



HAL
open science

Les métallothionéines : protéines inductibles sous irradiation ultraviolette

Eric Jourdan

► **To cite this version:**

Eric Jourdan. Les métallothionéines : protéines inductibles sous irradiation ultraviolette. Sciences pharmaceutiques. 2001. dumas-01472897

HAL Id: dumas-01472897

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01472897>

Submitted on 21 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



1^{er} exemplaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 2001

N° D'ordre :

7003

**LES METALLOTHIONEINES : PROTEINES
INDUCTIBLES SOUS IRRADIATION
ULTRAVIOLETTE**

**THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU
DOCTORAT EN PHARMACIE**

DIPLOME D'ETAT

JOURDAN Eric

[Données à caractère personnel]

Thèse soutenue publiquement le 23 Janvier 2001 à 18H00

Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur A. FAVIER, Président du jury

Monsieur le Professeur JC. BEANI

Madame le Docteur P. GUIRAUD

Madame le Docteur MJ. RICHARD (Directeur de thèse)



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 2001

N° D'ordre :

**LES METALLOTHIONEINES : PROTEINES
INDUCTIBLES SOUS IRRADIATION
ULTRAVIOLETTE**

**THESE PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU
DOCTORAT EN PHARMACIE**

DIPLOME D'ETAT

JOURDAN Eric

[Données à caractère personnel]

Thèse soutenue publiquement le 23 Janvier 2001 à 18H00

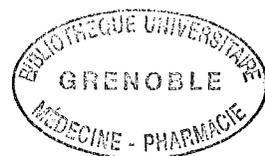
Devant le jury composé de :

Monsieur le Professeur A. FAVIER, Président du jury

Monsieur le Professeur JC. BEANI

Madame le Docteur P. GUIRAUD

Madame le Docteur MJ. RICHARD (Directeur de thèse)



UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté

M. le Professeur P. DEMENGE

Vice Doyen

M. le Professeur J. CALOP

PROFESSEURS DE PHARMACIE

ALARY	Josette	Chimie Analytique
BAKRI	Abdelaziz	Pharmacie Galénique
BENOIT-GUYOD	Jean-Louis	Chimie Toxicologie et Eco- toxicologie
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique et Bio- technique
CUSSAC	Max	Chimie Thérapeutique
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Générale
DEMENGE	Pierre	Physiologie/Pharmacologie
DROUET	Emmanuel	Microbiologie-Immunologie
FAVIER	Alain	Biochimie
GOULON	Chantal	Physique-Pharmacie
GRILLOT	Renée	Parasitologie
MARIOTTE	Anne-Marie	Pharmacognosie
RIBUOT	Christophe	Physiologie-Pharmacologie
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie
SEIGLE-MURANDI	Françoise	Botanique et Cryptogamie
STEIMAN	Régine	Biologie Cellulaire
WOUESSIDJEWÉ	Denis	Pharmacie Galénique

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE MEDECINE DE GRENOBLE

Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté
Vice-Doyen
Assesseurs

M. le Professeur J. L. DEBRU
M. le Professeur J. P. CHIROSSEL
M. le Professeur J. LEBEAU
M. le Professeur J.P. ROMANET
M. le Professeur B. SELE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

AMBLARD	Pierre	Dermato. Vénérologie	HOSTEIN	Jean	Hépto-Gastro-Entérol.
AMBROISE-THOMAS	Pierre	Parasitologie et Mycol.	JOUK	Pierre-Simon	Biologie du Dévelop.. et de la reproduction.
BACHELOT	Ivan	Endocrinologie et Maladies Métaboliques	JUVIN	Robert	Rhumatologie
BACONNIER	Pierre	Biostatistiques et Informatique Méd.	LAVIEILLE	Jean-Pierre	O.R.L.
BARGE	Michel	Neurochirurgie	LE BAS	François	Biophys.et Trait. de l'Image.
BARRET	Luc	Médecine Légale	LEBEAU	Jacques	Stomat. et Chirurgie Maxillo-Faciale
BAUDAIN	Philippe	Radiologie et Imag. Méd.	LEROUX	Dominique	Génétique
BEANI	J.-Claude	Dermatologie,Vénérologie	LETOUBLON	Christian	Chirurgie Générale
BENABID	Al.-Louis	Biophys. et Trait. de l'image	LEVERVE	Xavier	Thérapeutique
BENSA	J. Claude	Immunologie	LEVY	Patrick	Physiologie
BERNARD	Pierre	Gynéco et Obstétrique	LUNARDI	Joël	Biochimie et Bio. Molécu.
BESSARD	Germain	Pharma. Fondamentale	MACHECOURT	Jacques	Cardio. et Maladie Vascul.
BLIN	Dominique	Chir. Thor.et Cardio Vascul.	MAGNE	Jean-Luc	Chir. Vasculaire
BOLLA	Michel	Radiothérapie	MALLION	J. Michel	Méd.du Trav. et Risques Prof.
BOST	Michel	Pédiatrie	MASSOT	Christian	Médecine Interne
BOUCHARLAT	Jacques	Pédo Psychiatrie	MERLOZ	Philippe	Chir. Ortho. et Traumatol.
BOUGEROL	Thierry	Psychiatrie d'adultes	MICOUD	Max	Maladies Infect. et Trop.
BRAMBILLA	Christian	Pneumologie	MOREL	Françoise	Bioch. et Biol. Moléculaire
BRAMBILLA	Elisabeth	Anatomie et Cyto. Pathol.	MOUILLON	Michel	Ophthalmologie
BRICHON	P.Yves	Chir. Thor. et Cardio.Vasc.	MOUSSEAU	Mireille	Cancérologie
CARPENTIER	Françoise	Thérapeutique	MOUTET	François	Chir. Plast.Reconst. et Esth.
CARPENTIER	Patrick	Méd.Interne	PASQUIER	Basile	Anat. et Cyto.Patho
CESBRON	Jean-Yves	Immunologie	PASSAGIA	J.-Guy	Anatomie.
CHAMBAZ	Edmond	Biologie Cellulaire	PAYEN de LA		
CHARACHON	Robert	O.R.L.	GARANDERIE	J. François	Anesthésiologie
CHIROSSEL	J. Paul	Anatomie	PELLAT	Jacques	Neurologie
CINQUIN	Philippe	Biostatistique et Inf. Méd.	PHELIP	Xavier	Rhumatologie
COLOMB	Maurice	Immunologie	PISON	Christophe	Pneumologie
CORDONNIER	Daniel	Néphrologie	POLACK	Benoît	Hématologie
COULOMB	Max	Radiologie et Imagerie Méd.	POLLAK	Pierre	Neurologie
DEBRU	Jean-Luc	Médecine Interne	PONS	Jean-Claude	Gynécologie et Obstétrique
DE GAUDEMARIS	Régis	Méd. du Trav. et des risques professionnels.	RAMBAUD	Pierre	Pédiatrie
		Biostatistique et Inf. Med.	RAMBEAUD	J. Jacques	Urologie
DEMONGEOT	Jacques		RAPHAEL	Bernard	Stomato. et Chirurgie Maxillo-faciale
DESCOTES	Jean-Luc	Urologie			
DUPRE	Alain	Chirurgie Générale	REYT	Emile	O.R.L.
DYON	J.François	Chirurgie Infantile	ROMANET	J. Paul	Ophthalmologie
FAGRET	Daniel	Bioph et Trait. Image	SARAGAGLIA	Dominique	Chir. Orthopédique et Traumatologique
FAURE	Claude	Anatomie			
FAVROT	Marie C.	Cancerologie CLB Lyon	SCHAERER	René	Cancérologie
FERRETTI	Gilbert	Radiologie centrale	SEIGNEURIN	Daniel	Histo.embryo.cytogénét. Reproduction
FEUERSTEIN	Claude	Physiologie			
FOURNET	Jacques	Hépto-Gastro-Entéro.	SEIGNEURIN	J. Marie	Bactério-Viro - Hygiène.
FRANCO	Alain	Médecine. Interne	SELE	Bernard	Biologie du Développement et de la Reproduction
FRANCOIS	Patrice	Épidém., Écon. de la Sant. et Prévention.			
GARNIER	Philippe	Pédiatrie	SOTTO	J. Jacques	Hématologie et Transfusion
GIRARDET	Pierre	Anesthé. et Réa. Chir.	STAHL	J. Paul	Maladies Infect. et Trop.
GOULLIER-FLEURET	Andrée	Parasitologie et Mycologie	VANZETTO	Gérald	Clin./Urgences Cardio.
GUIDICELLI	Henri	Chirurgie Vasculaire	VIALTEL	Paul	Néphrologie
GUIGNIER	Michel	Réanimation Médicale	VROUSOS	Constantin	Radiothérapie
HADJIAN	A.-Jean	Biochimie et biol.Mol	VUILLEZ	J.-Philippe	Biophys./Méd. Nucléaire
HALIMI	Serge	Nutrition	ZARSKI	J.Pierre	Hépto-Gastro-Entérol.
HOMMEL	Marc	Neurologie.			

A Monsieur le Professeur Alain FAVIER,

Qui me fait l'honneur de présider le jury.

Je tiens à le remercier chaleureusement pour m'avoir tout d'abord permis de m'initier à la recherche dès ma deuxième année de Pharmacie, puis pour son accueil au sein du LBSO et son soutien lors de mon DEA.

Je lui exprime ici ma profonde gratitude et l'admiration pour ses conseils et remarques pertinentes permettant de stimuler mon travail.

A Monsieur le Professeur Jean-Claude BEANI,

Que je remercie chaleureusement pour son accueil dans le groupe « Photobiologie » du LBSO. Qui m'apporte une nouvelle ouverture d'esprit sur la photobiologie en me permettant de travailler en collaboration avec l'industrie cosmétique.

A Madame le Docteur Pascale Guiraud,

Que j'ai la chance de connaître depuis le début de mes études à la faculté de Pharmacie de Grenoble, et qui me fait l'honneur de juger aujourd'hui ce travail.

Merci pour ta disponibilité et ta bonne humeur.

A Madame le Docteur Marie-Jeanne Richard,

Qui a tout d'abord accepté de diriger ce travail de recherche après avoir dirigé mon travail de recherche en 5^{ème} année.

Merci pour m'avoir initié au travail de laboratoire, soutenu lors des longs mois de mise au point des techniques, et aussi pour m'avoir appris à raisonner d'une manière scientifique.

La rédaction de ce mémoire de thèse marque un tournant pour moi, la fin d'une époque.

Reçois ici toute ma gratitude.

Je tiens aussi à remercier toutes les techniciennes du laboratoire de Biochimie C qui ont participées à ce travail :

Sandra, Angèle, Lyse, Jacotte, pour leur gentillesse, leurs compétences, leur disponibilité et aussi leur bonne humeur, que je ne suis pas près d'oublier.

Merci à madame Guillermet et à madame le Docteur Labat-Moleur, du laboratoire de pathologie cellulaire (CHU Grenoble) pour leur aide.

A mon arrière grand-mère ; Tu n'es plus là aujourd'hui, mais ton souvenir est toujours aussi présent, je te dédie ce travail.

A mes parents, mes grands parents

A Daniel

A tous mes amis

Merci de votre soutien.

SOMMAIRE

<u>INTRODUCTION</u>	11
----------------------------	-----------

<u>L'ETAT DES CONNAISSANCES</u>	12
--	-----------

<u>CHAPITRE I : LES ULTRAVIOLETS</u>	
 SONT GENOTOXIQUES	13

I) Les UV : composant du rayonnement solaire	13
---	-----------

II) Les UV détériorent l'ADN cellulaire	15
--	-----------

 1) Les UV génèrent des ERO	15
---------------------------------------	-----------

a) Génèse des ERO

b) UVA et ERO

c) UVA et lésions de l'ADN

 2) Les lésions de l'ADN due aux UV-B	22
---	-----------

a) Les CPD

b) Les 6-4 photoproduits

c) Les dimères de type Dewear

III) Place des systèmes antioxydants et des systèmes de réparation dans le maintien de l'intégrité génomique	25
---	-----------

 1) Les systèmes de défense antioxydants	25
--	-----------

a) Les molécules antioxydantes non enzymatiques

a1) Le glutathion et les thiols

a2) Les vitamines	
a3) Les autres piègeurs	
b) Les enzymes antioxydantes	
b1) Les SOD	
b2) La catalase	
b3) Les peroxydases sélénodépendantes	
b4) Thiorédoxine et thiorédoxine réductase	
2) Les systèmes de réparation de l'ADN	36
a) Réparation par excision de bases	
b) Réparation par excision de nucléotides	
c) Réparation des bases mal appariées	

CHAPITRE II : LES METALLOTHIONEINES, PROTEINES

A ROLES MULTIPLES	48
I) Présentation des MT	48
1) Nomenclature et structure	50
2) Organisation génique	52
3) Synthèse, dégradation ; place des métaux	53
4) Fonctions physiologiques des MT	57
a) MT et métaux	

	b) Fonctions antioxydantes	
	c) Prolifération, différenciation et contrôle rédox des échanges de Zn	
II)	Effet génotecteur du Zinc :Place potentiel des MT	63
	1) Zn et ADN	63
	2) Zn et apoptose	64
	3) MT et apoptose	64
	4) Zn et MT	65

TRAVAUX PERSONNEL **67**

I)	Objectifs	68
II)	Matériel et méthodes	69
	1) Culture cellulaire	69
	2) Irradiation en Spectre Solaire Total	69
	3) Traitements chimiques	70
	a) Par le Zinc	
	b) Par le Cadmium	
	c) Par le BSO	
	d) Par l'actinomycine D	
	4) Mise en évidence de l'expression des MT	71
	a) Etude de la protéine :mise au point d'une technique de western-blot	

b)	Etude de la localisation des MT	
c)	Etude des ARNm de la MT-IIA	
5)	Evaluation des lésions de l'ADN par la technique COMETE	74
6)	Evaluation de la cytotoxicité	74
III)	Résultats	76
1)	Effet du Zn sur les lésions induites par irradiation en SST	76
2)	Analyse de l'expression des MT	77
a)	Northern-blot	
b)	Cinétique de néosynthèse des MT lors d'un traitement par le Zinc	
3)	Localisation intracellulaire des MT	79
4)	Redistribution cellulaire des MT lors d'une irradiation	79
5)	Effet du Zinc sur l'expression et la localisation des MT lors d'une irradiation	80
6)	Etude de la fonction thiol des MT en photoprotection	81
IV)	Discussion	84

CONCLUSION ET PERSPECTIVES **88**

BIBLIOGRAPHIE **90**

ABBREVIATIONS

6-4 PP : Photoproduit 6-4
Act D : Actinomycine D
ADN : Acide désoxyribonucléique
AP-1 : Activator Protein 1
AP-1 : Apurinic/aprimidinic endonucléase
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate
BER : Base Excision Repair
BSO : R-R buthionine R-S sulfoximine
Cd : Cadmium
CPD : Cyclobutane pyrimidinr dimer
Cu : Cuivre
Dewar PP : Photoproduit de type Dewar
ERO : Espèces réactives de l'oxygène
GC-NER : Global coupled NER
GPX : Glutathion peroxydase
GSH : Glutathion total ou réduit
GSSG : Glutathion oxydé
Hg : Mercure
HSP : Heat Sock Protein
I- κ B : Inhibitor- κ B
IgG : Immunoglobuline G
MMR : Mismatch repair
MRE : Metal responsive Element
MT : Métallothionéine
MTF1 : Metal Transcription Factor 1
NAC : N-Acetyl-Cysteine
NER : Nucleotide Excision Repair
NF- κ B : Nuclear Factor κ B
PCNA : Antigène nucléaire de prolifération cellulaire
RNA poly II : ARN polymérase II
SC : Syndrome de Cockayne
SOD : Superoxyde dismutase
TC-NER : Transcription Coupled NER
TFIIH : Transcription Factor IIIH
TPEN : N,N,N',N' tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylènediamine
TTD : Trichothiodistrophie
UV : Ultraviolet
XP : Xeroderma Pigmentosum
XPG : Xeroderma Pigmentosum groupe de complémentation G
Zn : Zinc

LES METALLOTHIONEINES :

**PROTEINES INDUCTIBLES SOUS
IRRADIATION ULTRAVIOLETTE**

INTRODUCTION

Les ultraviolets (UV), sont la composante la plus néfaste du rayonnement solaire. Ils interagissent avec de nombreux composants cellulaires, et modifient ainsi leurs structures et leurs fonctions. Les conséquences cliniques subséquentes à ces altérations sont plus ou moins graves et vont du simple érythème à la carcinogenèse.

Les altérations de l'ADN par le rayonnement UV sont une des conséquences de l'irradiation UV. L'étude de ces altérations, et de leur réparation font l'objet d'un intérêt grandissant car il est maintenant admis que l'incidence des cancers cutanés augmente avec le temps d'exposition au soleil. La recherche d'une photoprotection adaptée permettant l'épargne du « capital soleil » individuel est en plein développement.

Des travaux précédemment réalisés au laboratoire ont montré que les effets délétères des rayonnements UV, notamment au niveau de l'ADN, sont augmentés dans les cellules déplétées en zinc (Zn) indiquant un rôle important de cet oligoélément en photoprotection.

En utilisant une lignée cellulaire de kératinocytes humains (HaCaT) et un modèle d'irradiation solaire, nous nous proposons d'étudier l'un des mécanismes sur lequel repose la photoprotection Zn-dépendante. Nous avons focalisé nos recherches sur les protéines d'adaptation que sont les métallothionéines. Pour cela nous avons mis au point une technique de western-blot permettant d'identifier les MT sans utilisation de radioéléments.

Les métallothionéines, de part leur induction cellulaire lors d'un apport de Zn, et leur propriétés antioxydante et antiapoptotique seraient de bons candidats permettant d'expliquer l'effet génoprotecteur du Zn .

L'ETAT DES CONNAISSANCES

CHAPITRE I :

LES ULTRAVIOLETS, SONT GENOTOXIQUES

I) Les ultraviolets : Composants du rayonnement solaire

Le rayonnement émis par le soleil est un spectre continu, polychromatique constitué de radiations électromagnétiques dont les longueurs d'onde sont comprises entre les rayons gamma (10^{-7} μm) et les ondes radio (2×10^{10} μm). Chaque rayonnement comporte un double aspect, ondulatoire et corpusculaire. Le rayonnement solaire est filtré au niveau de l'atmosphère, surtout dans la stratosphère grâce à la couche d'ozone qui permet l'absorption de l'ensemble des radiations inférieures à 290 nm.

Le rayonnement solaire mesuré à la surface du globe est donc différent par rapport au rayonnement émis. C'est grâce à cette « filtration » atmosphérique que la vie a pu se développer à la surface du globe.

Ainsi, au niveau du sol, le spectre solaire ne comporte que les radiations comprises entre 290 nm et 3000 nm. Il est constitué de 56% d'infrarouges (780-3000 nm), 39% de lumière visible (400-780 nm) et 5% d'ultraviolets. Le rayonnement ultraviolet est divisé en 3 sous groupes :

- Les ultraviolets C (200-290 nm), sont absorbés en partie par la couche d'ozone.

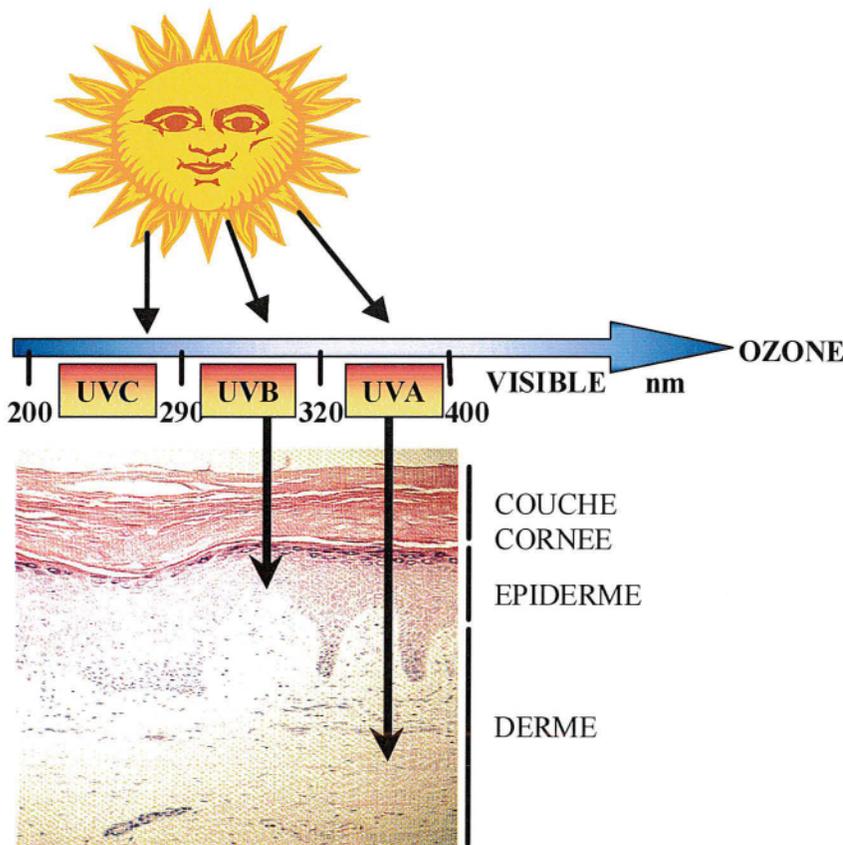
- Les ultraviolets B (290-320 nm), très énergétiques représentant 2% des UV.

- Les ultraviolets A (320-400 nm) traversant le verre, constituant 98% des UV et dont l'énergie décroît en fonction de leur longueur d'onde. Ils sont eux-mêmes subdivisés en UVA-2 courts (320-340 nm) et UVA-1 longs (340-400 nm).

La composition quantitative et qualitative du rayonnement solaire varie en fonction de différents paramètres qui sont l'heure, la saison, la latitude, l'altitude, la couverture nuageuse et la pollution atmosphérique. Sous nos latitudes, en plein mois de juillet, le spectre est particulièrement riche en UVB entre 11h et 14h (heure solaire). Mais la quantité d'UVA reçue est très nettement supérieure en terme de dose puisque les UVA sont présents du lever au coucher du soleil. Ainsi on peut admettre que lors d'une exposition solaire d'une journée sur une plage française, on reçoit 100 fois plus d'UVA que d'UVB.

La différence de longueur d'onde entre les UVA et les UVB reflète aussi une différence dans la pénétration de ce rayonnement au niveau de la peau. Les UVB, plus énergétiques que les UVA, n'atteignent que l'épiderme, alors que les UVA pénètrent jusqu'au derme.

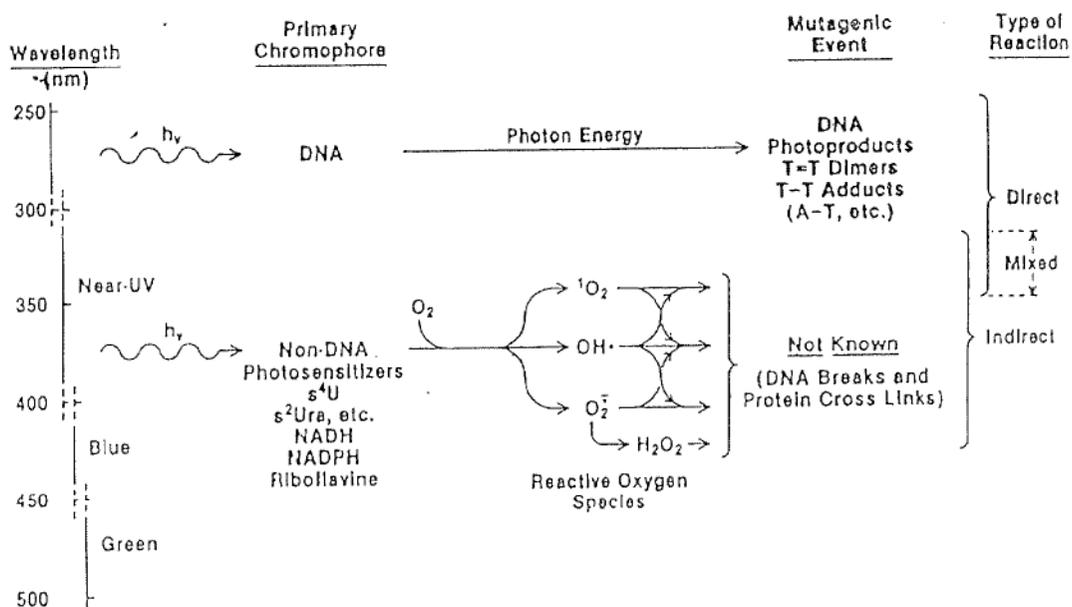
Fig 1: Pénétration des UV dans la peau



D'une manière schématique, les UVB sont capables d'interagir directement avec des macromolécules cellulaires. Ils sont notamment absorbés par l'ADN. De part leur longueur d'onde, les UVA ne peuvent pas interagir de manière directe avec l'ADN car cette macromolécule n'absorbe pas entre 320 et 400 nm. Les UVA peuvent toutefois endommager l'ADN par un mécanisme indirect, reposant sur la génération d'un stress oxydatif. (Il semble toutefois exister des lésions mixtes, de type direct et indirect pour les UVA les plus courts).

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) ainsi que certains radicaux engendrés lors d'un tel stress sont responsables de ces lésions.

Fig 2 Modèle des différents types de lésions induites par les UV à l'ADN cellulaire (d'après Peak et Peak, 1986)



II) Les UV détériorent l'ADN cellulaire

Les UV, en pénétrant dans la peau, vont perdre leur énergie en interagissant avec les constituants cellulaires et extracellulaires.

Nous nous intéresserons ici au cas de l'ADN

1°) Les ultraviolet génèrent des ERO

Après un bref rappel sur la genèse des espèces réactives de l'oxygène, nous nous intéresserons plus particulièrement aux lésions oxydatives UVA induites sur l'ADN.

Les UVA interagissent indirectement sur l'ADN, il a été décrit deux types de réaction ; les réactions photodynamiques de type I et de type II. Dans les deux cas ce sont des réactions de photooxydation d'un substrat impliquant un photosensibilisateur et l'oxygène moléculaire.

- Réaction de type II : L'oxygène intervient au cours de la première étape



(il y a ici formation d'oxygène singulet, lors de la première étape, via un transfert d'énergie entre le photosensibilisateur excité et le substrat. La deuxième étape correspond alors à l'oxydation d'un autre substrat (comme l'ADN) par l'oxygène singulet.

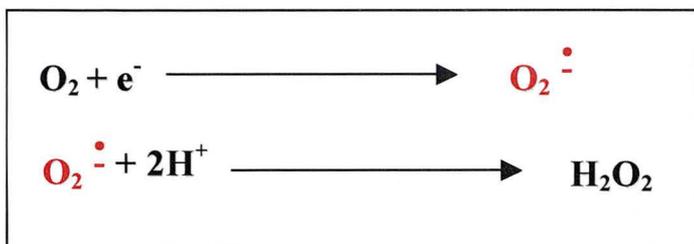
La réaction de type II ne produit pas de radicaux libres mais des molécules activées.

- Réaction de type I : l'oxygène intervient au cours de la seconde étape.

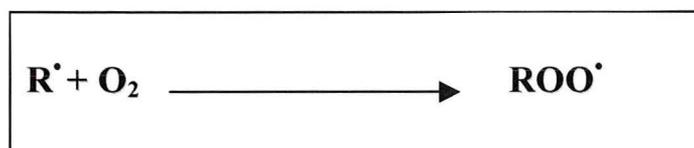


a) Genèse des espèces réactives de l'oxygène

A l'état fondamental, la molécule d'oxygène est un biradical possédant 2 électrons célibataires. Cette molécule est le receveur universel d'électrons, au terme de la chaîne respiratoire mitochondriale. D'une grande stabilité elle peut néanmoins, sous l'effet d'un apport d'énergie, arracher un électron à une molécule voisine, et ainsi donner naissance à l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) qui conduit secondairement à la production de peroxyde d'hydrogène selon les réactions ci dessous :



Elle peut aussi réagir énergétiquement avec des radicaux libres non oxygénés :



Les radicaux peroxydes ROO^{\cdot} ainsi formés peuvent se combiner, formant un pont tétrouxyde extrêmement instable, qui se fragmente et libère l'oxygène singulet (${}^1\text{O}_2$) dont tous les électrons sont appariés ${}^1\text{O}_2$ est aussi produit par transfert d'énergie (réaction de type II).

L'oxygène singulet représente la forme active de l'oxygène la plus agressive dans les milieux biologiques.

Bien que moins réactif que l'anion superoxyde, vis-à-vis des substrats biologiques, le peroxyde d'hydrogène peut néanmoins générer d'importantes lésions *in vivo*. En effet il peut se décomposer en radical hydroxyle et en ion hydroxyle lors de réactions catalysées par les ions Fe^{3+} (réaction de fenton).

b) UVA et espèces réactives de l'oxygène

Les UVA génèrent des ERO par des réactions de photosensibilisation qui nécessitent la présence de chromophores endogènes spécifiques. Les porphyrines, les flavines, les cofacteurs du nicotinamides (NADH et NADPH), les protéines à hèmes, et certaines molécules encore non identifiées permettent le transfert d'énergie vers la molécule d'oxygène, après absorption photonique (Fuchs et coll, 1991, Darr et coll, 1994).

Les porphyrines, les flavines et les quinones (photosensibilisateurs à l'origine de réaction photodynamique de type II) conduisent à la formation d'oxygène singulet (1O_2) espèce particulièrement réactive. L'oxygène singulet serait le principal agent délétère généré par le stress UVA (Peak et coll, 1991). Le peroxyde d'hydrogène est généré lors de l'irradiation UVA du tryptophane (McCormick et coll, 1976). Son action génotoxique a été mise en évidence *via* la photoexcitation de la bilirubine, sur des cellules cutanées humaines (Rosentein et coll, 1983).

En ce qui concerne le peroxyde d'hydrogène, son mode d'action (direct ou indirect) reste mal connu. Toutefois l'utilisation de cellules murines L1210 a permis de montrer l'implication de H_2O_2 dans la cytotoxicité du rayonnement UVA, mais aussi UVB (Bertling et coll, 1996).

La présence du Fe^{2+} et du peroxyde d'hydrogène semble des éléments déterminants dans la formation des dommages de l'ADN lors de l'irradiation UVA, via la formation de radical hydroxyle (Shih et coll, 1996).

De plus il est à noter que le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde peuvent être produits par photooxydation du NADH et du NADPH.

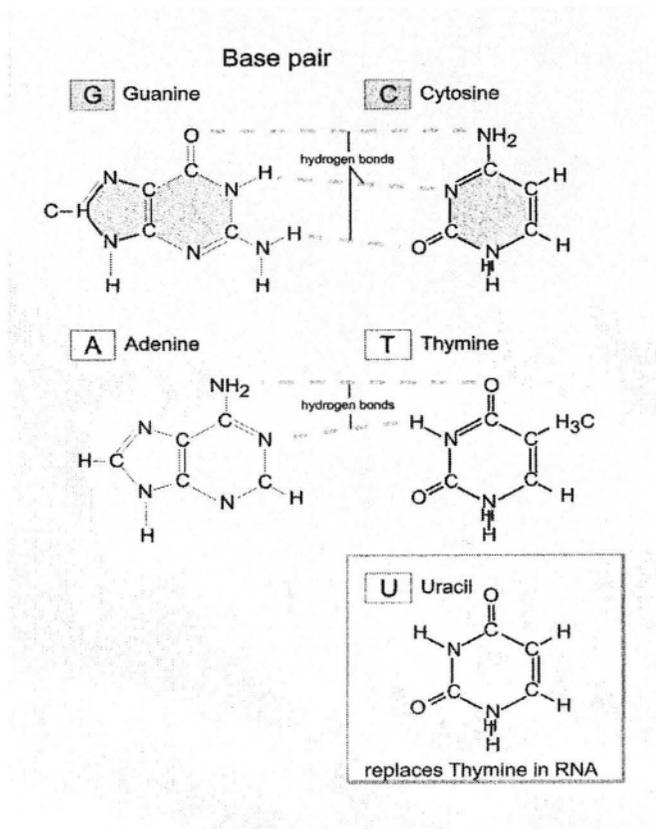
c) UVA et lésions de l'ADN

La notion de stress oxydatif induit par les UVA est maintenant clairement établie. Plusieurs cibles cellulaires peuvent être oxydées, selon le site de production et la nature des radicaux générés (Tyrrell, 1991). Outre les membranes cellulaires et les protéines nous nous intéresserons plus particulièrement à l'ADN.

Les dommages du matériel génétique et la mutagenèse font de l'ADN la cible cellulaire la plus étudiée.

Fig : 3 : Les bases de l'ADN

4 : Représentation schématique de la double hélice d'ADN





Trois types de lésions dépendantes de l'oxygène ont été décrits :

- Les coupures de chaînes : peu de techniques permettent de distinguer les coupures franches des sites alcali-labiles. L'addition de catalase à des fibroblastes cutanés humains normaux soumis à un stress UVA diminue le nombre de sites alcali-labiles, suggérant ainsi le rôle du peroxyde d'hydrogène dans la genèse de telles lésions (Roza et coll, 1985).

