



HAL
open science

Étude in vitro de la phototoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) : application à l'anthracène

Xavier Sentenac

► **To cite this version:**

Xavier Sentenac. Étude in vitro de la phototoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) : application à l'anthracène. Sciences pharmaceutiques. 1999. dumas-01567799

HAL Id: dumas-01567799

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01567799>

Submitted on 24 Jul 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>



2^e exemplaire

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

7077

Année 1999

**Etude *in vitro* de la phototoxicité des Hydrocarbures Aromatiques
Polycycliques (HAP):
Application à l'Anthracène**

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
PHARMACIE INDUSTRIELLE ET BIOLOGIE MEDICALE (P.I.B.M)**

Conformément aux dispositions du décret n° 88-996
du 19 octobre 1988, tient lieu de

THESE D'EXERCICE

Présenté à: GRENOBLE

et soutenu publiquement le: 2 juin 1999

pour obtenir le grade de **DOCTEUR EN PHARMACIE**

par **SENTENAC Xavier**

[Données à caractère personnel]

JURY

Président : Monsieur le Professeur A. Favier

Membres : Monsieur le Professeur J. Calop
Monsieur le Professeur G. Blake
Madame le Docteur P. Guiraud (Directeur de thèse)

**UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE**

Année 1999

**Etude *in vitro* de la phototoxicité des Hydrocarbures Aromatiques
Polycycliques (HAP):
Application à l'Anthracène**

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE
PHARMACIE INDUSTRIELLE ET BIOLOGIE MEDICALE (P.I.B.M)**

Conformément aux dispositions du décret n° 88-996
du 19 octobre 1988, tient lieu de

THESE D'EXERCICE

Présenté à: GRENOBLE

et soutenu publiquement le: 2 juin 1999

pour obtenir le grade de **DOCTEUR EN PHARMACIE**

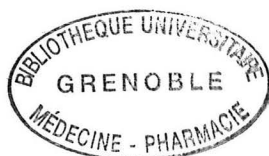
par **SENTENAC Xavier**

[Données à caractère personnel]

JURY

Président : Monsieur le Professeur A. Favier

Membres : Monsieur le Professeur J. Calop
Monsieur le Professeur G. Blake
Madame le Docteur P. Guiraud (Directeur de thèse)



A Monsieur le Professeur A. FAVIER, président du jury,

Qui nous a permis d'effectuer ce travail dans son laboratoire et a su nous conseiller par son expérience et ses compétences.

Qu'il nous permette d'exprimer ici le témoignage de notre profonde gratitude et de notre grande admiration.

A Monsieur le Professeur J. CALOP

Nous avons pu apprécier, au cours de nos études, la qualité de son enseignement, sa rigueur et son dynamisme.

Nous tenons à le remercier et à l'assurer de notre grand respect.

A Monsieur le Professeur G. BLACKKE

Qui nous a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail, qu'il en soit ici vivement remercié.

A Madame le Docteur P. GUIRAUD

Qui a accepté de diriger ces travaux et nous a fait partager ses connaissances et sa bonne humeur pour la contribution à ce travail.

Qu'elle veuille accepter ici nos sincères remerciements

Nous tenons à remercier les techniciennes du laboratoire de Biochimie C pour leur gentillesse et leur aide et pour nous avoir patiemment supporté tout au long des manipulations.

A tous mes Amis et en particulier Sophie

Qui ont toujours été présents, m'ont soutenu et encouragé

Qu'ils en soient remerciés

OBJECTIF DU MÉMOIRE:	3
INTRODUCTION:	4
LES FORMES REACTIVES DE L'OXYGÈNE	5
LA MOLÉCULE D'OXYGÈNE.....	5
DÉFINITION DES RADICAUX LIBRES.....	5
LES DIFFÉRENTS TYPES DE RADICAUX LIBRES OXYGÉNÉS (RLO) ET LES FORMES RÉACTIVES DE L'OXYGÈNE.....	6
<i>L'anion superoxyde : $O_2^{\cdot -}$</i>	6
<i>Le peroxyde d'hydrogène : H_2O_2</i>	6
<i>Le radical hydroxyle : OH^{\cdot}</i>	6
<i>L'oxygène singulet : 1O_2</i>	7
PRODUCTION BIOLOGIQUE DE RADICAUX LIBRES DE L'OXYGÈNE.....	7
DEVENIR DES RADICAUX LIBRES DE L'OXYGÈNE.....	9
ALTÉRATION DES PROTÉINES	9
<i>Oxydation de la chaîne peptidique</i>	10
<i>Oxydation des chaînes latérales des acides aminés</i>	11
<i>Carbonylation des protéines</i>	12
<i>Conséquences de l'attaque radicalaire des protéines</i>	12
ALTÉRATION DES ACIDES NUCLÉIQUES	14
PEROXYDATION DES LIPIDES MEMBRANAIRES	15
MÉCANISME DE LA LIPOPEROXYDATION.....	15
<i>Initiation</i>	15
<i>Propagation</i>	16
<i>Terminaison</i>	17
EFFETS DE LA PEROXYDATION DES MEMBRANES LIPIDIQUES.....	17
PRODUITS DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE.....	18
<i>Les diènes conjugués</i>	18
<i>Les hydroperoxydes</i>	18
<i>Les alcanes</i>	18
<i>Le malondialdéhyde (MDA)</i>	18
QUANTIFICATION DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE.....	19
SYSTÈMES DE DÉFENSE NATURELLE CONTRE LES FORMES RÉACTIVES DE L'OXYGÈNE	19
SYSTÈMES ANTI-RADICALAIRES ENZYMATIQUES.....	19
<i>Les superoxydes dismutases (SOD)</i>	20
<i>La catalase</i>	20
<i>Les glutathions peroxydases</i>	21
LES SYSTÈMES DE DÉFENSE NON ENZYMATIQUES.....	22
<i>Les vitamines</i>	22
CONSÉQUENCES CELLULAIRES	23
LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES	26
ACTIVATION EN DIOLS ÉPOXYDES :.....	32
ACTIVATION EN RADICAUX CATIONIQUES :.....	32
ACTIVATION EN O-QUINONES :.....	33
<i>La dihydrodiol déhydrogénase</i> :.....	33
<i>Propriétés des O quinones</i> :.....	34
L'ANTHRACÈNE:.....	36
MATERIEL ET METHODES :.....	38
ANTHRACÈNE: MISE EN SOLUTION ET CONDITIONS DE DÉCOMPOSITION PHOTOCHEMIQUE.....	38
<i>Solution d'anthracène</i> :.....	38
<i>Systèmes d'illumination</i> :.....	38

<i>Méthode:</i>	39
MISE EN ÉVIDENCE DE LA DÉGRADATION DE L'ANTHRACÈNE ET PRODUCTION DE RADICAUX LIBRES	39
<i>Chimiluminescence</i> :	39
<i>Résonance Paramagnétique Electronique (RPE)</i> :	40
<i>Suivi de dégradation de l'anthracène irradié par CLHP</i> :	42
MESURE DES EFFETS DES RADICAUX LIBRES SUR LES MACROMOLÉCULES:	43
<i>Mesure de la peroxydation lipidique: dosage du dialdéhyde malonique (MDA)</i>	44
<i>Etude de l'attaque radicalaire de l'acide désoxyribonucléique (ADN)</i>	46
ETUDE DE L'OXYDATION PROTÉIQUE:	48
<i>dosage des groupements carbonyles</i>	48
RESULTATS :	51
RADICAUX LIBRES GÉNÉRÉS PAR PHOTOCHEMIE DE L'ANTHRACÈNE:	51
<i>Etude de la dégradation de l'anthracène par HPLC</i> :	51
<i>Mesure par chimiluminescence</i> :	53
<i>Mesure par RPE:</i>	56
OXYDATION DES MACROMOLÉCULES	59
<i>Mesure de la peroxydation lipidique</i> :	59
<i>Mesure de la peroxydation protéique:</i>	64
<i>Etude des cassures de l'ADN</i> :	67
DISCUSSION :	71
CONCLUSION:	78
BIBLIOGRAPHIE :	81
ANNEXES:	89
ANNEXES 1: DOSAGE DES MDA	89
ANNEXES 2: GELS D'AGAROSE	91
ANNEXES 3: DOSAGE DES CARBONYLES	93
ANNEXES 4 :DOSAGE DES THIOLS	96

Objectif du mémoire:

L'objectif de notre travail est d'étudier les effets de l'anthracène (ANT) *in vitro* sur des macromolécules biologiques, lipides, protéines, acides nucléiques, afin d'établir des modèles d'étude des composés toxiques environnementaux.

Notre hypothèse de travail est basée sur la formation de radicaux libres après photooxydation de l'anthracène. Ces radicaux libres de l'oxygène et/ou les radicaux organiques sont capables d'altérer les macromolécules biologiques et de conduire ultérieurement à la mort ou à la transformation de la cellule.

INTRODUCTION:

Les problèmes de pollution de l'environnement sont de plus en plus présents en cette fin de siècle. La protection de l'environnement devient un souci majeur pour les gouvernements et de plus en plus pour les industriels pour qui l'image de marque auprès du public est fondamentale.

Il en résulte la mise en place de commissions et d'agences, comme l'Environmental Pollution Agency (EPA) aux Etats-Unis, chargées d'établir des listes de polluants ainsi que de fixer les seuils limites à ne pas dépasser dans l'eau, l'air, le sol (52). De plus en plus, on se tourne vers une évaluation du risque avec une définition du risque acceptable (69).

Cependant, pour définir de tels critères, il est nécessaire de procéder à de nombreux tests sur la substance incriminée. C'est le cas de la famille des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) présents dans l'environnement.

Une première approche consiste en l'étude de la relation structure / activité par analogie avec d'autres composés de toxicité connue, mais cela reste purement théorique (99).

La majorité des tests effectués sont des tests *in vitro* avec reconstitution d'un écosystème et étude de l'impact de l'HAP sur différents organismes. Ces tests ne permettent pas d'étudier le mécanisme d'action (101).

Systématiquement, est fait un test de mutagénicité, de type Ames, qui hélas ne prend pas en compte des métabolites éventuels ou d'autres formes de toxicité, notamment le stress oxydatif lié à une photoinduction.

C'est pourquoi il nous paraissait intéressant d'étudier l'action des HAP après photoinduction sur des macromolécules biologiques représentant des cibles potentielles au niveau cellulaire.

Le choix de l'HAP étudié s'est porté sur l'anthracène considéré comme non mutagène.

La première partie de ce mémoire se compose de rappels bibliographiques sur le stress oxydant, la formation de radicaux libres, et les HAP.

Dans une seconde partie nous développerons le travail de recherche effectué au sein du laboratoire, travail préliminaire donnant des pistes à suivre ultérieurement.

LES FORMES REACTIVES DE L'OXYGENE

La molécule d'oxygène.

L'oxygène moléculaire ou oxygène diatomique O_2 possède trois orbitales dans son état fondamental, possédant deux électrons non appariés sur ses orbitales externes. Il est paramagnétique et ne peut réagir avec des molécules diamagnétiques sans lever l'interdiction de spin (43).

De ce fait, l'oxygène moléculaire est une espèce peu réactive.

Sa conversion en une molécule réactive sous forme de singulet exige un changement de spin d'un électron célibataire ou une fragilisation de la liaison O-O. Cette conversion peut être obtenue dans les systèmes biologiques soit par des réactions photosensibilisées, le sensibilisateur étant un état électronique excité qui transfère de l'énergie à l'oxygène, soit par des réactions d'excitation chimiques ou enzymatiques n'impliquant pas la lumière.

Définition des radicaux libres.

Dans un composé stable, les électrons sont tous appariés deux à deux. Un radical libre peut donc se définir comme tout atome ou groupe d'atomes possédant un électron non apparié sur son orbitale externe (27).

Ce sont donc des corps instables, de durée de vie très courte, en moyenne 10^{-4} secondes, et présentant une extrême réactivité. En effet, s'ils ne sont pas éliminés très rapidement, ils vont réagir immédiatement avec des molécules environnantes afin de rattraper leur électron célibataire pour se stabiliser.

Les différents types de radicaux libres oxygénés (RLO) et les formes réactives de l'oxygène.

L'anion superoxyde : $O_2^{\circ-}$.

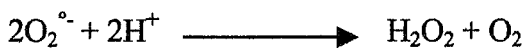
Il résulte de l'acceptation par une molécule d'oxygène à l'état fondamental d'un électron. Comme l'oxygène, l'anion superoxyde est paramagnétique.

C'est un oxydant ou un réducteur qui participe à des transferts d'électron (22).

Le peroxyde d'hydrogène : H_2O_2 .

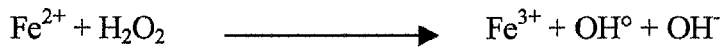
La réduction à un électron de l'anion superoxyde donne de l' $O_2^{\circ-}$ qui n'a plus d'électrons non appariés et n'est donc plus un radical. En milieu protique, il va former immédiatement H_2O_2 .

Dans les milieux biologiques, l'anion superoxyde subit une dismutation pour former le peroxyde d'hydrogène et l'oxygène moléculaire. Cette réaction est catalysée par la superoxyde dismutase et est considérée comme une défense naturelle contre la toxicité de l'anion superoxyde. Le peroxyde d'hydrogène n'est pas par lui-même un radical mais va pouvoir produire par réduction le radical hydroxyle.



Le radical hydroxyle : OH° .

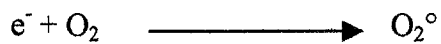
La fission homolytique de la liaison O-O du peroxyde d'hydrogène conduit à la production de deux radicaux OH° . L'homolyse peut s'effectuer par la chaleur ou des radiations ionisantes. En présence de Fer, le peroxyde d'hydrogène peut produire le radical hydroxyle par une suite de réactions non enzymatiques appelées réaction de FENTON.



Le radical hydroxyle est l'une des espèces chimiques les plus réactives connues. Son pouvoir oxydant est très puissant et lui permet de réagir avec pratiquement tous les substrats organiques (lipides, protéines, sucres, acides nucléiques), par arrachement d'un atome d'hydrogène ou par transfert de l'électron célibataire.

Schéma récapitulatif :

Réduction monovalente d'une molécule d'oxygène :



Dismutation de l'anion superoxyde :



Réaction de Fenton :



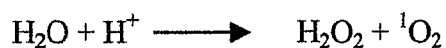
Régénération du Fe par l'anion superoxyde :



L'ensemble de ces réactions constitue le cycle d'Haber-Weiss

L'oxygène singulet : $^1\text{O}_2$.

L'oxygène singulet est formé par la dismutation spontanée des anions superoxydes selon les réactions suivantes : (28)



C'est une espèce très réactive et particulièrement instable.

Production biologique de radicaux libres de l'oxygène.

Les espèces réactives de l'oxygène résultent d'une réduction univalente ou divalente de l'oxygène moléculaire. Différents systèmes enzymatiques sont impliqués dans ce processus. Actuellement, il y a environ deux cents enzymes connues pour avoir l'oxygène moléculaire pour substrat. Les réactions qu'elles catalysent produisent soit l'anion superoxyde soit le peroxyde d'hydrogène. La réaction médiée par la cytochrome oxydase au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale permet la transformation de l'oxygène en eau par incorporation successive de quatre électrons. C'est la voie qui utilise plus de 95% de l'oxygène consommé par les cellules vivantes. Cependant, dans le métabolisme mitochondrial normal, environ 5% de l'oxygène suit la voie de réduction uni ou divalente après production d'espèces réactives. Les radicaux oxygénés peuvent donc provenir de différentes sources (27) (75) :

Sources endogènes		
RLO	Mécanismes	Localisation
O₂⁻	NADH déhydrogénase	Mitochondries
	Ubiquinone-cyt C réductase	Mitochondries
	NADPH-cyt P-450 réductase	Réticulum endoplasmique
	NADPH oxydase	Membrane cytoplasmique PMN, Cellule endothéliale
	Autoxydation: adrénaline, glutathion, vit C, flavines, dopamine, oxyhémoglobine	Cytoplasme
H₂O₂	Dismutation du superoxyde	Cytoplasme (ZnCuSOD)
	$2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$	Mitochondrie (MnSOD)
	Oxydation de substrats	Cytoplasme
	$AH + O_2 \longrightarrow A + H_2O_2$	
Sources exogènes		
	Oxygène	
O₂⁻	Oxygène Hyperbare	Mitochondrie
	Ischémie-Réoxygénation	Cytoplasme
	Radiation	
O₂⁻, ¹O₂	Rayonnements UV (Proche UV?)	
	Radiation gamma, Ultrasons	
	Toxiques	
O₂⁻	Adriamycine, ménadione,	Cytoplasme (cytochrome P 450)
	bléomycine	
	Paraquat, éthanol	
	Méthylglyoxal, tabac	
	Nitrés aromatiques	
	Benzopyrène	
	Polluants atmosphériques	
Amiante..		

