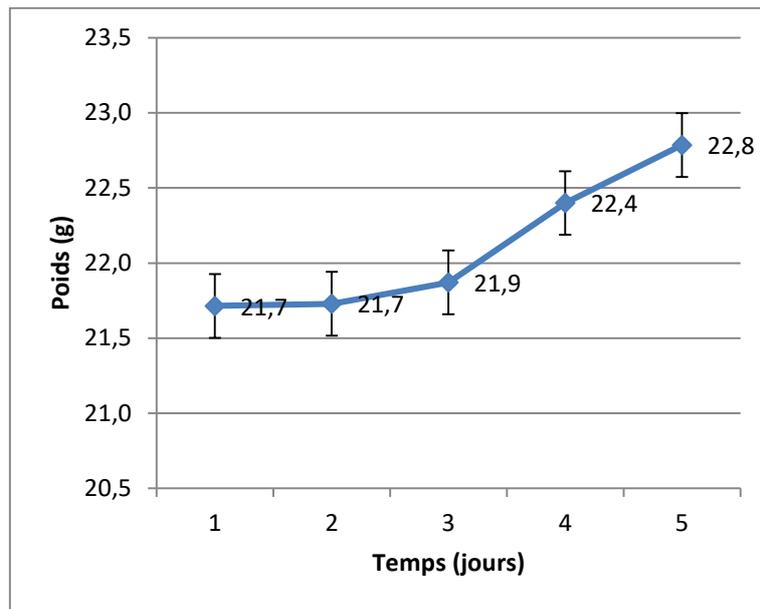
ANNEXE IX : Evolution pondérale des souris au cours de la période de stabulation

Figure 29 : Evolution pondérale des souris du lot TP au cours de la période de stabulation

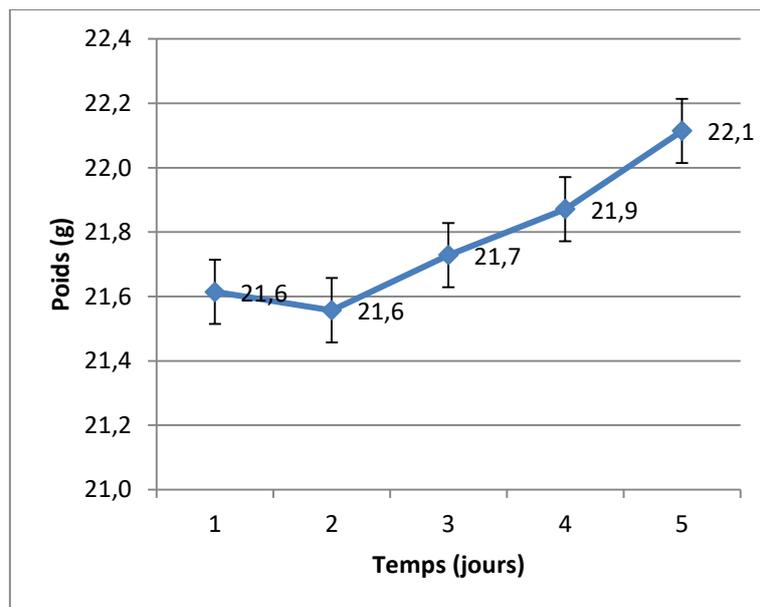


Figure 30 : Evolution pondérale des souris du lot TN au cours de la période de stabulation