Cependant, il semblerait que les coupures de chaînes induites par le rayonnement UVA ou le peroxyde d'hydrogène sont de nature différente (Rozen et coll, 1996). En 1990 Peak et Peak montrent que des piègeurs du radical hydroxyle suppriment les cassures de brins de l'ADN provoqué par le rayonnement gamma et les UVA (Peak et coll, 1990), le radical hydroxyle serait donc lui aussi impliqué dans ce type de lésions. Le développement plus récent de la « technique des comètes » ou « single cell gel electrophoresis » (SCGE) a permis d'étudier ces dommages sur l'ADN intact. Grâce à cette technique des travaux menés au laboratoire ont montré qu'un piègeur du radical hydroxyle (*N*-acetyl-cysteine), diminuait de manière significative le taux de ces lésions dans des fibroblastes cutanés humains en culture, soumis à un stress UVA, confirmant ainsi le rôle intermédiaire de radical hydroxyle.

Des travaux antérieurs que nous avons menés ont montré que si l'on déplete totalement en glutathion (GSH) des fibroblastes cutanés humain en culture, les lésions génomiques induites par une irradiation UVA sont très significativement plus élevées, cela confirmant l'importance du stress oxydant induit par l'irradiation UVA.

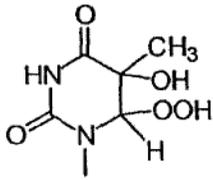
Le rôle antioxydant des MT a aussi été montré, lors d'un stress UVA, l'induction des MT dans la cellule permet de diminuer significativement les lésions oxydatives de l'ADN.

● Les pontages ADN-protéines : ils ont été mis en évidence pour la première fois par Gantt. R et coll (Gantt et coll, 1979). Ces auteurs ont démontré dans le même temps que la formation de ces lésions était strictement dépendante de l'oxygène, sans doute par le biais d'un mécanisme indirect, impliquant l'intervention d'un photosensibilisateur. J. G Peak et coll, ont ensuite démontré que le spectre d'action correspondant à la formation des pontages ADN-protéines présentait deux maxima : le premier dans l'UV lointain à 254 nm, le second dans le visible à 405 nm. Les flavines ont également été évoquées comme photosensibilisateurs (Peak et coll, 1985). Dans un travail plus récent Lai et coll confirment l'existence de deux mécanismes différents selon la longueur d'onde utilisée, et suggère également que des systèmes de réparation différents seraient impliqués selon ces longueur d'onde (Lai et coll, 1987).

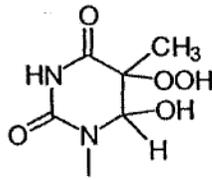
● Les bases oxydées de l'ADN : les modifications de bases par oxydations sont des lésions courantes au niveau de l'ADN et sont induites de manière physiologique au niveau cellulaire par le métabolisme aérobie. Certains travaux estiment que l'ADN cellulaire subirait environ 1000 attaques oxydatives par jour, et environ 10 fois plus pour l'ADN mitochondrial. L'induction de lésions oxydatives par les UVA touche de nombreuses bases, la lésion principale quantitativement et qualitativement, et qui reste la plus étudiée, est de loin la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua). En effet la guanine étant la cible privilégiée des réactions d'oxydation (Cadet et coll, 1998), cette base oxydée est aujourd'hui considérée comme un bon marqueur du stress oxydant.

Je n'énumèrerais pas ici la totalité des lésions oxydatives mais je citerais les plus représentatives :

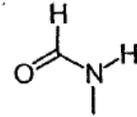
Fig 5 : structures de quelques bases oxydées



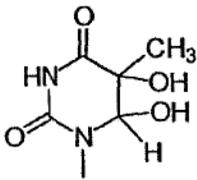
hydroxy-hydroperoxydes de thymine



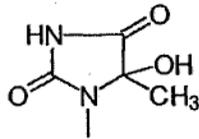
5-hydroperoxyméthyl-uracile



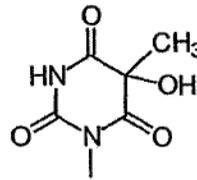
formamide



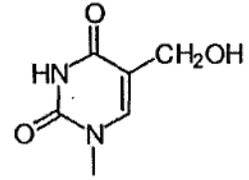
diols de thymine (Tg)



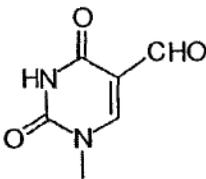
5-hydroxy-5-méthyl-hydantoïne (5-OH-5-MeHyd)



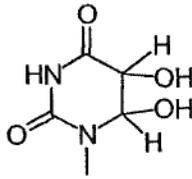
acide 5-hydroxy-5-méthyl-barbiturique



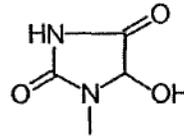
5-hydroxyméthyl-uracile



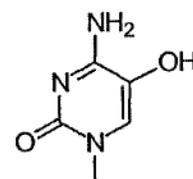
5-formyluracile



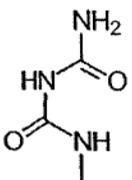
diols d'uracile (Ug)



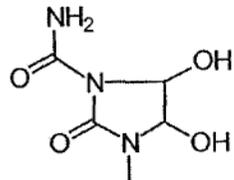
5-hydroxyhydantoïne



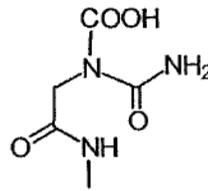
5-hydroxycytosine (5-OHCyt)



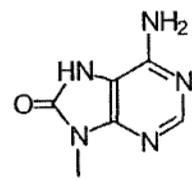
biuret



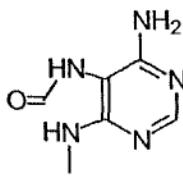
1-carbamoyl-4,5-dihydroxy-2-oxoimidazolidine



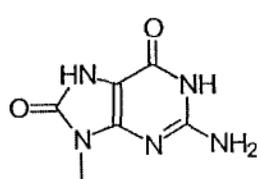
acide aminocarbonyl (2-amino)-2-oxométhyl carbamique



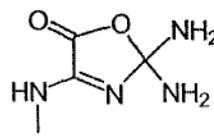
8-oxoAde



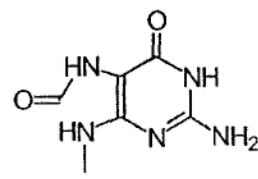
FapyAde



8-oxoGua



oxazolone



FapyGua

2°) Les lésions de l'ADN dues aux UVB

L'ADN est la cible privilégiée des UV-B au niveau épidermique car c'est le chromophore épidermique majeur. Les lésions induites majoritairement par les UV-B sont des dimérisation de pyrimidines qui sont formées indépendamment de l'oxygène. Il est à noter que depuis peu de temps les études montrent que les UV-B peuvent former par le biais de la photoexcitation de la cytosine et de la guanine des lésions de types 8-oxodG. La formation de ces lésions oxydatives lors de l'irradiation UVB apparaît être plus marginale, mais a souvent été sous estimé.

Nous nous focaliserons donc ici sur les phénomènes de dimérisation. On distingue trois types de dimères formés lors d'une irradiation UV-B :

- les cyclobutanes dipyrimidiques (CPD)
- Les pyrimidines (6-4) pyrimidones (6-4 PP)
- Les dimères de type dewear

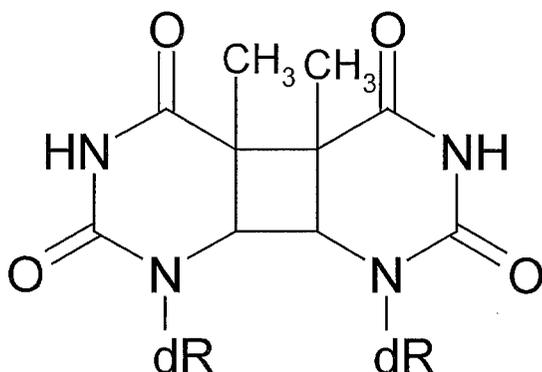
a) Les cyclobutanes dipyrimidiques

Ce sont les CPD qui sont formés majoritairement lors de l'irradiation UV-B. Ils résultent de la photoaddition de deux thymines adjacentes. Leur formation induit la distorsion de la double hélice d'ADN. De plus récents travaux montrent aussi une induction de CPD lors d'une irradiation UVA (Kuluncsics et coll, 1999).

L'élimination de ces lésions repose sur une voie appelée réparation par excision de nucléotide.

L'élimination de ce type de lésions est lente et incomplète (Friedberg et coll, 1995), ce qui n'est pas sans conséquence sur la cytotoxicité et la mutagénicité.

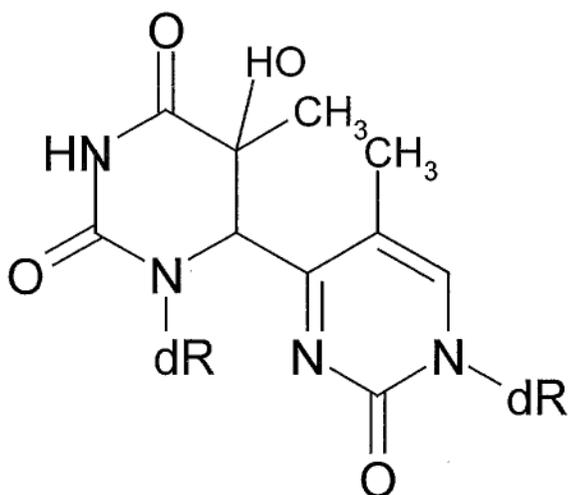
Fig 6: Structure d'un CPD



b) Les pyrimidines (6-4) pyrimidones (6-4 PP)

C'est le deuxième type le plus fréquent de photoproduits que l'on retrouve après irradiation aux UVB. Cette lésion se forme entre deux pyrimidines adjacentes. Il y a alors distorsion de la double hélice d'ADN. C'est un type de lésion éliminé rapidement et efficacement par la voie de réparation par excision de nucléotides (NER). En effet 24 heures après l'exposition UVB on ne retrouve plus de 6-4 PP au niveau de l'ADN (Perdiz et coll, 2000).

Fig 7 : Structure d'un photoproduit 6-4

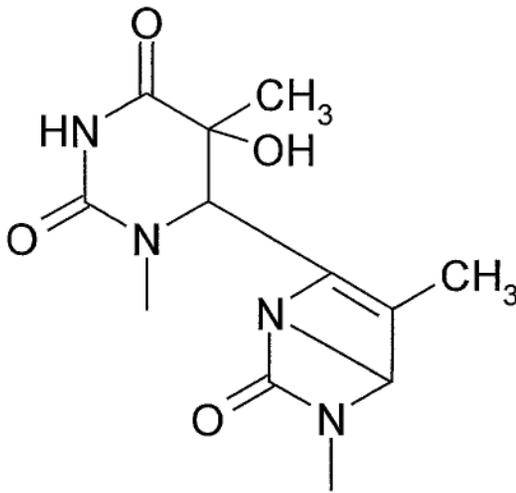


c) Les dimères de type dewar (DewarPP)

Ils résultent aussi de la photoaddition de deux pyrimidines adjacentes. Ils sont induits lors d'une irradiation UVB mais aussi lors d'une irradiation en spectre solaire total. Leur production est d'ailleurs plus importante sous irradiation solaire.

L'incidence biologique de ce type de photoproduit est mal connue à l'heure actuelle. Les travaux récents de Perdiz (Perdiz et coll, 2000), permettent toutefois de souligner leur importance en terme de cytotoxicité et de mutagénicité, puisqu'ils sont éliminés lentement et inefficacement par la NER

Fig 8:Structure d'un isomère de valence Dewar



Les nombreux travaux réalisés à l'heure actuelle, sont en train de modifier le clivage entre lésions de type UVA et de type UVB. En effet il apparaît clairement que les dimères peuvent être induites lors d'une irradiation UVA (Kuluncsics et coll, 1999) et qu'inversement des lésions oxydatives de type 8-oxodG sont détectées après irradiation UVB.

L'effet direct du rayonnement UVA est encore mal connu, mais existe réellement (Douki et coll, 1999).

De plus l'utilisation d'un modèle d'irradiation mimant l'effet du soleil (spectre solaire total), permet de mieux appréhender la véritable incidence des différents types de lésions et de modéliser l'effet combinatoire des UVB et des UVA sur l'ADN. L'équipe d'Evelyne Sage a ainsi démontré que l'irradiation solaire combinant UVB et UVA laissait entrevoir une conséquence biologique importante pour les photoproduits de type Dewar.

III) Place des systèmes antioxydants et des systèmes de réparations dans le maintien de l'intégrité génomique.

L'ADN cellulaire étant en permanence soumis aux agressions de nature endogène ou exogène, il existe des systèmes cellulaires, enzymatiques ou non, permettant de prévenir l'apparition de lésion génomiques ou de restaurer l'intégrité du génome.

Les systèmes de défenses antioxydants de l'ADN sont de nature enzymatiques ou non enzymatiques, inductibles ou constitutifs. Dans cet exposé je ne traiterai que les défenses antioxydantes constitutives.

Les systèmes de réparation sont quant à eux composés par des complexes enzymatiques et font intervenir une cascade d'activité enzymatique permettant de situer, éliminer et enfin resynthétiser la base ou la portion d'ADN lésée.

1°) Les systèmes de défense antioxydante

Sous le terme de systèmes de défense antioxydantes de l'ADN on regroupe :

- Des molécules antioxydantes : Glutathion et autres molécules à groupements thiols (les métallothionéines, la NAC), les vitamines E, A, C, les carotènes, l'acide urique, certains acides aminés, cette liste n'est pas exhaustive, elle s'allonge d'ailleurs régulièrement.

- Des protéines antioxydantes, constitutives et ou inductibles comme les Heat Shock Protein (HSP).

a) Les molécules antioxydantes non enzymatiques

Ces molécules sont présentes dans la cellule et fonctionnent comme des piègeurs de radicaux libres. Le terme anglosaxon de scavenger est aujourd'hui passé dans le langage

courant. Pour être dénommé scavenger une molécule doit remplir un certain nombre de fonctions : (Deby et Pincemail, 1986)

- Le produit de la réaction entre le scavenger et le radical ne doit pas être de nature radicalaire.
- L'affinité du piègeur pour le radical doit être supérieure à l'affinité entre le radical et le substrat à protéger.
- Le piègeur doit montrer un certain degré de spécificité envers les radicaux, sous-entendant qu'il n'est pas efficace contre toutes les espèces radicalaires.

Je ne ferai pas ici la liste exhaustive de tous les scavengers, je reprendrai simplement les caractéristiques de certains d'entre eux, bien étudiés et identifiés.

a1) Le glutathion et les thiols.

• Le GSH ou γ -glutamyl-cystéinyl-glycine est le plus abondant thiol libre non protéique dans les cellules de mammifères, dont la concentration est comprise entre 0,5 et 10mM, alors qu'elle oscille entre 0,5 et 10 μ M dans le plasma. Le glutathion existe en équilibre entre deux formes, l'une réduite (GSH) prépondérante dans le milieu intracellulaire, et l'autre oxydée (GSSG). Il a été mis en évidence l'existence de deux pools de glutathion intracellulaire dans des hépatocytes de rat, l'un cytosolique labile et l'autre mitochondrial stable (Meredith et coll, 1982). Il existe aussi un pool nucléaire de GSH. Les cellules préviennent l'accumulation du GSSG grâce à un processus d'excrétion active assuré par la γ -glutamyl-transpeptidase. Ainsi dans les conditions physiologiques la cellule est capable de maintenir un rapport GSH/GSSG élevé et de contrôler l'état redox.

La synthèse intracellulaire de cette molécule implique deux réactions enzymatiques ATP dépendante (Fig 3). C'est la γ -glutamyl-cystéine synthétase qui régule la biosynthèse. Le GSH ainsi formé va pouvoir avoir un effet inhibiteur sur cette enzyme.

La liaison γ -glutamyl ainsi que la fonction thiol du GSH lui confèrent un grand nombre de fonctions. Nous pouvons retenir les suivantes :

- Transport des acides aminés
- Synthèse de l'ADN par le biais de la ribonucléotide réductase
- Synthèse des œstrogènes, prostaglandines et leucotriènes.

- Détoxification des métaux lourds et autres xénobiotiques, par action directe ou indirecte.

Je détaillerai maintenant plus particulièrement le rôle du GSH comme défense antioxydante.

Le GSH est un piègeur d'espèces réactives de l'oxygène car il réagit notamment avec le radical hydroxyle (Bump et coll, 1990). De plus, dans un modèle *in vitro*, du GSH apporté à des concentrations physiologiques (<10 mM) protège l'ADN contre $^1\text{O}_2$ (Lafleur et coll, 1994). Ce travail est en accord avec celui de Sies et coll, qui démontre que l'anion thiolate (GS^-) est un piègeur de $^1\text{O}_2$. Dans certaines conditions aérobies l'action concomitante de la superoxyde dismutase (SOD) peut être nécessaire pour éliminer l'anion superoxyde formé par la réaction entre l'anion thiolate, le radical thiyle et l'oxygène.

De plus l'équipe de Tyrrell a montré l'existence d'une corrélation directe entre le taux de glutathion endogène et la sensibilité de fibroblastes et de kératinocytes irradiés aux UV-A (Tyrrell et coll, 1986, 1988). Nous avons montré au laboratoire qu'une déplétion intracellulaire du GSH induisait une forte augmentation des lésions de l'ADN suite a une irradiation UV-A de fibroblastes cutanés humain en culture. A contrario une supplémentation des cellules en NAC permet d'augmenter les taux intracellulaires de GSH chez ces fibroblastes et de lutter contre l'apparition des lésions génomiques UV-A induites (Emonet et coll, 1998). La modulation du taux intracellulaire de GSH permet de modifier non seulement la sensibilité des cellules aux UV-A mais permet aussi de moduler les lésions génomiques UV-A induites démontrant ainsi l'importance de cette molécule dans la lutte contre les ERO.

Le GSH est aussi le cofacteur enzymatique des glutathion peroxydases sélénodépendantes (GSH-Px). Cette enzyme antioxydante, dont l'action antiradicalaire sera détaillée plus loin, utilise le GSH comme source principale d'hydrogène. Cette réaction nécessite 2 molécules de GSH et produit une molécule de GSSG.

Le GSSG ainsi formé est soit expulsé soit régénéré dans les conditions physiologiques par le système glutathion réductase/NADPH. Les équivalents H^+ sont apportés par le shunte des hexoses monophosphates.

Le GSH contrôle le statut redox intracellulaire et le fonctionnement cellulaire.

Le statut redox intracellulaire est un paramètre finement régulé qui confère à la cellule la capacité à faire face à l'environnement extracellulaire hautement oxydant. L'homéostasie redox intracellulaire est régulée par des molécules riches en groupement thiols, comme le GSH et la thiorédoxine.

Les fonctions cellulaires essentielles, comme l'expression des gènes, sont influencées par la balance entre pro et antioxydants. De part son abondance dans la cellule, le GSH est le thiol le plus important dans la régulation du statut redox, dans des conditions physiologiques (cellules non stressées), 99% du glutathion est sous forme réduite (GSH). Le GSH peut être redistribué dans le noyau, phénomène pouvant être amplifié par la protéine antiapoptotique Bcl-2 (Voehringer et coll, 1998).

Il est aujourd'hui décrit que l'environnement redox intracellulaire module l'activité de certains facteurs de transcription, notamment NF- κ B, AP-1 ou encore p53 (Liste non exhaustive).

- NF- κ B, hétérodimère formé entre la protéine p50 et p65 se localise dans le cytoplasme, sous forme inactive, par association à I- κ B. Lors de son activation, il y a dissociation entre NF- κ B et I- κ B. I- κ B est alors phosphorylé puis dégradé par ubiquitination, permettant ainsi la migration de NF- κ B dans le noyau. Il y a alors transcription des gènes contenant des éléments de régulation κ B. Les conditions induisant un état prooxydant sont décrites comme permettant l'activation de NF- κ B. Inversement, les agents permettant une élévation du GSH intracellulaire inhibent tous l'activation de NF- κ B.

- AP-1 est un autre exemple de facteur de transcription dont l'activité est modulée par le statut redox intracellulaire. AP-1 ou « Activator Protein 1 » est une protéine induisant de nombreux gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Angel P et coll, 1991). AP-1 est un dimère composé des protéines c-Fos et c-Jun (produits des protooncogènes *c-fos*, *c-jun*). L'activation de AP-1 est régulée par un mécanisme extrêmement complexe.

Une première étape de régulation est la synthèse de c-Fos et c-Jun, qui génère AP-1. L'activité d'AP-1 ainsi formé varie en fonction du type d'association entre c-Fos et c-Jun car AP-1 peut être soit un hétérodimère soit un homodimère (c-Jun/c-Jun).

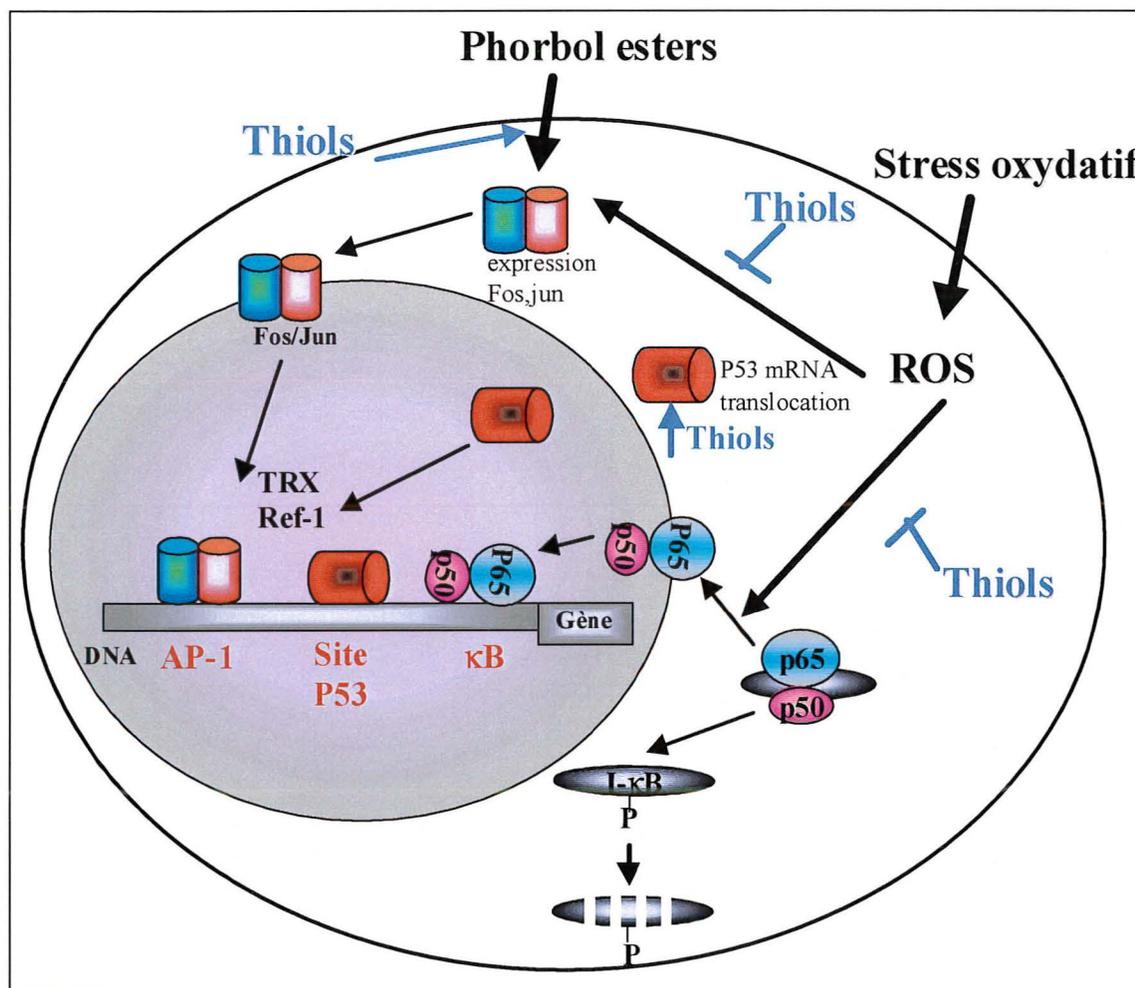
Les gènes *c-fos*, et *c-jun* sont induits par des agents responsables d'une accumulation d'ERO (UV, peroxydes...)(Lo et coll, 1995 ; Datta et coll, 1992). Toutefois le mécanisme d'induction semble plus complexe car des résultats différents ont été obtenus. En effet dans certaines

condition la NAC prévient l'induction de *c-fos* et *c-jun* et dans d'autres conditions induit ces gènes.

- p53, gène suppresseur de tumeur, souvent inactivé dans les cancers humains, joue un rôle central dans la réponse cellulaire aux agents ou conditions génotoxiques. p53 permet l'activation de la transcription de gènes contrôlant l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose (Ko, L et coll, 1996). La liaison de p53 à l'ADN ainsi que son activité transcriptionnelle est contrôlée par le statut redox.

Le GSH et les thiols participent donc au contrôle de l'équilibre Redox cellulaire et joue ainsi un rôle important sur l'activité de facteurs de transcription comme p53, AP-1 et NFκB et préviennent de l'apoptose (Fig 9).

Fig 9: Illustration schématique des voies d'induction de NF-κB, AP-1 et p53 et de l'influence des thiols intracellulaire (d'après Arrigo, 1999)



a2) Les vitamines

Les travaux sur les vitamines parlent essentiellement de la vitamine E.

- Le tocophérol ou vitamine E est connu pour sa puissante activité antiradicalaire, c'est d'ailleurs l'antioxydant lipophile le plus important. Il s'oppose principalement aux phénomènes de peroxydation lipidique car il est lipophile. Une molécule d' α -tocophérol (α -TH) peut protéger 3000 molécules d'acide gras polyinsaturés contre les attaques radicalaires suivant la réaction suivante :



Le radical tocophéryl ainsi formé sera alors transformé en quinone- α -tocophéryl.

Il est à noter que la vitamine E agit de façon complémentaire avec les glutathion peroxydases sélénodépendantes car il y a production d'hydroperoxyde à chaque fin de réaction.

La vitamine C est aussi indispensable puisqu'elle permet la régénération de l' α -tocophérol.

Nous voyons ici l'étroite interrelation des molécules antioxydantes : Vitamine E, vitamine C avec aussi les GPX et le GSH (Chaudière, 1994).

- La vitamine C ou acide ascorbique agirait aussi bien comme piègeur de radicaux et comme réducteur du radical tocophéryl

- Les caroténoïdes auraient quant à eux une action sur $^1\text{O}_2$ et protégeraient les membranes de la lipoperoxydation en association avec la vitamine E.

a3) Les autres piègeurs

- L'acide urique interviendrait en inactivant $^1\text{O}_2$ et OH^\bullet , on lui prêterait aussi des propriétés de complexation de fer.

- Certains acides aminés comme la taurine seraient des capteurs de OH^\bullet .

- La céruloplasmine agirait quand à elle de trois façons, soit par une activité catalytique sur la dismutation de l'anion superoxyde, soit en piégeant cet anion ou le radical hydroxyle ou 1O_2 , ou bien en limitant la réaction de Fenton.

b) Les enzymes antioxydantes

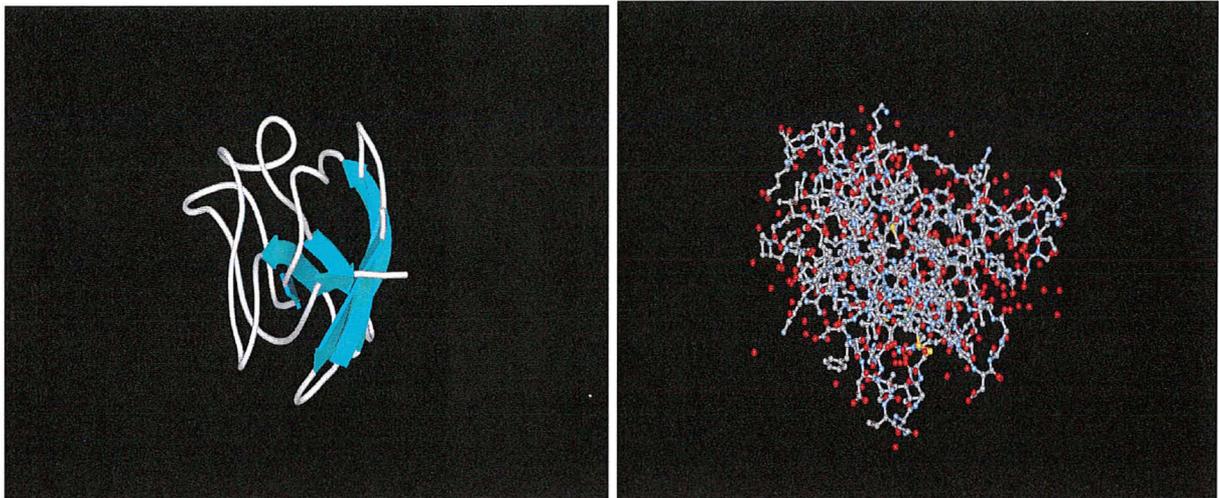
Ces enzymes sont présentes de manière constitutive et permettent de protéger les cellules contre les radicaux libres produits par le métabolisme cellulaire de manière physiologique. Leur rôle est capital lors de l'amplification de l'agression radicalaire, par exemple lors de l'exposition solaire ou de la prise de certains médicaments ou encore lors d'agressions virales. Les principaux systèmes enzymatiques constitutifs comprennent les superoxyde dismutases, la catalase, les peroxydases sélénodépendantes et le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase.

b1) Les superoxyde dismutases (SOD)

Ce sont des métalloprotéines ubiquitaires chez les procaryotes et les eucaryotes. Chez l'homme il en existe trois types :

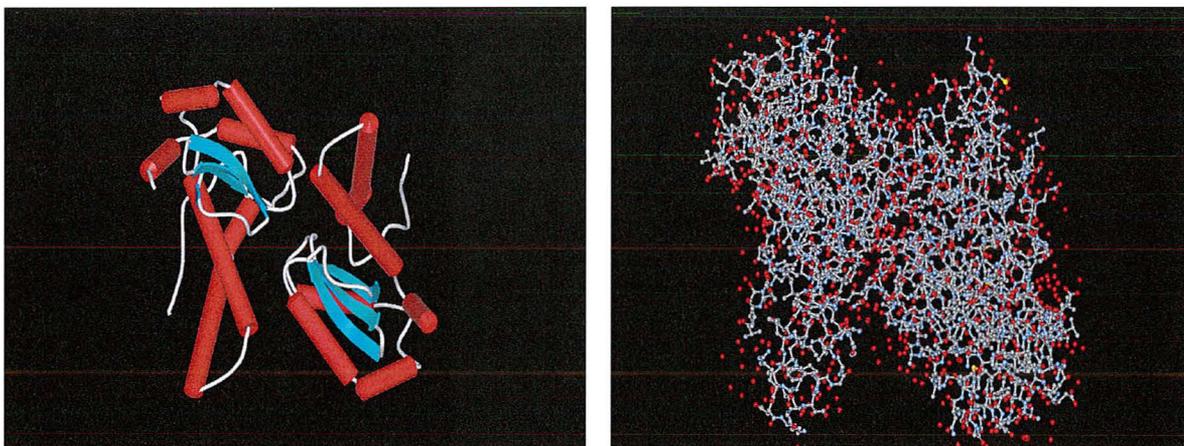
- La première est cytoplasmique, son poids moléculaire est de 32000 Da environ. Cette enzyme est formée de deux sous unités contenant chacune un atome de cuivre et un atome de zinc. C'est la cuprozinc superoxyde dismutase (CuZn-SOD), elle est sensible à l'inhibition par le cyanure

Fig 10: Représentation schématique de la CuZn-SOD. (structure tertiaire et primaire)



- La seconde est située au niveau mitochondrial, son poids moléculaire est d'environ 8000 Da. Cette enzyme comporte 4 sous unités contenant chacune un atome de manganèse et résiste assez bien à l'inhibition par le cyanure.

Fig 11: Représentation schématique de la Mn-SOD (structure tertiaire et primaire)



- La troisième est une CuZn-SOD extracellulaire, qui est différente immunologiquement de l'enzyme cytosolique. Elle est sécrétée exclusivement par certains types cellulaires dont les cellules endothéliales et les fibroblastes (Stralin et coll, 1994).

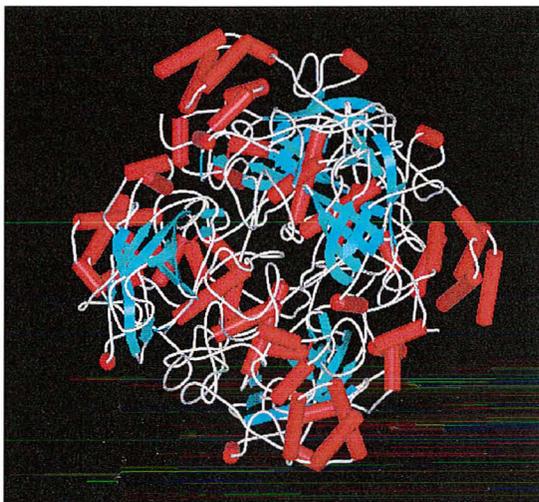
Les deux formes de SOD catalysent la même réaction enzymatique avec la même efficacité. Elles dismutent l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène.