Les différentes sources de radicaux libres dans une cellule (75)

- de réactions d'auto-oxydation avec les flavines, les quinones, les groupements thiols ou l'hémoglobine.

- de réactions enzymatiques : aldéhydes oxydases, NADPH Cyt P450 réductase, NADPH oxydase, xanthine oxydase, lipooxygénase.
- d'origines cellulaires comme les chaînes respiratoires mitochondriales, les microsomes, les macrophages au cours de la phagocytose, de l'agrégation plaquettaire, les cellules endothéliales.
- de facteurs environnementaux : Rayonnements Ultraviolets, ultrasons, radiations ionisantes, ions métalliques et xénobiotiques.

Devenir des radicaux libres de l'oxygène.

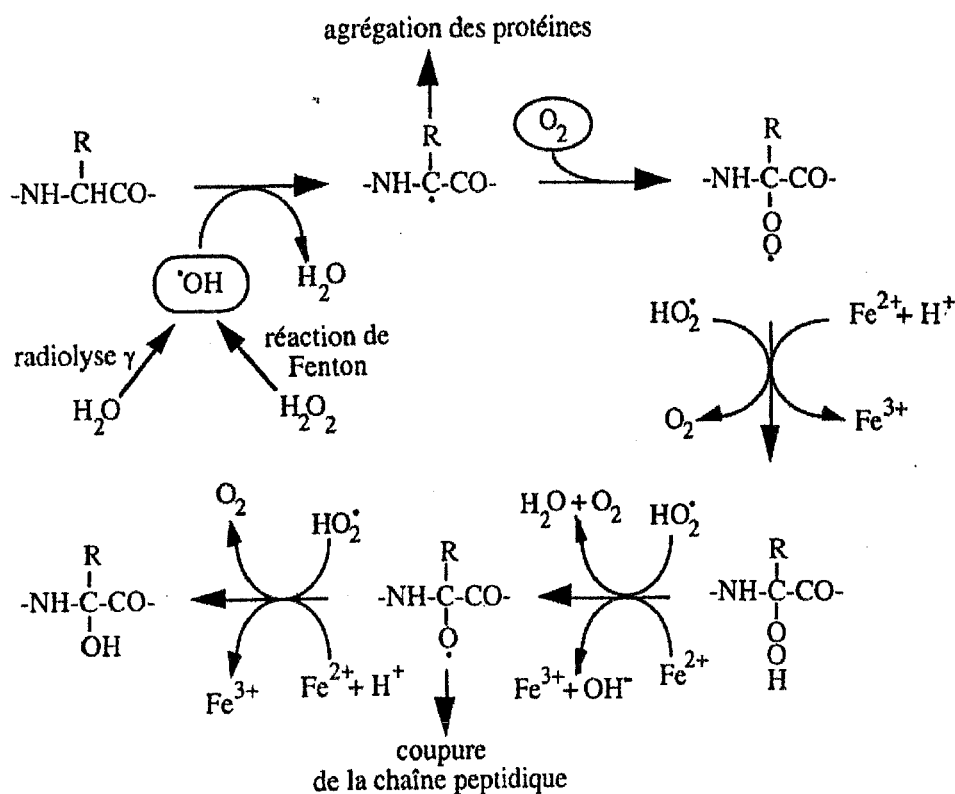
Outre l'interconversion chimique selon les réactions de Fenton et de Haber Weiss, plusieurs réactions enzymatiques interviennent dans la transformation des formes actives de l'oxygène, mettant en jeu plusieurs types d'enzymes (SOD, peroxydases, catalases). Ces formes actives de l'oxygène peuvent engendrer des effets tissulaires toxiques dès que les systèmes régulateurs de protection sont dépassés. Ceci par hyperproduction endogène lors de l'inflammation, hyperproduction exogène par les radiations et certains médicaments ou par diminution des systèmes de défense. Ces effets toxiques peuvent s'exercer aussi bien sur les acides nucléiques avec la formation de bases mutées, que sur les polysaccharides et les protéines par altération de la structure primaire modifiant les propriétés mécaniques ou fonctionnelles ou encore sur les lipides induisant alors des modifications structurales, altérations membranaires, etc...(34) (89)

Altération des protéines

De nombreuses études montrent que certaines protéines sont très sensibles à l'action de radicaux et semblent être de bons indicateurs de l'exposition au stress oxydatif. Les modifications des protéines débutent par l'action du radical OH° , le processus d'oxydation étant ensuite complété par l'oxygène, l'ion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène. Ces radicaux peuvent entraîner l'oxydation de la chaîne peptidique qui aboutit à l'agrégation des

protéines ou à leur fragmentation, selon que la réaction radicalaire initiée par OH^\bullet s'effectue en milieu anaérobie ou aérobie. Ces radicaux peuvent également oxyder les chaînes latérales des acides aminés. (91)

Oxydation de la chaîne peptidique



Oxydation de chaîne peptidique (Berlett et Stadtman, 1997)(8)

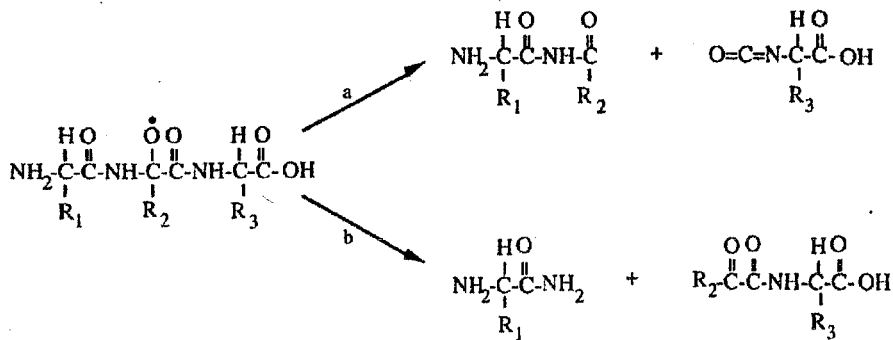
La réaction est initialisée par l'attaque de l'atome d'hydrogène en α d'un acide aminé par OH^\bullet pour former un radical centré sur le carbone. En absence d'oxygène, le radical centré sur le carbone est capable de réagir avec un autre radical centré sur le carbone et former des liaisons entre les protéines. Aussi, dans des conditions anaérobies, d'importantes quantités d'agrégats de haut poids moléculaire sont formées.

Par contre, en conditions aérobie, l'addition d'oxygène sur le radical centré sur le carbone entraîne la formation de composés suivants : un radical peroxy (ROO^\bullet), un hydroperoxyde (ROOH), un radical alcoyl (RO^\bullet) et finalement un dérivé hydroxylé de la protéine initiale (ROH). Ces différentes espèces radicalaires peuvent à leur tour réagir avec un autre acide

aminé de la molécule ou d'une protéine différente pour former un nouveau radical centré sur le carbone. (8)

Il faut remarquer que l'oxydation des protéines catalysée par des métaux diffère de l'oxydation par les radiations. Seuls quelques acides aminés d'une protéine donnée sont modifiés par les métaux alors que tous les acides aminés sont susceptibles d'être oxydés par les RLO. La modification des protéines catalysée par des métaux est relativement insensible à l'inhibition par des piègeurs de radicaux libres. Les réactions catalysées par des métaux sont des processus site spécifique dans lesquels les acides aminés proches des sites de liaison aux métaux sont des cibles privilégiées.

La production de radicaux alcoyles peut entraîner la coupure de la chaîne peptidique soit par la voie de la diamidation, soit par la voie de l' α -amidation (figure ci dessous)



Coupure de la chaîne peptidique (Berlett et Stadtman, 1997)(8)

Lors du clivage de la voie de diamidation, le fragment peptidique dérivé de la partie N terminale de la protéine initiale présente dans sa partie C terminale une structure diamide, l'autre fragment présentant une structure d'isocyanate. Dans la voie d' α -amidation, le fragment issu de la partie C terminale est un dérivé N- α -kétacyle, l'autre fragment possède un groupement amide.

Oxydation des chaînes latérales des acides aminés

Les résidus cystéines et méthionines sont particulièrement sensibles à l'oxydation par presque tous les RLO. Les cystéines sont converties en disulfures et les méthionines en méthionine sulfoxyde (MeSox) même sous des conditions modérées d'oxydation. La plupart des systèmes biologiques contiennent des disulfures réductases et des MeSox réductases qui régénèrent les

thiols. Ce procédé pourrait avoir un rôle en tant que piègeur de RLO et empêcher que ceux ci puissent avoir un rôle plus délétère sur d'autres acides aminés. (55)

De la même façon, dans un stress oxydatif, les groupements thiols des protéines peuvent former une liaison disulfure avec des thiols de faible poids moléculaire comme le glutathion, la cystéine, l'homocystéine et la cystéamine. Cette réaction appelée S thiolation est un phénomène réversible, la déthiolation faisant intervenir un système réducteur comme le glutathion réduit ou le NADPH. Certaines méthodes de mesure de l'oxydation des protéines sont ainsi basées sur le dosage des groupements thiols restés libres. (94)

Les acides aminés qui présentent des groupements aromatiques sont des sites privilégiés pour l'attaque des RLO. La formation de bityrosine peut se produire à l'intérieur d'une molécule ou entre deux molécules.

Carbonylation des protéines

Des groupements carbonylés (cétones ou aldéhydes) peuvent être introduits dans les protéines lors d'un stress oxydatif, non seulement lors de la coupure de la chaîne par la voie de l' α -amidation mais aussi lors de l'oxydation des chaînes latérales de certains acides aminés (lysine, arginine, proline). De plus, la réaction des protéines avec les aldéhydes produits lors de la peroxydation lipidique entraîne la formation de groupements carbonylés dans les protéines (33). La liaison des produits d'oxydation des sucres avec les résidus lysines des protéines (glycation et glycoxylation) produit également des groupements carbonylés (6).

Par conséquent, la carbonylation des protéines est un bon marqueur de l'oxydation protéique par les RLO, retrouvée dans un certain nombre de maladies comme la maladie d'Alzheimer (90) et la polyarthrite rhumatoïde (19).

Conséquences de l'attaque radicalaire des protéines

L'altération des protéines par les RLO peut provoquer la formation de dimères ou d'agrégats protéiques mais aussi le clivage des protéines en fonction des conditions d'oxygénation.

De plus, même après une modification oxydative très limitée, l'altération des protéines peut induire une modification de leur structure conformationnelle (35) et leur inactivation enzymatique (92).

L'accumulation des protéines oxydées reflète non seulement le taux d'oxydation des protéines mais aussi le taux de dégradation des protéines oxydées. Il existe souvent une

susceptibilité accrue à l'hydrolyse enzymatique par les protéases (23) Cependant, dans certains cas comme l'oxydation des protéines par les produits de la peroxydation lipidique, celles ci peuvent devenir résistantes à la protéolyse (10).

La peroxydation protéique peut donc être quantifiée par le dosage des groupements carbonyles ou des groupements thiols.

Altération des acides nucléiques

L'action des radicaux libres sur l'ADN a surtout été étudiée dans le cadre des actions toxiques des radiations : rayonnements ionisants, réactions de photosensibilisation et de photoionisation (14) (13). Au niveau cellulaire, de part leur action cancérigène, les UVA font actuellement l'objet de nombreux travaux. En effet, une partie de la toxicité de ces derniers serait due à une production intermédiaire d'eau oxygénée (64).

Les lésions dépendantes de l'oxygène pouvant se produire au niveau de l'ADN sont nombreuses : coupures de chaînes, formation de dimères cyclobutaniques, oxydation des bases puriques et pyrimidiques, pontages protéines nucléobases, réactions avec des photosensibilisateurs et formation ultérieure d'oxygène singulet et de peroxyde ROO° (96).

D'autre part, les produits de la peroxydation lipidique sont eux-mêmes capables d'interagir avec l'ADN et peuvent conduire à la formation de coupures double brin et mono brin.

L'ensemble de ces lésions oxydatives de l'ADN peut conduire à des anomalies de la multiplication cellulaire, de la synthèse protéique et de la transmission du message génétique. Mais des systèmes de réparation puissants assurent la conservation du génome (80,75).

L'identification et la mesure des bases oxydées de l'ADN dans des modèles acellulaires est actuellement bien maîtrisée mais son application à des modèles cellulaires est plus complexe étant donné la sensibilité requise pour une telle mesure (1 lésion pour 10^5 - 10^6 bases dans la plupart des cas). Ces méthodes nécessitent une extraction de l'ADN suivie d'une hydrolyse enzymatique. Le matériel le plus souvent utilisé reste la chromatographie liquide ou gazeuse couplée à un détecteur électrochimique ou un spectromètre de masse. Un des problèmes reste l'autooxydation de l'ADN lors de la silylation (13,12).

La détection de bases modifiées peut également se faire sur ADN intact. Les lésions sont alors mesurées par l'activité de coupures d'enzymes de réparation ou par des méthodes immunologiques. Parmi celles ci, les plus utilisées sont le dosage radioimmunologique (RIA) et le dosage enzymoimmunologique en phase solide (ELISA). Les deux méthodes nécessitent des anticorps mono ou polyclonaux. La modification contre laquelle est dirigé l'anticorps est appelée haptène. La technique est basée sur la capacité de la lésion contenue dans l'échantillon d'inhiber la fixation de l'antigène sur des anticorps marqués.

La reconnaissance des lésions de l'ADN oxydé par des enzymes de réparation (endonucléase) purifiées peut aussi être utilisée pour quantifier les lésions. Ces enzymes sont capables d'exciser spécifiquement certaines bases modifiées. Il en résulte des sites abasiques qui peuvent être convertis de façon quantitative en coupures de chaînes et quantifiés après électrophorèse sur gel d'agarose.

Les cassures de chaîne de l'ADN étant considérées comme parmi les plus importantes lésions provoquant des mutations, des aberrations chromosomiques, il paraissait nécessaire de les quantifier. Différentes méthodes *in vivo* et *in vitro* permettent après électrophorèse sous conditions alcalines ou neutres de visualiser les cassures par du bromure d'éthidium. Les différentes proportions d'ADN (circulaire, linéaire, surenroulé pour une méthode *in vitro* par rapport à un plasmide de référence, importance de la traînée en direction de l'anode pour les méthodes *in vivo*) permettent de quantifier les lésions de l'ADN.

Peroxydation des lipides membranaires

L'oxydation des lipides alimentaires est connue depuis longtemps. Il en résulte une modification de l'odeur, de la sapidité, et des qualités nutritives. De même, les lipides des organismes vivants sont particulièrement sensibles à l'oxydation et surtout ceux qui constituent les membranes cellulaires (acides gras polyinsaturés).

Les formes les plus réactives de l'oxygène peuvent initier directement la peroxydation lipidique : l'oxygène singulet attaque les doublets électroniques libres et le radical hydroxyle attaque la plupart des composés organiques (42).

Mécanisme de la lipoperoxydation

Initiation

La peroxydation est initiée par l'arrachement d'un atome d'hydrogène au niveau du groupement méthylène de la molécule lipidique suite à l'attaque par une espèce radicalaire suffisamment réactive.

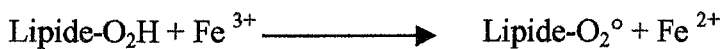
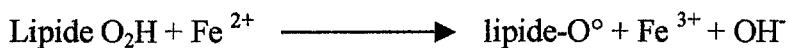
L'électron célibataire restant sur l'atome de carbone va chercher à se stabiliser par des réarrangements moléculaires internes, donnant des diènes conjugués, qui vont réagir avec l'oxygène moléculaire pour former le radical peroxyde (lipide-O₂[°]) (25).

Le radical ainsi formé est instable et va réagir avec un atome d'hydrogène d'une autre molécule lipidique pour donner des hydroperoxydes (ROOH).

Propagation

Les hydroperoxydes lipidiques sont relativement stables aux températures physiologiques. Néanmoins, les métaux de transition peuvent catalyser leur décomposition et contribuer à la propagation de la peroxydation lipidique dans la membrane.

Les complexes de fer ferreux réagissent avec les hydroperoxydes pour former des radicaux alkoxydes (lipide-O[°]) selon la réaction suivante :



Les radicaux alkoxydes et peroxydes formés stimulent la réaction de peroxydation lipidique en chaîne en arrachant d'autres atomes d'hydrogène à d'autres molécules lipidiques .

Au cours du processus de la peroxydation lipidique, l'arrachement d'un atome d'hydrogène au groupement méthylène situé entre les doubles liaisons en cis est thermodynamiquement favorable par rapport au reste de la chaîne. Cela explique pourquoi les acides gras polyinsaturés sont plus sensibles à la peroxydation (20).

Les hydroperoxydes formés peuvent évoluer de façons différentes :

1. Dégradation en différents produits et plus particulièrement en aldéhydes comme le malondialdéhyde ou le 4-hydroxynonéal.
2. Reconversion en RO[°] (en présence de fer) et entretien du processus peroxydatif.