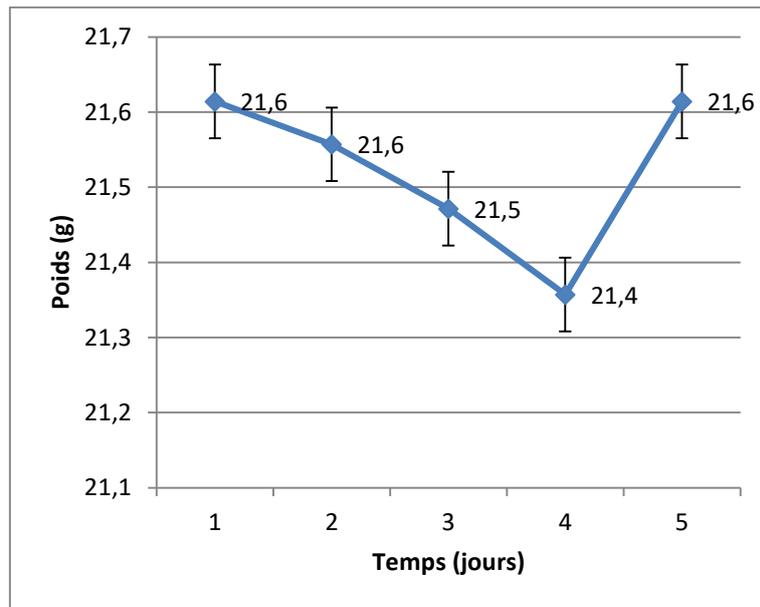


Figure 31 : Evolution pondérale des souris du lot ST au cours de la période de stabulation

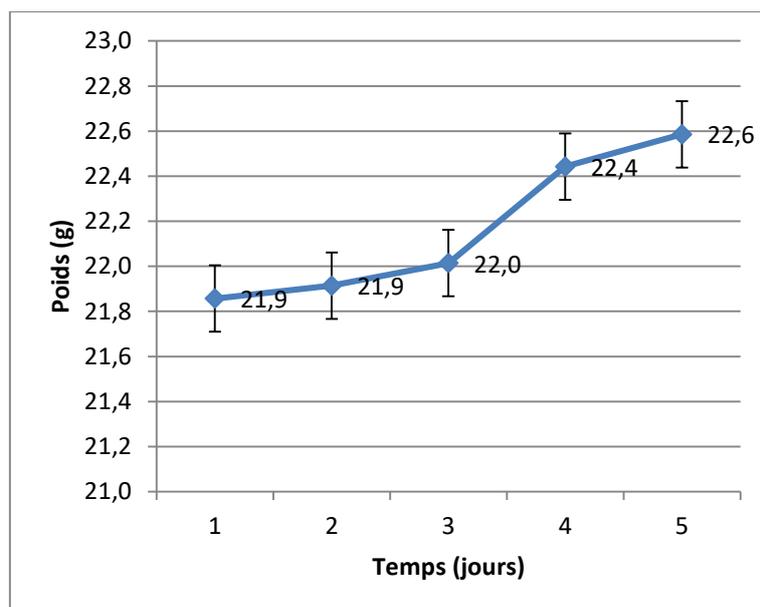


Figure 32 : Evolution pondérale des souris du lot In au cours de la période de stabulation

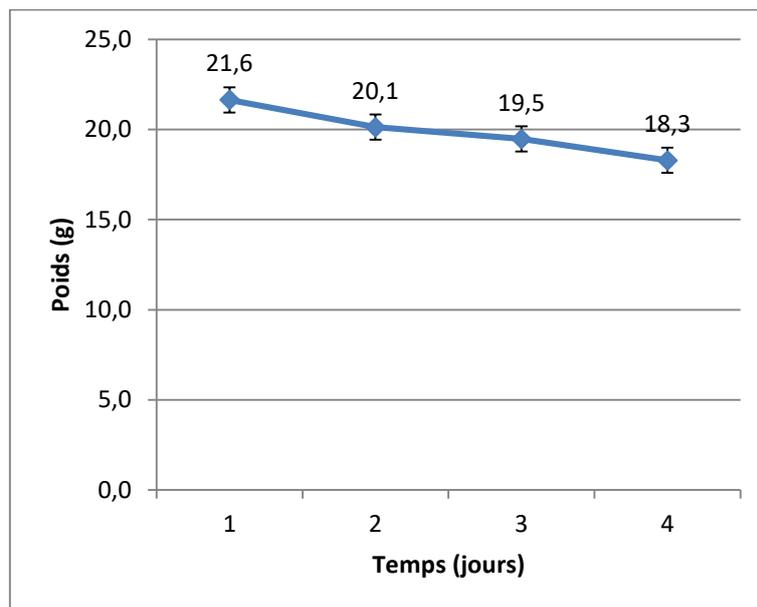
ANNEXE X : Evolution pondérale des souris au cours de l'essai