Le peroxyde d'hydrogène ainsi formé est métabolisé par la catalase et les glutathion peroxydases.

b2) La catalase

Cette enzyme catalyse la destruction du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau
Ce qui permet de limiter la réaction de fenton.

Fig 12: Représentation schématique de la catalase (structure tertiaire)



Cette hémoprotéine est trouvée principalement au niveau des peroxysomes où sont dégradés des substrats organiques relativement peu réactifs et où la concentration en peroxyde d'hydrogène peut être très importante. Cette enzyme est largement présente au niveau érythrocytaire où elle joue un rôle essentiel en cas de déficience de l'activité glutathion peroxydase.

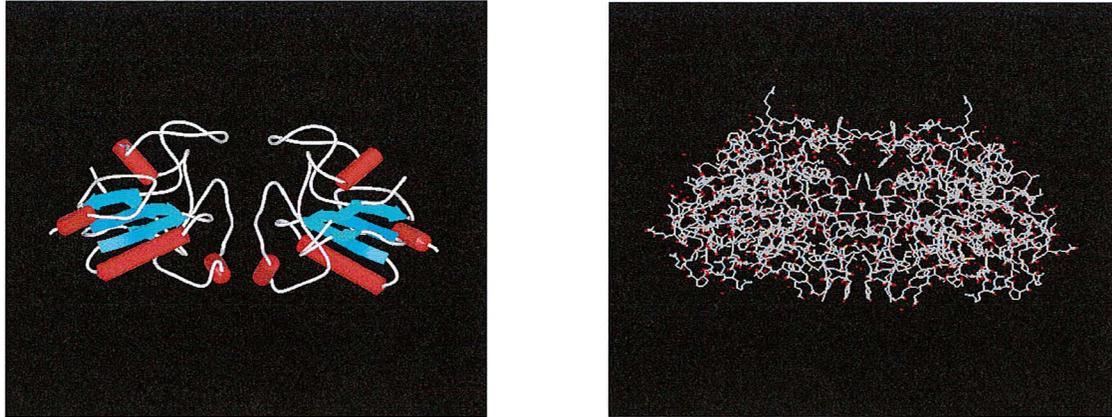
Son rôle dans la défense contre le stress oxydant UV induit est discuté, certains lui prêtent un rôle protecteur contre le peroxyde d'hydrogène (Sammartano, 1985) d'autre un rôle mineur (Eisenstark, 1987).

b3) Les peroxydases sélénodépendantes

La glutathion peroxydase sélénodépendante (GSH-Px) décompose les hydroperoxydes organiques et le peroxyde d'hydrogène. Elle est formée de 4 sous-unités contenant chacune un atome de sélénium sous forme de sélénocystéine qui constitue le site actif de l'enzyme.

Son poids moléculaire est d'environ 9000 Da. Sa localisation est cytosolique et mitochondriale (Zachara, 1992).

Fig 13: Représentation schématique de la GSH-Px (structure tertiaire et primaire)



Cette enzyme possède une grande spécificité vis-à-vis du GSH, qui lui sert de source d'hydrogène. Elle réduit un grand nombre de peroxydes avec des vitesses comparables, en fin de réaction du GSSG est formé, il sera régénéré par le système glutathion réductase/NADPH.

La glutathion peroxydase est ubiquitaire mais sa quantité varie en fonction des espèces et des tissus. Son taux intracellulaire est étroitement lié à la concentration en sélénium. La glutathion peroxydase joue un rôle majeur de détoxification du peroxyde d'hydrogène produit physiologiquement et continuellement par plusieurs systèmes enzymatiques comme la SOD, la monoamine oxydase, la xanthine oxydase, les systèmes à cytochrome P450. Son action sur les hydroperoxydes n'étant que partielle, surtout de part sa localisation cytosolique, elle nécessite l'action concomitante de la phospholipase A2.

Plus récemment, une phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxidase a été isolée. Un certain nombre de différence existe entre ces deux enzymes :

- Poids moléculaire plus faible : monomère de 20000 Da
- elle est lipophile
- Le GSH n'est pas cofacteur
- Spécificité envers les hydroperoxydes lipidiques notamment les hydroperoxydes phospholipidiques et de cholestérol
- Rôle unique contre la peroxydation lipidique (Thomas et coll, 1990)

b4) Thiorédoxine et thiorédoxine réductase

La thiorédoxine est une petite protéine de 12000 Da, retrouvée dans le cytosol et la mitochondrie, elle assure la réduction des groupements thiols protéiques. Sa régénération est assurée par la thiorédoxine réductase qui est une enzyme monomérique de 58000 Da. La thiorédoxine réductase utilise le NADPH comme cofacteur.

Fig 14: monomère de la thiorédoxine humaine sous forme réduite (structure tertiaire et primaire)

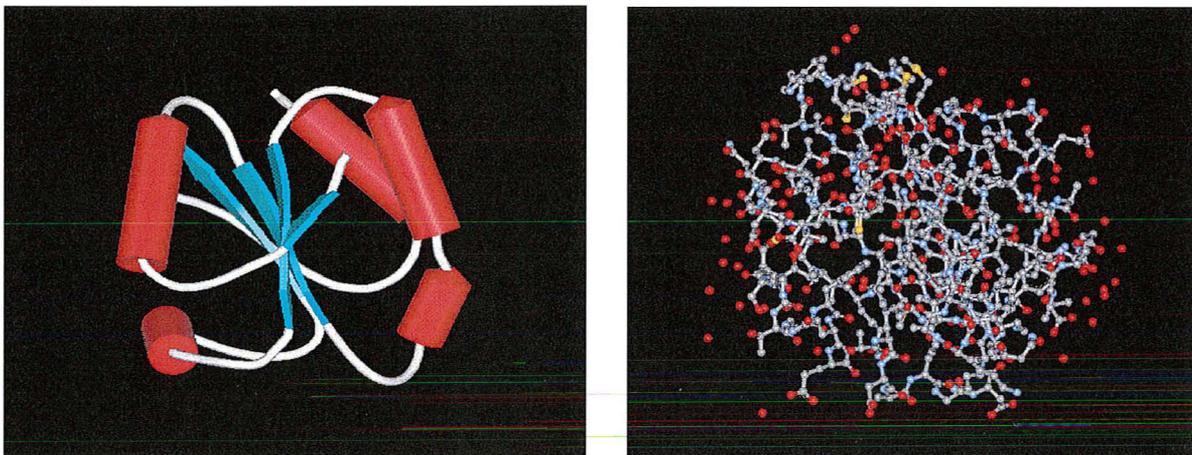
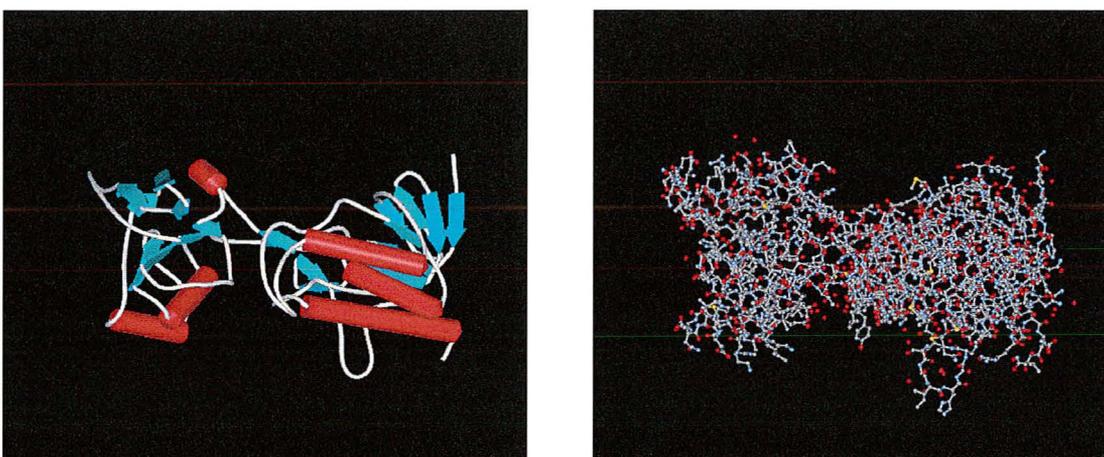


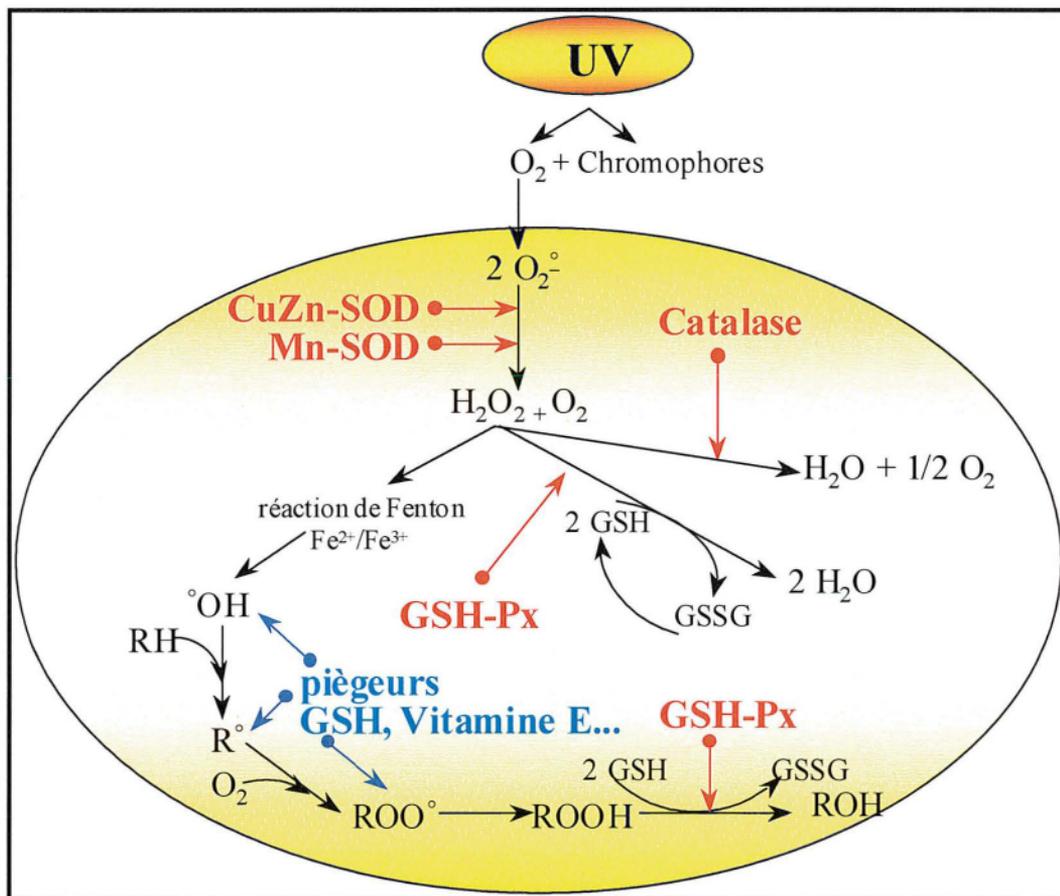
Fig 15: Représentation schématique de la thiorédoxine réductase (E.Coli) (structure tertiaire et primaire)



Le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase serait un système de défense antiradicalaire clef au niveau épidermique et plus précisément au niveau membranaire, en assurant la réduction des disulfides et l'élimination de l'anion superoxyde produit sur le versant

extracellulaire des kératinocytes (Schallreuter et coll, 1986). De plus au niveau épidermique, le système thiorédoxine/thiorédoxine réductase participe à la mélanogénèse de part son fonctionnement étroit avec la tyrosinase (Schallreuter et coll, 1994).

Fig 16 : Schéma récapitulatif des systèmes de défense antioxydant intracellulaires



2) Les systèmes de réparation de l'ADN

Les lésions de l'ADN peuvent conduire à des processus de mutation. Afin de lutter contre ces effets néfastes la cellule possède un arsenal enzymatique permettant de repérer, éliminer et remplacer les portions génomiques lésées.

Les différents systèmes enzymatiques de réparation de l'ADN sont classés en trois groupes en fonction de leur mode de fonctionnement. On distingue :

- La réparation par excision de base (BER pour les anglosaxons) qui s'applique pour des lésions de type oxydatives ou des lésions n'entraînant pas de distorsions de la double hélice d'ADN.

- La réparation par excision de nucléotide (NER pour les anglosaxons), est rencontrée pour la réparation des lésions induisant une distorsion dans la double hélice, les bulky-lesion (pour le terme anglosaxon). Ce système est très utile pour réparer les lésions UV-B induites.
- La réparation par excision de bases mal appariées (MMR pour les anglosaxons) permet de corriger les erreurs d'appariement et d'éviter ainsi d'amplifier des lésions potentiellement mutagènes.

Nous nous intéresserons dans cette revue de la littérature uniquement aux systèmes de réparation rencontrés chez les mammifères et donc chez l'homme. Ce sont des systèmes rencontrés chez la plupart des eucaryotes, mais qui peuvent varier. Par exemple le système de photo réparation des lésions génomiques induites par les UV-B est très répandu chez les eucaryotes mais est inexistant chez les mammifères de part l'absence de la photolyase (Yasui et coll, 1994). De ce fait la réparation directe des lésions génomique n'existe pas chez l'homme. D'autres systèmes comme la réparation par excision de nucléotide semble universelle.

Je discuterais ici les systèmes de réparation permettant d'éliminer les lésions UV induites.

a) Réparation par excision de base (BER)

La réparation par excision de bases permet de corriger un grand nombre de lésions spontanées ou induites par des agents environnementaux génotoxiques grâce à un processus initié par les ADN glycosylases. Dans un deuxième temps une apurique/apyrimidique endonucléase coupe l'extrémité 5' du site abasique et le processus de réparation est finalement terminé soit de manière courte ou longue en fonction du nombre de bases à remplacer.

Ce système permet de réparer spécifiquement les bases altérées, grâce à la présence d'une grande variété d'ADN glycosylases.

Tableau 1: DNA glycosylases chez les mammifères.

Mammalian DNA glycosylases [1-3]					
Name ^a	Size (aa)	Lyase activity	Cellular localisation	Chromosome localisation	Known substrates ^b
hUNG1	304	No	Mitochondria	12q24.1	ssU > U:G > U:A, 5-FU (poor: 5-hydroxyU, isodialuric acid, alloxan)
hUNG2	313	No	Nuclei	12q24.1	ssU > U:G > U:A, 5-FU (poor: 5-hydroxyU, isodialuric acid, alloxan)
mUNG1	295	No	Mitochondria	--	U, 5-FU
mUNG2	306	No	Nuclei	--	U, 5-FU
hSMUG1	270	No	--	12q13.1-q14	ssU > U:A, U:G
hTDG	410	No	Nuclei	12q24.1	U:G > εC:G > T:G
hMBD4	580	?	--	3q21	U or T in U/TpG:5-meCpG
hUDG2	327	No	--	5	U:A
hMPG	293	No	--	16p (telomere)	3-mA, 7-mA, 3-mG,7-mG, 8-oxoG, hypoxanthine, εA, εG
mMPG	--	No	--	--	3-mA, 7-mA, 3-mG
hOGG1 ^c	345	Yes	Nuclei (1a)	3p25	Me-fapyG:C >> fapyG:C > 8-oxoG:C >> 8-oxoG:T
	424	Yes	Mitochondria (2a)	--	--
mOGG1	345	Yes	--	--	8-oxoG:C >> 8-oxoG:T > 8-oxoG:G
hMYH ^d	521	Yes?	Mitochondria	1p32.1-p34.3	A:G, A:8-oxoG >> C:A, 2-OH-A
	535	Yes?	Nuclei	1p32.1-p34.3	A:G, A:8-oxoG >> C:A, 2-OH-A
hNTH1	312(304)	Yes	Nuclei (+mitoch?)	16p13.2-13.13	T/C-glycol, dihydrouracil, fapy,
mNTH1	300	Yes	--	17A3	T-glycol, urea

^ah = human, m = mouse.

^bIn mismatches, the target base is at the left.

^cThirteen alternative OGG1 transcripts have been demonstrated, of which only 1a encodes a nuclear localisation signal.

^dTen alternative hMYH transcripts have been demonstrated.

Les dommages reconnus par ces glycosylases sont pour la plupart du temps le résultat d'une instabilité « constitutionnelle » de l'ADN. Par exemple la desamination de la cytosine en uracile, les erreurs dans la réplication, les alkylations et les lésions oxydatives.

Ces enzymes sont localisées au niveau nucléaire mais aussi dans la mitochondrie.

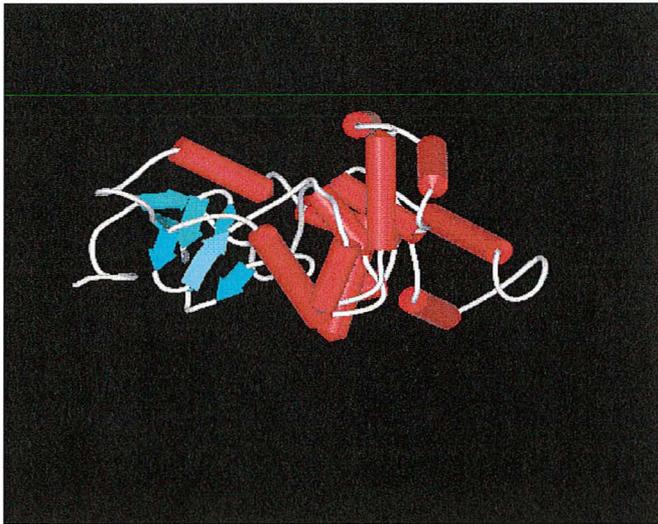
Ces enzymes sont souvent de petites protéines monomériques qui clivent la liaison N-C1' entre la base et le désoxyribose, laissant ainsi place à un site abasique (cytotoxique et mutagénique) qui sera alors pris en charge par d'autres enzymes.

Ce mécanisme s'applique pour les ADN glycosylases monofonctionnelles. Certaines glycosylases possèdent plusieurs activités enzymatiques, c'est le cas de la 8-oxoG DNA glycosylase (OGG1) et de l'endonucléase III (EndoIII), qui possèdent en plus une activité lyase et qui clive le côté 3' du site abasique (Shinmura et coll, 1997, Radicella et coll, 1997).

Puis après l'élimination de la base endommagée et l'incision du site abasique deux possibilités se présentent, une voie longue et une voie courte (long et short patch repair pour les anglosaxons) (figure 18)

- Dans la voie courte il n'y a qu'un seul nucléotide à remplacer c'est le cas lors du fonctionnement de l'enzyme hOGG1.

Fig 17: Représentation schématique de la structure tertiaire de la protéine hOGG1



Cette voie courte fonctionne préférentiellement avec l'ADN polymérase β même si cette enzyme est aussi retrouvée dans la voie longue.

- Dans la voie longue il y a plusieurs nucléotides à remplacer, leur nombre varie entre 2 et 8.

De plus il existe des interactions entre réparation par excision de base et réparation par excision de nucléotides. En effet l'enzyme hNTH (Endo III) responsable de la réparation de diverses pyrimidines oxydées, est stimulée par XPG, une endonucléase essentielle au processus de réparation par excision de nucléotides.

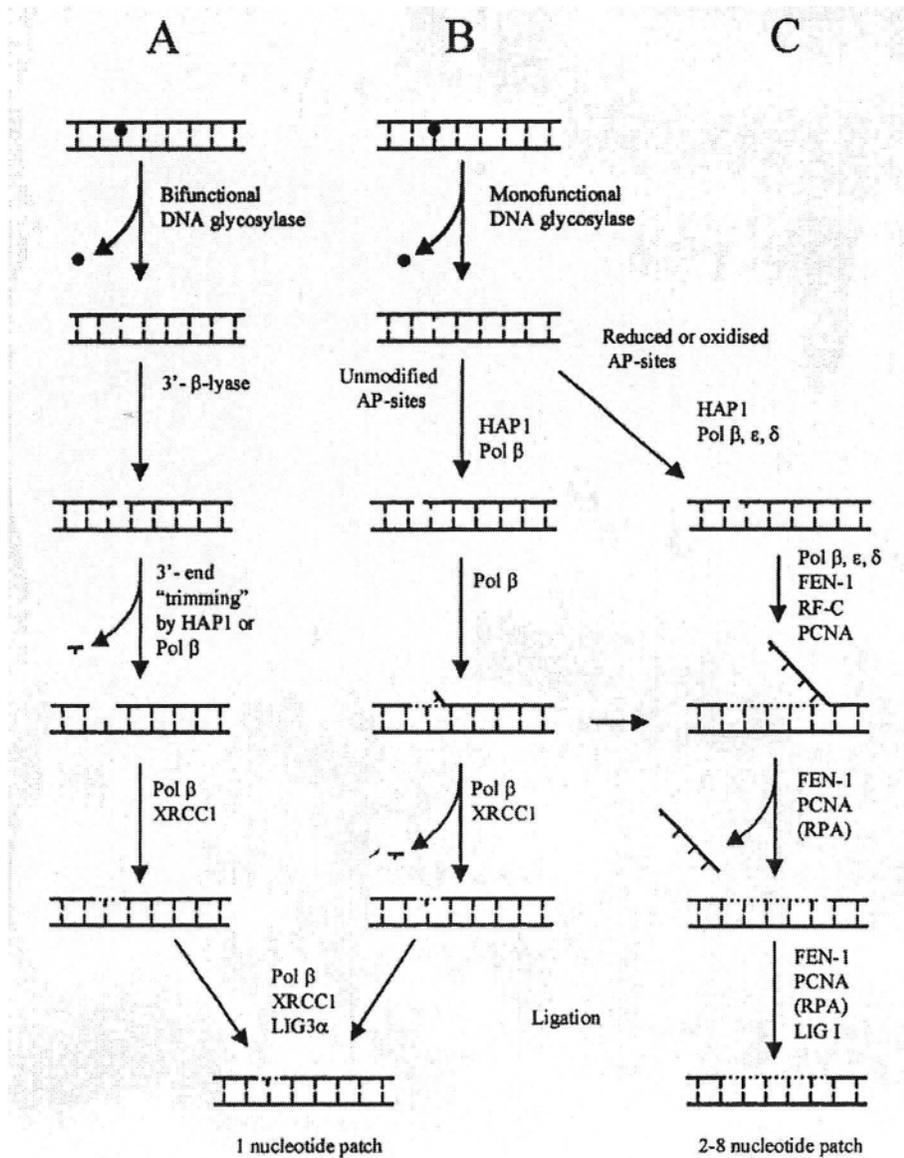
Les ADN glycosylases, de part leur fonctionnement créent des sites abasiques cytotoxiques et mutagènes, des données récentes montrent que la dissociation de la glycosylase ne se fait qu'en présence de l'enzyme HAP1/APE1 (Waters et coll, 1999), qui est la plus importante apurique apyrimidique endonucléase. De surcroît, HAP1 interagit avec l'ADN polymérase β qui agit juste après (Xu et coll, 1998).

La réparation par excision de base résulte donc d'une action concertée dans laquelle les différents intervenants interagissent de manière fonctionnelle par interaction protéine/protéine.

Fig 18: Représentation schématique des différents types de BER

A et B : voies courtes initiées par les glycosylases monofonctionelles (B) ou bifonctionelle (A).

C : voie longue



b) Réparation par excision de nucléotides (NER)

C'est un processus permettant de remplacer une grande variété de lésions distordant la double hélice d'ADN, et notamment les lésions de type CPD et 6-4PPs. C'est un processus universel et très conservé chez les eucaryotes. Cette voie de réparation n'est pas essentielle à court terme pour la survie, mais des mutations dans les gènes nécessaires à cette voie induisent une sensibilité considérable au soleil et notamment des cancers cutanés photoinduits (Benhamou et coll, 2000) comme le montre la maladie Xeroderma pigmentosum (XP) ou le syndrome de Cockayne (SC) ou encore la trichothiodystrophie (TTD), (Robert et coll, 1999).

La NER est subdivisée en deux groupes :

- La réparation des gènes transcrits ou TC-NER, qui comme son nom l'indique se fait préférentiellement au niveau du brin transcrit des gènes codant
- La réparation globale du génome ou GC-NER pour la réparation des brins non transcrits des gènes codant ou des gènes non transcrits.

Modèle général :

Les bases moléculaires du mécanisme de la NER chez les eucaryotes ont tout d'abord été travaillé chez la levure puis sur des cellules humaines et enfin modélisées in vitro.

Dans un premier temps, les protéines XPC-hHR23B agissent comme un détecteur de lésion, qui se lie au niveau de la distorsion de la double hélice et qui va alors initier la voie de réparation (Sugasawa et coll, 1998).

Dans un deuxième temps XPA, RPA et le facteur général de transcription TFIIH s'additionnent pour former un complexe ouvert. Les activités hélicases des sous unités XPB et XPD de TFIIH sont mises à profit pour dérouler l'ADN.

Puis une activité nucléasique est recrutée par le complexe, l'incision coté 3' est réalisée par la protéine XPG et du coté 5' par le complexe formé entre XPF et ERCC1.

Finalement les nucléotides manquants sont synthétisés et liés à l'ADN pour former le brin réparé.

En ce qui concerne le premier temps c'est à dire la reconnaissance du dommage, une alternative a été récemment proposée dans l'ordre d'assemblage du complexe d'excision. Dans ce cas se sont les protéines XPA et RPA qui forment le complexe de reconnaissance de la lésion et qui vont alors recruter TFIIH, XPC et hHR23B pour former le complexe ouvert.

Fig 19: Représentation schématique du complexe protéique intervenant dans la NER chez la levure. Les 7 protéines représentées en rouge sont les sous unités de la RNA Pol II (TFIIH)

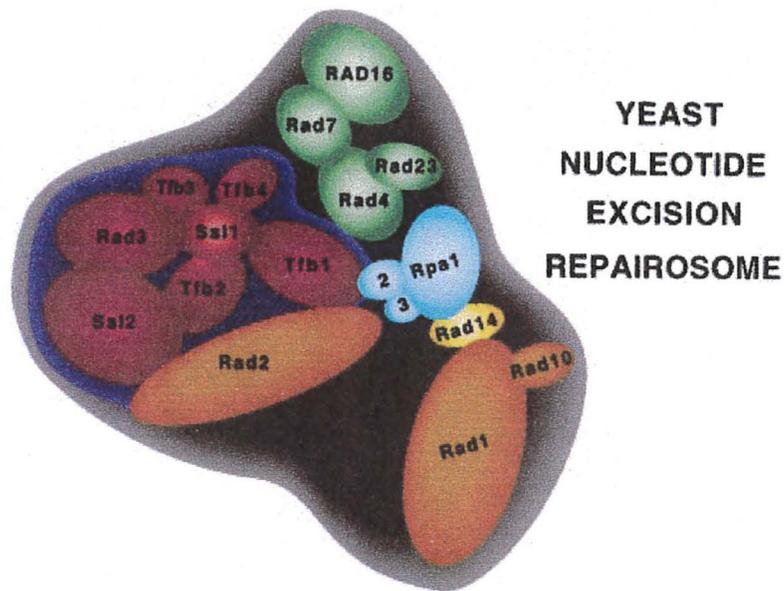
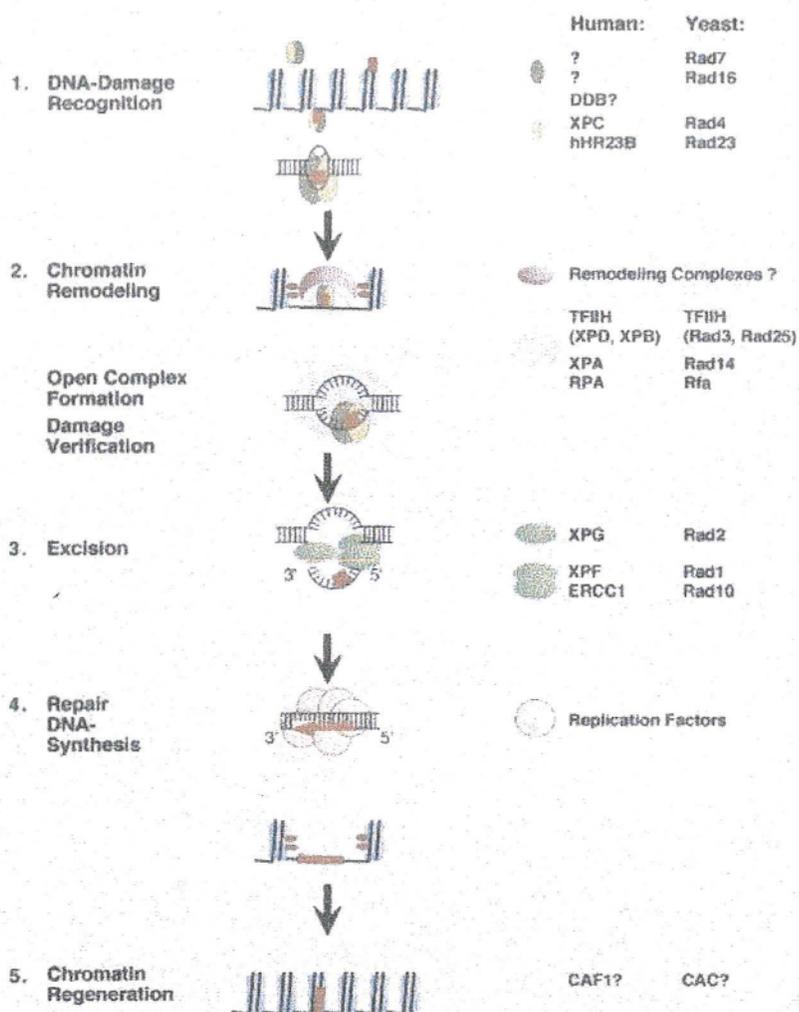


Tableau 2 : Proteines humaines et Proteines de la levure impliquées dans les différentes étapes de la NER précédant la synthèse et la ligation de l'ADN.

Yeast protein	Human homologue
Rad1	XPF
Rad10	ERCC1
Rad2	XPG
Rad4	XPC
Rad23	HHRAD23A, HHRAD23B
Rpa1	Rpa1
Rpa2	Rpa2
Rpa3	Rpa3
Rad3	XPD
Ssl1	p44
Ssl2	XPB
Tfb1	p62
Tfb2	p52
Tfb3	p44
Tfb4	p34
Rad7	?
Rad16	?
Abf1	?

Fig 20: Représentation schématique de la NER chez la levure



La TC-NER

L'existence de cette deuxième voie se fonde sur les observations suivantes :

- Les gènes transcrits sont réparés plus vite que les gènes non transcrits (Bohr et coll, 1985)
- Les lésions sont remplacées plus rapidement sur le brin transcrit que sur le brin non transcrit (Mellon et coll, 1987, 1989, Sweder et coll, 1992).

- Le facteur général de transcription TFIID joue un rôle dans l'initiation de la transcription par la RNA Pol II et aussi dans la NER (Feaver et coll, 1993, Drapkin et coll, 1994)

- Des mutations au niveau des gènes CSA et CSB des patients atteints du SC induit à un défaut dans la réparation du brin transcrit (Venema et coll, 1990, Tijsterman et coll, 1997).