Terminaison

La réaction en chaîne s'arrête lorsque deux radicaux libres appartenant ou non à la molécule interagissent pour former une molécule stable. La réaction est également freinée par la rencontre de piègeurs de radicaux libres tel que la vitamine E membranaire, ou par des pontages qui s'établissent entre les protéines membranaires et le malondialdéhyde.

Effets de la peroxydation des membranes lipidiques :

(27)

1. Altération de la bicouche phospholipidique
 - Diminution de la fluidité.
 - Augmentation de la charge négative de surface entraînant une perte de la stabilité électrique et un accroissement de la perméabilité.
2. Altération des membranes des organites cellulaires.
 - Inactivation des enzymes membranaires.
 - Oxydation des groupements thiols augmentant la perméabilité.
 - Gonflement des mitochondries.
 - Découplage de l'oxydation phosphorylation.
 - Inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale.
 - Décharges d'enzymes lysosomiales.
 - Activation des phospholipases membranaires.
3. Altération du métabolisme :
 - Destruction des tocophérols, thiols, stéroïdes et de la thyroxine.
 - Redistribution des ions.
 - Inhibition de la motilité cellulaire, ralentissement de la division cellulaire.

Produits de la peroxydation lipidique.

(25)

Les diènes conjugués.

Ils se forment à la suite de l'attaque de l'acide gras par un radical et du réarrangement qui s'en suit en vue d'une meilleure stabilité.

Une molécule d'oxygène peut facilement se fixer sur le diène pour former un radical peroxy.

Les hydroperoxydes.

Ils sont formés par la greffe d'un hydrogène sur le radical peroxy, ce qui les rend plus stable que leurs précurseurs.

Les alcanes.

L'éthane a été rapporté comme étant le produit ultime de la peroxydation lipidique. Il est utilisé avec d'autres alcanes (hexane, pentane) pour estimer la vitesse de la peroxydation chez l'animal.

Le malondialdéhyde (MDA).

Il provient en grande partie de la peroxydation lipidique mais aussi peut provenir du métabolisme de la cyclooxygénase. Il constitue le marqueur le plus utilisé pour évaluer la peroxydation lipidique *in vivo* (45).

La formation de dérivés d'oxydation, plus hydrophiles, dans les bicouches lipidiques, entraîne des perturbations de la microarchitecture membranaire et altère les fonctions des enzymes et des transporteurs (18). De plus, l'autocatalyse de la peroxydation peut aboutir à la formation

de concentrations élevées de dérivés d'oxydation qui altèrent la perméabilité membranaire. De telles perturbations peuvent être retrouvées dans diverses pathologies : Vasculaires (ischémie, infarctus), musculaires, hépatiques, certains syndromes hémolytiques, toxicité de certains médicaments, vieillissement, cancérogenèse et mutagenèse (27).

Quantification de la peroxydation lipidique.

La détection et la mesure de l'intensité de la peroxydation lipidique sont possibles aussi bien *in vivo* que *in vitro* et diverses méthodes peuvent être utilisées. Elles peuvent être divisées en plusieurs catégories en fonction de l'étape biochimique qu'elles explorent (20):

- Mesure de la disparition des acides gras polyinsaturés.
- Suivi de la formation des diènes et triènes conjugués en mesurant l'absorbance du milieu dans l'UV (méthode limitée par son peu de spécificité)
- Dosage des hydroperoxydes organiques (HPO).
- Dosage du malondialdéhyde par la méthode de l'acide thiobarbiturique.
- Mesure des hydroperoxydes gazeux produits.
- Mesure des fonctions carbonyles formées dans les résidus acyles des phospholipides membranaires après peroxydation.

Systèmes de défense naturelle contre les formes réactives de l'oxygène.

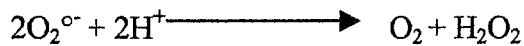
L'organisme est doté de systèmes régulateurs puissants pour faire face à une surproduction ponctuelle de radicaux libres. Ces systèmes de protection peuvent être divisés en deux groupes : enzymatiques et non enzymatiques.

Systèmes anti-radicalaires enzymatiques.

Dans la phase aqueuse des cellules, plusieurs systèmes enzymatiques sont présents afin de protéger l'intégrité fonctionnelle et structurale de la cellule face à la production de radicaux libres. Deux familles d'enzymes assurent l'essentiel de cette protection : les superoxydes dismutases et les reductases.

Les superoxydes dismutases (SOD).

Ces enzymes catalysent la dismutation de l'ion superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène :



La vitesse de dismutation est fortement accélérée par l'enzyme (10^9). Deux types de SOD ont été mis en évidence dans la cellule : la SOD cuivre-zinc présente dans le cytosol et la SOD manganèse localisée dans les mitochondries (24).

La présence de métaux de transition au niveau du site actif de ces enzymes est indispensable à leur action en leur permettant d'effectuer des cycles d'oxydoréduction. La céruloplasmine présente dans le milieu extracellulaire, surtout au cours de l'inflammation, possède aussi un effet SOD-like pouvant dismuter des ions superoxydes avec une efficacité moindre par rapport aux véritables SOD (34) (75).

La catalase.

Elle assure la dismutation bioélectrique du peroxyde d'hydrogène en oxygène et eau.



Dans la plupart des tissus, il semble que la catalase soit localisée uniquement dans les peroxysomes, organites quantitativement mineurs.

Les glutathions peroxydases.

Elles nécessitent le maintien de réducteurs dans le milieu, elles sont donc coûteuses sur le plan énergétique. Elles jouent un rôle fondamental dans le système de protection. La glutathion peroxydase séléno-dépendante en est le maillon central.

La glutathion peroxydase (GPx) découverte par MILLS en 1957 est constituée de quatre sous unités, chacune renfermant un atome de sélénium qui joue le rôle de coenzyme. Elle catalyse la réduction des hydroperoxydes (ROOH) par le glutathion (GSH) formé de trois acides aminés : Glu-Cys-Gly.

Elle fonctionne donc en consommant le glutathion réduit qui devra être régénéré par la glutathion réductase utilisant comme cofacteur le NADPH provenant du cycle des pentoses.

Les hydroperoxydes sont réduits en alcool correspondant (ROH) en produisant un équivalent de glutathion disulfure :



L'enzyme a été mise en évidence dans de nombreux organes et tissus humains ou animaux, en quantité variable selon les cas. Chez le rat, la plus forte activité se rencontre généralement dans le foie et les érythrocytes. Elle est plus modérée dans le rein, les poumons, la rate, et faible dans le plasma. Chez l'homme, on retrouve la même répartition.

D'autres types de glutathion peroxydase sont présents dans les cellules.

La phospholipide glutathion peroxydase, également sélénodépendante, est capable de réduire les hydroperoxydes des acides gras membranaires phospholipidiques sous l'action préalable de la phospholipase A2. Elle agit par un mécanisme identique à la GPx.

Il existe une GPx non séléno-dépendante qui catalyse uniquement l'élimination des HPO et non le peroxyde d'hydrogène comme la GPx séléno-dépendante.

Les systèmes de défense non enzymatiques.

Ils sont composés de molécules biologiques capables de fixer et de détruire les radicaux libres ou d'en empêcher la formation. On distingue les éliminateurs ou scavengers qui neutralisent les radicaux OH° et les atténuateurs (quencher) qui neutralisent l'oxygène singulet.

Ces substances sont principalement endocellulaires et ne participent que de manière modeste à la défense extracellulaire.

Les vitamines

La vitamine E :

Elle est située majoritairement dans les membranes et permet de piéger directement les radicaux peroxydes (ROO°). Elle interrompt l'étape de propagation radicalaire et forme un radical tocopheroxyl (toc-O°) relativement stable (83).

La susceptibilité des lipides membranaires à la peroxydation est directement liée à la concentration en vitamine E de la membrane (53).

La vitamine C(acide ascorbique) :

Elle inhibe la peroxydation lipidique par une double action.

Elle permet la régénération de la vitamine E oxydée et piège les radicaux libres. Ses propriétés lui permettent de piéger aussi bien les superoxydes que les radicaux peroxydes. Cependant, en présence de métaux elle peut provoquer la formation de ces mêmes radicaux (43).

β carotène :

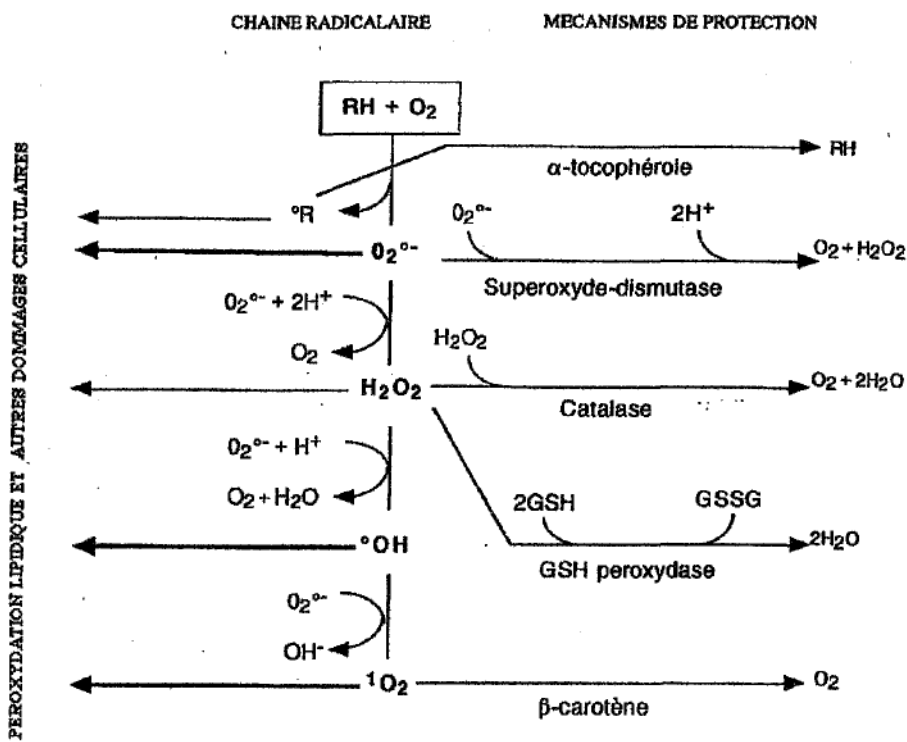
Il piège de façon très efficace l'oxygène singulet et agit comme antioxydant. La vitamine A possède également une activité antioxydante (11).

Autres molécules :

D'autres substances comme le glutathion, la transferrine, la céruloplasmine ont été rapportées comme agents protecteurs.

Certains micronutriments (cuivre, zinc, sélénium) sont d'une importance capitale dans la défense antiradicalaire (44).

Représentation schématique de la chaîne de production radicalaire et des mécanismes de protection cellulaire.

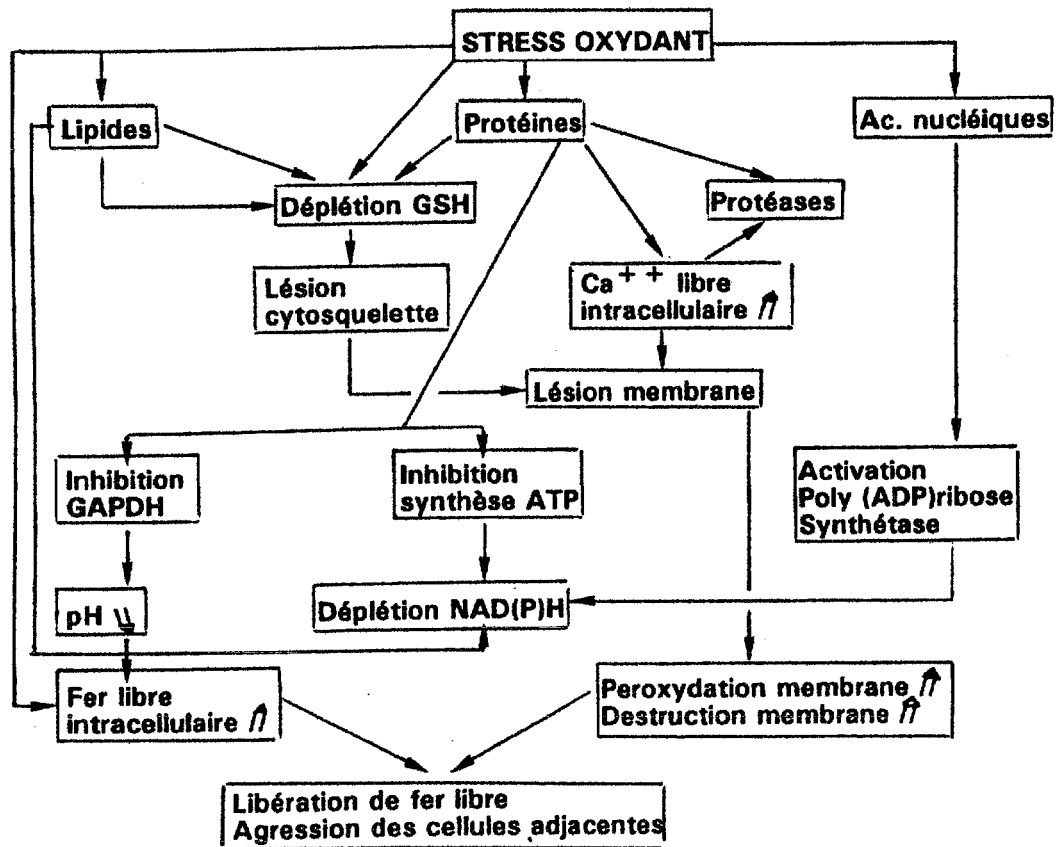


Représentation schématique de la chaîne de production radicalaire et des mécanismes de protection cellulaire. (HIDA A in Anticancéreux et espèces réactives de l'oxygène ;1993)(47)

Conséquences cellulaires

La peroxydation des macromolécules protéines, lipides, acides nucléiques se traduit à l'échelle cellulaire par une mobilisation des défenses antioxydantes et des mécanismes de réparation. Ces conséquences métaboliques sont énergétiquement coûteuses consommant à la

fois de l'ATP (adénosine triphosphate), des équivalents réducteurs (NADH) et du glutathion (GSH). Le déficit intracellulaire en ATP facilite le flux intracytoplasmique et intramitochondrial du calcium. Ce dernier, par son action sur les protéases, amplifie les lésions de la cellule puis des tissus avoisinants.



Séquences métaboliques pouvant conduire à la mort cellulaire après stress oxydatif (Richard MJ 1992)

Les cibles primaires des RLO sont les lipides des membranes cellulaires, la double chaîne de l'ADN et les protéines telles la glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase (GPDH).

La respiration mitochondriale est inhibée de manière dose dépendante par le peroxyde d'hydrogène suggérant que le complexe ATP synthétase est endommagé. L'oxydation des groupes sulfhydriles des protéines conduit à des pontages irréversibles intra et intermoléculaires, ainsi qu'à une diminution du rapport glutathion réduit/ glutathion oxydé. Cette perte d'intégrité structurale des protéines se traduit par des changements de conformation et une perte d'activité. Associée à une diminution des teneurs en ATP intracellulaires, elle facilite le passage transmembranaire du Ca, or celui ci est lui-même un élément essentiel de l'activation des protéases. Il amplifiera donc les dommages cellulaires.

Les stress oxydatifs induisent également une déplétion en NAD (81). Cette diminution associée à l'inactivation partielle de la GAPDH accentue la diminution de synthèse de l'ATP et concourt à l'amplification des dommages cellulaires.

A cette perturbation du métabolisme de la cellule se surajoute l'effet toxique secondaire des RLO et des produits dérivés de la peroxydation lipidique sur les protéines transporteuses de fer. Le relargage du fer libre à partir des protéines se traduit par l'apparition de boucles d'amplification des réactions radicalaires.

L'ensemble de ces réactions et sans aucun doute la mise en jeu de mécanismes encore plus complexes conduisent à la perte de fonctions puis à la mort de la cellule. Les lésions cellulaires deviennent irréversibles et vont s'étendre aux cellules des tissus avoisinants.

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des polluants environnementaux ubiquitaires. Ils sont présents dans l'environnement de façon naturelle (dans les pétroles et les huiles minérales, les goudrons), mais ils sont essentiellement produits par tout procédé industriel utilisant une combustion comme l'indique le schéma ci dessous.