Figure 33 : Evolution pondérale des souris du lot TP au cours de l'essai

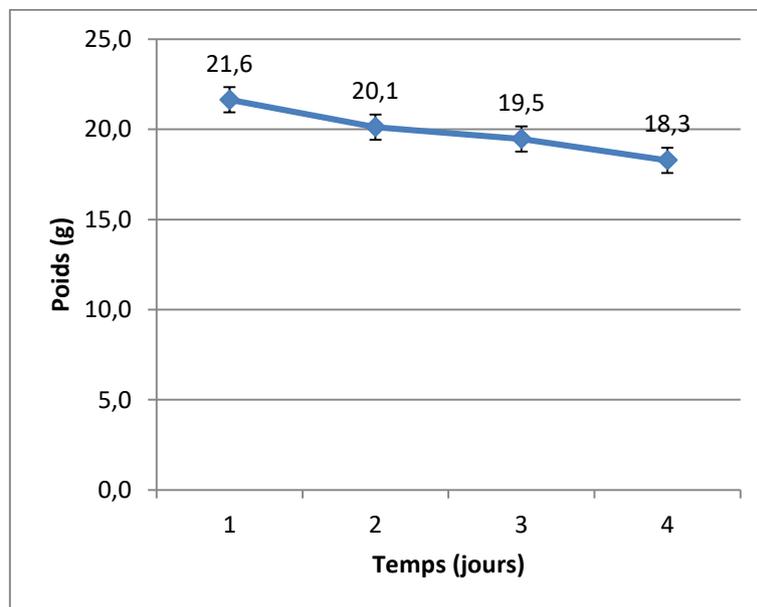


Figure 34 : Evolution pondérale des souris du lot TN au cours de l'essai

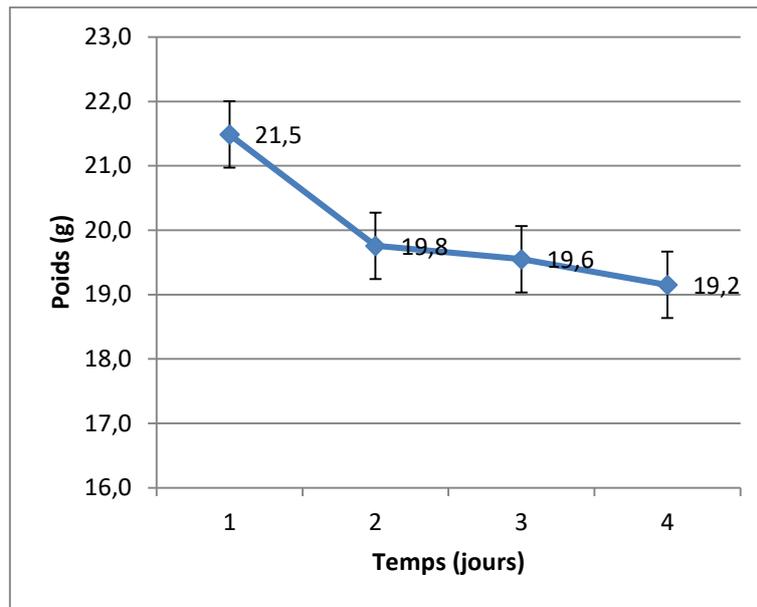


Figure 35 : Evolution pondérale des souris du lot ST au cours de l'essai

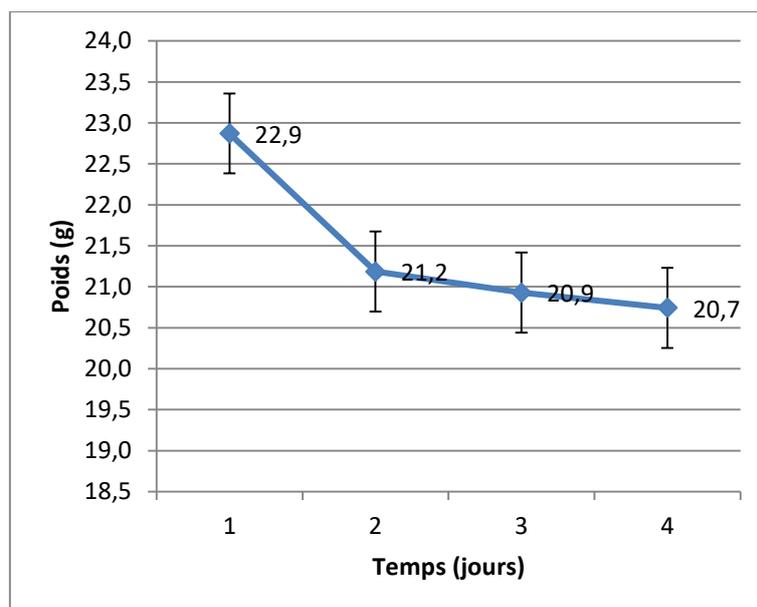


Figure 36 : Evolution pondérale des souris du lot In au cours de l'essai

ANNEXE XI : Résultats de l'ANOVA post-hoc relatifs à l'évaluation pondérale au cours de la période de stabulation (de J1 à J5)

Tableau XIII : Tableau récapitulatif des résultats de l'ANOVA post-hoc relatifs à l'évaluation pondérale au cours de la période de stabulation (de J1 à J5)

Lot TP					Lot TN				
Comparaison pair-à-pair (Durbin-Conover)					Comparaison pair-à-pair (Durbin-Conover)				
		Statistique	p			Statistique	p		
TPJ1S	-	TPJ2S	0,931	0,361	TN1S	-	TN2S	0,246	0,808
TPJ1S	-	TPJ3S	0,931	0,361	TN1S	-	TN3S	1,846	0,077
TPJ1S	-	TPJ4S	4,502	< 0,001	TN1S	-	TN4S	3,077	0,005