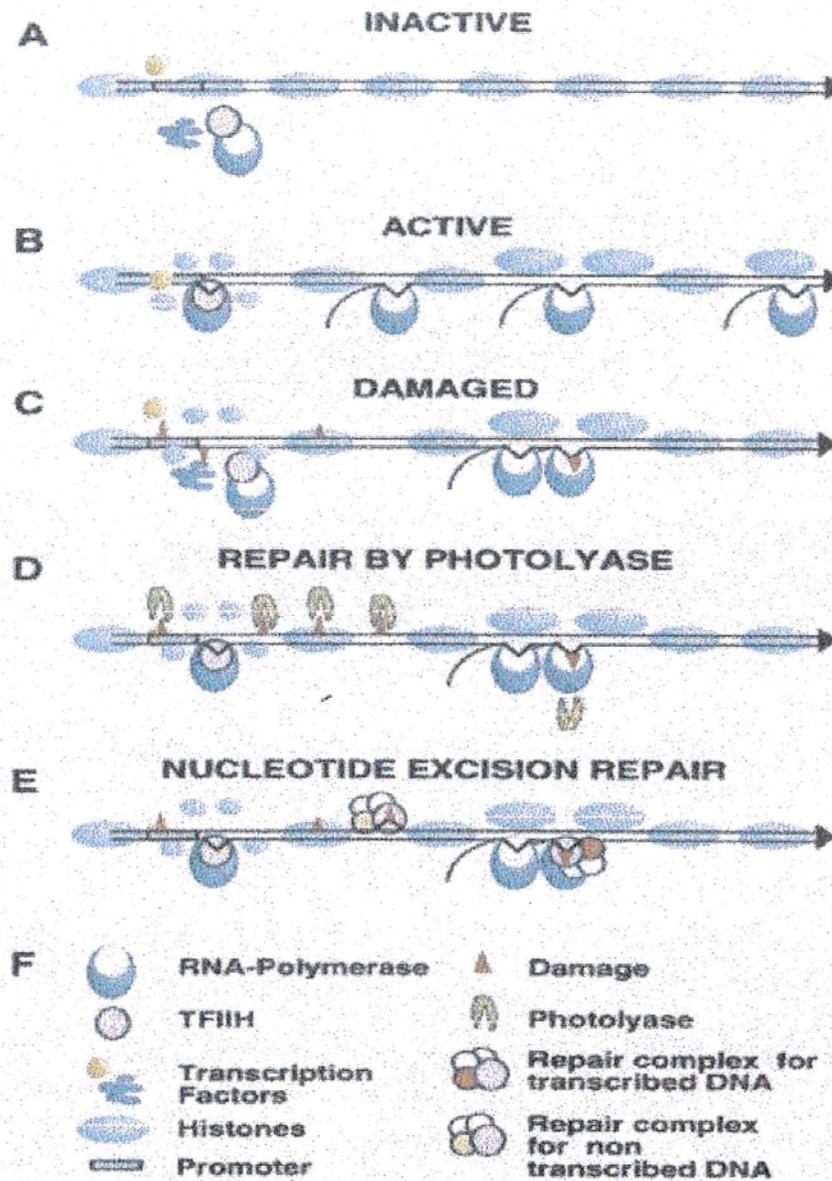
Modèle courant pour la TC-NER au niveau des cellules humaine : (Friedberg, 1996 ; Sancar, 1996, de Laat et coll, 1999).

La protéine RNA Pol II s'immobilise au niveau de la lésion. Les protéines CSA/CSB se lient au complexe probablement avec l'aide d'un facteur général de transcription (TFIID). La RNA Pol II recule de la lésion sans libérer l'ARN. Les protéines CSA/CSB recrutent XPA et TFIID et provoquent ainsi la formation du complexe de réparation. Après l'excision et la resynthèse d'ADN la RNA pol II reprends la transcription.

Chez les eucaryotes la réparation préférentielle du brin transcrit est trouvée chez les gènes transcrit par la RNA pol II, pour les gènes transcrits par d'autres RNA polymérase les données sont plus controversées cela indiquant probablement d'autres fonctions pour les complexes de transcription. Par exemple, les ARN r, transcrits par la RNA pol I ne montrent pas ou peu de réparation dans les cellules humaines et de surcroît aucune évidence en faveur de la TC-NER. Quant aux gènes transcrits par la RNA pol III, ils ne montrent aucune réparation préférentielle chez l'homme (Dammann et coll, 1997)

Le fait que seulement les gènes transcrit par la RNA pol II subissent la TC-NER suggère que ce processus de réparation couplée à la transcription existe pour assurer une réparation extrêmement efficace des gènes existant en une seule copie ou des gènes de grande taille. En effet les gènes transcrits par la RNA pol III sont de petite taille, ce qui limite le risque d'être lésé, alors que les gènes transcrits par la RNA pol I existent sous forme de nombreuses copies, limitant ainsi le risque d'inactivation simultanée par ces lésions.

Fig 21 : Représentation schématique de diverses voies de réparation. A : gène non transcrit, B : gène transcrit, C : Gène transcrit et brin non transcrit comportant des lésions, D : réparation par photoréactivation, E : TC-NER (brin transcrit) et GC-NER (brin non transcrit).



c) Réparation par excision des bases mal appariées (MMR)

Le taux de mutation d'un organisme est dépendant de la faculté de son système global de réparation des erreurs d'appariement (MMR) à corriger les erreurs de réplication. De nombreuses protéines vont interagir pour permettre à ce système de fonctionner.

Ce système de réparation est spécifique car il va dans un premier temps devoir reconnaître le brin fils néosynthétisé porteur du nucléotide incorrect, du brin d'ADN parental.

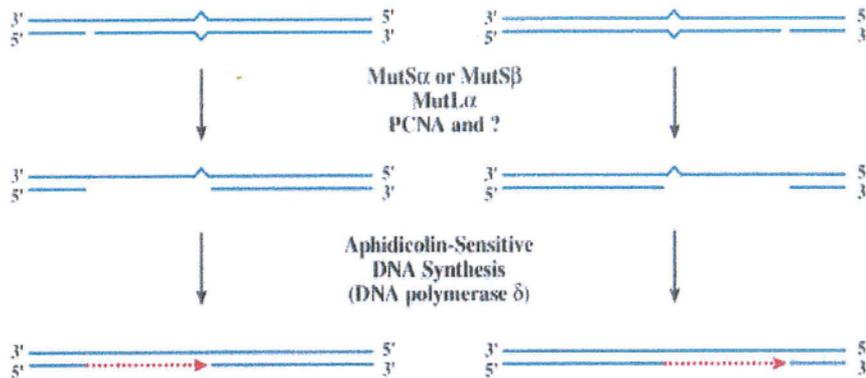
La voie humaine de réparation des bases mal appariée n'est pas encore reconstituée comme un système bien défini. Cinq différentes activités ont été mises en évidence comme faisant partie de cette voie. On retrouve chez l'homme des analogies avec la MMR de chez E.Coli, en effet l'utilisation de lignées cellulaires hyper mutables et résistantes à l'action de certains chimiques génotoxiques a permis de déterminer différents groupes de complémentation, permettant de restaurer la MMR.

Ainsi hMutS α un hétérodimère humain homologue à MutS (bactérien) (MSH2+MSH6) va se lier aux deux bases mal appariées. De plus MSH2 peut se lier avec MSH3 pour former un autre hétérodimère nommé MutS β qui va quant à lui pouvoir se lier aux erreurs de types insertion ou délétion de bases. Il est à noter que les cellules génétiquement déficientes en protéines MSH6, sous unité de MutS α sont déficiente dans la réparation des bases mal appariées mais conservent une petite activité pour la réparation des erreurs de type insertion ou délétion et cette activité est due au complexe MutS β (Drummond et coll, 1995). MutS β aurait donc une activité limitée uniquement à la réparation des lésions de type insertion ou délétion.

Il a aussi été isolé une activité hMutL appelée MutL α . MutL α est l'homologue humain du complexe MLH1 et PMS2 (bactérien). Les cellules déficientes en MutL α ne sont plus capables d'assurer la MMR que se soit pour des bases mal appariées ou des erreurs de type insertion/délétion.

Il est permis de penser que MutL α fonctionne avec MutS α dans la MMR, mais aucune interaction entre MutL α et MutS α ou MutS β n'a été mise en évidence chez l'homme.

Fig 22: Représentation schématique de la MMR



D'autres protagonistes ont été montrés comme ayant un rôle dans le processus de MMR, c'est le cas de PCNA (antigène nucléaire de prolifération cellulaire) qui joue un rôle important dans la machinerie transcriptionnelle eucaryote. PCNA est capable d'interagir avec PMS2 (Umar et coll, 1996). Du fait du rôle de PCNA qui permet de stimuler l'activité DNA pol durant la transcription, des auteurs pensent que PCNA intervient dans l'étape de resynthèse de l'ADN pour la MMR. Umar et coll. ont aussi démontré que PCNA intervient avant l'étape d'excision, c'est à dire dans les étapes précoces de la MMR.

La recherche dans le domaine de la réparation de l'ADN est très intense, et permet de mieux cerner les différentes voies existantes.

Malgré cela de nombreux mécanismes restent inconnus, et régulièrement de nouvelles protéines sont identifiées. La complexité de ces phénomènes est mise en évidence par de nombreux travaux, qui montrent l'imbrication des différentes voies de réparation de l'ADN, notamment une interrelation entre BER et NER par l'intermédiaire de la protéine XPG (Klungland A et coll, 1999).

CHAPITRE II :

LES METALLOTHIONEINES, PROTEINES A ROLES MULTIPLES

I) Présentation des MT

C'est en 1957 que Margoshes et Vallee découvrirent les métallothionéines, en isolant cette protéine à partir d'une structure rénale équine.

C'est la spectroscopie qui révéla par la suite la nature du métal lié. Bien que le cadmium fut présent en quantité importante, elle fut nommée Métallothionéine car la présence de zinc et de cuivre était tout de même non négligeable.

Les premiers travaux de recherche furent dirigés par les toxicologistes, voyant un intérêt majeur pour cette protéine liant le cadmium, notamment comme biomarqueur, en raison de la toxicité importante de ce métal pour l'écosystème. Mais au fur et à mesure de l'avancée de ces recherches l'importance du zinc dans la composition de cette protéine a retenu l'attention des biochimistes et immédiatement de nombreuses questions découlèrent sur le rôle des métallothionéines dans le métabolisme de cet oligo-élément indispensable au fonctionnement cellulaire. En effet le zinc entre dans la composition de près de 300 métalloprotéines.

Aujourd'hui Métallothionéine est le nom générique donné à une superfamille de protéines possédants un type de liaisons particulier entre une protéine et un métal : une liaison soufre / métal. Chez ces protéines les liaisons avec le métal sont formées préférentiellement par la coordination tétraédrique d'un ion métallique par les groupements thiols de cystéines régulièrement espacées le long de la structure primaire de la protéine.

Les ions métalliques présents dans la structure de ces protéines représentent plus de 20% de la masse moléculaire totale. De plus les métallothionéines sont restées les seules protéines capables de fixer du cadmium à l'état natif.

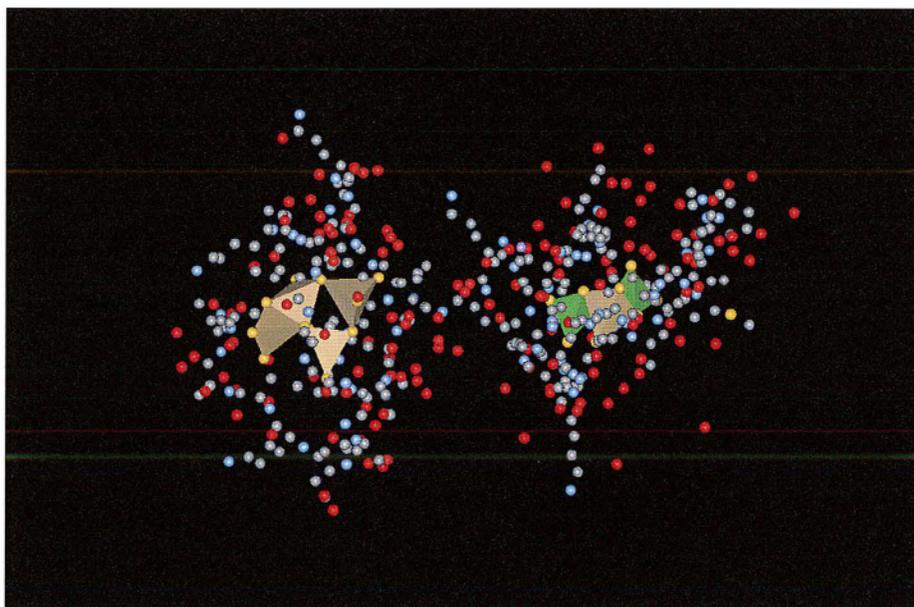
Ce sont le zinc et le cuivre qui sont les principaux métaux liés aux métallothionéines dans des conditions physiologiques, cela sous-entendant le rôle majeur de ces protéines dans le métabolisme et le transport de ces oligo-éléments.

Les métallothionéines sont ubiquitaires dans le règne animal, les gènes codant pour ces protéines sont situés sur le chromosome 16 (chez l'homme). La majeure partie des tissus exprime deux isoformes désignées par MT-I et MT-II. L'expression de la MT-III est spécifique du cerveau (Palmiter et coll, 1992), la MT-IV n'est exprimée que dans les épithéliums squameux différenciés (Quaife et col, 1994). Les caractéristiques communes à ces protéines sont : (Pountney et col, 1995)

- faible poids moléculaire
- teneur importante en métal
- composition particulière en acides aminés : très riche en cystéine (30%) pas d'acides aminés aromatiques ni d'histidine.
- une seule séquence d'acides aminés de type Cys-X-Cys.

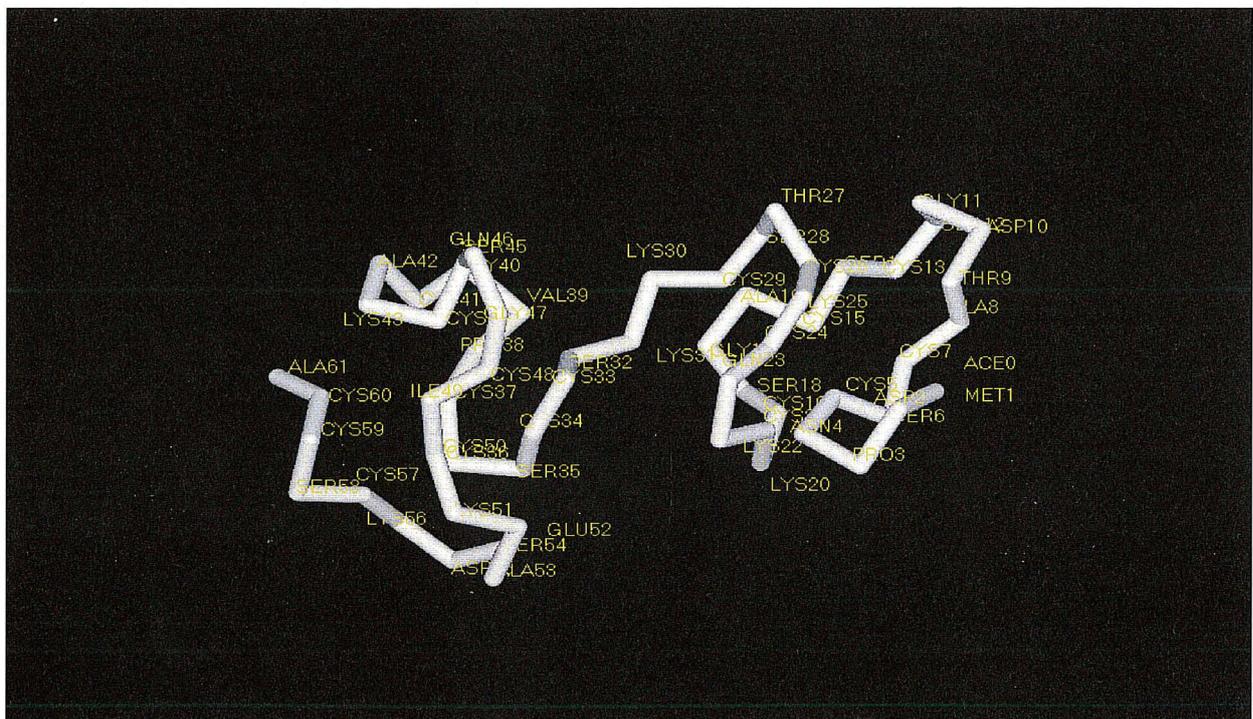
Le poids moléculaire des MT est de 6000 Da, mais peut varier de 6500 à 7000 Da. Cette petite protéine est constituée de 61 acides aminés dont 20 cystéines, et comporte deux domaines, un domaine β de l'acide aminé 1 à 30 qui contient 9 cystéines, et un domaine α , de l'acide aminé 31 à 61 contenant 11 cystéines (Furey et coll, 1986, Hamer et coll, 1986). Les deux domaines α et β sont globulaires

Fig 23: Représentation schématique des domaines α et β de la MT-II humaine (Cd7-Zn2-MTII-A) Les atomes de Zinc sont verts, les atomes de Cd en marron.



Les ions métalliques, 7 au maximum, sont liés exclusivement par des complexes de coordination “ thiols-métal ” faisant intervenir 20 résidus cystéine. Dans les conditions physiologiques les ions métalliques liés à la protéine sont du zinc (Zn) et/ou du cuivre (Cu), ils peuvent être remplacés par du cadmium (Cd) ou du mercure (Hg) lors d’intoxications par ces métaux.

Fig 24: Représentation schématique de la MTII-A humaine, visualisation de la chaîne polypeptidique.

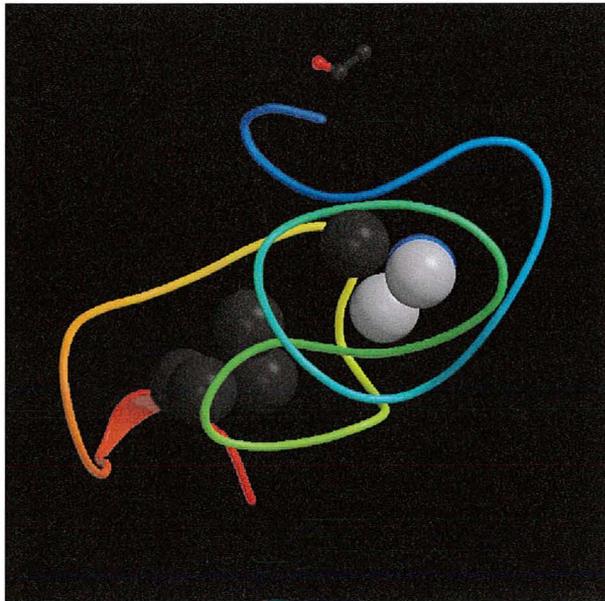


1°) Nomenclature et structure

L’apoforme des métallothionéines est nommée apométallothionéine ou thionéine, les termes plus spécifiques comme cadmium-métallothionéines ou zinc-métallothionéine sont exclusivement réservés aux métallothionéines ne contenant qu’un seul métal. Le contenu molaire en métal peut être spécifié par l’utilisation d’un indice: Zn₇-métallothionéine ou Cd₇-métallothionéine. Quand les métallothionéines contiennent plusieurs métaux on peut les nommer Cd,Zn-métallothionéine ou Cd,Zn-thionéine et même utiliser un indice pour exprimer la proportion de chaque métal : Cd_{5,3},Zn_{1,7}-métallothionéine ou Cd_{5,3},Zn_{1,7}-thionéine si la protéine contient 5,3 mole de cadmium et 1,7 mole de Zinc par mole de métallothionéine.

Lorsque le contenu exact en métal n'est pas connu, on se contentera du terme métallothionéine.

Fig 25: Représentation schématique de la Cd,Zn-métallothionéine II-A humaine, visualisation de la chaîne polypeptidique et des 5 atomes de Cd (noir) et des 3 atomes de Zn liés (gris).



La majeure partie des tissus chez les vertébrés contient deux isoformes désignées par MT-I et MT-II en raison de leur différence de temps d'éluion par chromatographie d'échange d'ions, entre ces deux isoformes seul un acide aminé est différent. Pour MT-I il existe des sous groupes : MT-I_A, MT-I_B, etc.

La MT-III est uniquement présente dans le cerveau et diffère de la MT-I par deux insertions, une thréonine après le quatrième acide aminé, et six acides aminés à l'extrémité carboxyterminale (Palmiter et al 1992). Cette MT-III est particulière, elle est aussi nommée en anglais « neuronal growth inhibitory factor » (GIF). Cette GIF est une protéine non inductible (Palmiter et coll, 1992), dont les fonctions physiologiques sont différentes des autres MT. En effet des expériences in vivo sur des souris surexprimant la GIF (dans de nombreux organes) ont montré que ces animaux transgéniques mouraient en raison d'une atrophie pancréatique (Quaife et coll, 1998).

La MT-IV comporte un glutamate après la position quatre et n'est exprimée que dans les épithéliums squameux différenciés (Quaife et al 1994).

Chez les mammifères les MT sont formées d'une seule chaîne polypeptidique de 61 acides aminés comportant à son extrémité amino terminale un résidu *N*-acétylméthionine et un résidu alanine à son extrémité carboxy terminale. Les cystéines sont disposées en motifs polypeptidiques hautement conservées au cours de l'évolution, soit Cys-Cys soit Cys-X-Cys. Ces motifs sont régulièrement distribués au long de la séquence polypeptidique de la protéine. Le domaine α peut ainsi lier 4 atomes de zinc ou de cadmium ou bien 4 à 6 atomes de cuivre. Les ions métalliques sont liés exclusivement par des complexes de coordination Thiols-Metal qui font intervenir les 20 résidus cystéines. Ainsi la protéine native ne contient ni pont disulfure ni groupement thiol libre. Tous les atomes de zinc et de cadmium liés à chaque domaine sont à l'état de valence +2 et sont coordonnés tétrahédriquement à 4 cystéines par l'intermédiaire de leur groupements thiols. Les complexes résultants de cette association ($[\text{métal}^{2+}(\text{cys}^-)_4]^{2-}$) sont chargés négativement et sont directement responsables de la charge globale négative de cette protéine. Quand au cuivre il se lie à l'état de valence +1 et serait coordonné de manière trigonale avec trois groupement thiols. Les affinités relatives de chaque ion métallique lourd pour la MT diffèrent. Par exemple la constante de stabilité pour le cuivre est 100 fois plus élevée que pour le cadmium et 1000 fois plus élevée que pour le zinc. D'une manière plus générale on utilise la représentation suivante : $\text{Ag} > \text{Hg} > \text{Cu} > \text{Cd} > \text{Zn} > \text{Co} = \text{Ni}$ (Klaassen et coll, 1989). De plus il est à noter que certaines équipes ont mis en évidence des différences d'affinités des métaux pour les deux domaines. En effet des études d'échange d'ions entre une Zn_7 -MT et une Cd_7 -MT ont montré une redistribution de ces métaux entre les deux types de MT pour former 2 MT mixtes, cela étant du à la fixation préférentielle du cadmium sur le domaine α et du zinc sur le domaine β . Cette réaction d'échange d'ions démontre que la liaison des métaux aux MT est réversible et rapide, sous-entendant une signification physiologique importante.

2°) Organisation génique

Les gènes codant pour les MT sont composés de 3 parties dans lesquelles 3 exons sont séparés par deux introns situés au niveau de régions hautement conservées. Les traditionnelles boîtes TATA, régions riches en GC et les sites de polyadénylation sont bien définis (Glanville et coll, 1981, Shworak et coll, 1993). Et les sites de régulations inductibles et constitutifs sont bien identifiés (Andrews, 1990).

Chez la souris les gènes codant pour la MT sont situés en tandem sur le chromosome 8 et l'expression de la MT-I et de la MT-II est régulée en coordination.

Chez l'homme les gènes codant pour les MT sont situés sur le chromosome 16. Comme chez la souris ces gènes varient en position 11, mais chez l'homme, seul le gène MT-I possède une micro hétérogénéité (Hunziker et coll, 1985). En conséquence seule une isoforme de la MT-II a été identifiée (hMT-IIA) alors que l'on a 8 isoformes pour la MT-I (hMT-IA, -IB, -IE, -IF, -IG, -IH, -IX, et MT-0) (Karin et coll, 1984, Soumillion et coll, 1992). Il existe aussi quelque pseudogènes de MT ne codant pas pour des protéines fonctionnelles (Karin et coll, 1982, Schmidt et coll, 1985, Stennard et coll, 1994).

3°) Synthèse, dégradation : place des métaux

La synthèse des métallothioneines se fait de manière préférentielle au niveau hépatique. Quasiment toutes les autres cellules, même les lymphocytes et les tissus lymphoïdes sont capables, sous l'influence du bon stimulus, de produire cette protéine (Harley et coll, 1989, Pauwels et coll, 1994). L'expression des métallothioneines est influencée par une grande variété de stress, incluant les cations de métaux lourds, les cytokines pro-inflammatoires, les radicaux libres et les composés organiques divers.

Un tableau non exhaustif permet de mieux comprendre la grande variété d'agents inducteurs.

<i>Ions métalliques</i>	Cd, Zn, Cu, Hg, Au, Ag, Co, Ni, Bi
<i>Hormones et seconds messagers</i>	Glucocorticoïdes, progestérone, œstrogènes Catécholamines, glucagon, angiotensine II Arg-vasopressine, adénosine AMPc, DAG, Ca,
<i>Facteurs de croissance</i>	Insuline, IGF-1, EGF
<i>Cytokines et agents proinflammatoires</i>	IL-1, IL-6, INF- α , INF- γ , TNF LPS, carrageenane, dextran, endotoxine

<i>Promoteurs tumoraux et oncogènes</i>	Esters de phorbol ras
<i>Vitamines</i>	Acide ascorbique, acide rétinoïque, dérivé dihydroxylé de la vitamine D3
<i>Antibiotiques</i>	Streptozotocine, cycloheximide, mitomycine
<i>Agents cytotoxiques</i>	Hydrocarbures, éthanol, isopropanol, formaldéhyde, acides gras, butyrate, chloroforme, tétrachlorure de carbone, bromobenzène, iodoacétate, uréthane, éthionine, di(2-ethylhexyl)phtalate, α -Mercapto- β -(2-furyl)acrylate, 6-Mercaptopurine, diethyldithiocarbamate, penicillamine, 2,3-Dimercaptopropanol, 2,3-Dimercaptosuccinate, EDTA, 5-Azacytidine, acetaminophène, indométacine
<i>Conditions induisant un stress</i>	Infection, inflammation, laparotomie, stress physique, radiation ionisante (X), tension en O ₂ élevée, radiations non ionisantes (UV)

Bien sûr, en fonction du tissu, ou du type cellulaire, il existe une plus ou moins grande spécificité pour ces nombreux agents inducteurs. Dans nos travaux personnels nous nous intéresserons plus particulièrement à l'effet d'une irradiation en spectre solaire total et aussi au rôle du Zinc sur la synthèse des MT.

La métabolisation des MT est très variable et dépend pour beaucoup du type de métal lié.

Depuis très longtemps on sait que le contenu en MT du foie, du rein, de l'intestin peut être fortement augmenté par une administration parentérale ou par l'apport nutritionnel de Cu ou de Zn. Le mécanisme d'action de cette augmentation repose sur une élévation du taux de transcription des gènes codant pour la MT. Par exemple le zinc augmente le taux de transcription du gène de la MT-1 dans le rein ou le foie de souris quelques heures avant d'obtenir une accumulation d'ARNm de la MT-1 et par suite le taux maximum de synthèse de la MT-1.

Il existe d'importantes différences, pour un même métal, dans sa capacité à induire les MT, en fonction du tissu (Durnam et coll, 1981), et dans un même tissu. Cela démontre que l'interaction métal / tissu est importante dans la régulation de la synthèse des MT. On comprendra dans interaction métal tissu :

- la capacité du tissu à capter un métal particulier à partir de la circulation systémique.
- L'accessibilité de ces différents métaux aux facteurs de régulations (protéines...) intracellulaire.
- L'inductibilité des gènes des MT dans les cellules (la potentialité des gènes à être induit).

D'autre part des découvertes plus récentes indiquent que l'isoforme majeure des MT peut être induite à différents moments par différents métaux, ceci sera fonction des espèces et des tissus. A l'heure actuelle, seuls les métaux suivants, Cd, Zn, Cu, Hg, mais aussi, Ag, Au, Ni, Co et Bi, sont connus comme pouvant réguler la transcription des gènes de MT (Palmiter, 1987).

Certains de ces métaux agiraient de manière indirecte par exemple en déplaçant le zinc des MT et ce zinc redevenant libre irait induire directement ou par l'intermédiaire d'un stress associé à l'administration de doses pharmacologiques de ce métal..

Le nombre de gènes codant pour les MT varie de deux chez la souris (un pour chaque isoforme) à un nombre élevé chez le primate. Le nombre de séquences de régulation pour les métaux (MRE : metal regulatory elements), pour chaque gène, varie aussi en fonction des espèces. Les MRE sont en amont du gène de structure et contiennent des séquences de bases à proximité les unes des autres. Le fait de posséder plusieurs copies de séquences de régulation pour les métaux permet l'intervention de nombreux facteurs de régulation (probablement des protéines spécifiques) synthétisés par différents types cellulaires pour agir, entre eux, de manière coopérative ou antagoniste, sur l'induction de la synthèse des MT.

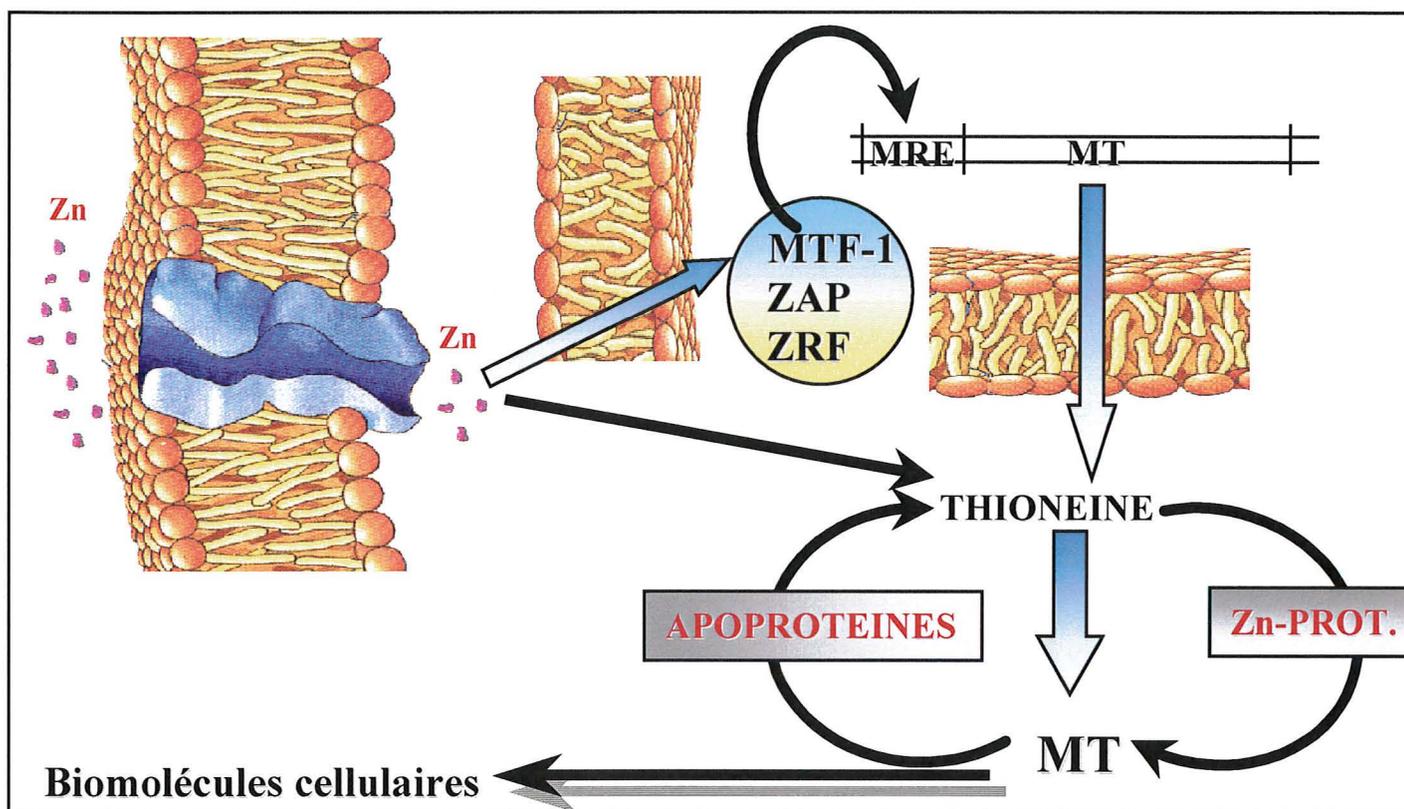
Le mécanisme moléculaire par lequel les ions métalliques interagissent avec les MRE pour induire la transcription, ne sont pas très bien compris. Un des modèles envisagés est la présence d'une protéine de liaison, appelée MTF1 pour le Zn, liant d'une part le métal et pouvant alors se fixer sur le MRE (Heuchel et coll, 1994, Radtke et coll, 1993).

L'expression des MT est, chez les animaux supérieurs, restreinte à un faible nombre d'organes. Les MT sont exprimées majoritairement au niveau hépatique. Néanmoins les MT peuvent être induites dans quasiment tous les types cellulaires et tous les organes en réponse à

une très grande variété de stress aussi bien physiques que chimiques (Borghesi et coll, 1996). De nombreuses études se sont intéressées à ce phénomène d'inductibilité; Les premières rapportent un effet des métaux lourds comme Cd et Hg, qui induisent la protéine *via* une séquence spécifique présente en amont du gène de structure et nommé Metal Responsive Element (Dunn et coll, 1987). Les mécanismes d'induction des MT par d'autres agents sont moins connus. Néanmoins l'induction par les agents cytotoxiques et carcinogènes est démontrée. Les agents anticancéreux comme l'adriamycine (Lazo et coll, 1998, Miyazaki et coll, 1998) induisent un niveau de transcription élevé des ARNm codant pour la MT. Il en est de même pour le promoteur de tumeur, 12-*O*-tétradécanoylphorbol-13-acetate (TPA) (Angel et coll, 1986). La synthèse des MT pourrait être liée à la chute intracellulaire du GSH. En effet, la déplétion partielle en GSH par des agents chimiques comme le *trans*-stilbene oxyde (substrat de la glutathion-*S*-transférase) ou BSO permet dans certains modèles animaux d'induire la MT au niveau hépatique (Masao et coll, 1995). Cette induction pourrait également être médiée par le déséquilibre de la balance antioxydante.