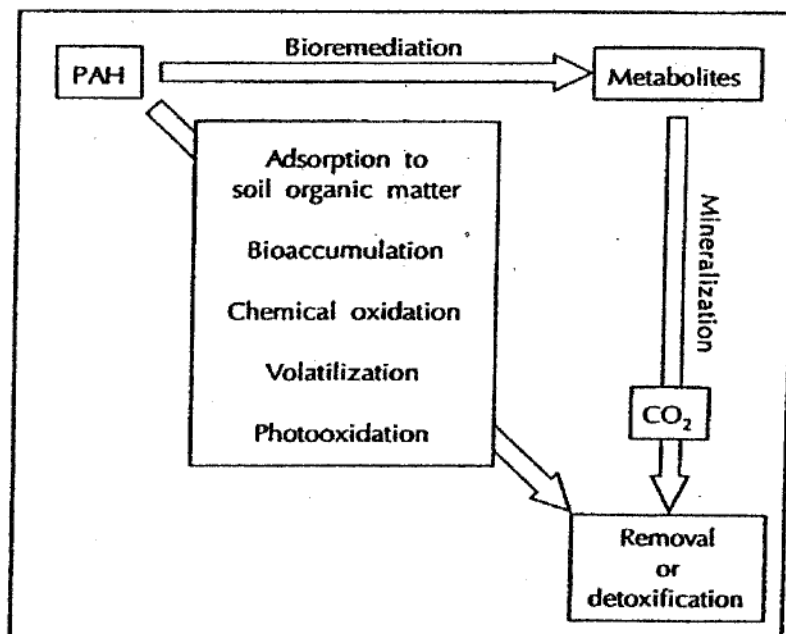
Major sources and transport mechanisms of PAHs in the environment.

Natural oil seeps
Refinery and oil storage wastes
Accidental spills from oil tankers and other ships
Municipal and urban wastewater discharge runoff
River-borne pollution
Atmospheric fallout of fly ash particulates
Petrochemical industrial effluents
Coal tar and other coal processing wastes
Automobile engine exhausts
Combustion of fossil fuels (gasoline, kerosene, coal, diesel fuel)
Smoked, charcoal broiled, or pan fried foods
Tobacco and cigarette smoke
Forest and prairie fires
Rural and urban sewage sludge
Refuse and waste incineration
Coal gasification and liquefaction processes
Creosote and other wood preservative wastes
Commercial and pleasure boating activities

Reference: IARC (1972-1990) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol 1-49, International Agency for Research in Cancer, Lyons, France.

Cerniglia ; biodegradation 1992(16)

De ce fait, ils peuvent être rencontrés dans les gaz d'échappement automobile, dans certains procédés de cuisson comme le fumage des viandes. L'exposition de l'homme est multiple: directe par inhalation des fumées de combustion ou indirecte par contamination de la chaîne alimentaire (63). Les HAP sont considérés comme agents tumorigène dans certains cancers notamment dans le milieu professionnel depuis longtemps. Le schéma suivant permet de mieux comprendre le lien entre les HAP et l'ensemble de l'écosystème.





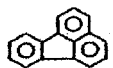

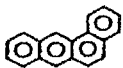
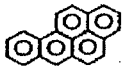


Processes influencing the fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the environment.

Cerniglia ; Biodegradation 1992(16)

Dès le XVIII^{ème} siècle, on rapporte des cas de tumeurs localisées au niveau du scrotum chez des ramoneurs. De telles observations sont retrouvées au cours du XIX^{ème} siècle et au début du XX^{ème} siècle chez des mineurs et des métallurgistes travaillant avec le coke (les tumeurs sont alors soit dermiques soit pulmonaires). De nombreuses études épidémiologiques ont été effectuées afin de déterminer l'impact des HAP sur la santé humaine (69).

Depuis, certains composés de la famille des HAP comme le benzo(a)pyrène ou le dimethylbenz(a)anthracène (DMBA) sont classés comme mutagènes et cancérigènes forts et classiquement utilisés pour induire des tumeurs cutanées. Ce sont donc les HAP de haut poids moléculaire qui ont été impliqués dans les phénomènes de mutagenèse et cancérogenèse alors que ceux de faibles poids moléculaires n'étaient pas reconnus en tant que tel comme l'indique le schéma suivant :

PAH	Solubility mg l ⁻¹	Carcinogenicity
 Naphthalene	31.7	Non-carcinogen
 Acenaphthene	3.9	Non-carcinogen
 Anthracene	0.07	Non-carcinogen
 Phenanthrene	1.3	Non-carcinogen
 Fluoranthene	0.26	Weak carcinogen
 Pyrene	0.14	Non-carcinogen
 Benz[a]anthracene	0.002	Carcinogen
 Benzo[a]pyrene	0.003	Carcinogen

Structural formulas, solubilities and carcinogenicities of model polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs).

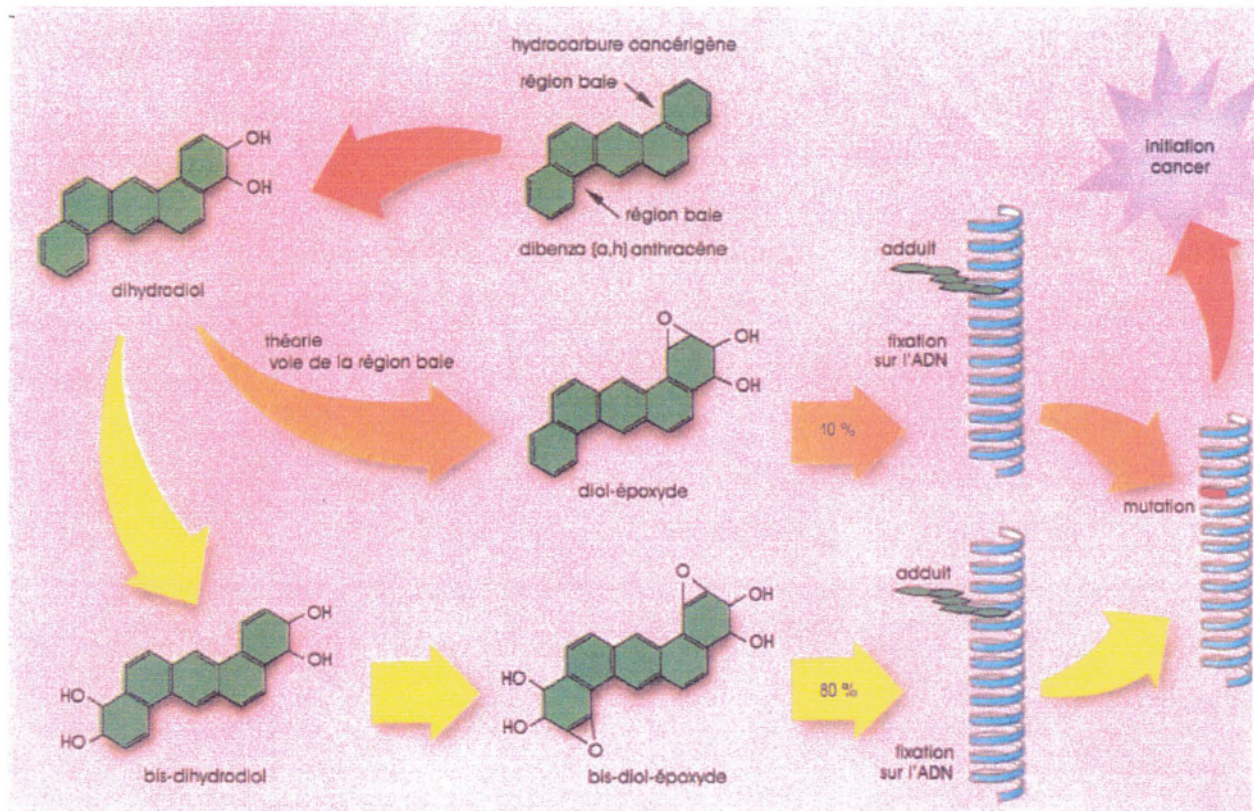
Cerniglia ; Biodegradation 1992(16)

Des études ont été menées (50) afin de déterminer les transformations cellulaires induites par les HAP dans des cellules de mammifère. Il a ainsi été démontré un lien entre la carcinogénicité des HAP et leur mutagénicité sans pouvoir isoler les métabolites formés.

D'autres études (58)(26)(51) suggèrent que le mécanisme de réparation des dommages causés à l'ADN par une exposition aux HAP est le même que celui utilisé par la cellule lors de lésions induites par les UV.

Une hypothèse reliant la structure des HAP « bay ou bay-like » avec une action spatiale sur les « gap junctions » ou canaux intracellulaires a vu le jour (97, 99, 46). Il s'agit d'une homologie structurale entre une partie de la molécule de l'HAP et les canaux de communication intracellulaire. Cette hypothèse pourrait expliquer en partie la cancérogénicité des HAP.

D'autres auteurs expliquent la phototoxicité par une modification des orbitales π de la molécule et des modifications d'absorption de l'énergie lumineuse (forme HOMO-LUMO de la molécule) (48, 62, 88). Ces différences d'état énergétique de la molécule permettraient d'expliquer la stabilité, l'absorbance, la photoinduction du composé.



LEQUOC.S. La voie détournée des cancers : les HAP ; La Recherche Dec 1993 vol 260

C'est donc essentiellement le mécanisme d'action des HAP qui a été étudié avec formulation de plusieurs hypothèses: intercalation du cycle benzénique dans la double hélice d'ADN (37) ou de la formation d'adduits comme des diols, bisdihydrodiol époxydes sur l'adénine et la guanosine entraînant des mutations de bases de type transversion. (5) (67) ainsi que la formation d'ADN oxydé: 8 hydroxy 2 déoxyguanosine (38). Certains HAP ont ainsi un schéma de métabolisation parfaitement connu, c'est le cas notamment du benzo[a]pyrène :

Ces expériences ont montré que les HAP présents dans les sédiments pouvaient être relargués dans le milieu sous certaines conditions et provoquer soit la mort d'organismes unicellulaires soit l'apparition de tumeurs chez les poissons.

De plus, il s'avère que certains composés (anthracène, fluoranthène, pyrène, phénanthrène) ne sont pas toxiques par eux-mêmes mais nécessitent une photoactivation par les rayonnements UV ou le spectre solaire.

Cette synthèse bibliographique fait ressortir deux grands axes de recherche sur les HAP par les équipes de recherche. D'un côté, des travaux sur des HAP de toxicité connue dont les principaux métabolites formés dans la cellule sont connus permettent de comprendre le mécanisme d'action de cette famille dans une cellule de mammifère. On peut donc étudier les mutations induites par une exposition aux HAP et connaître leur influence sur l'expression d'un gène ou d'une enzyme.

D'un autre côté, des équipes étudient l'impact des HAP sur les écosystèmes notamment aquatique (écosystème ayant le plus d'interactions avec les rejets d'hydrocarbures). La complexité de telles études est due à la nature même des rejets composés d'un mélange d'HAP. Les hydrocarbures utilisés sont ceux qui sont soit toujours présents soit en proportion plus importante et différent de ceux précédemment choisis. C'est le cas de l'anthracène, composé de faible poids moléculaire et non substitué.

Dans ces études, seul l'impact final est étudié sans chercher à mettre en évidence les métabolites formés par les différentes voies de métabolisation.

C'est pourquoi, nous nous proposons d'étudier plus particulièrement une molécule de base comme l'anthracène afin de déterminer les métabolites formés dans l'environnement et dans l'organisme vivant et leur action sur la cellule.

Métabolisation des HAP (72):

On peut définir classiquement trois voies de métabolisation pour tous les composés de la famille. Certaines ont été plus explorées que d'autres notamment sur certains HAP connus pour être cancérigène comme le benzo[a]pyrène ou le diméthyl-benzanthracène.

Formation de diols époxydes catalysée par de nombreux cytochromes P450 en particulier le CYP4501A1 qui jouera un rôle dominant. La formation de radicaux cations catalysée par les

450 peroxydases et enfin la formation de quinones sous forme réactives ou rédox par la dihydrodiol déhydrogénase.

Activation en diols époxydes :

C'est une voie métabolique acceptée depuis une vingtaine d'année et appelée théorie de la région baie. Du fait de leurs structures très simples, assemblage de noyaux benzénique, les HAP sont très hydrophobes (non solubles dans l'eau) ce qui les empêche d'être directement actif. Lorsqu'ils pénètrent dans la cellule, ils seront transformés en espèces plus solubles pour être éliminés par l'organisme. Toutefois, certains de ces métabolites peuvent être très actifs et se fixer sur l'ADN formant des adduits.

D'après cette théorie, tous les HAP cancérogènes devraient en bout de chaîne en un métabolite particulier très réactif le diol époxyde pour se fixer sur l'ADN. Cette réaction a lieu au niveau d'une zone particulière de la molécule appelée région baie se situant sur le noyau benzénique terminal.

La première époxydation via les cytP450 produit un arène oxyde qui sera hydrolysé par une époxyde hydrolase permettant la formation d'un trans dihydrodiol qui formera des adduits sur l'ADN en particulier des N2 déoxyguanosines.

Ces adduits peuvent provoquer des transversions G/T sur l'ADN. De plus, le dihydrodiol formé peut activer certains protooncogènes comme cHras et inactiver des gènes suppresseurs de tumeur comme p53 par formation d'adduits sur des codons spécifiques. On ne peut cependant pas dire si les époxydes sont liés à la formation de bases oxydées comme la 8 hydroxy-dGuo.

La méthode la plus couramment utilisée pour mettre en évidence les dommages causés à l'ADN par les diols époxydes a été de doser ces adduits par des techniques utilisant des anticorps spécifiques marqués par fluorescence ou au Phosphore 32 (méthode permettant de doser tous les adduits que leurs structures soit connue ou non).

Activation en radicaux cationiques :

C'est la seconde voie de métabolisation qui met en cause les taux élevés de P450 peroxydase présents dans le foie. Les radicaux cationiques proviennent de l'oxydation mono électronique

du carbone le plus électrophile. Ces radicaux forment préférentiellement des adduits avec les bases puriques (A G) au niveau de N7 et C8. pendant la réplication de ces bases mutées, on peut voir des transversions G/T.

La voie des radicaux cationiques peut expliquer l'apparition de certains composés lors du métabolisme des HAP qui ne peuvent former des diols époxydes mais qui restent potentiellement tumorigènes.

Il se pose certains problèmes avec cette voie de métabolisation. Tout d'abord, les espèces radicalaires hautement réactives ont une demi-vie très courte ce qui implique que les cations formés ne peuvent agir sur l'ADN nucléaire. De plus, comme la voie précédente, cette voie de métabolisation ne produit pas de bases oxydées et on ne retrouve pas de mécanismes initiateurs ou promoteurs sur certains gènes.

Activation en O-quinones :

Cette voie met en jeu la formation de quinones actives sous formes réduites ou oxydées par la dihydrodiol déhydrogénase (DD).

Cette enzyme produit un catéchol à partir d'un dihydrodiol. Cette réaction d'oxydation est NADPH dépendante. Le catéchol formé est instable et s'oxyde spontanément en présence d'oxygène, il en résulte la formation d'ion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène, tous deux impliqués dans la production de lésions au niveau de l'ADN ainsi qu'une augmentation de la peroxydation lipidique. Les quinones peuvent former des adduits avec des bases puriques pouvant provoquer des transversions G/T provoquant des modifications géniques (ras et p53).

La dihydrodiol déhydrogénase :

C'est une enzyme présente dans de nombreux tissus mais plus particulièrement ceux en contact avec les xénobiotiques (foie, poumons, petit intestin).

Elle fait partie de la famille des aldo-kéto-réductases jouant un rôle central dans la détoxification comme la famille des cytochromes P450. C'est une enzyme NADPH dépendante possédant une forte homologie génomique avec les prostaglandines synthétases.

C'est un monomère de 34 kDa possédant une structure chaîne α et feuillet β . Elle forme des trois boucles contenant le site actif et les sites de fixation.

Elle possède de plus une régiosélectivité spécifique et agit uniquement sur les trans dihydrodiols des cycles benzéniques terminaux. C'est le (+)SS stéréoisomère qui est préférentiellement oxydé.

Propriétés des O quinones :

Réactions de conjugaison :

Toutes les O quinones dérivées des HAP forment des conjugués dans les tampons phosphate ou les tampons glycine. L'addition du composé nucléophile se fait selon une addition 1-4 de type Michäelis (présence d'un diène conjugué à un groupement cétonique).

Le produit ainsi formé se réarrange afin d'obtenir la conformation la plus stable. Ce réarrangement donne lieu à une autooxydation de la quinone en catéchol avec formation d'espèces réactives de l'oxygène.

Généralement, en présence de bases nucléiques, l'addition s'effectue sur l'azote intracyclique ou sur le groupement aminé présent sur le cycle. D'autres composés nucléophiles comme le glutathion réduit ou la L cystéine peuvent également réagir avec la quinone.

De plus, les quinones interviennent dans les cycles redox non enzymatiques et contribuent ainsi à la formation de radicaux libres par l'intermédiaire d'enzymes cellulaires comme la NADPH cytP450 réductase ou la NADH cyt b réductase. Ceci implique donc la formation de radicaux quinoniques stables servant d'accepteurs d'électrons dans un cycle redox.