TPJ1S	-	TPJ5S	5,588	< 0,001	TN1S	-	TN5S	4,554	< 0,001
TPJ2S	-	TPJ3S	1,863	0,075	TN2S	-	TN3S	2,093	0,047
TPJ2S	-	TPJ4S	5,433	< 0,001	TN2S	-	TN4S	3,323	0,003
TPJ2S	-	TPJ5S	6,520	< 0,001	TN2S	-	TN5S	4,801	< 0,001
TPJ3S	-	TPJ4S	3,570	0,002	TN3S	-	TN4S	1,231	0,230
TPJ3S	-	TPJ5S	4,657	< 0,001	TN3S	-	TN5S	2,708	0,012
TPJ4S	-	TPJ5S	1,087	0,288	TN4S	-	TN5S	1,477	0,153
Lot ST					Lot In				
Comparaison pair-à-pair (Durbin-Conover)					Comparaison pair-à-pair (Durbin-Conover)				
		Statistique	p			Statistique	p		
ST1S	-	ST2S	0,644	0,526	IN1S	-	IN2S	0,151	0,881
ST1S	-	ST3S	0,828	0,416	IN1S	-	IN3S	0,000	1,000
ST1S	-	ST4S	0,276	0,785	IN1S	-	IN4S	4,389	< 0,001
ST1S	-	ST5S	1,656	0,111	IN1S	-	IN5S	5,599	< 0,001
ST2S	-	ST3S	0,184	0,856	IN2S	-	IN3S	0,151	0,881
ST2S	-	ST4S	0,920	0,367	IN2S	-	IN4S	4,540	< 0,001
ST2S	-	ST5S	2,300	0,030	IN2S	-	IN5S	5,751	< 0,001
ST3S	-	ST4S	1,104	0,281	IN3S	-	IN4S	4,389	< 0,001
ST3S	-	ST5S	2,484	0,020	IN3S	-	IN5S	5,599	< 0,001
ST4S	-	ST5S	1,380	0,180	IN4S	-	IN5S	1,211	0,238