In vivo une induction des MT a été démontrée dans les fibroblastes de patients irradiés par de faibles doses d'UVB. L'induction des MT se ferait *via* la libération de messager (tel IL-1) par les kératinocytes basaux (Anstey et coll, 1996). En effet un certain nombre de cytokines pro-inflammatoires (IL-1) peuvent induire les MT (Cousins et coll, 1988). Lors d'une irradiation plusieurs mécanismes d'inductions peuvent toutefois influencer la synthèse de MT car il existe une grande variété de motifs présents dans la séquence de régulation du promoteur de leurs gènes. Cette grande inductibilité laisse présager un rôle des MT dans l'adaptation cellulaire aux différents stress. Cette hypothèse est confirmée par la mise en évidence d'une redistribution des MT du cytoplasme vers le noyau lors d'une irradiation UVB (Hanada et coll, 1998).

Fig 26: Mécanisme de l'induction des MT par le Zinc

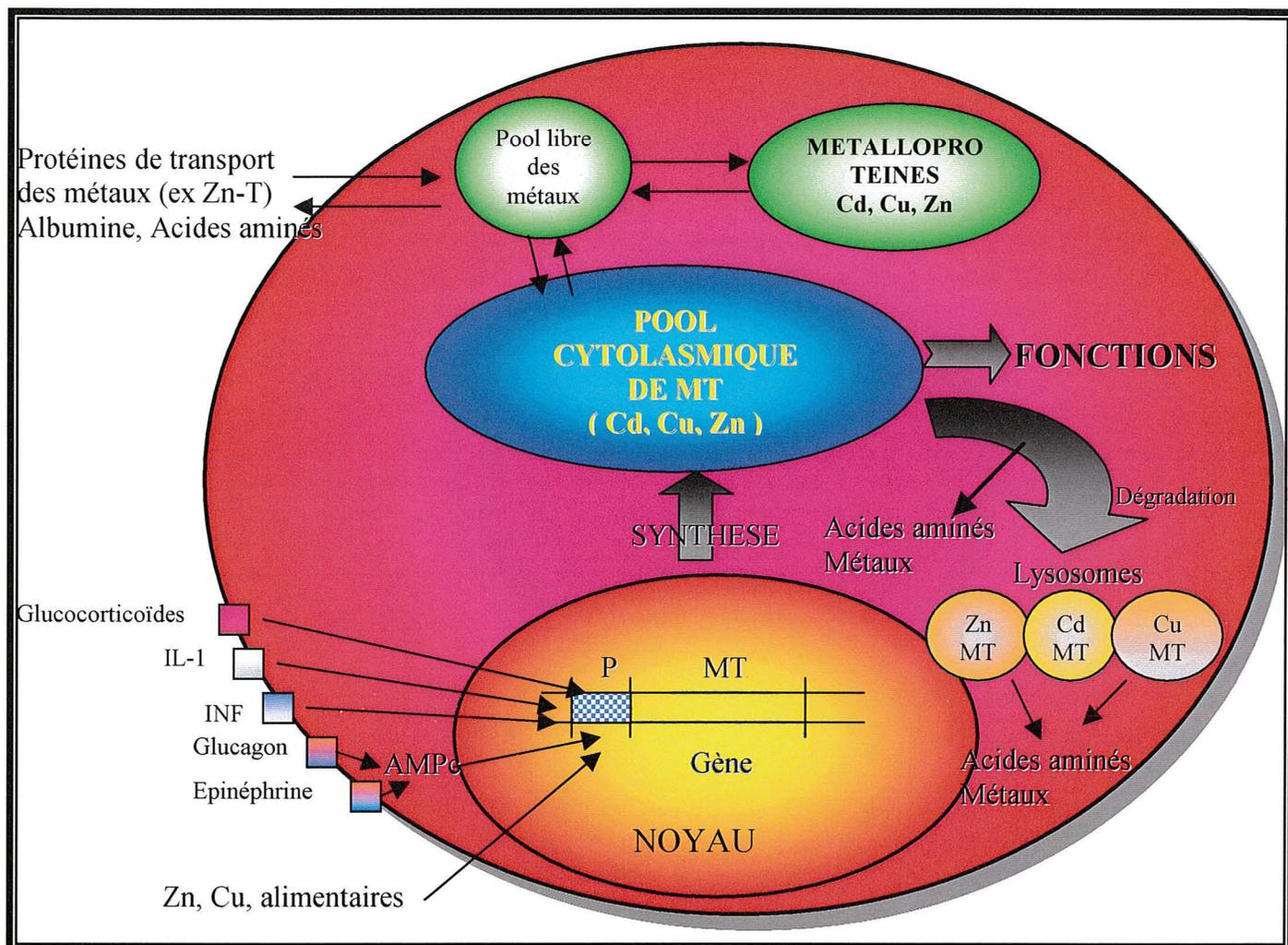


4°) Fonctions physiologiques des MT

a) MT et métaux

La fonction majeure des MT est à mettre en relation directe avec le métabolisme des métaux car elles assurent la détoxification intracellulaire des métaux lourds (Lazo et coll, 1995). D'autres fonctions biologiques potentielles émergent à partir des données plus récentes de la littérature. Les MT modulent les mouvements de Cu et de Zn. Elles se comporteraient comme un réservoir intracellulaire de ces métaux et contrôlèrent leur homéostasie en les stockant ou en les échangeant avec d'autres structures ou protéines. Ce contrôle des concentrations intracellulaires en Cu et Zn permet aussi l'adaptation entre les apports nutritionnels et les besoins physiologiques de ces oligo-éléments. De plus, en contrôlant le métabolisme de ces métaux, les MT auraient un rôle dans le développement fœtal et dans l'adaptation cellulaire à différents types de stress. Enfin leur ubiquité et leur induction par des composés très variés suggèrent l'implication de ces protéines dans la protection cellulaire vis à vis de stress physiques et chimiques (Pountney et coll, 1995).

Fig 27 : Représentation schématique de la fonction et du métabolisme cellulaire des MT
(Selon Cousins et al).



b) Fonctions antioxydantes

Les métallothionéines participent à la protection intracellulaire contre les espèces réactives de l'oxygène (ERO). Leur activité de OH^\cdot a été mise en évidence par Thornalley, (1985). Connaissant l'implication de ces radicaux dans l'oxydation des bases de l'ADN, Abel et De Ruiter (1989), ont étudié la capacité des MT à inhiber la dégradation *in vitro* de l'ADN. L'activité piègeur de chaque résidu cystéine des MT serait 38,5 fois plus efficace que le résidu cystéine du GSH dans la protection de l'ADN vis à vis de l'attaque par le radical OH^\cdot .

In vivo l'effet protecteur des MT vis à vis des lésions oxydatives de l'ADN induites par le peroxyde d'hydrogène est également démontrée (Chubatsu et coll, 1993). Des résultats similaires sont obtenus vis à vis des lésions de l'ADN et de la cytotoxicité de l'oxyde nitrique (Schwartz et coll, 1995). Cette notion de protection de l'ADN suggère l'existence d'un pool nucléaire de MT. Ainsi elles seraient un des antioxydants les plus importants du noyau, ce dernier étant dépourvu d'enzymes antioxydantes de type catalase et superoxydes dismutases (SODs).

La fonction de piègeur d'ERO des MT ne se limite pas au radical hydroxyle. Certaines mutations spontanées induites par d'autres types ERO (peroxyde d'hydrogène, radical superoxyde, oxyde nitrique, radicaux peroxyde) sont en effet inhibées par les MT intracellulaires (Rossman et coll, 1998).

L'effet antioxydant des MT a également été démontré vis à vis de la peroxydation des lipides membranaires, induite par le système xanthine/xanthine oxydase (Markant et coll, 1996). D'une manière plus générale les propriétés de piègeur des métallothionéines sont 50 fois supérieures à celles du GSH, (Miura et coll, 1996) et permettent de limiter les lésions oxydatives cellulaires. L'effet antioxydant des MT pourrait aussi passer par la modulation de divers systèmes enzymatiques cellulaires comme la glutathion réductase et la Se GPX (Iszard et coll, 1995). Il semble en fait difficile de pouvoir imputer aux MT la modulation de divers systèmes de défense antioxydant puisque dans cette études les MT ont été induites notamment par le Zn, qui possède la capacité de moduler de tels systèmes.

Ces activités antioxydantes des MT sont à prendre en considération dans la photoprotection. En effet les rayonnements UV génèrent un stress oxydant (Peak et coll, 1989). Le rayonnement solaire induit à la fois une augmentation de la production de ERO par photosensibilisation (UVA) (peak et coll, 1989) et une action génotoxique directe (UVB) (Peak et coll, 1989). Les rayons UV modulent également le potentiel antioxydant endogène. L'exposition à de fortes doses d'UVA diminuent les défenses antioxydantes: consommation du GSH (Tyrrell et coll, 1990, Emonet et coll, 1997) inactivation de la GPX, des SODs, et de la catalase tandis que l'exposition des cellules à des rayonnements de faible intensité entraînent une modification de l'expression génique avec une néosynthèse de protéines de stress telle l'hème oxygénase (Lautier et coll, 1992) ou des HSPs.

L'étude de Dudek (1993) montre que des cellules exprimant de forts taux de MT présentent une résistance accrue vis à vis du rayonnement UVA. La part des ERO dans la phototoxicité des rayonnements UVB est sujet à controverse. Cependant les MT semblent également exercer une activité photoprotectrice vis à vis des UVB (Kobayashi et coll, 1994). L'induction

de MT par application percutanée ou injection intrapéritonéale de 1,25-dihydroxyvitamin D₃ permet une tolérance accrue vis à vis du rayonnement UVB avec une diminution du nombre de sunburn cells (Hanada et coll, 1995).

Les études d'immunohistochimie permettant de localiser les MT viennent conforter l'hypothèse que ces protéines ont un rôle actif au niveau cutané. En effet, ces protéines ont été mises en évidence au niveau épidermique. Les kératinocytes basaux et les kératinocytes granulaires ainsi que les mélanocytes expriment la MT, alors que dans le derme aucune cellule ne l'exprime (Anstey, 1996). Cette localisation tissulaire particulière suggère un rôle important des MT en photoprotection (Hanada et coll, 1992).

c) Prolifération, différenciation, et contrôle redox des échanges de Zn

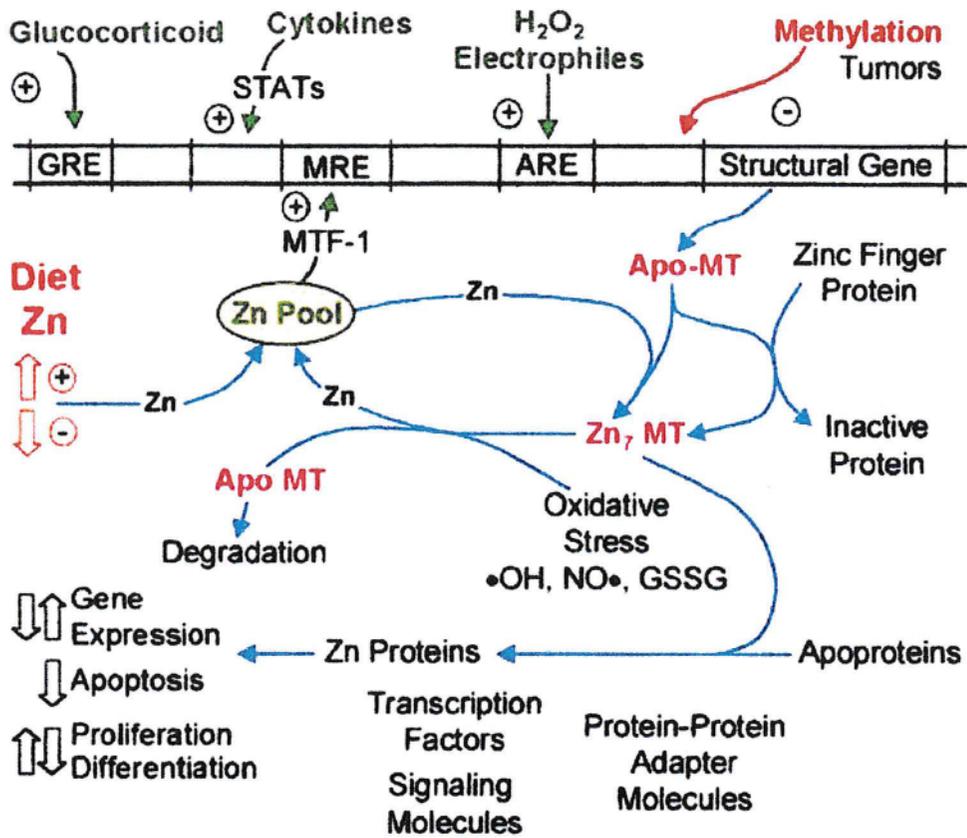
Les MT sont exprimées constitutionnellement chez les kératinocytes basaux, alors qu'au niveau du derme les métallothionéines ne sont pas détectables (Anstey et coll, 1996), ce qui suggère un rôle important des MT dans les tissus en prolifération. Lors de la différenciation des cellules 3T3 (fibroblastes de souris) en adipocytes, une phase de prolifération s'engage. Cette phase proliférative ne survient que si le taux de MT cellulaire augmente et qu'une translocation nucléaire survient (Schmidt et coll, 1999). Si l'on soumet la peau de souris transgéniques n'exprimant pas de MT, à un agent prolifératif, seule une faible prolifération est mise en évidence, contrairement à un épiderme normal riche en kératinocytes exprimant les MT (Hanada et coll, 1998). L'induction puis la translocation de la protéine au niveau nucléaire serait due à un mécanisme actif nécessitant de l'énergie sous forme d'ATP (Woo et coll, 1996). Effectivement il a été démontré plus récemment que les MT pouvaient lier l'ATP (Jiang et coll, 1998). L'état énergétique de la cellule ainsi que le potentiel redox semble contrôler non seulement la distribution de Zn à partir des MT mais également la localisation de la protéine. L'immunocoloration de cellules 3T3 à l'aide d'anticorps anti-métallothionéine a permis de confirmer la présence de la protéine au niveau nucléaire à certaines phases du cycle cellulaire (Schmidt et coll, 1999). Elles agiraient en captant ou en distribuant Zn aux facteurs de transcription Zn-dépendants comme TFIIIA, SP1 (Zeng et coll, 1991, Zeng et coll, 1991). Les diverses isoformes des MT ne sont pas impliquées de la même manière dans la croissance et la prolifération cellulaire. Ainsi la MT III ne serait pas impliquée dans l'homéostasie du Zn mais dans la modulation de la croissance des cellules neuronales (Palmiter et coll, 1995).

Les concentrations intracellulaires en Zn doivent être finement régulées pour permettre le fonctionnement de plus de 300 métalloenzymes à Zn dont les facteurs de transcriptions à doigts de Zn. Les MT exercent une régulation post-transcriptionnelle de l'activité de ces protéines.

En effet bien que les MT possèdent une très forte affinité pour le Zn ($3,2 \times 10^{13}$), il a été démontré qu'elles pouvaient libérer ces atomes et les échanger avec des apoenzymes. Le processus inverse, c'est à dire la libération de Zn à partir des métalloprotéines, est également possible et peut être induit par les apométallothionéines (thionéines) (Jacob et coll, 1998). C'est ainsi que les MT pourraient réguler les échanges intracellulaires de Zn. Les thionéines, formées *in situ* lors de l'échange de Zn des MT vers d'autres protéines (Jiang et coll, 1998) pourraient assurer le même type de fonction en activant un groupe d'enzymes pour lesquels le Zn est lié sur un site inhibiteur (Maret et coll, 1999). L'inhibition par les thionéines d'enzymes à Zn est un processus nécessitant la coopération du GSH qui jouerait alors le rôle d'intermédiaire pour le mouvement de Zn. En effet, le potentiel rédox module, par l'intermédiaire du couple GSH/GSSG, le taux de transfert et le nombre final d'atomes de Zn transféré (Jiang et coll, 1998). Le GSSG augmente de 3 fois le taux de zinc transféré; Quant au GSH son rôle est bivalent, sans GSSG il inhibe la libération du zinc des MT alors qu'en présence de GSSG il facilite ce transfert.

Enfin les thionéines pourraient agir sur la transcription de certaines protéines, en modulant la liaison du facteur de transcription SP1 à l'ADN et en chélatant le zinc contenu dans le motif en doigt de zinc de SP1. Des résultats similaires sont partiellement publiés concernant les échanges métallothionéines et p53 (Meplan et coll, 2000).

Fig 28: Régulation des gènes et de la fonction des MT (d'après Davis et coll, 2000)



II) Effet génoprotecteur du zinc : place potentielle des MT

Le zinc est un oligo-élément présent de manière ubiquitaire dans le règne animal. Son intérêt dans le fonctionnement cellulaire n'est plus à démontrer mais ses différents mécanismes d'action restent encore à élucider. Nous rapporterons ici les résultats récents montrant un impact du Zn au niveau du noyau.

1) Zinc et ADN

Le zinc intervient dans la structure et le métabolisme de l'ADN en interagissant avec les groupements phosphates de la double hélice. Des études ont montré une modification de la chromatine et des histones dans des cellules d ficiennes en Zn de l'algue *Euglena gracilis* (Ref). Cet oligo-élément possède en outre une activité antioxydante, qui s'exerce par la protection des groupements thiols protéiques ou non protéiques. En effet la déplétion en Zn intracellulaire par un chélateur diffusible spécifique le N,N,N',N'tétrakis(2-pyridylm thyl) thyl nediamine (TPEN), induit une chute significative du GSH (Parat et coll, 1998). Cet oligoélément protège l'ADN vis à vis des lésions induites par les rayonnements UVA et UVB: une diminution du nombre de cassures de chaînes est observée dans les cellules supplémentées (Leccia et coll, 1998; Emonet et coll, 1998) alors qu'une augmentation de ces cassures est retrouvée dans les cellules déplétées en zinc par chélation chimique (Parat et coll, 1997).

Les MT sont des acteurs potentiels pour expliquer le rôle de Zn en photoprotection car elles protègent l'ADN en piégeant les ERO, et maintiennent le potentiel redox de part leur richesse en GSH.

2) Zinc et apoptose

Les cellules HaCaT déplétées en Zn par le TPEN entrent en apoptose sans stress additif (Parat et coll, 1997). Par opposition il est rapporté une diminution de l'entrée en apoptose des cellules irradiées aux UVB (Parat et coll, 1997) et aux UVA (Leccia et coll, 1999) lorsque celles-ci sont supplémentées en Zn. La supplémentation permet donc à la cellule de renforcer ses défenses antioxydantes, alors que la seule privation en Zn, induit dans un délai très court, (6 heures), l'entrée en apoptose avec fragmentation de la chromatine. Une des explications possible est l'inhibition par le Zn de l'endonucléase calcium-magnésium dépendante, responsable du clivage internucléosome de l'ADN, et que l'on retrouve dans certaine forme d'apoptose (Marini, 1998). Zn agit aussi sur la phase précoce de l'apoptose en inhibant la caspase-3, protéase responsable du clivage de la poly(ADP-ribose)polymérase (PARP) (Perry et coll, 1997).

3) MT et apoptose

Des modèles animaux "MT- nul" montrent un nombre plus important de sunburn cell lors d'une irradiation UVB (Hanada et coll, 1998). Ces cellules sont décrites comme des kératinocytes épidermiques apoptotiques (Baba et coll, 1996) ce qui suggèrent un rôle anti-apoptotique des MT. Cette hypothèse est renforcée par le fait que le cadmium en induisant la synthèse des MT prévient la formation de ces "sunburn cell" dans l'épiderme d'animaux (Hanada et coll, 1991). La présence des MT au niveau cutané permettrait donc de limiter la survenue du processus apoptotique induit par une irradiation UV.

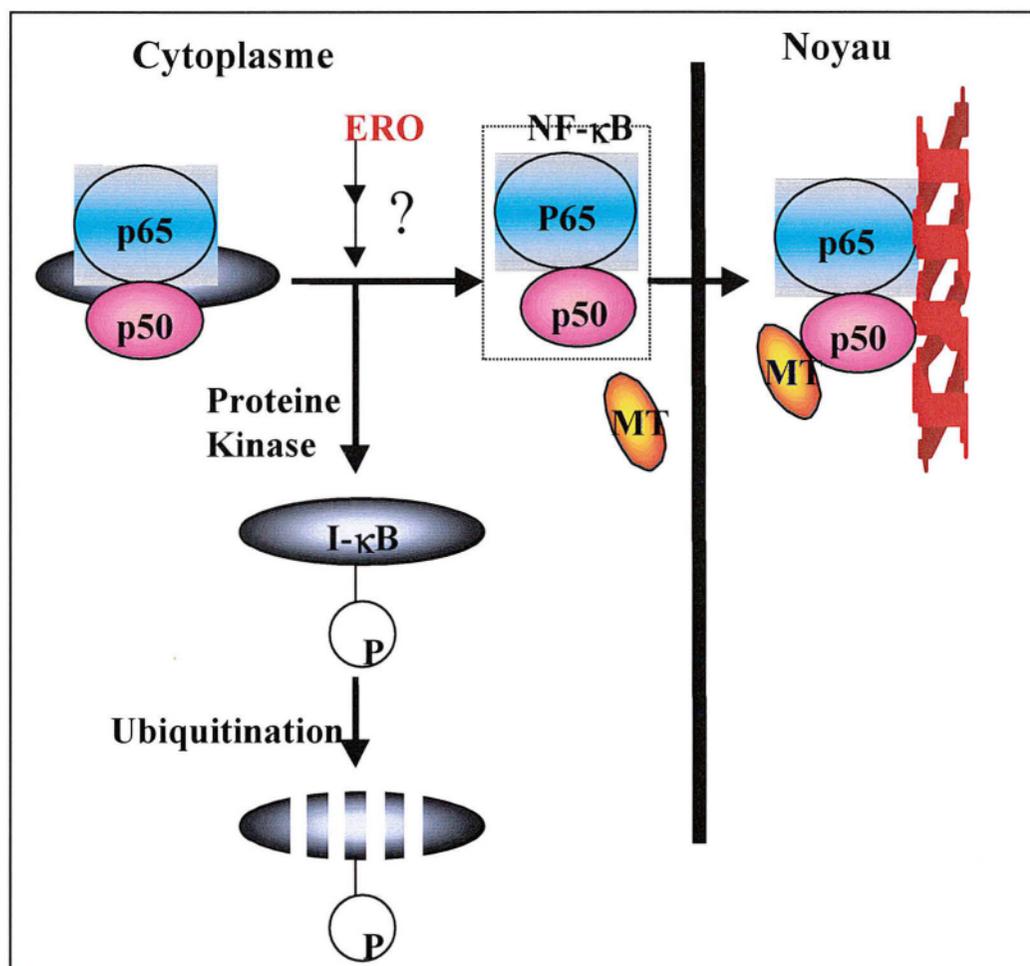
De plus des études de différentes équipes ont montré que dans des cellules en culture dont on fait chuter le taux de MT par des antisens, on obtiens non seulement une inhibition de la croissance mais aussi l'initiation d'un processus apoptotique (Tsangaris et coll, 1998; Abdel-Mageed et coll, 1997).

L'étude de l'équipe d'Abdel-Mageed en 1997 a montré une interaction entre la sous unité p50 de NF- κ B et des MT. Cette interaction a permis à cette équipe de proposer un mécanisme original modélisant l'action antiapoptotique des MT.

Cette action antiapoptotique des MT-I et MT-II serait donc médiée par l'interaction entre la sous unité p50 de NF- κ B et la MT via 2 cysteines spécifiques de p50. Une fois activé au

niveau cytoplasmique, NF- κ B est transloqué vers le noyau. Les deux cystéines spécifiques sont alors réduites par la thiorédoxine, c'est alors qu'une interaction avec les MT est possible. Cette interaction va stabiliser la liaison de NF- κ B avec l'ADN et permettre l'activation de nombreux gènes.

Fig 29 : Role antiapoptotique des MT-1 et MT-2 selon d'Abdel-Mageed et coll, 1997



4) Zinc et MT

Le zinc induit les MT *via* le "MRE" situé en amont des gènes de structure codant pour les MT. Lors de leur synthèse, les thionéines se lient à Zn pour former les Zn-MT contenant 7 ions Zn^{2+} . Les MT, seraient donc des réservoirs intracellulaires de Zn, contrôlant finement la concentrations, libres, ou liés, de ce métal, en adaptant les apports nutritionnels aux besoins

cellulaires. Les souris transgéniques n'exprimant pas de MT, possèdent une absorption anormale de Zn due à une modification dans l'expression du transporteur transmembranaire: le ZnT-1 (Davis et coll, 1998). Dans la cellule, les Zn-MT sont capables de libérer leur Zn pour le donner aux apoenzymes afin de les rendre fonctionnelles (Cano-Gauci et coll, 1996, Jacob et coll, 1998).

TRAVAUX PERSONNELS

LES METALLOTHIONEINES : PROTEINES INDUCTIBLES A GROUPEMENTS THIOLS ASSURANT LA PROTECTION DU GENOME LORS DE L'IRRADIATION ULTRAVIOLETTE.

I) Objectifs

L'objectif principal de ce travail est d'étudier la place des métallothionéines en photoprotection.

Nous étudierons dans un premier temps :

- La corrélation entre le statut en Zn et la synthèse des MT
- L'interdépendance entre Zn, glutathion intracellulaire et néosynthèse des MT

Pour cela nous mettrons au point une méthode performante permettant de suivre l'expression des MT et nous étudierons par immunocytochimie leur localisation.

Dans un deuxième temps nous nous proposons d'étudier :

- L'expression et la localisation de la protéine lors de l'irradiation en spectre solaire dans les cellules kératinocytaires de la lignée HaCaT. Dans ces conditions nous étudierons les conséquences d'un traitement des cellules par le Zn.

Enfin nous nous intéresserons à la fonction thiol de la protéine, en analysant dans les cellules HaCaT déplétées en GSH, la capacité des MT à protéger le génome lors d'une irradiation solaire.

II) Matériel et méthodes

1°) Culture cellulaire

Le modèle cellulaire utilisé pour notre étude est une lignée kératinocytaire humaine issue d'un explant cutané, spontanément immortalisée *in vitro* (HaCaT), cultivée en monocouche (Boukamp, 1988). Le comportement de ces cellules est identique aux kératinocytes humains normaux (Schürer, 1993). Les cellules sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (ATGC) tamponné avec du bicarbonate de sodium, supplémenté en L-glutamine 7,14 mM (SEROMED) et en sérum de veau foetal (SVF, 10%, ATGC). Afin de limiter la contamination par des micro-organismes un mélange d'antibiotiques (pénicilline: 1,25 U/ml et streptomycine 0,0125 U/ml) (Boehringer Mannheim) est ajouté au milieu. L'amplification des cellules se fait dans des flacons de culture de 75 cm² (Falcon® plastics, Becton Dickinson) dans un ratio de 1:6. Les cellules sont placées dans un incubateur (température 37°C) sous une atmosphère enrichie en CO₂ (5%).

2°) Irradiation en spectre solaire total

L'irradiation des cellules est réalisée en boîte de pétri (Nalgène® Nunc®, Dannemark), au moyen d'un simulateur solaire Dermolum UM-W, équipé d'une lampe au xénon de 1000 Watt (Muller GmbH, Allemagne). Le flux lumineux délivré se rapproche du spectre solaire naturel grâce à différents filtres (Muller, Allemagne) : un filtre à eau pour éliminer les infrarouges et un filtre WG305 pour éliminer les UVB les plus courts. Aucune augmentation de température n'est décelable sur la durée d'irradiation utilisée dans notre travail. Le spectre obtenu est voisin d'un spectre solaire d'altitude (contrôlé par le laboratoire de métrologie des UV, EUDIL-USTL, France). La puissance délivrée est contrôlée au moyen d'un dosimètre dont la sensibilité spectrale s'étend de 270 nm à 4 µm. La valeur moyenne de la dose érythémale minimale, (DEM), définie comme la valeur permettant de quantifier la sensibilité actinique individuelle, déterminée avec cette même lampe sur un échantillon représentatif de 21 patients de phototype I, II ou III, est de 1,5 J/cm².

Les irradiations se font dans un tampon phosphate pH 7,4 (PBS, sans Ca²⁺ ni Mg²⁺; 4ml par pétri de 15 cm²), inerte aux UV. Les cellules témoins, non irradiées, sont laissées sur la paillasse à l'abri de la lumière dans le même tampon et pendant un temps équivalent à celui de l'irradiation.

3°) Traitements chimiques

a) Traitement des cellules par le Zn

Une solution mère de chlorure de zinc (ZnCl_2 , 100mM) est préparée par dissolution dans de l'eau millipore, puis stérilisée par filtration (0,22 μm). Une quantité suffisante de cette solution mère est ajoutée au milieu de culture pour obtenir une concentration finale de 100 μM de ZnCl_2 .

b) Traitement des cellules par le Cadmium

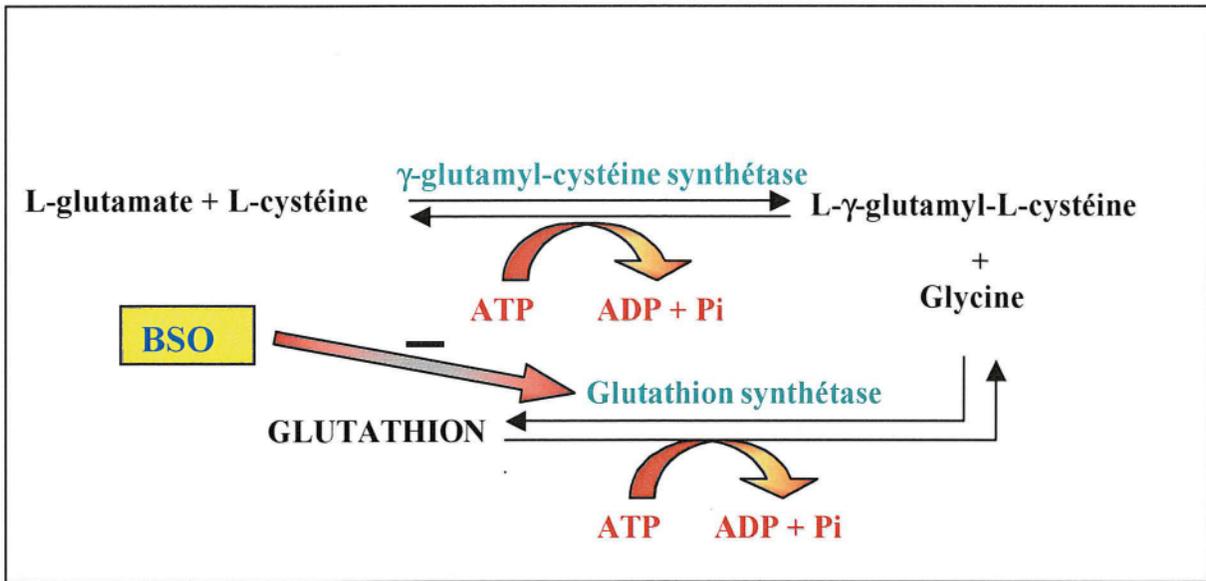
Une solution mère de chlorure de cadmium (CdCl_2 , 6 mM) est préparée par dissolution dans de l'eau millipore, puis stérilisée par filtration (0,22 μm). Une quantité suffisante de cette solution mère est ajoutée au milieu de culture pour obtenir une concentration finale de 3 μM de CdCl_2 .

c) Traitement des cellules par le BSO

La synthèse du glutathion (GSH) dans la cellule fait intervenir différentes enzymes. L'une des plus importante est la glutathion synthétase, qui transforme la γ -glutamyl-cystéine en glutathion en présence d'ATP. Afin de diminuer le taux de GSH intracellulaire nous avons traité les cellules pendant 18 heures avec le R-R buthionine R-S sulfoximine (BSO), à différentes concentrations. Nous avons vérifié que ce traitement n'était pas cytotoxique aux doses utilisées.

L'efficacité du traitement a été contrôlé par le dosage du glutathion intracellulaire selon la technique décrite par Emonet-Piccardi et coll (1998). Les cellules sont cassées par congélation/décongélation, les protéines sont précipitées par l'acide métaphosphorique à 6% dans un ratio 5/1, v/v, lysat/Ac métaphosphorique. Les thiols non protéiques sont mesurés dans le surnageant obtenu par centrifugation (4000 rpm, 10 mn, 4°C). Les résultats sont exprimés en μmoles de GSH par grammes de protéines totales (dosées par la technique décrite par Shopsis et Mackay, 1984).

Fig 30: Biosynthèse du glutathion d'après Meister A. Action du BSO



d) Traitement des cellules par l'actinomycine D

L'actinomycine D est un agent chimique permettant le blocage de la transcription de l'ADN. L'actinomycine D permet, en bloquant la transcription, d'inhiber la néosynthèse protéique. Le traitement des cellules a été mené durant 24, 48, ou 72 h, à la dose de 0,5 µg/ml.