Propriétés cytotoxiques :

Les quinones peuvent être divisées en trois groupes selon leur cytotoxicité,

- Groupe I : réduisant la viabilité et la survie cellulaire.
- Groupe II : réduisant la survie cellulaire seulement.
- Groupe III : réduisant la viabilité cellulaire.

Les quinones du groupe I produisent le plus de radicaux libres (de l'oxygène ou radicaux quinoniques) qui provoquent un changement du statut redox de la cellule en consommant le glutathion réduit modifiant ainsi la balance Glutathion réduit/glutathion oxydé et en augmentant le rapport NADP/NADPH. La mort cellulaire intervient par l'augmentation du calcium ionisé intracellulaire.

Les quinones de type II produisent plus de radicaux quinoniques sans production concomitante d'anion superoxyde. La survie cellulaire n'est alors liée qu'aux dommages causés par les quinones par l'intermédiaire de leurs radicaux.

Le groupe III ne produit pas un changement mesurable du statut redox cellulaire mais provoque une déplétion en glutathion réduit entraînant la mort cellulaire.

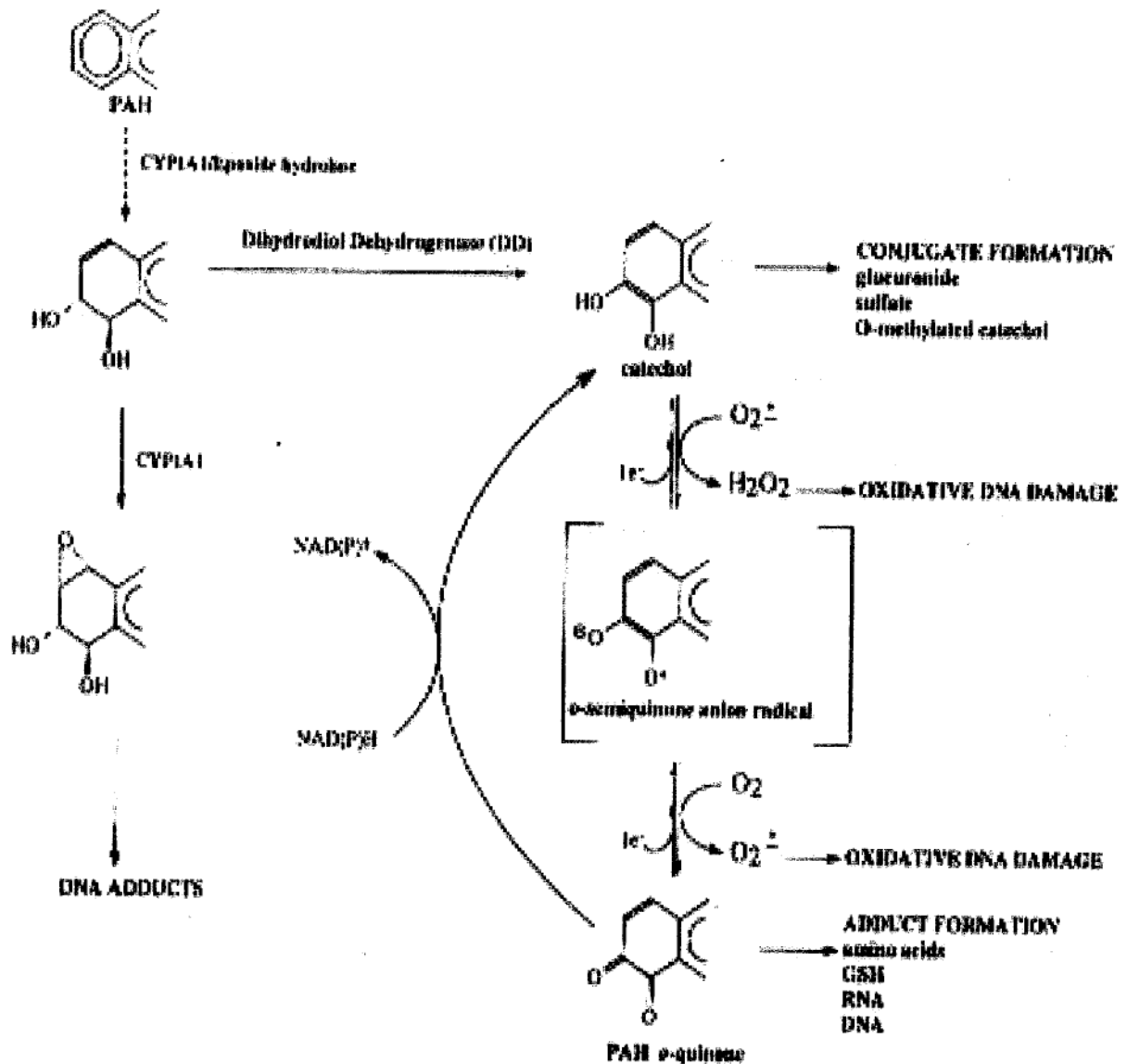
Propriétés mutagènes :

La mutagénicité des quinones apparaît comme indépendante de la formation de radicaux libres de l'oxygène et est due modifications d'intercalation et/ou de covalence sur l'ADN.

Bien que les quinones soient considérées comme moins mutagènes que les diols époxydes (autre voie de dégradation des HAP), elles provoquent plus de cassures des brins d'ADN, ce qui suggère que les dommages oxydatifs puissent se poursuivre notamment par la formation de bases oxydées comme la 8 hydroxy dGuo.

On peut donc constater que quelle que soit la voie de dégradation des HAP (formation de diols époxydes, de radicaux cationiques, de quinones), toutes contribuent à induire les effets carcinogènes des HAP. L'importance relative de chaque voie de métabolisation dépend essentiellement du tissu dans lequel se développe la tumeur, du taux d'enzymes d'activation

présents (cytP450, peroxydases, déshydrogénases), de l'exposition du tissu aux PAH ou ses dérivés.



Penning ; *Chem res Toxicol* ;1999 ;(72)

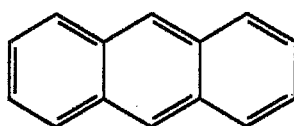
L'anthracène:

L'Anthracène fait partie de la famille des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques. Ce composé est considéré comme ni mutagène, ni cancérigène. Cependant, cette molécule a été choisie pour l'étude car la littérature ne fournit que peu de renseignements sur sa toxicologie. L'anthracène est présent à des concentrations de l'ordre du $\mu g/l$ dans beaucoup de systèmes

aquatiques et ne montre pas de toxicité aiguë autour de son seuil de solubilité (<35 µg/l à 35°C).

Des études de toxicologie ainsi que des mesures de son impact sur l'environnement ont donc été réalisées notamment sur le milieu aquatique, connu pour son pouvoir de concentration, et ont montré une augmentation importante de la toxicité sous l'influence de la lumière solaire et des UV. Cependant, ces études n'évoquent pas de mécanismes d'action.

L'anthracène est constitué de trois cycles benzéniques accolés pour un poids moléculaire de 178,22 g/mol et de formule brute C₁₄H₁₀. la formule chimique semi-développée ci dessous:



C₁₄H₁₀

Il est obtenu à partir du goudron mais également par synthèse car il est utilisé dans la chimie des colorants, il est également utilisé dans le traitement du psoriasis en application locale (action sur les cellules dermiques).

Pur, il possède une fluorescence violette (maximum d'absorption à 506 nm). Impur, sa fluorescence varie de jaune à vert. Lorsque l'anthracène est exposé aux ultraviolets, il se forme un précipité de dianthracène qui redevient de l'anthracène par sublimation.

L'anthracène possède une activité toxique aiguë sur les animaux de laboratoire (101) mais ne possède pas d'activité mutagène ou cancérigène démontrée (test d'Ames négatif) (9;15).

La toxicité après photoactivation a par contre été clairement montrée dans des études utilisant des sédiments contaminés mis en présence d'UV ou de lumière naturelle proche du spectre solaire (49, 48,4, 39, 56, 61, 74, 85, 82). D'autre part, l'existence d'une relation structure activité a été évoquée. Celle-ci serait due aux orbitales absorbant l'énergie lumineuse (62, 48). Ces orbitales sont modifiées par des substitutions d'hétéroatomes (88). Des études de dégradation après photoinduction par les UV ont été publiées (49). Néanmoins, les métabolites produits de cette dégradation et le mécanisme de toxicité restent imparfaitement connus.

MATERIEL ET METHODES :

Anthracène: Mise en solution et conditions de décomposition photochimique

Le but est d'étudier la production de radicaux libres par l'anthracène soumis à des radiations UV ou à un spectre proche du spectre solaire. Pour cela, trois lampes sont utilisées: une lampe UVA, un illuminateur à lumière froide et une lampe horticole.

Le premier problème à résoudre et qui se retrouvera tout au long des manipulations suivantes est la faible solubilité et la conservation de la solution mère d'anthracène. La solution mère a une concentration de 10 g/l dans du DMSO pur. La dissolution se fait au bain-marie à 60°C.

La dilution de cette solution au 1/1000 ème dans de l'eau désionisée de fait dans les mêmes conditions de température pendant une heure. Seule la solution mère peut être conservée à + 4°C à l'abri de la lumière sans altération de la concentration initiale.

Solution d'anthracène:

Anthracène 99% (ALDRICH®), diméthyl sulfoxyde (DMSO) MERCK®

Solution mère d'anthracène à 10g/l dans du DMSO.

Puis, dilution extemporanée de la solution mère au 1/100 dans de l'eau bi distillée.

Préparation des points de concentration : 0; 2.5; 5; 7.5; 10 µg/ml avec de l'eau bi distillée.

Systèmes d'illumination:

Lampe GRO-LUX® 75 W (SYLVANIA®)

Illuminateur lumière froide 150W à filtres couleur GLI 154 (FORT).

UVA : Lampe DIXWELL® 340-420 nm max. : 372 nm

Méthode:

Les conditions appliquées à toutes les expériences ont été les suivantes:

- Irradiation de 15 min sous une puissance en moyenne de 27 J/ cm^2 (dose utilisée pour l'irradiation cellulaire) avec une lampe UVA de spectre 340-420 nm (maximum à 372 nm) dans des boîtes de Pétri de 30 mm de diamètre en polystyrène ou microplaques 96 puits en polystyrène.
- Irradiation de 60 min sous un illuminateur de lampe froide d'une puissance de 150 Watts à une distance standardisée de 3cm d'un tube à hémolyse de 5 ml en polystyrène.
- Les cinétiques effectuées pour déterminer la dégradation par CLHP, pour détecter une production de radicaux libres de l'oxygène par chimiluminescence et pour l'étude de la peroxydation lipidique ont été réalisées dans les mêmes conditions, seul le temps d'irradiation a été modifié: de 0 à 115 minutes quelle que soit la lampe.

Mise en évidence de la dégradation de l'anthracène et production de Radicaux libres

Chimiluminescence :

Principe de la méthode :

La luminescence est définie comme l'émission de photons dans le visible, l'UV, l'IR.

La chimiluminescence est une luminescence induite par une réaction chimique.

Les radicaux libres sont des espèces photoémétrices capables de revenir à l'état basal en émettant de la lumière, mais ces photons restent insuffisamment nombreux pour être détectés par des luminomètres classiques. Aussi fait-on appel à des sondes chémiluminogéniques afin d'amplifier le signal. Les plus couramment utilisées sont le luminol et la lucigénine. La lucigénine détecte spécifiquement les ions superoxyde. Sa sensibilité est plus faible que celle du luminol mais elle permet mieux de suivre la production de radicaux au cours du temps car il n'y a pas d'extinction du signal comme avec le luminol (21).

Matériel :

Luminomètre Lumat LB 9501 de BERTHOLD®

Réactifs:

bis N méthyl acridinium nitrate (Lucigénine) SIGMA®, Tris (hydroxyméthyl) aminométhane MERCK®, 3-aminophthalhydrazide (luminol) ALDRICH®, Acide Chlorhydrique pur (HCl) PROLABO®.

Préparation de la sonde :

Solution mère à 20 mg/ml aliquotée en tubes EPENDORF® et conservée à -20°C.

Dilution au 1/200 d'un aliquote dans du tampon Tris-HCl pH= 7.15 Osm= 290 (dilution au 1/20 au moment de l'emploi).

Méthodes :

La mesure au Luminomètre s'effectue immédiatement après irradiation sur une prise d'essai de 100 µl des différentes dilutions d'anthracène (2-10 µg/ml) en présence de 100 µl de sonde de chimiluminescence. Les essais ont été pratiqués après des temps d'irradiation différents : fixe de 15 minutes ou cinétiques sur 120 minutes. Les lampes UVA, horticoles et visibles ont été utilisées.

Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) :

Principe de la méthode :

Placée entre les pôles d'un aimant puissant, une substance magnétique voit l'ensemble de ses électrons appariés s'aligner de manière à s'opposer au champ magnétique externe: la force exercée tend à la faire sortir du champ magnétique.

Par contre, les substances paramagnétiques, caractérisées par la présence d'un électron célibataire s'opposent à la contribution diamagnétique des électrons appariés.

La RPE permet la détection de toute espèce chimique possédant un électron célibataire. Cette technique appartient avec la RMN aux groupes des méthodes spectroscopiques, qui présentent comme point commun d'étudier les transitions entre les différents états d'énergie induits dans la matière par un rayonnement électromagnétique.

De part leur forte réactivité, les radicaux libres réagissent avec eux-mêmes ou avec un nombre considérable d'autres molécules à des vitesses élevées. De ce fait, il est nécessaire d'utiliser la technique de piégeage de spin pour permettre leur mise en évidence. Le radical libéré est capté par un piègeur en solution avec lequel il forme un dérivé stable de demi-vie suffisamment longue pour être détectable. La capture se traduit par la formation d'un spectre caractéristique du complexe piègeur-radical.

Matériel :

BRUKER® ESR 100 et son logiciel de travail

Réactifs:

α (4 pyridyl 1 oxide) N ter- butylnitrone (POBN) de ALDRICH®

N ter butyl α phénylnitrone (PBN) ALDRICH®

5.5-diméthyl-1-pyrrolidine N oxide (DMPO) ALDRICH®

H₂O₂ 30% de chez MERCK®

Méthode :

Prise d'essai de 50 μ l de solution d'anthracène (10 μ g/ml) après 15 minutes d'irradiation UVA + 5 μ l de "spin trap" à 100 mM.

Des irradiations ont été effectuées en présence du spin trap dans le milieu réactionnel. Dans d'autres cas, le spin trap n'a été rajouté qu'en fin d'irradiation.

La solution contrôle positive sur laquelle est étalonné l'appareil est constituée d'un mélange 500 µl de H₂O₂ à 50mM + 500µl FeSO₄ à 0.416 mM connu pour ses propriétés génératrices d'OH° par la réaction de Fenton.

Suivi de dégradation de l'anthracène irradié par CLHP :

Principe de la méthode :

La HPLC est une technique de séparation de différents composés présents dans un mélange, basée sur une différence d'affinité par rapport à une colonne et un éluant spécifique (phase liquide) permettant de décrocher sélectivement les composés fixés à la colonne. Les molécules sont caractérisées par des temps de rétention spécifiques.

Réactif :

Acétonitrile PROLABO®

Matériel :

Analyseur : SHIMADZU® CR3A Chromatopac

Injecteur : SHIMADZU® Si1 9A

Détecteur : SHIMADZU® RF 10 AXL Fluorescence

Pompe : SHIMADZU® 2CCA

Colonne C18 : SUPELCO® CCPAH 5-8318 Supelcosil

Méthode :

Une solution d'anthracène de concentration 10 µg/ml est irradiée sous UVA et visible selon les conditions décrites précédemment. Un prélèvement est effectué toutes les 10 minutes jusqu'à 90 minutes puis est conservé en chambre froide (+4°C) avant dosage.

20 µl de l'échantillon sont prélevés par l'injecteur automatique puis injectés dans la colonne. Le débit de la pompe est fixé à 1 ml/ min, la température de la pièce est de 21.4°C. La phase liquide est constituée d'un mélange acétonitrile/ eau (70/ 30).

Le détecteur est un détecteur à fluorescence avec une longueur d'onde d'émission de 406 nm et une longueur d'onde d'excitation de 250 nm. Le gain est réglé à 3, la sensibilité à 1.

L'analyseur est réglé sur une atténuation de 4, un arrêt d'enregistrement fixé à 17 min et une méthode de programmation de calcul automatique de concentration à partir de l'aire sous la courbe par rapport à une solution étalon d'anthracène (10 µg/ml).

Mesure des effets des radicaux libres sur les macromolécules:

Les travaux préliminaires en chimiluminescence et l'étude de la dégradation de l'anthracène par HPLC ont permis de définir les conditions de travail pour les manipulations sur les macromolécules. On a pu définir un temps minimum d'irradiation sous UVA et visible, soit un point fixe déterminé à 15 minutes pour les UVA et 60 minutes pour la lumière visible.