ANNEXE XII : Résultats de l'ANOVA post-hoc relatifs à l'évaluation pondérale au cours de l'essai (de J1 à J4)

Tableau XIV : Tableau récapitulatif des résultats de l'ANOVA post-hoc relatifs à l'évaluation pondérale au cours de l'essai (de J1 à J4)

Lot TP					Lot TN						
Comparaison pair-à-pair (Durbin-Conover)					Comparaison pair-à-pair (Durbin-Conover)						
		Statistique			p			Statistique			P
TP1E	-	TP2E	Inf	< 0,001	TN1E	-	TN2E	6,93	< 0,001		
TP1E	-	TP3E	Inf	< 0,001	TN1E	-	TN3E	11,26	< 0,001		
TP1E	-	TP4E	Inf	< 0,001	TN1E	-	TN4E	18,19	< 0,001		
TP2E	-	TP3E	Inf	< 0,001	TN2E	-	TN3E	4,33	< 0,001		
TP2E	-	TP4E	Inf	< 0,001	TN2E	-	TN4E	11,26	< 0,001		
TP3E	-	TP4E	Inf	< 0,001	TN3E	-	TN4E	6,93	< 0,001		
Lot ST					Lot In						
Comparaison pair-à-pair (Durbin-Conover)					Comparaison pair-à-pair (Durbin-Conover)						
		Statistique			p			Statistique			P
ST1E	-	ST2E	5,07	< 0,001	IN1E	-	IN2E	3,69	0,002		
ST1E	-	ST3E	11,41	< 0,001	IN1E	-	IN3E	6,77	< 0,001		
ST1E	-	ST4E	13,95	< 0,001	IN1E	-	IN4E	6,77	< 0,001		
ST2E	-	ST3E	6,34	< 0,001	IN2E	-	IN3E	3,08	0,007		
ST2E	-	ST4E	8,87	< 0,001	IN2E	-	IN4E	3,08	0,007		
ST3E	-	ST4E	2,54	0,023	IN3E	-	IN4E	0,00	1,000		

ANNEXE XIII : Taux et fréquence des érythrocytes immatures micronucléés dans les différents groupes d'étude

Tableau XV : Taux et fréquence des érythrocytes immatures micronucléés dans les différents groupes d'étude.

		MN-PCE	PCE	\mathcal{F}
Lot TP	S1	118	1094	0,108
	S2	126	1123	0,112
	S3	185	1012	0,183
	S4	96	1028	0,093
	S5	109	1150	0,095
	S6	59	1041	0,057
	S7	110	1014	0,108
Lot TN	S1	77	1043	0,074
	S2	38	987	0,039
	S3	61	1040	0,059
	S4	83	934	0,089
	S5	/	/	/
	S6	42	1091	0,038
	S7	171	1013	0,169
Lot ST	S1	165	1006	0,164
	S2	109	1079	0,101
	S3	/	/	/
	S4	104	1059	0,098
	S5	137	1024	0,134
	S6	104	1042	0,100
	S7	83	1026	0,081
Lot In	S1	94	1042	0,090
	S2	98	1056	0,093
	S3	98	1078	0,091
	S4	77	1028	0,075
	S5	123	1003	0,123
	S6	43	1000	0,043
	S7	56	1020	0,055

MN-PCE : érythrocytes immatures micronucléés (Micro-nucleated Polychromatic Erythrocytes) ; PCE : érythrocytes immatures (Polychromatic Erythrocytes); TP : témoin positif ; TN : témoin négatif ; ST : somatropine ; In : insuline ; **en gras** : valeurs aberrantes identifiées par le logiciel JAMOVI.

**ANNEXE XIV : Résultats du test de normalité de Shapiro-Wilk et du test
d'homogénéité des variances de Levene**

Tableau XVI : résultats du test de normalité de Shapiro-Wilk

Test de normalité de Shapiro-Wilk	
Statistique	P
0,975	0,810

Tableau XVII : résultats du test d'homogénéité des variances de Levene

Test d'homogénéité des variances de Levene			
Statistique	df	df2	P
1,76	3	19	0,190