4°) Mise en évidence de l'expression des métallothionéines

a) Etude de la protéine: mise au point d'une technique de Western-blot

Il n'existe aucune technique de western-blot utilisant une révélation par anticorps spécifique des MT dans la littérature, car la faible taille de la protéine, son manque d'antigénicité, et sa richesse en groupement thiols rendent sa séparation et sa détection très difficile (Cousins, Methods in enzymology, Metallobiochemistry). La mise au point d'une technique, simple, sensible n'utilisant pas de métaux radioactifs a été l'un des objectifs de ce DEA.

Les cellules sont trypsinées puis lavées deux fois dans du PBS (sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}). Le culot cellulaire est repris par un volume de 150µl de tampon de lyse (Tris 10 mM), contenant un inhibiteur de protéase (Pefabloc, 1 mM) et un agent réducteur (DTT, 2 mM). Les cellules sont cassées par congélation/décongélation (azote liquide/bain-marie 30°C, 5 cycles).

L'échantillon est alors centrifugé à 4000 rpm pendant 15 mn à 4°C. Le surnageant est récupéré. La concentration en protéine est déterminée par la méthode de Bradford (ref). La séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire se fait par électrophorèse en gel d'acrylamide 12% (SDS PAGE) une nuit à 20 mA. Le transfert des protéines sur une membrane nitrocellulose PROTAN® (Scleicher & Schuell, Dassel, Allemagne) se fait sous une tension de 60V durant trois heures. La coloration au rouge ponceau de la membrane permet de vérifier l'efficacité du transfert. Les sites non spécifiques sont alors bloqués par les protéines du lait pendant deux heures (PBS-poudre de lait: 5%, NP40: 0,5 %).

La membrane est rincée trois fois dans du PBS (Ca^{2+} , Mg^{2+}) additionné de NP40 0,5%, (Boehringer). et incubée une nuit à 4°C avec un anticorps monoclonal de souris (IgG1) anti MT (Dako E9, dilution au 1/4600^{ème} dans du PBS-NP40: 0,5%, BSA: 1%). Une série de deux rinçage dans le PBS NP40 est faite avant addition d'un anticorps secondaire monoclonal anti IgG1 de souris marquée à la peroxydase (dilution au 1/5000^{ème} dans PBS-NP40: 0,5%, BSA: 1%). La révélation se fait par chimiluminescence (Kit ECL, Amersham pharmacia biotech) sur un film photographique (Hyperfilm ECL, Amersham Life Science). Pour contrôler la spécificité de la bande MT, nous avons utilisé une solution commerciale MT-I, MT-II (Sigma). La quantité déposée est de 6,25 µg de protéines commerciales.

b) Immunocytochimie: Etude de la localisation des métallothionéines

L'immunocoloration des cellules a été réalisée en collaboration avec le service de pathologie cellulaire (Dr Labat-Molleur, Dr Guillermet, CHU Grenoble). Les cellules sont trypsinées et remises en culture dans des chambres plastiques 4 puits (Lab-tek, NUNC). 5000 cellules sontensemencées par compartiment, et cultivées pendant trois jours. Au troisième jour les cellules sont traitées. La première étape de la technique de marquage est un lavage au PBS (sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}), puis fixation et perméabilisation des cellules par le paraformaldéhyde 4% (10 mn, t° ambiante) suivi de 10 mn dans le méthanol froid (-20°C). Après trois rinçages dans le PBS (pH 7,4) les sites protéiques sont saturés dans le régilait (PBS/poudre de lait 2%, Tween 20 0,1%, pH 7,4). Après élimination du régilait, on incube les cellules dans le premier anticorps, anti-métallothionéine (Dako clone E9) (2 h, t° ambiante). Puis on incube les cellules avec un anticorps secondaire F(ab)'2 anti-souris IgG (Jackson Immunoresearch lab). Deux rinçages dans le PBS sont réalisés avant addition d'un complexe avidine/streptavidine (Dako, K0377). La révélation de la coloration se fait grâce au substrat de la peroxydase (tablettes FST Dab peroxydase, Sigma). Une contre coloration à l'haematoxylin est utilisée pour visualiser les

noyaux des cellules non marquées et les cellules des témoins négatifs. Les cellules exprimant les MT apparaissent plus ou moins brunes en fonction de la concentration, les cellules MT négatives apparaissent colorées en bleu au niveau du noyau.

Pour chaque condition opératoire, on réalise trois témoins: un premier témoin négatif, pour lequel l'anticorps primaire (Ac I) est remplacé par un anticorps irrelevant de souris, afin de mettre en évidence la spécificité de l'anticorps anti-MT. Un deuxième témoin négatif ne contenant pas d'Ac I, permet de vérifier la spécificité de l'anticorps secondaire. Puis un témoin positif pour lequel on remplace l'Ac I par un autre anticorps spécifique de la cellule utilisée. Le témoin positif utilisé est un anticorps dirigé contre une cytokératine de 56 kiloDaltons (KL1, IgG1 anti souris, Immunotech) exprimée notamment chez les kératinocytes afin de vérifier que le marquage à la peroxydase fonctionne.

c) Etude des ARNm (Northern-blot)

L'étude des ARNm est réalisée 3 heures après les différents traitements apportés aux cellules. Celle-ci sont trypsinées, lavées deux fois dans du PBS (sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}) et récoltées. La purification des ARNm se fait sur le culot cellulaire grâce au kit QuickPrep™ Micro mRNA purification (Pharmacia). La concentration en ARNm est mesurée par spectrophotométrie. Les ARNm sont récupérés par centrifugation (1200 rpm/20mn/4°C). Le culot est repris par de l'eau DEPC. Les échantillons sont déposés à masse égale après dilution dans le tampon de migration, (MOPS: 6mM, EDTA: 0,3mM, formaldéhyde: 8,35%) et addition de bromure d'éthidium (BET). La dénaturation se fait par la chaleur (67°C, 15mn). Par électrophorèse sur gel d'agarose (1%), les ARNm sont séparés en fonction de leur taille. Les ARNm sont alors transférés par capillarité sur une membrane de nylon (Hybond-N⁺, Amersham) grâce à un tampon de transfert (SSC 20X, Sigma). L'efficacité du transfert est vérifiée sous UV par fluorescence du BET, puis les ARNm sont fixés sur la membrane.

La sonde utilisée pour l'hybridation avec l'ARNm recherché est un ADNc de MT-IIA préalablement préparée à partir d'un plasmide MT-IIA (amplifié dans *Escherichia coli*). Cette sonde est alors marquée au phosphore 32 grâce au kit Nonaprimer I II (Appligene® Oncor®). L'hybridation entre l'ADNc et l'ARNm est réalisée à 45°C dans un tampon d'hybridation (SSC 10X, Derrhardt's 2X). La révélation des ARNm se fait par autoradiographie (Hyperfilm ³²P) après lavages successifs de la membrane dans un tampon SSC de molarité croissante.

5°) Evaluation des lésions de l'ADN par la technique Comète en milieu alcalin

(Emonet-Piccardi, 1998, adaptation de la technique décrite par Alapetite, 1996)

Les lésions de l'ADN mises en évidence par cette technique sont de deux types : Les sites alcali-labiles et les sites abasiques. La technique comprend une électrophorèse de l'ADN nucléaire sur cellules isolées dans une couche d'agarose. Les cellules cultivées en flask de 75 cm² sont récoltées puis mises en suspension dans l'agarose low melt à la densité de 20000 cellules par lame. Cette suspension est alors coulée sur une lame de verre dépolie préalablement recouverte d'agarose (0,5% dans du PBS). Il est à noter que toutes ces étapes sont réalisées à l'obscurité afin de limiter au maximum l'influence de la lumière de jour. Les lames sont alors irradiées en spectre solaire total, la dose reçue est de 1,5 J/cm². Après la lyse *in situ* des cellules, on réalise une dénaturation de l'ADN en milieu alcalin fortement salin, qui permet la décondensation de l'ADN (expliquée en partie par la perte des protéines de type histones). Les sites abasiques et alcali-labiles sont mis en évidence sous l' action d'un champ électrique durant une électrophorèse de 25V, 300mA, 30 mn. L'intercalation du bromure d'éthidium (BET) rends l'ADN fluorescent qui est alors visualisé à l'aide d'un microscope à épifluorescence Zeiss Axioscope 20 (lampe à vapeur de mercure HBO JOW) dont la longueur d'onde d'émission se situe entre 516 et 560 nm. Par lame, nous avons analysé 75 noyaux à l'aide d'une caméra Plumix TM 765 reliée à un système informatique d'analyse d'image Komet 3.0 (Kinetic imaging). Le tail moment défini par la formule suivante est utilisé afin d'évaluer les dommages de l'ADN:

$$\text{Tail moment} = (D_{ct} - D_{cq}) \times Q_{\text{adn queue comète}}$$

$D_{ct} - D_{cq}$ représente la distance du centre de la tête à la queue de la comète.

Q représente le % d'ADN dans la queue de la comète.

6°) Evaluation de la cytotoxicité: test au rouge neutre

Ce test évalue l'intégrité des membranes lysosomales. Il est utilisé comme indice de la mort cellulaire. Les cellules sont incubées 3h dans 3 ml de milieu contenant 50 mg par litre de rouge neutre (Sigma). Après aspiration du milieu, les cellules sont mises brièvement en contact avec 2 ml de formaldéhyde 4%, CaCl₂ 1%, puis rincées par 1 ml de PBS. Le colorant est extrait par 3 ml d'un mélange acide acétique 1%, éthanol 50%. L'absorbance ou densité

optique (DO) est mesurée à 540 nm. La détermination des pourcentages de survie est calculée selon la formule suivante : % survie = $[(I - B) / (T - B)] \times 100$

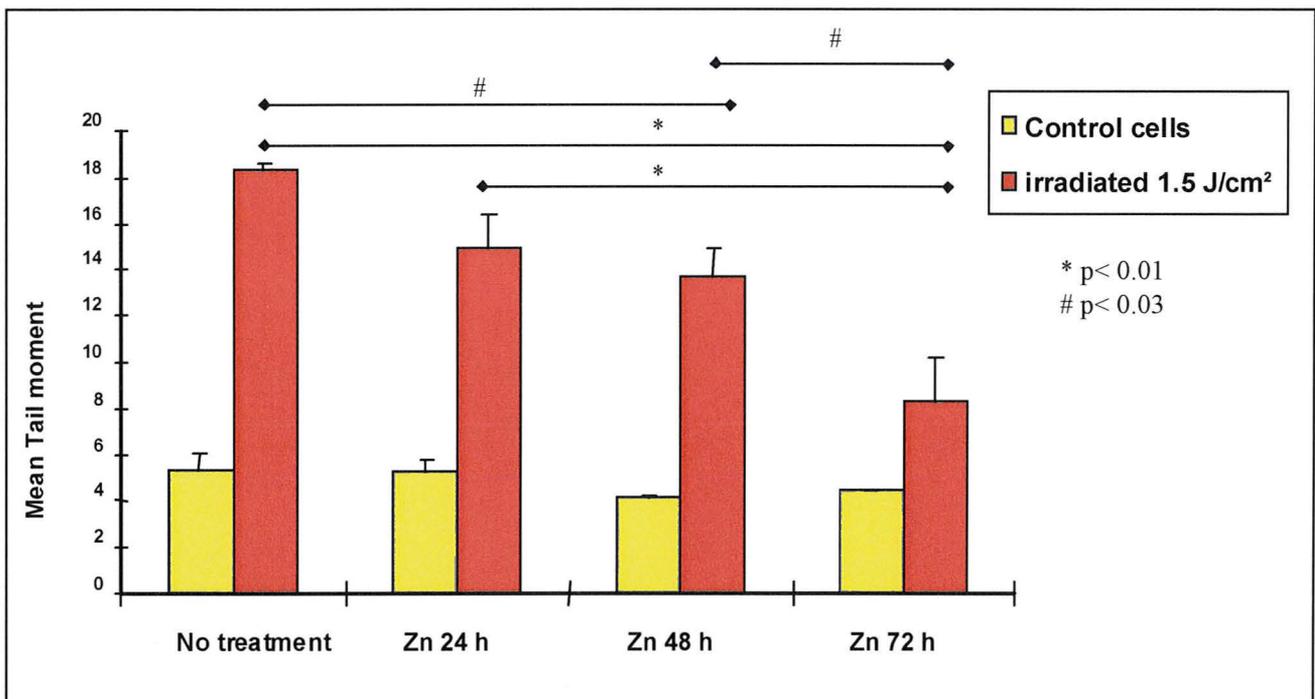
T, I, B représente respectivement la moyenne des DO des cellules témoins non traités, des cellules irradiées, et des «blancs».

III) RESULTATS

1°) Effet du zinc sur les lésions induites par une irradiation en spectre solaire total.

Un prétraitement des cellules par le Zn (100 μ M) est réalisé pendant 24, 48, et 72h. Les cellules HaCaT, sont alors irradiées en spectre solaire total, à la dose de 1,5 J/cm² (1 DEM). L'importance des lésions de type alcali-labiles et sites abasique est évaluée par la technique comète. Les résultats sont exprimés par la moyenne du tail moment +/- écarts types (n=3).

Fig 31. Evaluation des lésions de l'ADN après irradiation solaire : Effet protecteur du zinc.



Le tail moment passe de 5 dans les cellules contrôle à 18 (3,3 fois plus) pour une irradiation de 1,5 J/cm², ce qui confirme les effets délétères immédiats du rayonnement solaire sur l'ADN génomique. Une diminution significative des lésions de l'ADN s'observe dès 24 heures de traitement par Zn alors que le tail moment n'est pas modifié dans les cellules témoin Zn⁺ non irradiés. La protection apportée par Zn est fonction du temps de traitement, après 72 heures l'augmentation du tail moment n'est plus que de 50 %. En présence d'actinomycine D la génotoxité n'est plus retrouvée.

Tableau 3. Effet de l'actinomycine D sur la protection médiée par le Zinc

	Irradiation 1,5 J/cm ²	CONTROLE
ACTINOMYCINE D	72 +/- 1,5	35 +/- 7
ACTINOMYCINE D + Zn	65 +/- 3	32 +/- 2

Ces résultats montrent que :

- 1. Le rayonnement solaire à la dose de 1,5 J/cm² est génotoxique.**
- 2. Le zinc limite les lésions de l'ADN induites par une irradiation solaire.**
- 3. Cette protection de l'ADN est une fonction directe de la durée du prétraitement des cellules avec un effet maximum pour 72 heures,**
- 4. L'actinomycine D annule l'effet protecteur de Zn confirmant la nécessité d'une néosynthèse de protéines.**

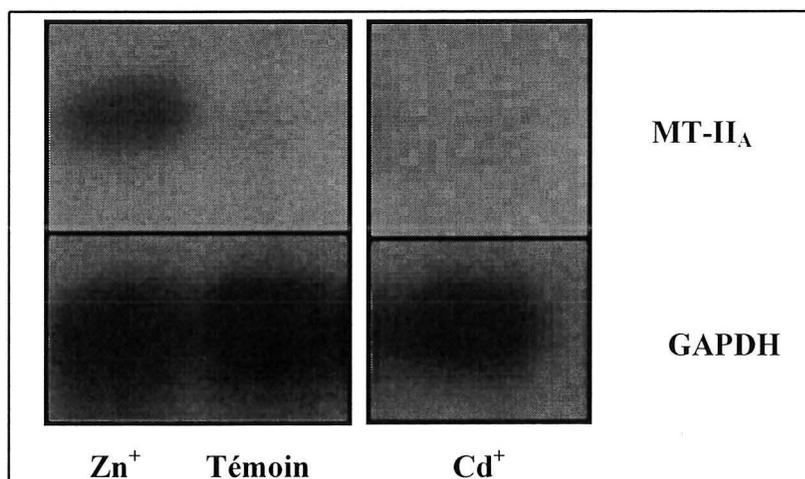
2°) Analyse de l'expression des métallothionéines.

Parmi les mécanismes d'action du zinc en photoprotection nous avons étudié la place des MT.

a) Analyse par northern-blot des ARNm

L'étude des ARNm spécifiques des MT permet de suivre l'induction de ces protéines. Le traitement des cellules par Zn (100 µM) et Cd (3 µM) est réalisé sur un temps court (3h), car la transcription des gènes étudiés est un mécanisme précoce.

Fig 32. Induction des ARNm de la MT II_A par le zinc et le cadmium.



Un faible taux d'ARNm - MT est retrouvé dans les cellules HaCaT témoin. Le traitement par Zn augmente fortement la transcription de ces gènes, alors que dans nos conditions l'effet du Cd est beaucoup moins important. Les ARNm de la GAPDH utilisés ici comme ARNm témoins, permettent de confirmer cette induction.

Les résultats montrent :

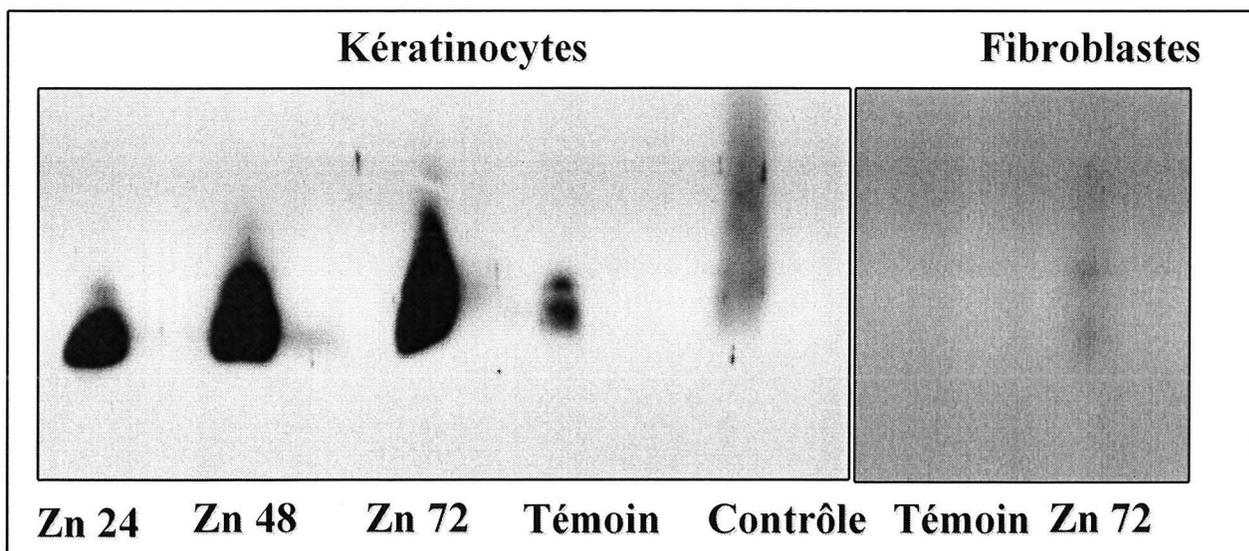
- 1. Un faible taux de transcrit pour le gène de la MT dans les cellules HaCaT à l'état basal.**
- 2. Une forte induction de la transcription des ARNm de la MT par le zinc (100 μ M, 3 heures).**
- 3. Un effet inducteur moins important pour le cadmium (3 μ M, 3 heures)**

b) Cinétique de la néosynthèse des MT lors d'un traitement par Zn.

la synthèse des MT, a été étudiée par une technique de western-blot, mise au point au cours de ce DEA; la quantité de transcrit présent dans la cellule n'est en effet pas directement corrélée avec la synthèse de la protéine correspondante. Le prétraitement par Zn est réalisé sur 24, 48, ou 72 heures, les protéines sont extraites et séparées par électrophorèse dénaturante comme décrit dans le paragraphe matériel et méthodes.

Fig 33. Expression des MT dans les cellules cutanées.

33A Cinétique d'expression des MT dans les kératinocytes en fonction de la durée du traitement par Zn.



Les cellules HaCaT expriment la MT (contrairement aux fibroblastes). Le Zn augmente de manière importante la quantité de protéine dès la 24^{ème} heure. La quantité de protéine croît en fonction du temps de traitement, avec une très nette augmentation à la 72^{ème} heure.

Nos résultats montrent :

- 1. La présence de MT dans les cellules HaCaT témoins. Ces MT sont absentes dans les fibroblastes.**
- 2. Une corrélation entre le temps de prétraitement des cellules, et l'induction des MT, avec un taux maximum de MT pour 72 heures de traitement.**

3°) Localisation intracellulaire des MT: étude par immunocytochimie.

Le Zn induit une protection de l'ADN vis à vis d'une irradiation solaire, les MT pourraient être l'un des acteurs de cette protection. Nous avons donc étudié la localisation cellulaire des MT après 72 heures de traitement par Zn (Figure 34).

Les cellules contrôles (34A) sont très faiblement marquées par la peroxydase ce qui confirme la présence d'une faible quantité de MT dans ces cellules. Celles-ci sont exclusivement localisées dans le cytoplasme car les noyaux restent bleus (coloration à l'haematoxylline). Après 72h de traitement par Zn (34B) les cellules apparaissent fortement colorées en brun, tant au niveau cytoplasmique que nucléaire. Toutes les cellules sont marquées, la coloration est parfois très intense. Les images sont uniformes sur toute la lame. Les différents témoins (34C, 34D, 34E) réalisés permettent d'affirmer la spécificité du marquage.

Nos résultats montrent :

- 1. Une induction des MT dans les cellules traitées par le zinc.**
- 2. Une répartition cytoplasmique et nucléaire des MT dans les cellules traitées.**

4°) Redistribution cellulaire des MT lors d'une irradiation solaire.

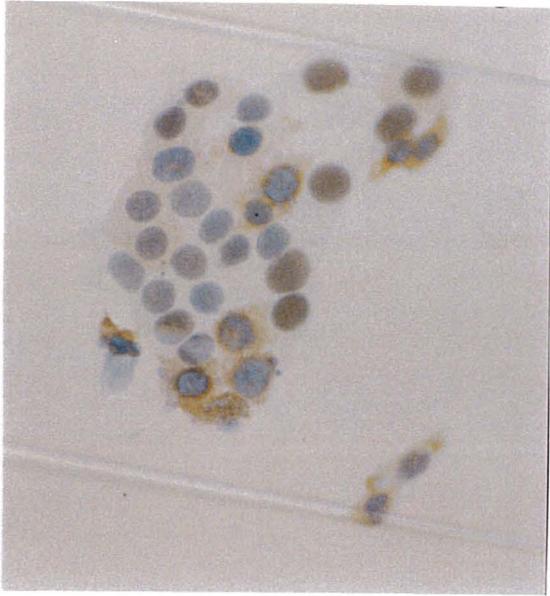
L'irradiation en spectre solaire induit de nombreuses modifications dans le fonctionnement cellulaire, et notamment la synthèse de protéines de stress (comme les HSPs). La figure 35 montre une induction des MT lors d'une irradiation solaire.

Fig34 : Localisation intracellulaire des MT après 72 heures de traitement par Zn.

4A: Cellules témoins

4B: Cellules Zn⁺ 72 h

34A



34B

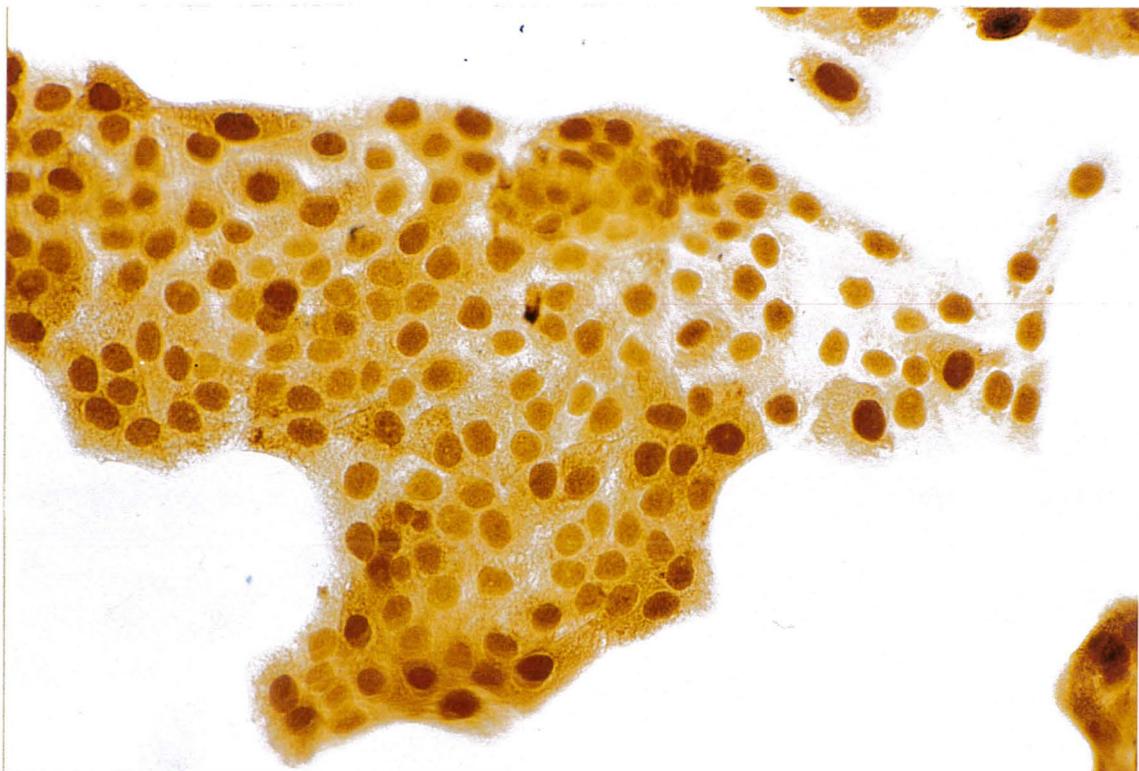
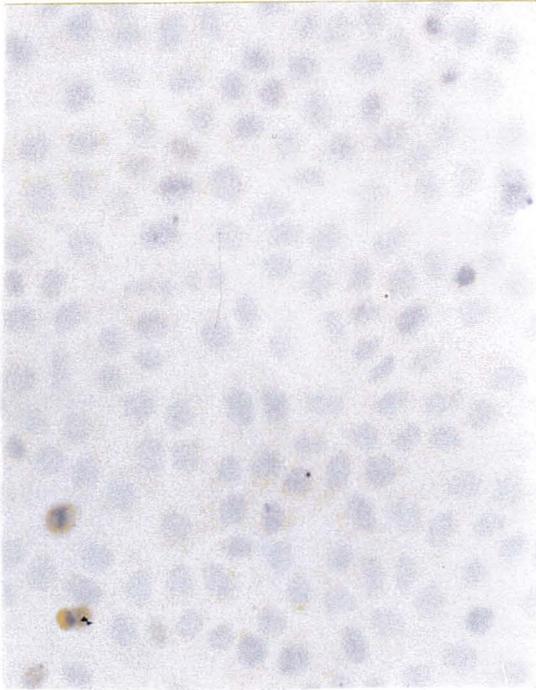


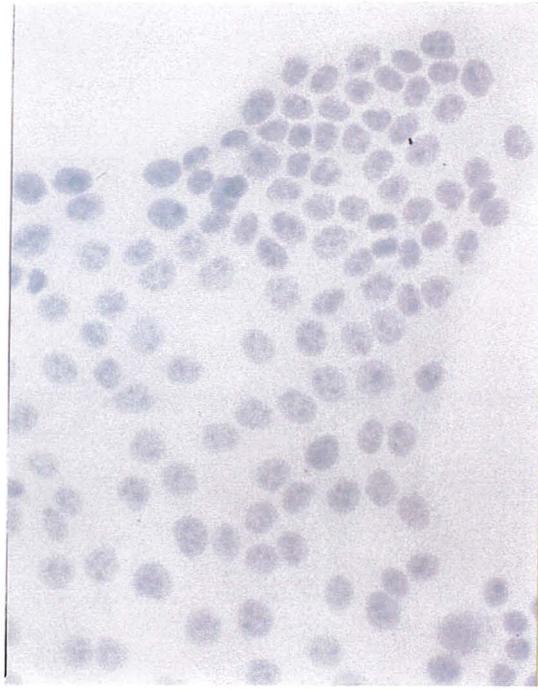
Fig34 : Suite.

4C : Témoin négatif 1; 4D : Témoin négatif 2; 4E : Témoin positif

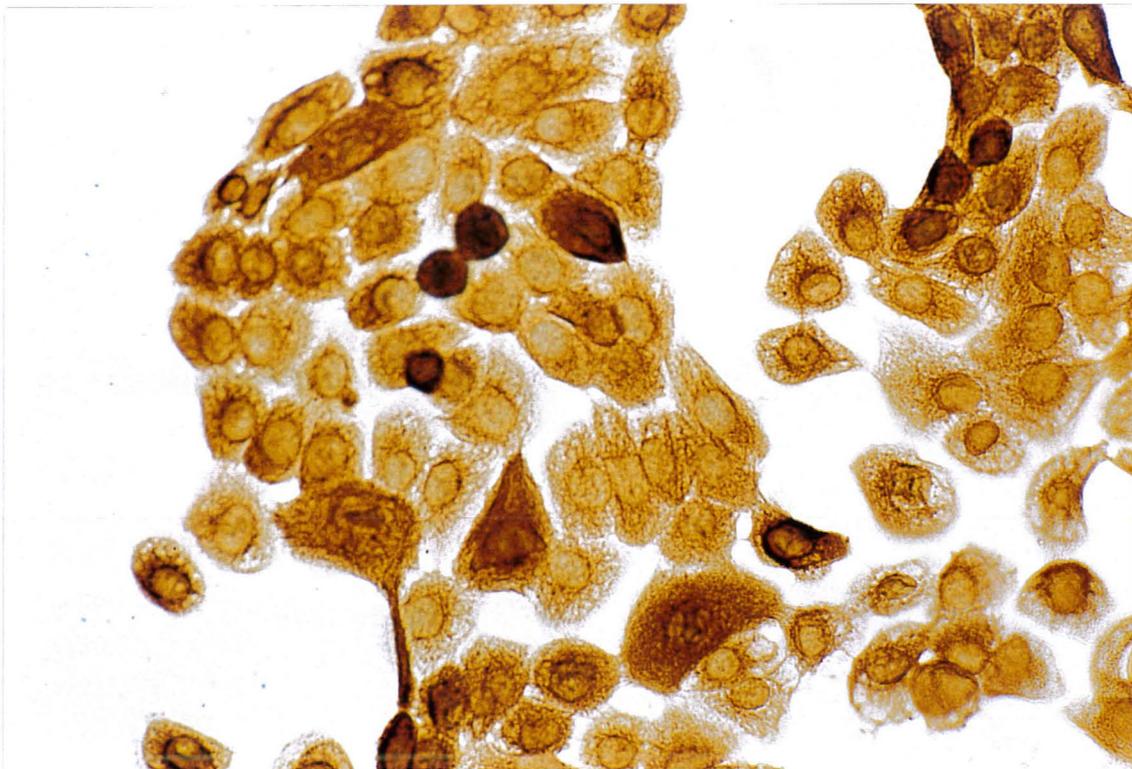
34C



34D



34E



Les cellules irradiées à la dose de $0,75 \text{ J/cm}^2$ sont colorées en brun (Fig 35A). Cette coloration n'apparaît pas de manière homogène dans toutes les cellules. Pour les cellules fortement colorées c'est le noyau qui est très nettement marqué dénotant ainsi la forte quantité de MT nucléaire. Le cytoplasme de ces cellules reste faiblement coloré (idem cellules témoins Fig 34A).

Sur la planche 34C dans certaines cellules, les noyaux bleus présentent une fragmentation de la chromatine caractéristique des cellules apoptotiques.

Pour une dose d'irradiation plus faible ($0,3 \text{ J/cm}^2$), la même distribution est observée avec une intensité de coloration plus faible, et moins homogène (Fig 35B). A cette dose, très peu de cellules présentent un noyau fragmenté, caractéristique de l'apoptose.

Les résultats montrent :

- 1. Une répartition essentiellement nucléaire des MT lors d'une irradiation solaire.**
- 2. L'induction d'un processus apoptotique dans les cellules irradiées à $0,75 \text{ J/cm}^2$.**

5°) Effet du zinc sur l'expression et la localisation des MT lors d'une irradiation.