Dans chaque expérience, plusieurs témoins ont été faits en parallèle:

- Un témoin macromolécule non irradié
- Un témoin macromolécule + anthracène non irradié
- Un témoin macromolécule irradiée
- Un témoin macromolécule + Fenton (H₂O₂ 50 mM et FeSO₄ 0,416mM) servant de témoin positif d'oxydation totale.

Les antioxydants utilisés sont répertoriés dans le tableau suivant:

Diméthylsulfoxyde (DMSO) (MERCK®)

Butylated Hydroxytoluène (BHT) (SIGMA®)

Superoxyde Dismutase (SOD) from *E. Coli* (SIGMA®)

Catalase de foie de bovin (SIGMA®)

Vitamine E (α tocopherol) (SIGMA®)

Mannitol d(+) (ALDRICH®)

Desferal® déféroxamine (CIBA-GEIGY®)

L Histidine (ALDRICH®)

antioxydants	<i>BHT</i>	<i>Desferal</i>	<i>Histidine</i>	<i>Vit E</i>	<i>Mannitol</i>	<i>DMSO</i>	<i>Catalase</i>	<i>SOD</i>
action sur:	RO°	Fe	¹ O ₂	RO°	OH°	OH°	H ₂ O ₂	O ₂ °
Concentration de départ	1mM	10µM	10 ⁻⁵ M	500µM	50mM	1%	200U/ml	80µg/ml

Ils ont été utilisés sur toutes les macromolécules.

Mesure de la peroxydation lipidique: dosage du dialdéhyde malonique (MDA)

Principe :

Le dialdéhyde malonique (MDA) est dans beaucoup de cas l'aldéhyde le plus abondant résultant de la peroxydation lipidique et sa détermination par l'acide thiobarbiturique (TBA) est l'une des techniques les plus utilisée pour suivre l'oxydation des lipides (76) (77).

Dans la réaction avec le TBA, une molécule de MDA réagit avec deux molécules de TBA pour former un complexe coloré en rose qui absorbe entre 532 et 535 nm et possède une forte fluorescence à 553 nm. Une hydrolyse à chaud (90-100°C) permet de libérer le MDA de ces complexes. En effet, seul le MDA libre peut réagir avec le TBA or il n'existe pratiquement pas de MDA à l'état libre.

Il est important de noter que la réaction au TBA n'est pas spécifique du MDA mais que beaucoup d'autres molécules possédant des activités proches réagissent avec le TBA en formant des complexes roses d'où la nécessité d'effectuer un témoin pour chaque dosage.

Ce qui est mesuré par le test TBA dépend étroitement des conditions de réaction ainsi que de la méthode de lecture (UV, fluorescence, HPLC). Seule l'analyse utilisant une séparation préalable par CLHP permet d'exprimer les résultats en quantité de MDA. Dans les autres méthodes, les résultats correspondent à une mesure du taux d'adduits à l'acide thiobarbiturique ou Tbars (thiobarbituric acid reactants).

Matériel :

fluorimètre PERKIN ELMER ® L550

micro ordinateur EPSON® PC AX2e et son logiciel de pilotage

Réactifs:

INTRALIPIDE 20%® pour perfusion (Pharmacia & upjohn)

Acide thiobarbiturique (MERCK®)

Acide perchlorique 70% (MERCK-SUPRAPUR®)

NaOH (PROLABO®)

1,1,3,3 tétraéthoxypropane (TEP) (SIGMA®).

Ethanol absolu (PROLABO®)

Butanol 1 (PROLABO®).

Méthode :

L'anthracène aux concentrations de 0 à 20 µg/ml est mélangé extemporanément avec une solution d'INTRALIPIDE® 10% (IL) pur ou dilué au 1/60 ème en quantité équivalente (500 µl). Afin d'éviter une oxydation de la dilution d'IL, celle ci est préparée extemporanément. Ce mélange est soumis aux irradiations puis les MDA sont immédiatement dosés par la méthode décrite en annexe 1. Des témoins de contrôle d'oxydation sont effectués en utilisant un mélange H₂O₂/ Fe (précédemment décrit), 500 µl de ce mélange sont ajoutés à 500 µl d'IL. Des témoins négatifs de contrôle ont été réalisés en absence d'irradiation, ou en absence d'anthracène.

Les tests avec les antioxydants se sont déroulés de la même façon:

Un mélange contenant 500 µl d'IL dilué au 1/60ème, 500 µl d'anthracène de concentration 10µg/ml et 500 µl d'antioxydant a été irradié pendant 15 min sous UV (27J/cm²) puis 100 µl de ce mélange ont été immédiatement dosés pour déterminer la concentration de MDA.

Les valeurs de MDA sont lues sur une courbe de calibration préparée à partir de TEP (concentrations de 0 à 8 µM). La courbe de calibration est traitée comme les échantillons.

Etude de l'attaque radicalaire de l'acide désoxyribonucléique (ADN)

Principe:

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode qui permet la détection des différents types de coupure de l'ADN. En effet, l'introduction d'une seule coupure sur un brin de l'ADN natif surenroulé convertit celui-ci en sa forme relâchée, alors que deux coupures sur les deux brins complémentaires engendre l'apparition de la forme linéaire. Ces trois formes d'ADN, de mobilité électrophorétique différentes et qui migrent vers la cathode, se séparent facilement en électrophorèse sur gel horizontal immergé d'agarose (0.8%) d'épaisseur 5 mm.

Matériel :

Cuve d'électrophorèse horizontale HOEFER HE 33®

générateur : BIORAD® Power Pac 1000

HOEFER® PS 500XT DC Power Supply

Polaroïd équipé d'un filtre orange anti UV KODAK® Wratten 22A

Réactifs:

Plasmide PBR 322 (BOEHRINGER®) 0.25µg / µl

Plasmide PGL3 de concentration 1,4 µg/µl (dilué au 1/80 pour les essais)

Tris(hydroxyméthyl)aminométhane GR (MERCK®)

Ethylenediamine-tetraacétique Acid (EDTA) (SIGMA®)

Acide Acétique glacial (100%) (RP Normapur PROLABO®)

Bleu de Bromophénol

Glycérol (Sigma)

Agarose electrophoresis Grade (GIBCO BRL®)

Bromure d'éthidium (10 mg/ml) (INTERCHIM®)

Méthode :

(cf. annexes 2)

L'étude est réalisée dans des puits de microplaque (le volume de chaque puits est de 90 µl). 20 µl d'une solution d'ADN diluée au quinzième (PBR 322) ou au 1/80ème (PGL3) dans le tampon phosphate 5mM à pH adéquat.

20 µl de produit étudié (anthracène à une concentration de 2 µg/ml)

20 µl de produit testé (antioxydants)

Irradiation 15 minutes à 27 J/ cm²

La révélation des différentes bandes d'ADN est réalisée en exposant le gel aux rayons UV d'un transilluminateur. Le bromure d'éthidium, produit qui s'intercale entre deux brins d'ADN, émet une fluorescence de couleur orange sous l'action des UV de longueur d'onde 312 nm.

Préparation du plasmide PGL3 :

Transfection de la souche bactérienne (*E. Coli* JM 109) par le plasmide PGL3 en utilisant une technique de choc thermique : 30 min à 4°C puis 1 min 30 à 42°C.

Après repiquage et cultures des bactéries à 37°C sur milieu LBO, on effectue une centrifugation avec récupération du culot.

Le culot est traité pour récupérer le plasmide. La technique utilisée fait appel à un kit élaboré par QIAGEN® utilisant plusieurs tampons et réactifs.

La première étape est une étape de lyse bactérienne avec dégradation de l'ARN par une ARNase.

La deuxième et troisième étape permettent une dénaturation et un déroulement de l'ADN chromosomique bactérien. Le plasmide soluble reste dans la phase liquide.

L'étape suivante permet une filtration et une séparation du plasmide sur une colonne après décantation.

La colonne est lavée pour éliminer les impuretés puis le plasmide est élué à l'aide d'un tampon ionique de force adéquate.

Le liquide ainsi obtenu est mis en présence d'éthanol pur qui permettra une précipitation du plasmide.

Après centrifugation, lavage, et récupération du culot, celui-ci est redissout dans de l'eau désionisée stérile.

La solution est ensuite lue au spectrophotomètre après dilution au 1/250^{ème} afin de connaître la concentration de plasmide ($\text{Conc ng}/\mu\text{l} = \text{Abs} * \text{Dilution} * \epsilon_{\text{ADN}} (50)$). Puis on effectue une électrophorèse sur gel d'agarose pour apprécier la pureté et le poids moléculaire du plasmide.

Etude de l'oxydation protéique:

dosage des groupements carbonyles

Principe du dosage :

Les carbonyles protéiques sont dosés par une méthode colorimétrique avec le Dinitrophénylhydrazine (DNPH). Il se forme une diphénylhydrazone qui absorbe à 380 nm. La présence de fonctions carbonylées sur de nombreuses molécules, et en particulier les lipides, nécessite une précipitation au préalable des protéines par l'acide trichloracétique. Les lavages éthanol / acétate d'éthyle ont pour but d'extraire les lipides présents et l'excès de DNPH n'ayant pas réagi (celui-ci interfère au niveau de la lecture). Il est nécessaire de ramener la concentration de carbonyles obtenus à la quantité de protéines présentes en solution, notamment à cause des extractions qui peuvent fausser les valeurs mesurées.

Matériel:

Spectrophotomètre UVIKON®860

Réactifs :

Potassium dihydrogénophosphate KH_2PO_4 PROLABO®

Acide trichloracétique 20% MERCK®

Acide chlorhydrique 36% PROLABO®

Ethanol absolu PROLABO®

Acétate d'éthyle PROLABO®

Chlorure de guanidine PROLABO®

Albumine MERCK®

2.4 Dinitrophénylhydrazine SIGMA®

Méthode:

500 μl d'une solution d'albumine de concentration 10 g/l préparée extemporanément sont mélangés avec 500 μl d'une solution d'anthracène de concentration variant de 2 à 10 $\mu\text{g/ml}$.

Après irradiation sous UV (27 J/cm^2) pendant 15 min, 200 μl du mélange sont utilisés pour le dosage des carbonyles selon la méthode décrite en annexe 3.

Les essais effectués avec les antioxydants ont suivi le même protocole: ajout de 500 μl d'antioxydants au mélange précédemment cité.

Dosage des groupements thiols (SH)

Principe du dosage:

Cette méthode colorimétrique repose sur les propriétés réductrices des groupements thiols (SH). En présence des groupements thiols de l'échantillon, le pont disulfure (SS) contenu dans le réactif d'Ellman ou DTNB (5-5' dithio nitrobenzoic acid) va être réduit et donner des dérivés thiols aromatiques fortement colorés. La vitesse de la réaction sera différente selon que le DTNB se trouve en présence de SH protéiques ou non protéiques. Cette différence peut dans certaines conditions (de pH et de forme ionique) être accentuée et permettre ainsi la mesure des SH protéiques et celle des SH totaux.

Matériel:

Spectrophotomètre UVIKON® 860 et 930

Réactifs:

Albumine (SIGMA®)

Potassium dihydrogénophosphate KH_2PO_4 (PROLABO®)

Disodium hydrogénophosphate Na_2HPO_4 (PROLABO®)

Ethylenediaminetetraacetic acid EDTA (SIGMA®)

5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) DTNB (SIGMA®)

N acetyl cystéine NAC (SIGMA®)

Méthode:

Cette technique s'effectue sur microplaques 96 puits (FALCON®).

A 100 μl d'une solution d'albumine de concentration 10 g/l préparée extemporanément, on ajoute 100 μl d'une solution d'anthracène variant de 2 à 10 $\mu\text{g/ml}$.

Après irradiation UVA (27J/cm^2 pendant 15 min) 50 μl du mélange est prélevé et traité selon la méthode décrite en annexe 4. La Phase de dosage s'effectue sur la glace.

Les essais avec les antioxydants ont suivi le même protocole: ajout de 100 μl d'antioxydants en concentrations variables au mélange précédemment cité.

RESULTATS :

Toutes les expériences sur les macromolécules suivent le même schéma:

Après une mise au point des concentrations de macromolécule et d'anthracène à utiliser pour pouvoir mettre en évidence un effet, l'étude s'est portée sur l'influence de la concentration d'anthracène dans l'évolution de l'oxydation dans le but d'établir un effet dose/ réponse.

Puis dans un deuxième temps, lorsque techniquement il était possible de le faire, nous avons fait varier les temps d'irradiation afin d'obtenir une cinétique d'oxydation.

Enfin, nous avons étudié l'action de certains antioxydants sur la réaction d'oxydation.

Ces antioxydants ont été choisis d'après la littérature et leurs concentrations sont restées identiques pour chaque macromolécule.

La SOD et la Catalase testées vis à vis de la peroxydation lipidique induite par l'anthracène irradié n'ont montré aucune efficacité et n'ont donc pas été utilisées dans la suite des expérimentations.

Radicaux libres générés par photochimie de l'anthracène:

Etude de la dégradation de l'anthracène par HPLC :

Cette étude a pour but d'étudier la dégradation de l'anthracène dans le temps pendant une irradiation par l'illuminateur de lumière froide et la lampe UV.

Ces manipulations ne permettent pas de mettre en évidence la formation de composés de dégradations. Une étude complémentaire en fluorimétrie a permis de distinguer des pics d'absorption et d'émission différents de ceux de l'anthracène. Nous avons pu définir une longueur d'onde maximum d'excitation de 357 nm et une longueur d'onde maximum d'émission de 419 nm correspondant au pic du métabolite.

Une courbe étalon d'anthracène est tracée à partir d'une gamme faite à partir de la solution mère (figure 3)

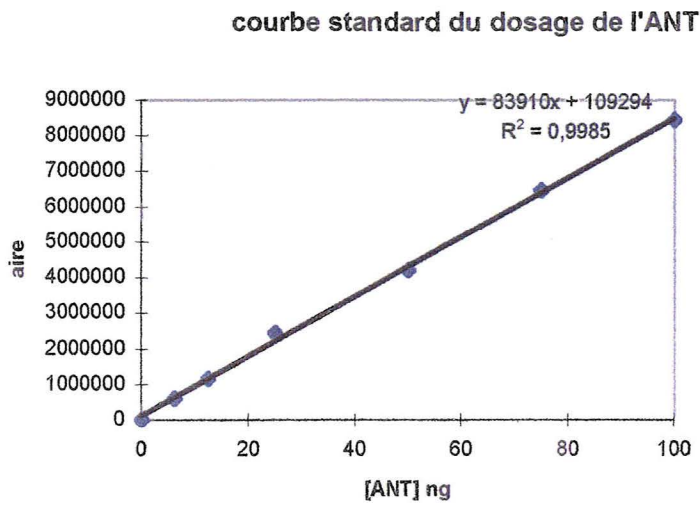


figure 3

La dégradation de l'anthracène suivant le type d'irradiation a été mesurée par le rapport: $\% \text{ ANT}_{\text{résiduel}} = [\text{ANT}]_t / [\text{ANT}]_{t_0}$ et présentée sur la figure 4.

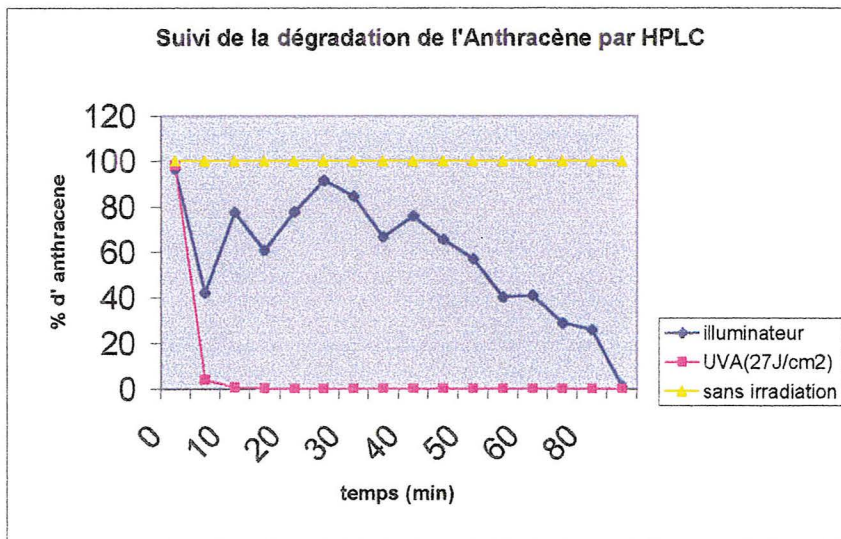


figure 4 [Ant] = 10 µg/ml

On peut remarquer que la dégradation de l'anthracène sous UVA est totale après 15 minutes. Ce résultat a permis de définir le temps d'irradiation par les UVA au cours des expériences sur les macromolécules. Ce temps a été fixé à 15 minutes.

La dégradation de l'anthracène dans le visible est beaucoup plus longue et n'est totale qu'au bout de 90 minutes. On distingue l'apparition de 3 pics aux temps 10, 25 et 40 minutes.

L'irradiation avec de la lumière visible lors des expériences avec les macromolécules a été fixé à 60 minutes ou l'on obtient une dégradation de l'ordre de 60%.

Mesure par chimiluminescence :

Le choix d'une sonde de luminescence se fait après essai de deux sondes les plus couramment utilisées dont la spécificité dépend du radical à mettre en évidence. Le luminol est plus sensible à H_2O_2 et à l'ion superoxyde $O_2^{\cdot -}$. La lucigénine réagit préférentiellement avec les radicaux OH^{\cdot} .

Sur la figure 5 sont représentées les intensités de luminescence (RLU) obtenues avec les sondes luminol ou lucigénine sur des solutions d'anthracène après irradiation par les UVA ($27J/cm^2$) pendant 15 min. Les intensités de chimiluminescence sont dose dépendante avec la lucigénine. Aucune luminescence n'est observée avec le luminol.

Les essais réalisés avec une solution d'anthracène non irradié de concentration $10 \mu g/ml$ ne montrent aucun résultat.

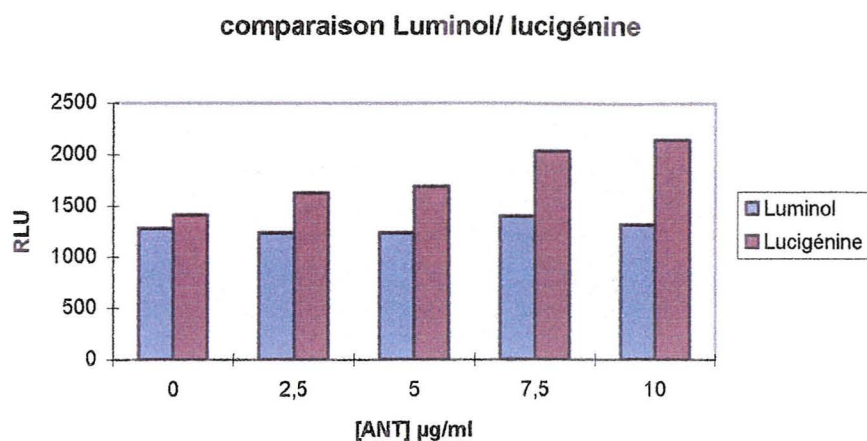


figure 5

La stabilité du complexe lucigénine-RL n'est pas modifiée par une variation de pH mais un tampon Tris 20 mM pH 8 permet de stabiliser le signal.

L'étude de la cinétique de formation de radicaux libres a permis de suivre le comportement de l'anthracène (10µg/ml) sous l'action des différentes lampes comme le montrent les figures 6 et 7.

La figure 6 permet de comparer l'action de lampes fournissant une lumière visible: ampoule horticoles GRO-LUX® de 75 W et un illuminateur à lumière froide de 150W. On peut noter que les résultats obtenus avec l'ampoule horticoles sont comparables aux résultats obtenus après irradiation d'une solution témoin (le solvant de l'anthracène). La lampe horticoles ne dégrade pas l'anthracène. Par contre, on trouve une action de l'illuminateur. Une deuxième expérience dans les mêmes conditions ne permet pas d'obtenir les mêmes résultats. Cependant, on peut voir que la forme de la courbe reste la même ce qui montre que le profil de dégradation de l'anthracène reste le même. On retrouve la formation de 3 pics.

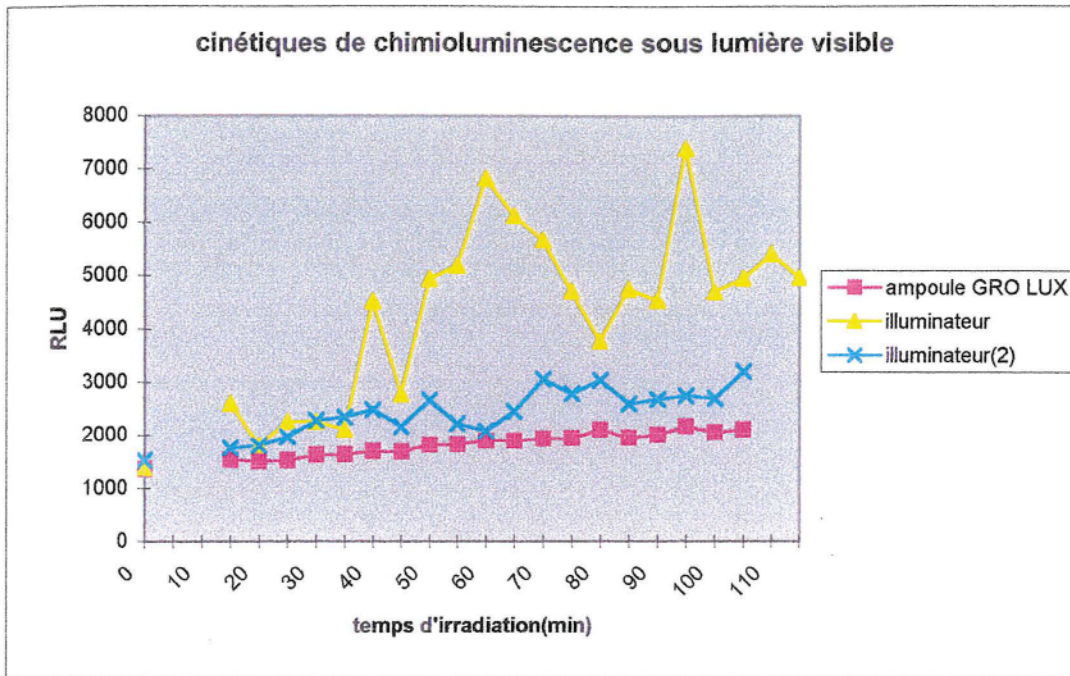


figure 6 [Ant]=10 μ g/ml

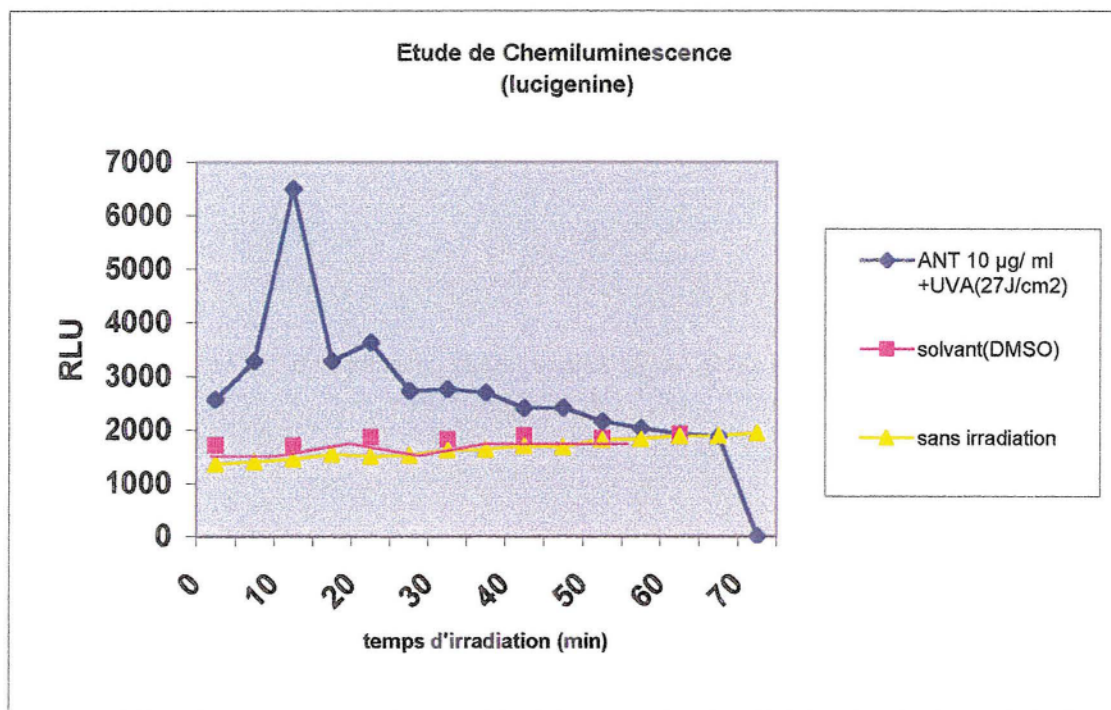


figure 7

Sur la figure 7 sont représentées les intensités de chimioluminescence mesurées sur une solution d'anthracène 10 μ g/ml irradiée avec des doses croissantes d'UVA. Ces intensités

sont comparées à celles mesurées sur une solution irradiée ne contenant que le solvant. La dégradation de l'anthracène par les UVA est très rapide, environ 15 minutes.

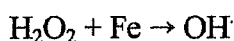
Une expérience utilisant des quantités croissantes d'anthracène en présence d'UVA et d'UVB n'a pas donné de résultats interprétables. Pour des raisons de praticabilité, la lampe UVB fournissant un mélange d'UVA et d'UVB et n'ayant pas les mêmes conditions de réglage, une comparaison entre ces deux lampes s'est avérée impossible. L'étude sur les UVB n'a pu être continuée. Toutes les expériences suivantes sont effectuées sous UVA.

Mesure par RPE:

L'étude par RPE a été faite au Centre de Recherche du Service de Santé des Armées (CRSSA).

A notre connaissance, aucune publication ne traite de radicaux libres produits sous UV. De plus, l'hypothèse de travail est la présence de radicaux libres organiques. Les radicaux libres de l'oxygène ayant une demi-vie très faible, ils sont difficiles à mettre en évidence.

Les premières expériences ont donc été faites avec des spin-trappeurs couramment utilisés: PBN, DMPO et POBN. L'appareil a été calibré grâce au mélange H_2O_2/Fe :



Les radicaux hydroxyls sont piégés par le POBN et produisent un spectre caractéristique (cf. figures 8 et 9).

Il en est de même pour le PBN

Les expériences faites avant et après irradiation montrent que les deux spin-trap utilisés sont partiellement détruits par les UV et donnent un spectre altéré. Ils sont donc impossible à utiliser pour mettre en évidence les radicaux formés lors de la dégradation de l'anthracène.



File: cuachon1

Number of Scans: 9

Mode: EPR

Operator:

Temperature:

Resonator: st4102_B3

Goniometer angle:

Date: 11-DEC-1999

Time: 4: 49: 01

Error Message: Overflow appeared;

Receiver	Signal Channel	Field	Microwave
Receiver Gain : 4.00e+04	Conversion : 81.92 ms	Center Field : 3488.00 G	Frequency : 9.8900000 GHz
Phase : 0.0 deg	Time Const : 40.96 ms	Sweep Width : 100.00 G	Power : 2.08e+01 mW
Harmonic : 1	Sweep Time : 83.886 s	Resolution : 1024 points	
Mod Frequency : 100.0000 kHz	Scale : 16		
Mod Amplitude : 1.006 G			

Comment: fenton avec POBN sans irradiation UVA (1)

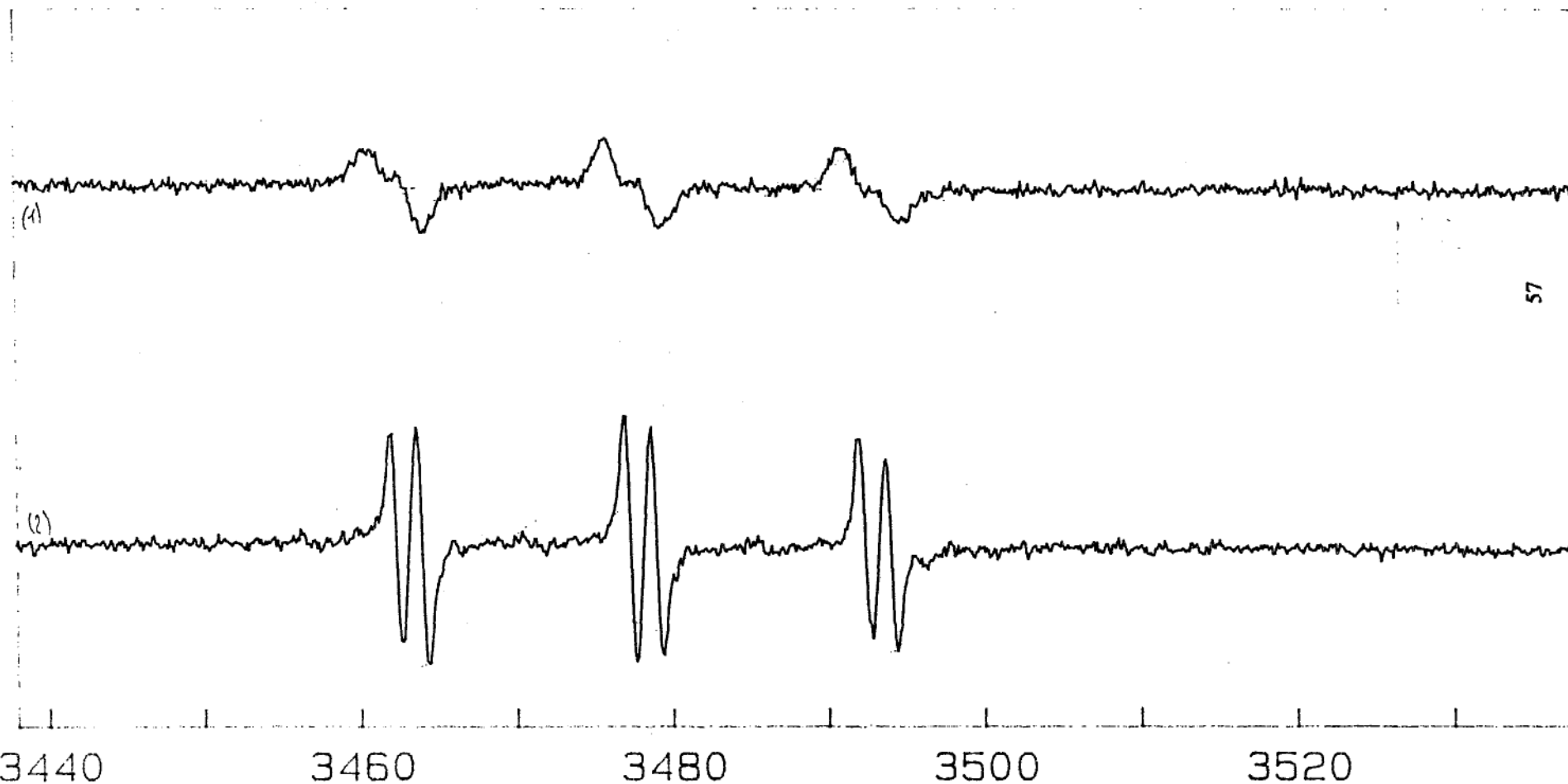


Figure 8 : Réaction de Fenton avec le POBN avec et sans irradiation UVA (15 min 27J/cm²)

[G]



File: cuacnor1 Operator: Resonator: st4102_B3 Date: 15-DEC-1899
Number of Scans: 9 Mode: EPR Temperature: Goniometer angle: Time: 5: 49: 44

Error Message: Overflow appeared:

Receiver	Signal Channel	Field	Microwave
Receiver Gain : 4.00e+04	Conversion : 81.92 ms	Center Field : 3488.00 G	Frequency : 9.8900000 GHz
Phase : 0.0 deg	Time Const : 40.96 ms	Sweep Width : 100.00 G	Power : 2.08e+01 mW
Harmonic : 1	Sweep Time : 89.886 s	Resolution : 1024 points	
Mod Frequency : 100.0000 KHz	Scale : 16		
Mod Amplitude : 1.006 G			

Comment: Fenton avec PBN apres irradiation UVA (1)