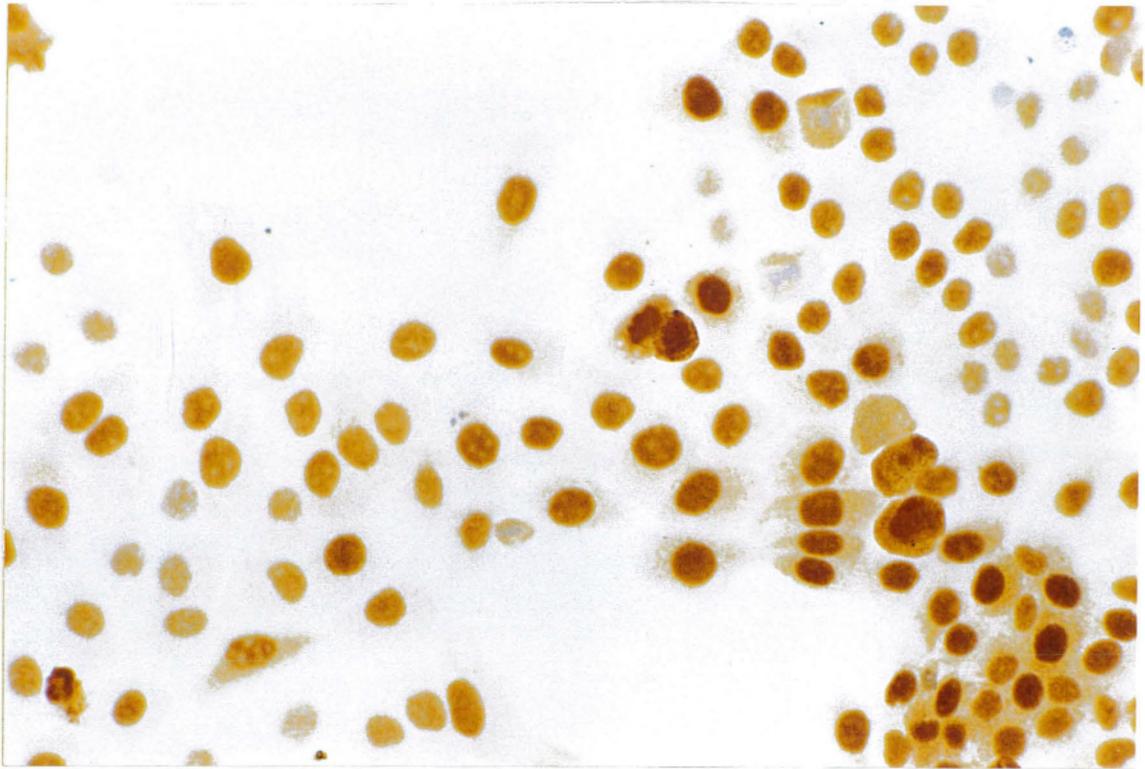
L'expression et la localisation des MT dans les cellules irradiées préalablement traitées par Zn sont représentées sur la figure 36. Les cellules sont prétraitées 72 heures par Zn puis irradiées à la dose de $0,75$ ou $0,3 \text{ J/cm}^2$. Les cellules sont toutes colorées en brun. La coloration est très intense, que ce soit au niveau cytoplasmique ou nucléaire. Les images sont très homogènes sur l'ensemble de la lame. Les cellules irradiées à la dose de $0,75 \text{ J/cm}^2$ (36A) sont plus intensément colorées que les cellules irradiées à $0,3 \text{ J/cm}^2$ (36B). La comparaison par rapport aux cellules témoin (34A) met clairement en évidence une induction nucléaire et cytoplasmique. Aucune cellule apoptotique n'est visible.

Les résultats montrent :

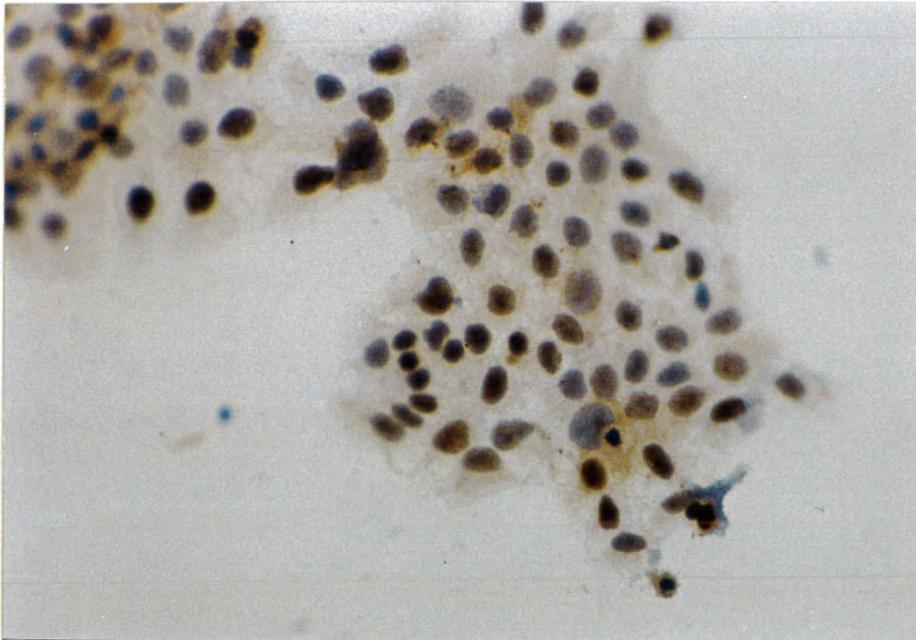
- 1. Un taux de MT élevé dans le noyau des cellules traitées par le zinc lors d'irradiation.**
- 2. L'absence de cellules apoptotiques.**

Fig 35 : Répartition cellulaire des métallothionéines après une irradiation solaire.
5A : 0,75 J/cm²; 5B : 0,3 J/cm²; 5C : 0,75 J/cm², mise en évidence des corps apoptotiques

35A



35B



35C

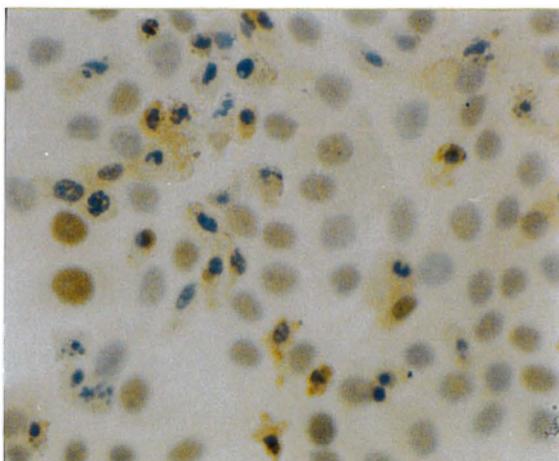
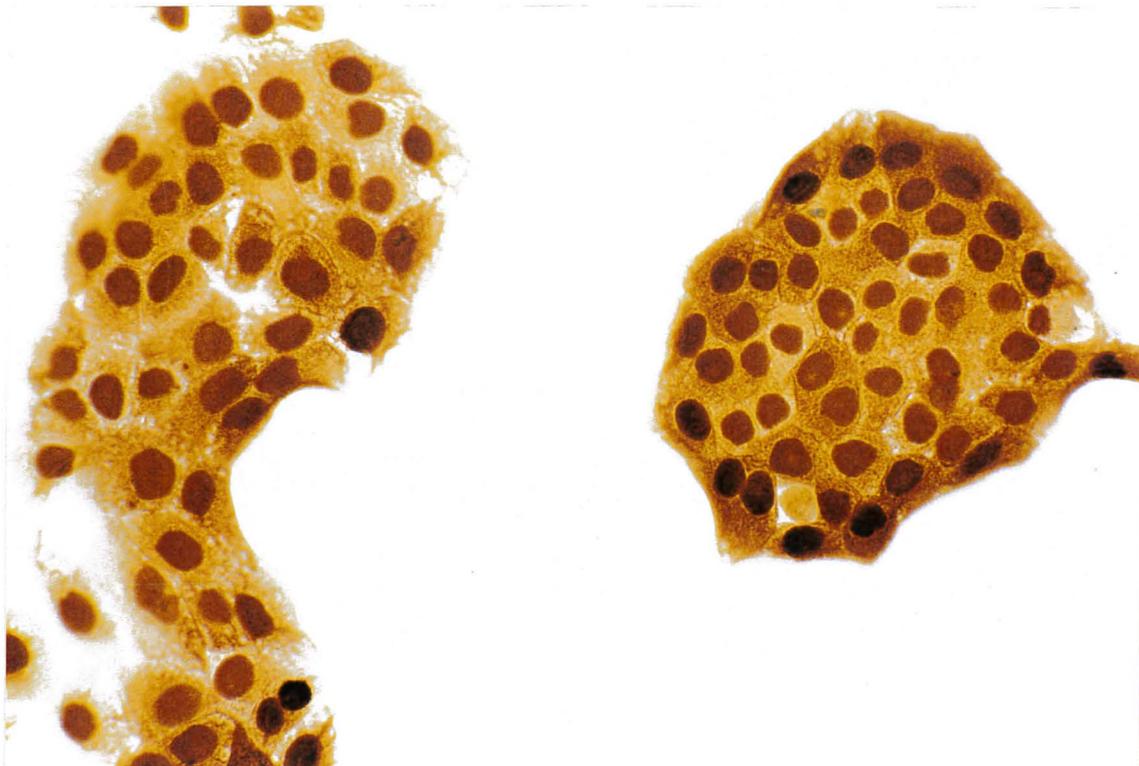


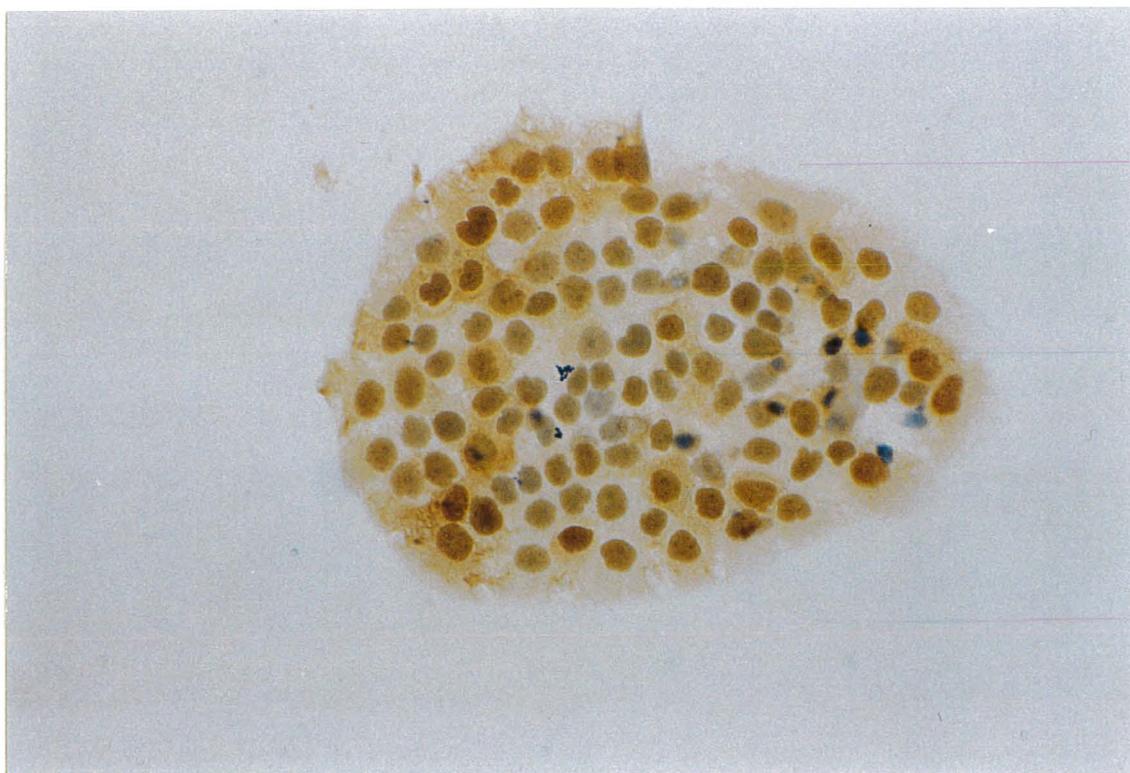
Fig36 : Expression et localisation des MT lors d'une irradiation solaire dans les cellules HaCaT prétraitées par Zn.

36A : 0,75 J/cm²; 6B : 0,3 J/cm²

36A



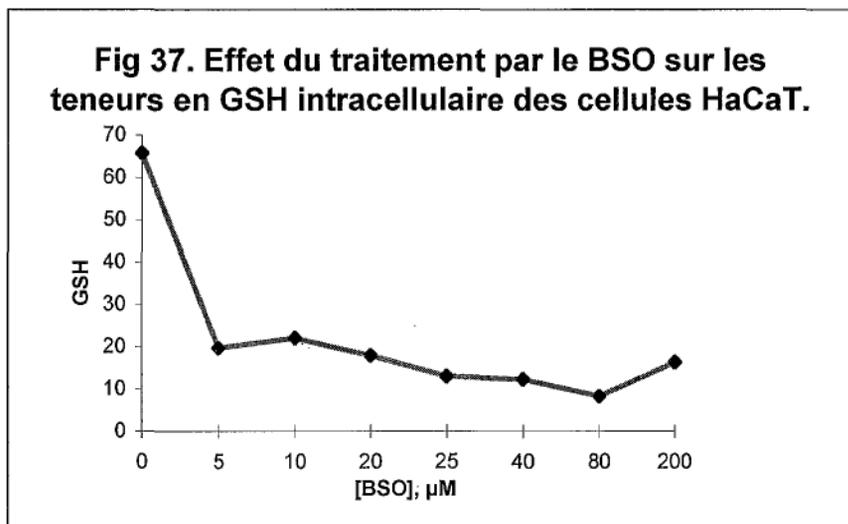
36B



6°) Etude de la fonction thiol des MT en photoprotection.

De part leur composition extrêmement riche en cystéine (30 %), les MT possèdent de nombreuses fonction thiols. Lors d'une irradiation solaire le glutathion réduit intracellulaire (GSH) est consommé. La présence des MT dans le noyau pourrait jouer le rôle de "tampon" thiol, et maintenir ainsi le potentiel redox intracellulaire limitant l'attaque de l'ADN génomique.

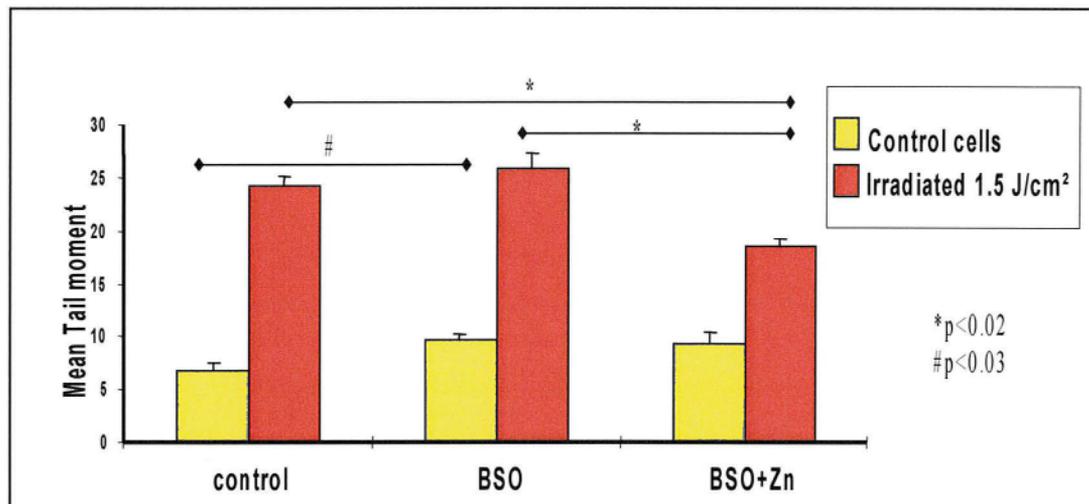
Nous avons étudié l'effet protecteur des MT vis à vis des lésions de l'ADN dans des cellules HaCaT dont nous avons modulé le taux de GSH par traitement par le BSO



La déplétion en GSH apparaît pour des doses faibles en BSO (5 µM, 18h). Elle est maximale pour un traitement des cellules par 80 µM de BSO (Figure 37)(cellules GSH⁻). Aucune toxicité n'a été mesurée pour ces doses de BSO par le test au rouge neutre.

Les cellules GSH⁻ ont été ou non traité par le zinc avant irradiation. Nous avons alors étudié les lésions de l'ADN.

Fig 38 : Evaluation des lésions de l'ADN lors d'une irradiation solaire dans les cellules HaCaT déplétées en GSH.



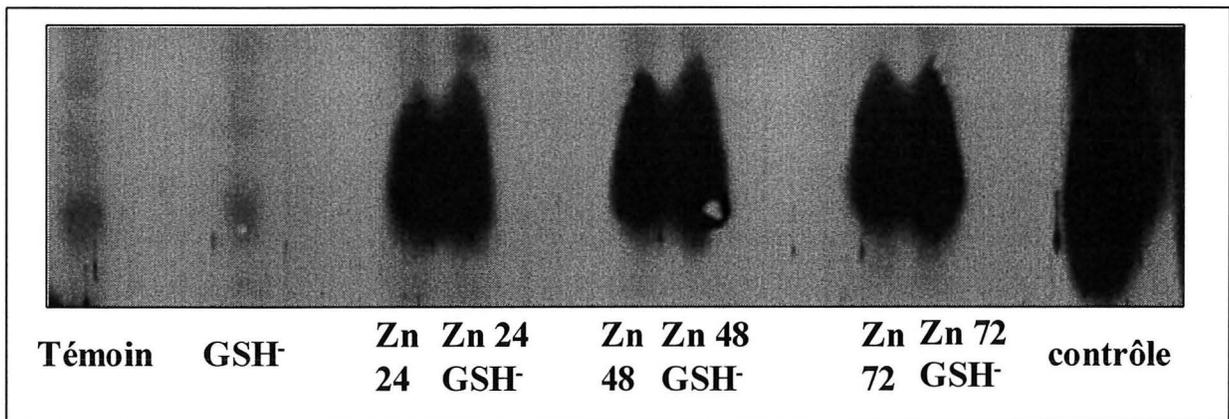
Les cellules traitées par le BSO non irradiées ne présentent pas de modification du tail moment comparée aux cellules contrôles. L'irradiation des cellules déplétées en GSH n'induit pas une élévation significative du tail moment, (comme nous l'avons observé pour des fibroblastes déplétés à 98 % en GSH). Dans les cellules Zn⁺/GSH⁻, le nombre de lésions de l'ADN reste plus faible que celui observé dans les cellules témoin ou GSH⁻. Ces résultats suggèrent un rôle prépondérant des MT, par rapport au GSH, dans la protection du génome vis à vis du rayonnement UV.

Les résultats montrent que :

- 1. La protection apportée par le zinc est indépendante du GSH intracellulaire.**
- 2. Le zinc compense partiellement la déplétion en GSH lors d'une irradiation.**

Ces résultats suggèrent qu'un traitement des cellules par le BSO ne modifie pas l'expression des MT. Cette hypothèse a été vérifiée par western-blot.

Fig 39. Cinétique d'induction des MT par Zn dans les cellules déplétées en GSH par traitement par le BSO.



La cinétique d'induction des MT est indentique dans les cellules Zn⁺ et Zn⁺/GSH⁻. La modulation du potentiel rédox intracellulaire par un traitement chimique n'a aucune influence sur l'induction des MT.

IV) Discussion

Les MT sont présentes dans l'épiderme de peau non insolée. Leur rôle au niveau du tissu cutané n'est pas élucidé. Dans ce travail nous avons mis en évidence i) une induction de ces protéines dans les cellules exposées au spectre solaire ii) leur redistribution du cytoplasme vers le noyau dans les cellules irradiées. Nous avons montré que la culture en présence de Zn augmente à la fois l'induction des MT par les rayonnements UV et leur concentration dans le noyau. Nous proposons donc les MT comme effecteurs cellulaires de la génoprotection apportée par Zn.

Le modèle d'irradiation solaire combinant rayonnements UVB et UVA permet d'étudier les effets additifs et/ou synergiques de ces rayonnements. L'augmentation importante (3,3 fois) du tail moment dans les cellules insolées à la dose de 1,5 J/cm² (1 DEM) confirme que les effets délétères du rayonnement solaire au niveau du génome sont immédiats. Ces mêmes modifications seraient responsables *in vivo* des processus de photocarcinogénèse. En effet, les processus de cancérisation cutanée sont imputables aux UVB (carcinomes) (Freeman et coll, 1978; Setlow et coll, 1993) et aux UVA qui potentialiseraient les effets néfastes des UVB (Van Weelden et coll, 1986). Cependant, les cellules ayant subi de nombreuses altérations de l'ADN peuvent se diriger vers la mort cellulaire par apoptose, mécanisme qui limite la multiplication des cellules dont le génome a été modifié. Des corps apoptotiques sont effectivement observés dans les cellules irradiées (Fig 35C).

Les cellules soumises à des agressions engendrant des lésions de l'ADN, altérations des membranes, consommation des antioxydants constitutifs (chute du GSH)... développent des mécanismes d'adaptation tels la néosynthèse de protéines de stress (HSPs, hème oxygénase). Nous avons montré que les MT font partie de ces processus d'adaptation. L'irradiation en spectre solaire induit les MT dans la lignée kératinocytaire HaCaT. Le mécanisme de cette induction reste à élucider. La composante UVA du spectre solaire pourrait agir par l'intermédiaire des ERO qui selon (Borghesi et coll, 1996) induisent la transcription des MT. La composante UVB pourrait, quant à elle, agir en générant des cassures de brins de l'ADN car d'autres génotoxiques induisent les MT (Takafoumi et coll, 1989). Cette induction par des radiations non ionisantes est retrouvée *in vivo* chez l'homme (Anstey et coll, 1996). Des études récentes suggèrent que ces protéines sont importantes en photobiologie : le nombre de « sunburn cells » après irradiation UVB est plus grand chez les

souris transgéniques n'exprimant pas le gène MT, que chez les animaux normaux (Hanada et coll, 1998). Les MT présentes dans l'épiderme limiteraient donc les effets délétères des UV. La protection apportée par les MT pourrait s'expliquer par leurs propriétés antioxydantes. Leur teneur en groupement thiol leur permet de piéger les ERO (Hanada et coll, 1993) plus efficacement que le GSH (Miura et coll, 1997). La localisation particulière des MT cutanées, notamment dans les kératinocytes basaux et supra-basaux, suggère qu'elles font partie intégrante de l'arsenal antioxydant de ces cellules, et exercent ainsi un rôle dans la protection vis à vis des effets phototoxiques. Cette expression constitutive des MT est retrouvée dans les cellules en culture de la lignée HaCaT alors que dans les fibroblastes issus de biopsie prélevée en peau saine les MT ne sont pas détectables. Néanmoins, de manière constitutive, les MT s'expriment à faible taux et se répartissent de manière homogène et diffuse dans le cytoplasme.

Une des questions à résoudre dans la problématique des MT en photoprotection reste leur localisation. En effet pour protéger l'ADN, les MT doivent traverser la membrane nucléaire. Effectivement, les MT induites par l'irradiation se retrouvent à la 24ème heure quasi exclusivement dans le noyau cellulaire. Le mécanisme de translocation des MT vers le noyau, après leur induction, pourrait s'expliquer selon deux théories. La première s'appuie sur la possibilité de passage, par simple diffusion à travers la membrane nucléaire, de molécules de moins de 20 kD. La deuxième s'appuie sur la présence d'un transporteur dans la membrane nucléaire capable, en consommant de l'énergie, de faire traverser la membrane aux protéines globulaires de plus de 70 kD. La première théorie de diffusion libre ne permet pas d'expliquer la rétention de MT dans le noyau 24 heures après son induction. La deuxième théorie est aujourd'hui confirmée par les travaux de Jiang (1998), décrivant la possibilité d'une liaison entre les MT et l'ATP, cette liaison permettrait le transport actif de la molécule à travers la membrane nucléaire, et maintiendrait une concentration intranucléaire élevée.

Afin de mieux appréhender le rôle photoprotecteur du Zn, nous avons surexprimé les MT en traitant les cellules avec Zn. La néosynthèse des MT lors de l'apport de Zn se fait par fixation du facteur de transcription MTF-1 sur la séquence consensus MRE situé en amont du gène de structure des MT (Bittel et coll, 1998). De nombreuses études menées au laboratoire ont permis de montrer l'importance du Zn en photoprotection. Un traitement des kératinocytes par Zn prévient l'apoptose induite par les UVB (Parat et coll, 1997), tout en diminuant les lésions de l'ADN, des résultats similaires ont été décrits dans les fibroblastes lors de l'irradiation UVA (Emonet et coll, 1998). Dans ce travail nous avons montré que le traitement des cellules par Zn stimule la transcription des gènes codant pour les MT dès la 3ème heure.

La quantité de MT s'accroît avec le temps et atteint un taux très important à 72 heures. En parallèle nous observons une diminution significative des lésions de l'ADN induites par l'irradiation et le tail moment est diminué de 53% à la 72ème heure de traitement par Zn (100 μ M). L'effet génoprotecteur du Zn est plus grand à 72h qu'à 24h. Cette diminution progressive des lésions de l'ADN permet de poser l'hypothèse d'un mécanisme inductible, impliquant notamment la synthèse des MT. La protection médiée par Zn n'est plus retrouvée si le traitement se fait en présence d'actinomycine D. Le blocage de la transcription des gènes, ne permet plus à Zn d'exercer son rôle génoprotecteur confirmant qu'il doit déclencher la néosynthèse de protéines pour être actif. Les petites protéines à groupements thiols que sont les MT sont les acteurs potentiels de cette protection. Elles pourraient participer au maintien du potentiel redox intracellulaire. A ce jour, la question du lien entre GSH et induction des MT n'est pas r solv e. Dans les kératinocytes Zn⁺ déplétés en GSH, la quantité de MT observée est la même que dans les cellules contrôles. La déplétion en GSH ne serait donc pas par elle-même un agent inducteur de MT. Ces résultats sont en contradiction avec ceux observés par Sato (1995).

Une translocation des MT vers le noyau lors d'un traitement des cellules par le Zn seul est retrouvée dans la lignée HaCat. Cette translocation n'a pas été observée par l'équipe d'Hanada (1998) lors d'un traitement par le cadmium et les MT-Cd restent localisées dans le cytoplasme. L'hypothèse de l'induction d'une autre isoforme de MT ayant des propriétés biologiques différentes pourrait être posée. L'irradiation des cellules Zn⁺ entraîne une importante translocation nucléaire de la protéine qui deviendrait alors l'antioxydant majeur du noyau. Cette translocation s'accompagne d'une diminution voir une absence de cellules apoptotiques. Zn exerce un effet antiapoptotique par inhibition des enzymes responsables du clivage internucl osomal de l'ADN dans la phase tardive de l'apoptose ou par inhibition de la caspase-3 à un stade plus précoce, le Zn diminue également le nombre de lésions de l'ADN. La présence des MT dans le noyau suggère qu'en exerçant leur rôle piègeur de ERO elles sont les effectrices de ce rôle antioxydant et génoprotecteur du Zn. La mesure des lésions de l'ADN dans les cellules HaCaT Zn⁺/GSH⁻ montre que l'apport de zinc permet de pallier l'augmentation de la sensibilité aux UV des cellules GSH⁻. L'étude par western blot des MT dans les cellules Zn⁺/GSH⁻ ne montre pas de modification de la quantité de MT comparativement aux cellules Zn⁺/GSH⁺. Ces résultats confirment que l'expression des MT n'est pas affectée par le potentiel rédox cellulaire.

Les MT, de part leur présence nucléaire, pourraient également exercer un effet antiapoptotique par redistribution du Zn vers des structures protéiques permettant de

maintenir une activité cellulaire optimum lors d'une irradiation. L'étude de Jacob (1998) montre la possibilité pour les MT d'échanger des atomes de zinc afin d'activer des apoenzymes comme la phosphatase alcaline ou la carboxypeptidase A bovines. Ces échanges de zinc seraient sous le contrôle rédox du couple GSH/GSSG (Jiang et coll, 1998). La présence de GSH limiterait la libération de Zn. Lorsque GSH est consommé ou lorsque GSSG augmente, la libération de Zn est facilitée, tant par le nombre d'atomes transféré que par augmentation de la vitesse de transfert (Jiang et coll, 1998). Lors de l'irradiation, le taux de GSH chute (Emonet et coll, 1997). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le transfert de Zn vers d'autres protéines comme l'endonucléase calcium, magnésium est facilité. Ces hypothèses doivent être vérifiées car elles ouvriraient de nouvelles voies d'approche de l'étude de l'apoptose. Le transfert de Zn entre thionéine, métallothionéine et p53 est un sujet d'étude important dans ce domaine. En effet la chélation du Zn déstabilise la molécule qui prend alors une forme mutée non fonctionnelle tandis que l'apport de Zn lui redonne à la fois sa conformation et sa fonctionnalité (Hainaut et coll, 1998). Le transfert de Zn des MT vers des enzymes de réparation de l'ADN est une autre hypothèse possible pour expliciter à la fois le rôle génoprotecteur et anti apoptotique du Zn; il y aurait alors stimulation des mécanismes de réparation des lésions induites par l'irradiation.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les MT sont des protéines à rôles multiples, à l'interface entre de nombreux systèmes biologiques.

Bien que leur fonction physiologique soit de réguler l'homéostasie intracellulaire en zinc et en cuivre, leur inductibilité permet l'adaptation cellulaire au stress génotoxique de par leurs propriétés antioxydante et antiapoptotique et peuvent aussi maintenir le potentiel rédox intracellulaire grâce à leur nombreux groupement thiols.

Les MT, présentes *in vivo* dans la couche basale de l'épiderme, appartiennent donc aux systèmes de défenses antioxydantes, permettant le maintien de l'intégrité du tissu cutané lors d'expositions solaires. En effet l'irradiation UV induit des lésions génotoxiques participant à l'émergence de cellules mutées au niveau cutané.

La présence de zinc est un facteur essentiel à la génoprotection médiée par les MT. En effet l'induction de l'apoforme des métallothionéines (thionéines) dans des cellules déplétées en zinc pourrait avoir des effets biologiques néfastes. L'utilisation de cellules transfectées par le gène MT dont le promoteur serait indépendant du zinc permettrait d'étudier le rôle de ces thionéines dans des conditions de carence en Zn. La fonctionnalité de p53 dans ces conditions est particulièrement importante à étudier car p53, en bloquant le cycle cellulaire en G1, est un des mécanismes permettant le maintien de l'intégrité du génome.

Les nombreuses relations entre MT et certains facteurs de transcription comme NF- κ B ou AP-1 montre que les MT peuvent influencer sur des étapes clé régulant la « vie » cellulaire

Notre objectif actuel est donc de mieux comprendre le mécanisme d'action génoprotecteur des MT. De récents résultats obtenus au laboratoire laissent penser que l'induction des MT par le Zn permettrait premièrement de diminuer l'incidence des lésions de l'ADN après irradiation et aussi de stimuler la réparation de ces lésions, du fait que de nombreuses glycosylases sont des enzymes à zinc.

Pour mieux comprendre l'effet des MT sur la réparation de l'ADN, nous utilisons un plasmide permettant la surexpression des MT dans les cellules HaCaT, sans addition de Zinc. De plus

l'utilisation de fibroblastes provenant de souris transgéniques déficientes en MT nous permettra de mieux cerner l'importance du couple Zn/MT, et la part de chacun d'eux, dans le maintien de l'intégrité génomique (lésion et réparation de l'ADN) après irradiation UV.

BIBLIOGRAPHIE

Abel J, De Ruiter N: Inhibition of hydroxyl-radical-generated DNA degradation by MT. Toxicol. Lett., 1989; 47: 191-196.

Alapetite A, Watcher T, Sage E, Moustacchi E: Use of alkaline comet assay to detect DNA repair deficiencies in human fibroblast exposed to UVC, UVB, UVA, and γ -rays. International J. Rad. Biol., 1996, 69 :359-369.

Andrews GK : Regulation of metallothionein gene expression. Prog Food Nutr Sci. 1990;14(2-3):193-258.

Angel P, Karin M : The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. Biochim Biophys Acta. 1991 Dec 10;1072(2-3):129-57.

Angel P, Pötting A, Mallick U, Rahmsdorf HJ, Schorpp M, Herrlich P: Induction of metallothionein and other mRNA species by carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblast. Mol. Cell. Biol. 1986, 6(5): 1760-1766.

Anstey A, Marks R, Long C, Navabi H, Pearse A, Wynford-Thomas D, Jasani B: *In vivo* photoinduction of metallothionein in human skin by ultraviolet irradiation. J. Pathol. 1996, 178: 84-88.

Arrigo AP : Gene expression and the thiol redox state. Free Radic Biol Med. 1999 Nov;27(9-10):936-44

Atanasiu RL, Stea D, Mateescu MA, Vergely C, Dalloz F, Briot F, Maupoil V, Nadeau R, Rochette L : Direct evidence of caeruloplasmin antioxidant properties. Mol Cell Biochem. 1998 Dec;189(1-2):127-35.

Baba T, Katsumi H, Hashimoto I :The study of ultraviolet B-induced apoptosis in cultured mouse keratinocytes and in mouse skin. J. Dermatol. Sci. 1996, 12 :18-23.

Benhamou S, Sarasin A : Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. Mutat Res. 2000 Apr;462(2-3):149-58.

Bertling CJ, Lin F, Girotti AW : Role of hydrogen peroxide in the cytotoxic effects of UVA/B radiation on mammalian cells. *Photochem Photobiol.* 1996 Jul;64(1):137-42.

Bittel D, Dalton T, Samson SL, Gedamu L, Andrews GK : The DNA binding activity of metal response element-binding transcription factor-1 is activated in vivo and in vitro by zinc, but not by other transition metals. *J Biol Chem.* 1998 Mar 20;273(12):7127-33.

Bohr VA, Smith CA, Okumoto DS, Hanawalt PC : DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell.* 1985 Feb;40(2):359-69.

Borghesi LA, Lynes MA : Stress proteins as agents of immunological change: some lessons from metallothionein. *Cell Stress and Chaperones*, 1996, 1(2): 99-108 (mini-review).

Boukamp P, Petrussevska R, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig N: Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 1988, 106:761-771.

Cadet J, Bardet M, Berthod T, Delatour T, D'Ham C, Douki T, Gasparuto D, Grand A, Jolibois F, Molko D, Polverelli M, Ravanat JL, Romieu A, Signorini N and Sauvaigo S : Oxidative base damage to DNA : recent mechanistic aspects, measurement and repair. Dans « DNA damage and repair : oxygen radical effects, cellular protection and biological consequences », Dizdaroglu M (ed), NATO ASI Series, 1998.

Camalier RF, Gantt R, Price FM, Stephens EV, Baeck AE, Taylor WG, Sanford KK : Effect of visible light on benzo(a)pyrene binding to DNA of cultured human skin epithelial cells. *Cancer Res.* 1981 May;41(5):1789-93.

Cano-Gauci DF, Sarkar B: Reversible zinc exchange between metallothionein and the estrogen receptor zinc finger. *FEBS Lett.* 1996, 386 :1-4.

Chubatsu LS, Meneghini R: Metallothionein protects DNA from oxidative damage. *Biochem J.* 1993, 291(Pt 1): 193-198.

Cousins RJ, in *Metallobiochemistry, Part B, Metallothionein and related molecules*. *Methods Enzymol.* 1991, 2051-2626.

Cousins RJ, Leinart A: Tissue-specific regulation of zinc metabolism and metallothionein genes by interleukin-1. *FASEB J.* 1988, 2: 2884-2890.

Dammann R, Pfeifer GP : Lack of gene- and strand-specific DNA repair in RNA polymerase III-transcribed human tRNA genes. *Mol Cell Biol.* 1997 Jan;17(1):219-29.

Darr D, Fridovich I : Free radicals in cutaneous biology. *J. Invest. Dermatol*, 1994, 102, 671-675.

Datta R, Hallahan DE, Kharbanda SM, Rubin E, Sherman ML, Huberman E, Weichselbaum RR, Kufe DW : Involvement of reactive oxygen intermediates in the induction of c-jun gene transcription by ionizing radiation. *Biochemistry.* 1992 Sep 8;31(35):8300-6.

Davis SR, McMahon RJ, Cousins RJ :Metallothionein knockout and transgenic mice exhibit altered intestinal processing of zinc with uniform zinc-dependent zinc transporter-1 expression. *Am. Soc. Nutr. Sci.* 1998, 825-831.

Davis SR, Cousins RJ : Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function. *J Nutr.* 2000 May;130(5):1085-8.

De Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH : Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 1999 Apr 1;13(7):768-85.

Deby C, Pincemail J : Toxicity of oxygen, free radicals and defense mechanisms. *Presse Med.* 1986 Sep 25;15(31):1468-74

Didier C, Emonet-Piccardi N, Beani JC, Cadet J, Richard MJ: L-arginine increases UVA cytotoxicity in irradiated human keratinocyte cell line :Potential role of nitric oxide. *FASEB J.*

Douki T, Perdiz D, Grof P, Kuluncsics Z, Moustacchi E, Cadet J, Sage E : Oxidation of guanine in cellular DNA by solar UV radiation: biological role. *Photochem Photobiol.* 1999 Aug;70(2):184-90.

Drapkin R, Reardon JT, Ansari A, Huang JC, Zawel L, Ahn K, Sancar A, Reinberg D : Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II. *Nature.* 1994 Apr 21;368(6473):769-72.

Drummond JT, Li GM, Longley MJ, Modrich P : Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science.* 1995 Jun 30;268(5219):1909-12.

Dudek EJ, Peak JG, Roth RM, Peak MJ: Isolation of V79 fibroblast cell lines containing elevated metallothionein levels that have increased resistance to the cytotoxic effects of ultraviolet-A radiation. *Photochem. Photobiol.* 1993, 58(6): 836-840.

Dunn MA, Lynn Blalock T, Cousins RJ: Metallothionein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1987, 185: 107-119 (minireview).

Durnam DM, Palmiter RD : Transcriptional regulation of the mouse metallothionein-I gene by heavy metals. *J Biol Chem.* 1981 Jun 10;256(11):5712-6.

Eisenstark A, Perrot G : Catalase has only a minor role in protection against near-ultraviolet radiation damage in bacteria. *Mol Gen Genet.* 1987 Apr;207(1):68-72.

Emonet-Piccardi N, Richard MJ, Ravanat JL, Signorini N, Cadet J, Beani JC: Protective effects of antioxidants against UVA-induced DNA damage in human skin fibroblasts in culture. *Free Rad. Res.* 1998, 29 :307-313.

Feaver WJ, Svejstrup JQ, Bardwell L, Bardwell AJ, Buratowski S, Gulyas KD, Donahue TF, Friedberg EC, Kornberg RD : Dual roles of a multiprotein complex from *S. cerevisiae* in transcription and DNA repair. *Cell.* 1993 Dec 31;75(7):1379-87.

Fornace AJ Jr, Schalch H, Alamo I: Coordinate induction of metallothioneins I and II in rodent cells by UV irradiation. *Mol. Cell Biol.* 1988, 8(11): 4716-4720.

Freeman RG: Action spectrum for ultraviolet carcinogenesis. 1978, in « Ultraviolet carcinogenesis », Kripke ML, Sass ER(eds), NCI Monograph 50, DHEW Publication.

Friedberg EC : Cockayne syndrome--a primary defect in DNA repair, transcription, both or neither?. *Bioessays*. 1996 Sep;18(9):731-8.

Fuchs J, Packer L : Photooxidative stress in the skin. Dans « Oxydative stress : oxidant and antioxidants » H. Sies (eds), Academic Press, 1991, pp 559-583.

Furey WF, Robbins AH, Clancy LL, Winge DR, Wang BC, Stout CD :Crystal structure of Cd,Zn metallothionein.*Science*. 1986 Feb 14;231(4739):704-10.

Gantt R, Jones GM, Stephens EV, Baeck AE, Sanford KK : Visible light-induced DNA crosslinks in cultured mouse and human cells. *Biochim Biophys Acta*. 1979 Dec 17;565(2):231-40.

Glanville N, Durnam DM, Palmiter RD : Structure of mouse metallothionein-I gene and its mRNA. *Nature*. 1981 Jul 16;292(5820):267-9.

Gutteridge JM : Inhibition of the Fenton reaction by the protein caeruloplasmin and other copper complexes. Assessment of ferroxidase and radical scavenging activities. *Chem Biol Interact*. 1985 Dec 17;56(1):113-20.

Hainaut P, Milner J : Redox modulation of p53 conformation and sequence-specific DNA binding in vitro. *Cancer Res*. 1993 Oct 1;53(19):4469-73.

Hamer DH : Metallothionein. *Annu Rev Biochem*. 1986;55:913-51

Hanada K, Baba T, Hashimoto I, Fukui R, Watanabe S : Possible role of cutaneous metallothionein in protection against photo-oxidative stress – epidermal localization and scavenging activity for superoxide and hydroxyl radicals. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed*. 1992/1993, 9: 209-213.

Hanada K, Gange RW, Siebert E, Hassan T: Protective effects of cadmium chloride against UVB injury in mouse skin and in cultured human cells :a possible role for cadmium-induced metallothionein. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 1991, 8 :111-115.

Hanada K, Sawamura D, Hashimoto I, Kazuyuki K, Naganuma A: Epidermal proliferation of the skin in metallothionein-null mice. *J. Invest. Dermatol.* 1998, 110(3): 259-262.

Hanada K, Sawamura D, Nakano H, Hashimoto I :Possible role of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced metallothionein in photoprotection against UVB injury in mouse skin and cultured rat keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 1994, 9: 203-208.

Hanada K, Sawamura D, Tamai K, Baba T, Hashimoto I, Muramatsu T, Nobuhiko M, Naganuma A: Novel fonction of metallothionein in photoprotection :Metallothionein-null mouse exhibits reduced tolerance against Ultraviolet B injury in the skin. *J. Invest. Dermatol.* 1998, 111(4): 582-585.

Hanada K, Tamai K, Sawamura D, Hashimoto I, Muramatsu T: Dynamic changes in intracellular location of metallothionein in rat keratinocytes after ultraviolet-B irradiation. *J. Invest. Dermatol.* 1998, 110(1): 98-100.

Harley CB, Menon CR, Rachubinski RA, Nieboer E : Metallothionein mRNA and protein induction by cadmium in peripheral-blood leucocytes. *Biochem J.* 1989 Sep 15;262(3):873-9.

Heuchel R, Radtke F, Georgiev O, Stark G, Aguet M, Schaffner W : The transcription factor MTF-1 is essential for basal and heavy metal-induced metallothionein gene expression. *EMBO J.* 1994 Jun 15;13(12):2870-5.

Hunziker PE, Kagi JH : Isolation and characterization of six human hepatic isometallothioneins. *Biochem J.* 1985 Oct 15;231(2):375-82.

Iszard MB, Liu J, Klaassen CD: Effect of several metallothionein inducers on oxidative stress defense mechanisms in rats. *Toxicol.* 1995, 104: 25-33.

Jacob C, Maret W, Vallee BL: Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 31; 95(7): 3489-3494.

Jiang LJ, Maret W, Vallee BL: The ATP-metallothionein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998, 95(16): 9146-9149.

Jiang LJ, Maret W, Vallee BL: The glutathione redox couple modulates zinc transfer from metallothionein to zinc-depleted sorbitol dehydrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998 Mar 31; 95(7): 3483-3488.

Karin M, Richards RI : Human metallothionein genes--primary structure of the metallothionein-II gene and a related processed gene. *Nature.* 1982 Oct 28;299(5886):797-802.

Karin M, Eddy RL, Henry WM, Haley LL, Byers MG, Shows TB : Human metallothionein genes are clustered on chromosome 16. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Sep;81(17):5494-8.

Klaassen CD, Lehman-McKeeman LD : Regulation of the isoforms of metallothionein. *Biol Trace Elem Res.* 1989 Jul-Sep;21:119-29.

Ko LJ, Prives C : p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 1996 May 1;10(9):1054-72.

Kobayashi S, Hirota Y, Sayato-Suzuki J, Takehana M, Nishimura H, Nishimura N, Tohyama C : Possible role of metallothionein in the cellular defense mechanism against UVB irradiation in neonatal human skin fibroblasts. *Photochem. Photobiol.* 1994, 59(6): 650-656.

Kuluncsics Z, Perdiz D, Brulay E, Muel B, Sage E : Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts. *J Photochem Photobiol B.* 1999 Mar;49(1):71-80.

Lafleur MV, Hoorweg JJ, Joenje H, Westmijze EJ, Retel J : The ambivalent role of glutathione in the protection of DNA against singlet oxygen. *Free Radic Res.* 1994 Jul;21(1):9-17.

Lai LW, Ducore JM, Rosenstein BS : DNA-protein crosslinking in normal human skin fibroblasts exposed to solar ultraviolet wavelengths. *Photochem Photobiol.* 1987 Jul;46(1):143-6.

Lautier D, Luscher P, Tyrell RM : Endogenous glutathione levels modulates both constitutive and UVA radiation/hydrogen peroxide inductible expression of the human heme oxygenase gene. *Carcinogenesis*, 1992, 13 :227-232.

Lazo JS, Kuno SM, Woo ES, Pitt BR : The protein thiol metallothionein as an antioxidant and protectant against antineoplastic drugs. *Chem. Biol. Interact.* 1998, 111-112:255-262. Review.

Lazo JS, Pitt BR : Metallothioneins and cell death by anticancer drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1995, 35: 635-653 (minireview)

Leccia MT, Richard MJ, Favier A, Beani JC: Zinc protects against ultraviolet A1-induced damage and apoptosis in cultured human fibroblasts. *Biological Trace Elem. Res.* 1999.

Lo YY, Cruz TF : Involvement of reactive oxygen species in cytokine and growth factor induction of c-fos expression in chondrocytes. *J Biol Chem.* 1995 May 19;270(20):11727-30.

Maret W, Jacob C, Vallee BL, Fischer EH : Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998, 95(7): 3478-3482.

Margoshes M, Vallee BL : A cadmium binding protein from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc.* 1957, 79 :4813-14

Marini M, Musiani D : Micromolar zinc affects endonucleolytic activity in hydrogen peroxide-mediated apoptosis. *Exp. Cell. Res.* 1998, 239 :393-398.

Markant A, Pallauf J : Metallothionein and zinc as potential antioxidants in radical-induced lipid peroxidation in cultured hepatocytes. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 1996, 10: 88-95.

McCormick JP, Fischer JR, Pachlatko JP, Eisenstark A : Characterization of a cell-lethal product from the photooxidation of tryptophan: hydrogen peroxide. *Science*. 1976 Feb 6;191(4226):468-9.

Mellon I, Hanawalt PC : Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. *Nature*. 1989 Nov 2;342(6245):95-8.

Mellon I, Spivak G, Hanawalt PC : Selective removal of transcription-blocking DNA damage from the transcribed strand of the mammalian DHFR gene. *Cell*. 1987 Oct 23;51(2):241-9.

Meplan C, Richard MJ, Hainaut P : Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells. *Oncogene*. 2000 Nov 2;19(46):5227-36.

Meredith MJ, Reed DJ : Status of the mitochondrial pool of glutathione in the isolated hepatocyte. *J Biol Chem*. 1982 Apr 10;257(7):3747-53.

Miura T, Muraoka S, Ogiso T :Antioxidant activity of metallothionein compared with reduced glutathione. *Life Sci*. 1997, 60(21): 301-309.

Miyazaki H, Naitoh Y, Nakahashi Y, Yanagitani S, Kuno K, Ueno Y, Okajima A, Inoue K : Induction of metallothionein isoforms in rat hepatoma cells by various anticancer drugs. *J Biochem*. 1998, 124 :65-71.

Muramatsu T, Tada H, Kobayashi N, Oshnishi I: Induction of the 72-kD heat shock protein in organ-cultured normal human skin. *J. Invest. Dermatol*. 1992, 98 :786-790.

Nagel WW, Vallee BL: Cell cycle regulation of metallothionein in human colonic cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, 92: 579-583.

Palmiter RD: Constitutive expression of metallothionein-III (MT-III), but not MT-1, inhibits growth when cells become zinc deficient. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 1995, 135 :139-146.

Palmiter RD: The elusive function of metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998, 95(15): 8428-8430.

Palmiter RD, Findley SD, Whitmore TE, Durnam DM : MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Jul 15;89(14):6333-7.

Palmiter RD : Molecular biology of metallothionein gene expression. *Experientia Suppl.* 1987;52:63-80.

Parat MO, Richard MJ, Beani JC, Favier A: Involvement of zinc in intracellular oxidant / antioxidant balance. *Biol. Trace Elem. Res.* 1997, 60(3): 187-204.

Parat MO, Richard MJ, Pollet S, Hadjur C, Favier A, Beani JC : Zinc and DNA fragmentation in keratinocytes apoptosis: its inhibitory effect in UVB irradiated cells. *J. Photochem. Photobiol. B.* 1997, 37 :101-106.

Pauwels M, van Weyenbergh J, Soumillion A, Proost P, De Ley M : Induction by zinc of specific metallothionein isoforms in human monocytes. *Eur J Biochem.* 1994 Feb 15;220(1):105-10.

Peak JG, Peak MJ, Blazek ER : Improved quantitation of DNA-protein crosslinking caused by 405-nm monochromatic near-UV radiation in human cells. *Photochem Photobiol.* 1987 Aug;46(2):319-21.

Peak JG, Peak MJ, Sikorski RS, Jones CA : Induction of DNA-protein crosslinks in human cells by ultraviolet and visible radiations: action spectrum. *Photochem Photobiol.* 1985 Mar;41(3):295-302.

Peak JG, Pilas B, Dudek EJ, Peak MJ : DNA breaks caused by monochromatic 365 nm ultraviolet-A radiation or hydrogen peroxide and their repair in human epithelioid and xeroderma pigmentosum cells. *Photochem Photobiol.* 1991 Aug;54(2):197-203.

Peak MJ, Peak JG : Solar-ultraviolet-induced damage to DNA. *Photodermatol.* 1989, 6: 1-15

Peak MJ, Peak JG : Hydroxyl radical quenching agents protect against DNA breakage caused by both 365-nm UVA and by gamma radiation. *Photochem Photobiol.* 1990 Jun;51(6):649-52.

Perry KD, Smyth MJ, Stennicke HR, Salvesen GS, Duriez P, Poirier G, Hannun YA : Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. *J. Biol. Chem.* 1997, 272(30) :18530-18533.

Pountney DL, Kägi JHR, Vasak M : Metallothioneins *in Handbook of metal-ligand interaction in biological fluids*, Berthon J (Eds) Dekker Inc, New York, 1995 pp 431-442.

Quaife CJ, Kelly EJ, Masters BA, Brinster RL, Palmiter RD : Ectopic expression of metallothionein-III causes pancreatic acinar cell necrosis in transgenic mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1998 Jan;148(1):148-57.

Quaife CJ, Findley SD, Erickson JC, Froelick GJ, Kelly EJ, Zambrowicz BP, Palmiter RD : Induction of a new isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry.* 1994 Jun : 33: 7250-7259.

Radicella JP, Dherin C, Desmaze C, Fox MS, Boiteux S : Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jul 22;94(15):8010-5.

Radtke F, Heuchel R, Georgiev O, Hergersberg M, Gariglio M, Dembic Z, Schaffner : Cloned transcription factor MTF-1 activates the mouse metallothionein I promoter. *EMBO J.* 1993 Apr;12(4):1355-62.

Robert C, Sarasin A : Trichothiodystrophies: anomalies of the repair and transcription of genes. *Ann Dermatol Venereol.* 1999 Oct;126(10):669-71

Rosen JE, Prahalad AK, Williams GM. 8-Oxodeoxyguanosine formation in the DNA of cultured cells after exposure to H₂O₂ alone or with UVB or UVA irradiation. *Photochem Photobiol.* 1996 Jul;64(1):117-22.

Rosenstein BS, Lai LW, Ducore JM, Rosenstein RB : DNA-protein crosslinking in normal and solar UV-sensitive ICR 2A frog cell lines exposed to solar UV-radiation. *Mutat Res.* 1989 May;217(3):219-26.

Rosenstein BS, Ducore JM : Induction of DNA strand breaks in normal human fibroblasts exposed to monochromatic ultraviolet and visible wavelengths in the 240-546 nm range. *Photochem Photobiol.* 1983 Jul;38(1):51-5.

Rossmann TG, Goncharova EI, Nadas A, Dolzhanskaya N : Spontaneous mutagenesis in mammalian cells is caused mainly by oxidative events and can be blocked by antioxidants and metallothionein. *Mutat. Res.* 1998, 402(1-2): 103-110.

Roza L, van der Schans GP, Lohman PH : The induction and repair of DNA damage and its influence on cell death in primary human fibroblasts exposed to UV-A or UV-C irradiation. *Mutat Res.* 1985 Jul;146(1):89-98.

Sancar A : DNA excision repair. *Annu Rev Biochem.* 1996;65:43-81.

Sato M, Sasaki M, Oguro T, Kuroiwa Y, Yoshida T : Induction of metallothionein synthesis by glutathione depletion after *trans*- and *cis*-stilbene oxide administration in rats. *Chem. Biol. Interact.* 1995, 98: 15-25.

Schallreuter KU, Lemke KR, Hill HZ, Wood JM : Thioredoxin reductase induction coincides with melanin biosynthesis in brown and black guinea pigs and in murine melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 1994 Dec;103(6):820-4.

Schallreuter KU, Wood JM : The role of thioredoxin reductase in the reduction of free radicals at the surface of the epidermis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986 Apr 29;136(2):630-7.

Schmidt CJ, Jubier MF, Hamer DH : Structure and expression of two human metallothionein-I isoform genes and a related pseudogene. *J Biol Chem.* 1985 Jun 25;260(12):7731-7.

Schmidt C, Beyrsmann D : Transient peaks and metallothionein levels during differentiation of 3T3L1 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999, 364 (1): 91-98.

Schürer N, Kohne A, Schliep V, Barlag K, Goerz G : Lipid composition and synthesis of HaCaT cells, an immortalized human keratinocyte line, in comparison with normal human adult keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 1993, 4 :179-185.

Schwartz MA, Lazo JS, Yalowich JC, Allen WP, Whitmore M, Bergonia HA, Tzeng E, Billiard TR, Robbins PD, Lancaster JR, Pitt BR : Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA-damaging effects of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995, 92 :4452-4456.

Setlow RB :The wavelength in sunlight effective in producing skin cancer : a theoretical analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1974, 71: 3363-3366.

Shih MK, Hu ML : UVA-potentiated damage to calf thymus DNA by Fenton reaction system and protection by para-aminobenzoic acid. *Photochem Photobiol.* 1996 Mar;63(3):286-91.

Shimura K, Kasai H, Sasaki A, Sugimura H, Yokota J : 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) DNA glycosylase and AP lyase activities of hOGG1 protein and their substrate specificity. *Mutat Res.* 1997 Oct;385(1):75-82.

Shopsis C, Mackay GJ : Semi automated assay for cell culture. *Anal. Biochem.* 1984, 140 :104-107.

Shworak NW, O'Connor T, Wong NC, Gedamu L : Distinct TATA motifs regulate differential expression of human metallothionein I genes MT-IF and MT-IG. *J Biol Chem.* 1993 Nov 15;268(32):24460-6.

Soumillion A, Van Damme J, De Ley M : Cloning and specific polymerised-chain-reaction amplification of a third charge-separable human metallothionein isoform. *Eur J Biochem.* 1992 Nov 1;209(3):999-1004.

Stankiewicz AJ, Falchuk KH, Vallee BL : Composition and structure of zinc-deficient *Euglena gracilis* chromatin. *Biochemistry*, 1983, 22 :5150-5156.

Stennard FA, Holloway AF, Hamilton J, West AK : Characterisation of six additional human metallothionein genes. *Biochim Biophys Acta*. 1994 Aug 2;1218(3):357-65.

Stralin P, Marklund SL : Effects of oxidative stress on expression of extracellular superoxide dismutase, CuZn-superoxide dismutase and Mn-superoxide dismutase in human dermal fibroblasts. *Biochem J*. 1994 Mar 1;298 (Pt 2):347-52.

Sugasawa K, Ng JM, Masutani C, Iwai S, van der Spek PJ, Eker AP, Hanaoka F, Bootsma D, Hoeijmakers JH : Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell*. 1998 Aug;2(2):223-32.

Sweder KS, Hanawalt PC : Preferential repair of cyclobutane pyrimidine dimers in the transcribed strand of a gene in yeast chromosomes and plasmids is dependent on transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Nov 15;89(22):10696-700.

Takafumi O, Cerutti PA : Differential effects of glutathione depletion and metallothionein induction on the induction of DNA single-strand breaks and cytotoxicity by tert-butyl hydroperoxide in cultured mammalian cells. *Chem. Biol. Interact*. 1989, 72(3): 335-345.

Tarnag DC, Huang TP, Wei YH, Liu TY, Chen HW, Wen Chen T, Yang WC : 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine of leukocyte DNA as a marker of oxidative stress in chronic hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis*. 2000 Nov;36(5):934-44.

Thomas JP, Maiorino M, Ursini F, Girotti AW : Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. In situ reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *J Biol Chem*. 1990 Jan 5;265(1):454-61.

Thornalley PJ, Vasak M : Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radical. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 827: 36-44.

Tijsterman M, Verhage RA, van de Putte P, Tasseron-de Jong JG, Brouwer J : Transitions in the coupling of transcription and nucleotide excision repair within RNA polymerase II-transcribed genes of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Jul 22;94(15):8027-32.

Tyrrell RM, Keyse SM : New trends in photobiologie. The interaction of UVA radiation with cultured cells. Photochem. Photobiol. B :Biol. 1990, 4 :349-361.

Tyrrell RM, Keyse SM : New trends in photobiology. The interaction of UVA radiation with cultured cells. J Photochem Photobiol B. 1990 Mar;4(4):349-61. Review.

Tyrrell RM, Pidoux M : Endogenous glutathione protects human skin fibroblasts against the cytotoxic action of UVB, UVA and near-visible radiations. Photochem Photobiol. 1986 Nov;44(5):561-4.

Tyrrell RM : UVA(320-380 nm) radiation as an oxidative stress. Dans « Oxydative stress : oxidant and antioxidants » H. Sies (eds), Academic Press, 1991, pp 57-83.

Umar A, Buermeier AB, Simon JA, Thomas DC, Clark AB, Liskay RM, Kunkel TA : Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. Cell. 1996 Oct 4;87(1):65-73.

Van Weelden H, De Gruijl FR van der Leun JC : Carcinogenesis by UVA, with an attempt to assess the carcinogenic risks of tanning with the UVA and UVB. In « The photobiologic effects of UVA radiation » Urbach F, Gange RW (eds), New-York, Praeger Publishers, 1986, pp 137-146.

Venema J, van Hoffen A, Karcagi V, Natarajan AT, van Zeeland AA, Mullenders LH : Xeroderma pigmentosum complementation group C cells remove pyrimidine dimers selectively from the transcribed strand of active genes. Mol Cell Biol. 1991 Aug;11(8):4128-34.

Verhaegh G, Parat MO, Richard MJ, Hainaut P : Modulation of p53 protein conformation and DNA-binding activity by intracellular chelator of zinc. *Mol. Carcinogenesis*, 1998, 21: 205-214

Voehringer DW, McConkey DJ, McDonnell TJ, Brisbay S, Meyn RE : Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 17;95(6):2956-60.

Waters TR, Gallinari P, Jiricny J, Swann PF : Human thymine DNA glycosylase binds to apurinic sites in DNA but is displaced by human apurinic endonuclease 1. *J Biol Chem*. 1999 Jan 1;274(1):67-74.

Woo ES, Kondo Y, Watkins SC, Hoyt DG, Lazo JS : Nucleophilic distribution of metallothionein in human tumor cells. *Exp. Cell. Res*. 1996, 224: 365-371.

Xu YJ, Kim EY, Demple B : Excision of C-4'-oxidized deoxyribose lesions from double-stranded DNA by human apurinic/apyrimidinic endonuclease (Ape1 protein) and DNA polymerase beta. *J Biol Chem*. 1998 Oct 30;273(44):28837-44.

Yasui A, Eker AP, Yasuhira S, Yajima H, Kobayashi T, Takao M, Oikawa A : A new class of DNA photolyases present in various organisms including aplacental mammals. *EMBO J*. 1994 Dec 15;13(24):6143-51.

Zachara BA : Mammalian selenoproteins. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis*. 1992 Sep;6(3):137-51.

Zeng J, Heuchel R, Schaffner W, Kägi JHR : Thionein (apometallothionein) can modulate DNA binding and transcription activation by zinc finger containing factor Sp1. *FEBS Lett* . 1991, 279(2): 310-312.

Zeng J, Vallee BL, Kägi JHR : Zinc transfer from transcription factor IIIA fingers to thionein clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991, 88: 9984-9989.

CONCLUSION

THESE SOUTENUE PAR : Jourdan Eric

TITRE : Les métallothionéines : protéines inductibles sous irradiation ultraviolette

Les MT sont de petites protéines, riches en groupement thiol, exprimées constitutivement dans les kératinocytes des couches supérieures de la peau. Leur rôle physiologique principal est de réguler l'homéostasie intracellulaire du zinc et du cuivre. En revanche leur capacité à être induite par de nombreux stimuli sous-entend une fonction dans les processus adaptatifs suite à un stress. Il apparaît que le rôle de ces protéines a longtemps été sous estimé, de part le manque de techniques sensibles permettant leur détection.

Les études actuelles confirment l'importance de ces protéines dans l'adaptation cellulaire lors d'un stress physique ou chimique, bien que le mode d'action des MT soit encore mal compris.

Les travaux précédemment réalisés au laboratoire ont démontré le rôle clef du zinc en photoprotection, notamment la protection de l'ADN suite à une irradiation UVB ou UVA, et aussi une augmentation des lésions de l'ADN induites par les UV dans des cellules déplétées en zinc.

L'objectif de notre travail a été d'évaluer la place des MT dans la photoprotection zinc dépendante.

Nous avons étudié l'expression de cette protéine en fonction des apports en zinc et avons corrélé cette expression à l'effet génoprotecteur du zinc. Nous avons observé une corrélation entre la cinétique d'expression des MT et la diminution des lésions de l'ADN suite à l'irradiation de cellules traitées par le Zn.

Le blocage de la transcription, lors de la supplémentation des cellules en zinc, a permis de démontrer que la génoprotection zinc dépendante est due à un mécanisme inductible.



Par immunocytochimie nous avons observé l'induction et la redistribution nucléaire des MT suite à un apport de zinc. Cette présence dans le noyau permet d'augmenter les défenses antioxydantes nucléaire.

De plus nous avons montré que l'irradiation en simulateur solaire permet l'induction et la redistribution des MT vers le noyau.

Tous ces résultats sont autant de facteurs mettant en évidence que l'effet protecteur du zinc serait médié en partie par l'induction des MT.

La relation entre GSH et MT est une question non résolue à l'heure actuelle. Nous avons donc étudié ce lien.

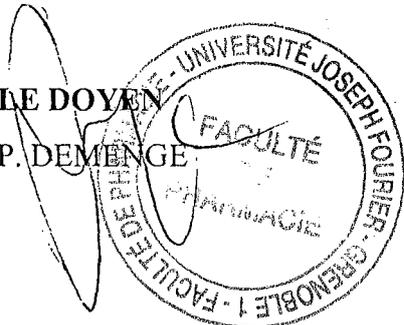
Nos résultats montrent premièrement, que la synthèse des MT dans les cellules HaCaT est indépendante du taux intracellulaire en GSH, et deuxièmement, que l'induction des MT dans les cellules HaCaT déplétées en GSH permettait de conserver un effet génoprotecteur du zinc.

Ce travail démontre que les MT participent à l'effet génoprotecteur du zinc.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le **20 DEC. 2000**

LE DOYEN
P. DEMENGE



LE PRESIDENT DE THESE

LABORATOIRE DE BIOLOGIE
DU STRESS OXYDANT

Alain FAVIER
Professeur des Universités



Serment des Apothicaire

Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



RESUME :

Les MT sont de petites protéines, riches en groupement thiol, exprimées constitutivement dans les kératinocytes des couches supérieures de la peau. Leur rôle physiologique principal est de réguler l'homéostasie intracellulaire du zinc et du cuivre.

En revanche leur capacité à être induite par de nombreux stimuli sous-entend une fonction dans les processus adaptatifs suite à un stress. Il apparaît que le rôle de ces protéines a longtemps été sous estimé, de part le manque de techniques sensibles permettant leur détection.

Les études actuelles confirment l'importance de ces protéines dans l'adaptation cellulaire lors d'un stress physique ou chimique, bien que le mode d'action des MT soit encore mal compris.

Les travaux précédemment réalisés au laboratoire ont démontré le rôle clef du zinc en photoprotection, notamment la protection de l'ADN suite à une irradiation UVB ou UVA, et aussi une augmentation des lésions de l'ADN induites par les UV dans des cellules déplétées en zinc.

L'objectif de notre travail a été d'évaluer la place des MT dans la photoprotection zinc dépendante.

Nous avons étudié l'expression de cette protéine en fonction des apports en zinc et avons corrélé cette expression à l'effet génoprotecteur du zinc. Nous avons observé une corrélation entre la cinétique d'expression des MT et la diminution des lésions de l'ADN suite à l'irradiation de cellules traitées par le Zn.

Le blocage de la transcription, lors de la supplémentation des cellules en zinc, a permis de démontrer que la génoprotection zinc dépendante est due à un mécanisme inductible.

Par immunocytochimie nous avons observé l'induction et la redistribution nucléaire des MT suite à un apport de zinc. Cette présence dans le noyau permet d'augmenter les défenses antioxydantes nucléaire.

De plus nous avons montré que l'irradiation en simulateur solaire permet l'induction et la redistribution des MT vers le noyau.

La relation entre GSH et MT est une question non résolue à l'heure actuelle. Nous avons donc étudié ce lien.

Nos résultats montrent premièrement, que la synthèse des MT dans les cellules HaCaT est indépendante du taux intracellulaire en GSH, et deuxièmement, que l'induction des MT dans les cellules HaCaT déplétées en GSH permettait de conserver un effet génoprotecteur du zinc.

Ce travail démontre que les MT participent à l'effet génoprotecteur du zinc.

MOTS CLES :

Métallothioneine, Zinc, ADN, Ultraviolets

JURY :

Président : Monsieur le Professeur Alain Favier

Membres : Monsieur le Professeur Jean-Claude Beani

Madame le Docteur Pascale Guiraud

Madame le Docteur Marie-Jeanne Richard (directeur de thèse)

DATE DE SOUTENANCE : Le 23 Janvier 2001