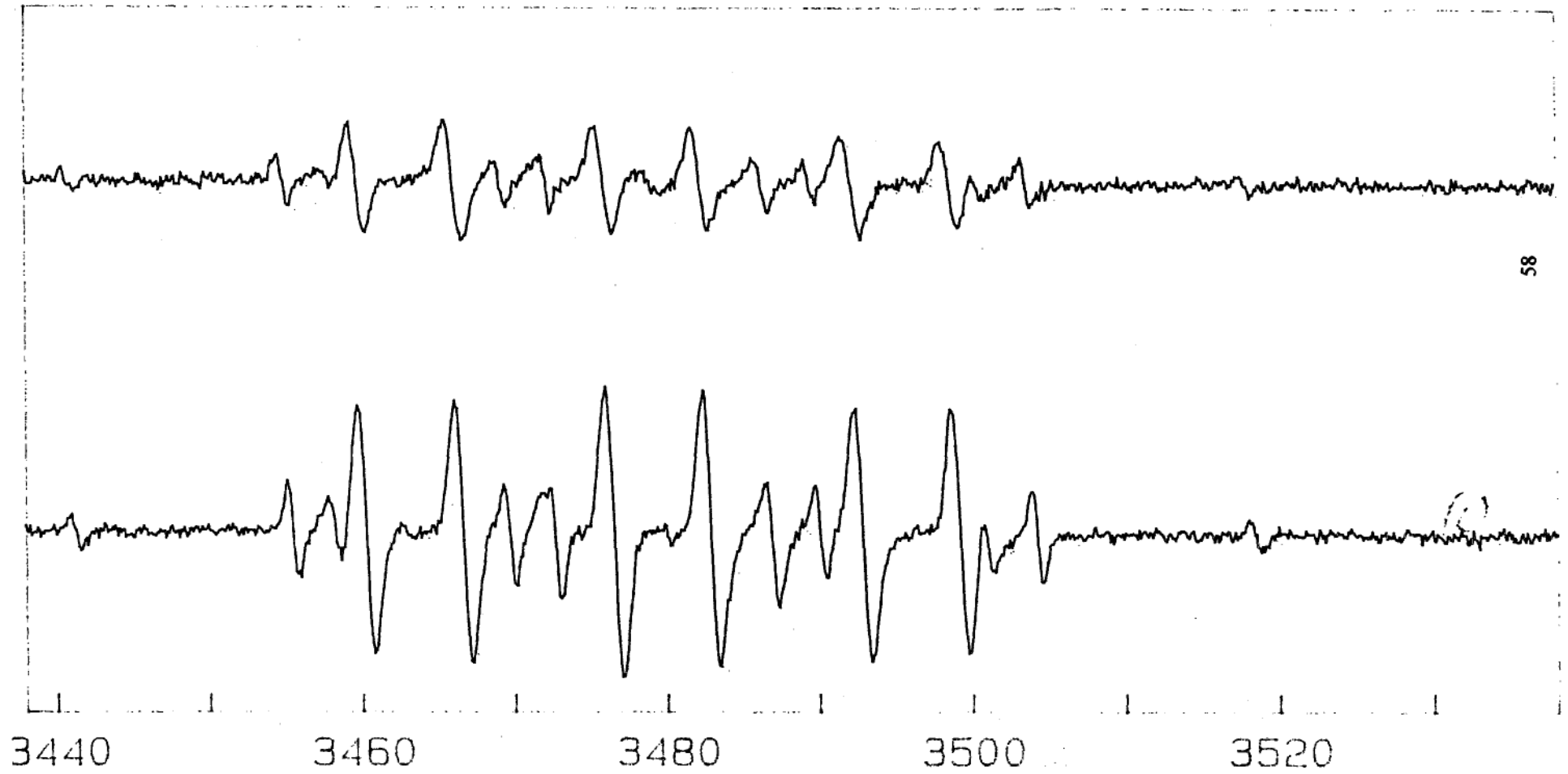


Figure 9 : Réaction de Fenton avec du PBN avant et après irradiation UVA (15 min 27J/cm2)

Oxydation des macromolécules

Mesure de la peroxydation lipidique :

Les dosages effectués dans ce travail ont été faits selon une méthode mise au point au laboratoire (76, 77). Le protocole normalement adapté aux liquides biologiques a été adapté au mélange lipidique utilisé pour ce travail.

Un premier travail basé sur la cinétique de peroxydation a permis de choisir une concentration de lipides utilisée pour le reste des expériences (figure 10). L'utilisation de l'Intralipide pur n'a pas montré de différences entre le témoin d'oxydation par les UVA et une oxydation par l'anthracène en présence d'UVA.

Seule l'irradiation par UVA a été testée car des essais avec l'illuminateur se sont révélés négatifs, le dosage de MDA était équivalent au bruit de fond et ce quel que soit le temps d'irradiation.

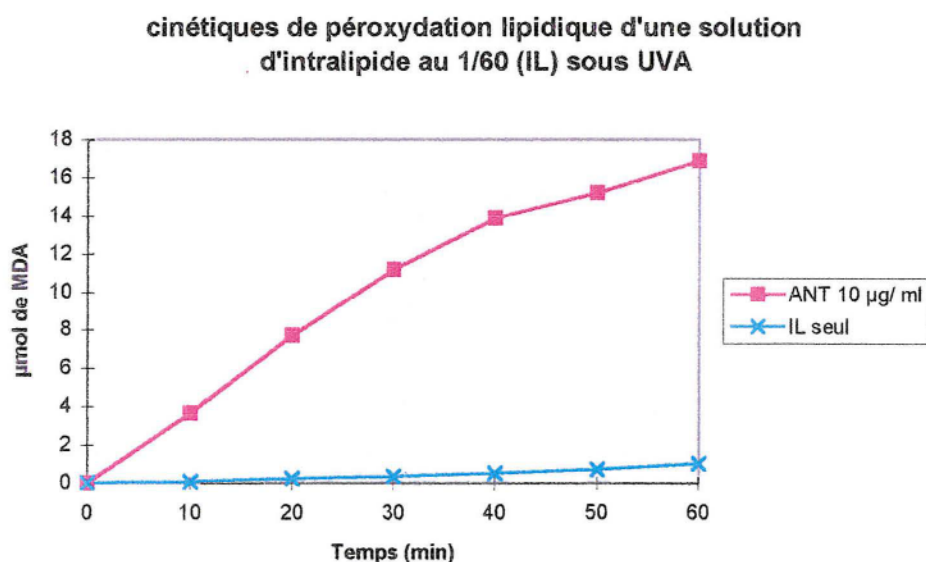


figure 10

On peut constater qu'une dilution au 1/60ème (dilution utilisée lors d'expériences de peroxydation (40)) des lipides permet d'éliminer le bruit de fond dû à l'oxydation des lipides par les UVA seuls car les courbes IL pur seul et avec anthracène sont peu différentes, on ne

voit que la peroxydation lipidique causée par les UVA. Un excès de lipides ne permet pas de mettre en évidence l'action de l'antracène sur l'oxydation lipidique. Des essais effectués avec une solution d'antracène non irradiée à une concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ n'ont pas donné de résultats.

Pour des rapports lipides/ anthracène, nous observons une peroxydation lipidique proportionnelle au temps d'irradiation, nous nous sommes attachés à montrer une corrélation entre la dose d'antracène présente dans le milieu et l'augmentation des MDA comme le montre la figure 11

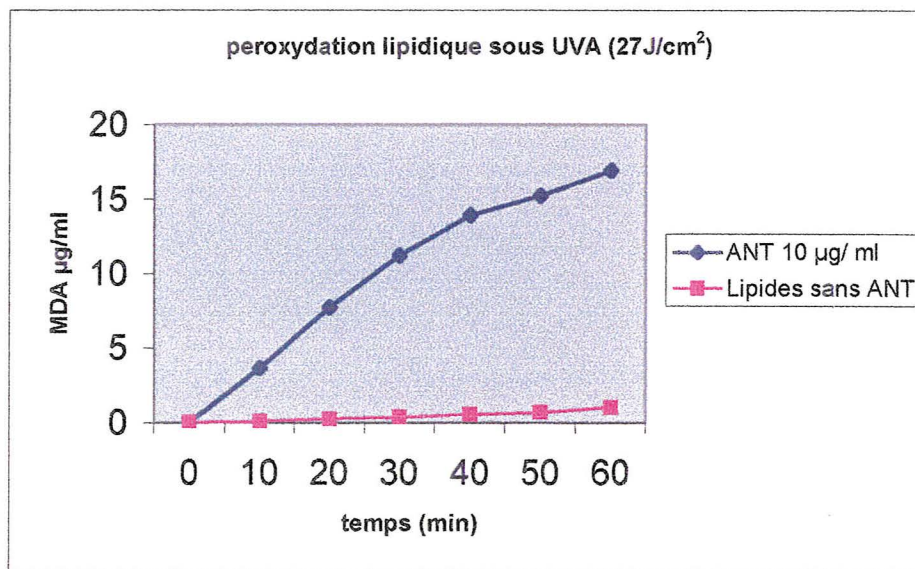


figure 11

Les deux essais ont été effectués avec des gammes de concentration d'antracène d'amplitude différente. On constate que dans le cas de la courbe 1 (gamme d'ANT de 0 à 10 $\mu\text{g/ml}$), il y a une proportionnalité entre le taux de MDA formé et la concentration d'antracène. Ce résultat n'est pas confirmé par la courbe 2 (gamme d'ANT de 0 à 20 $\mu\text{g/ml}$) car les points communs aux deux courbes ne sont pas reproductibles bien que le point zéro (oxydation naturelle de l'IL) des deux courbes soit proche. De plus, on constate qu'au bout de 15 minutes, temps de dégradation total de l'antracène par les UVA (cinétique HPLC et chimiluminescence), on observe encore un effet de peroxydation lipidique. Ceci indique la présence de métabolites actifs de l'antracène.

Cette expérience montre clairement la présence d'un plateau à partir d'une concentration d'anthracène de 10 $\mu\text{g/ml}$. Il y a soit un effet de saturation soit une consommation totale des lipides présents dans l'échantillon. Une cinétique pratiquée avec deux concentrations (10 et 20 $\mu\text{g/ml}$) pourrait apporter un élément de réponse (figure 12).

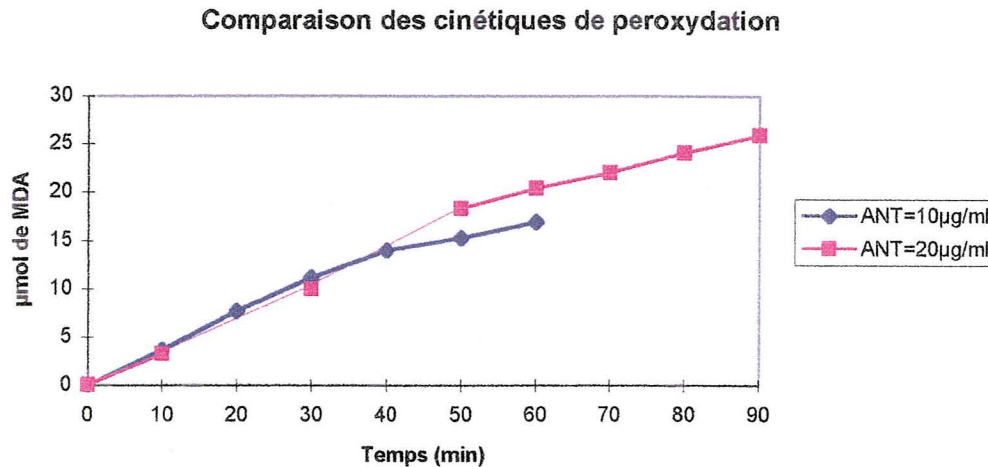


figure 12 UVA=27J/cm²

On peut constater que la courbe pour laquelle la concentration d'anthracène est de 10 $\mu\text{g/ml}$ présente une inflexion au temps 40 minutes suivie d'une phase linéaire. On retrouve cette linéarité sur la courbe (concentration d'anthracène = 20 $\mu\text{g/ml}$) au point 50 min.

Des antioxydants ont été utilisés pour identifier (dans la mesure du possible) les radicaux libres formés au cours de l'irradiation de l'anthracène.

La SOD et la Catalase agissent respectivement sur l'ion superoxyde et H_2O_2 .

L'histidine agit sur l'oxygène singulet.

La vitamine E et le BHT agissent plus spécifiquement sur RO^\cdot et bloquent les cassures de chaîne.

Le mannitol et le DMSO bloquent les radicaux hydroxyls OH^\cdot .

Le desféral bloque le Fe qui pourrait intervenir dans une réaction du type Fenton.

Des études doses/réponses avec des concentrations croissantes d'antioxydant ont été effectuées.

Les résultats montrent une action de la vitamine E et du BHT alors que le mannitol et le DMSO n'induisent aucune action. (figures 13, 14, 15, 16)

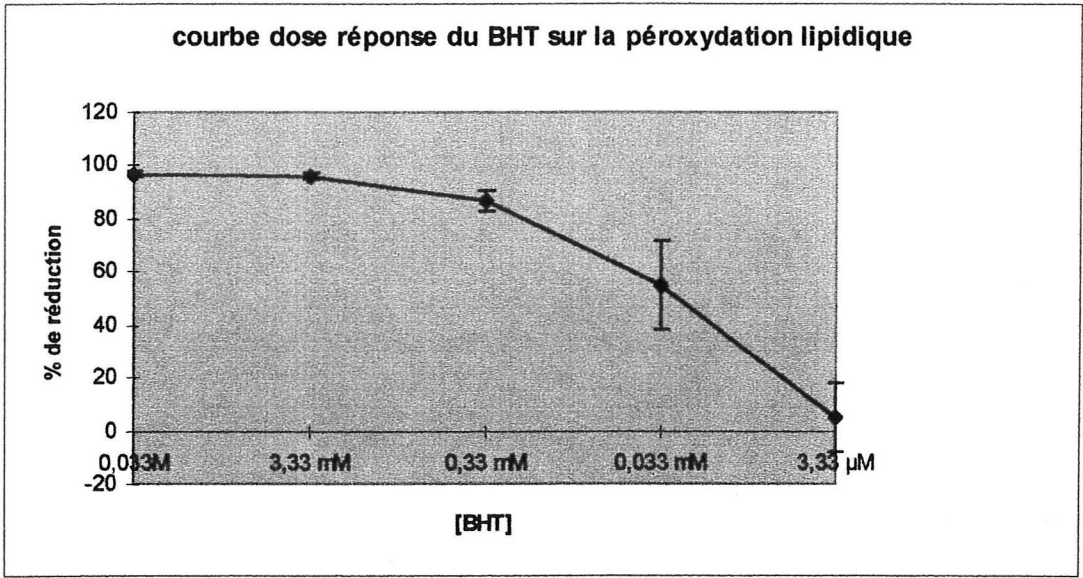


Figure 13 [Ant]=3.5 µg/ml

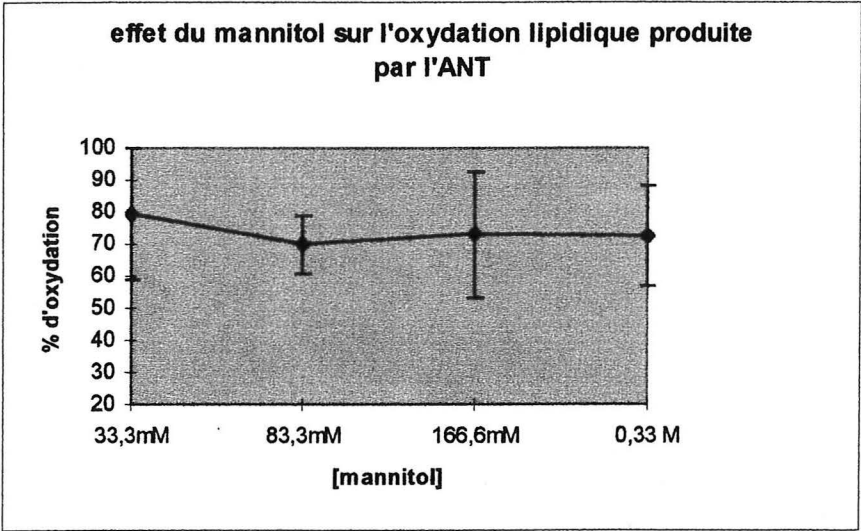


Figure 14 [Ant]=3.5 µg/ml

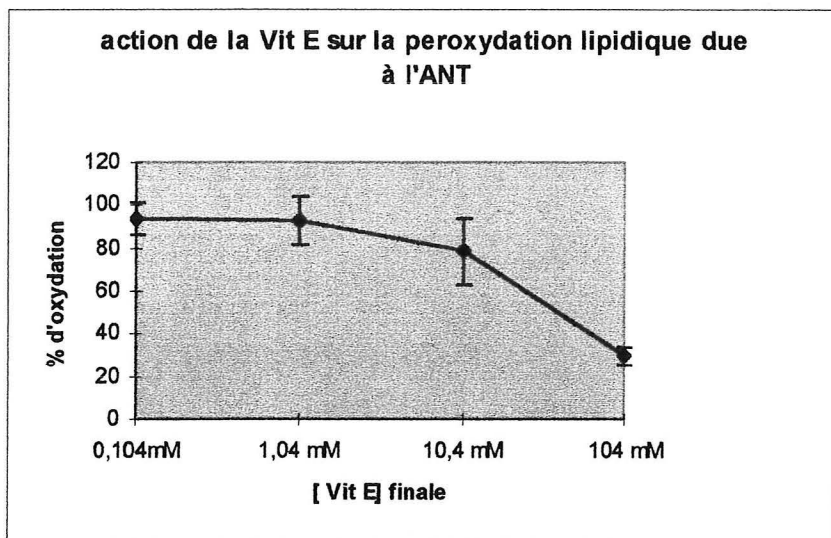


Figure 15 [Ant]=3.5µg/ml

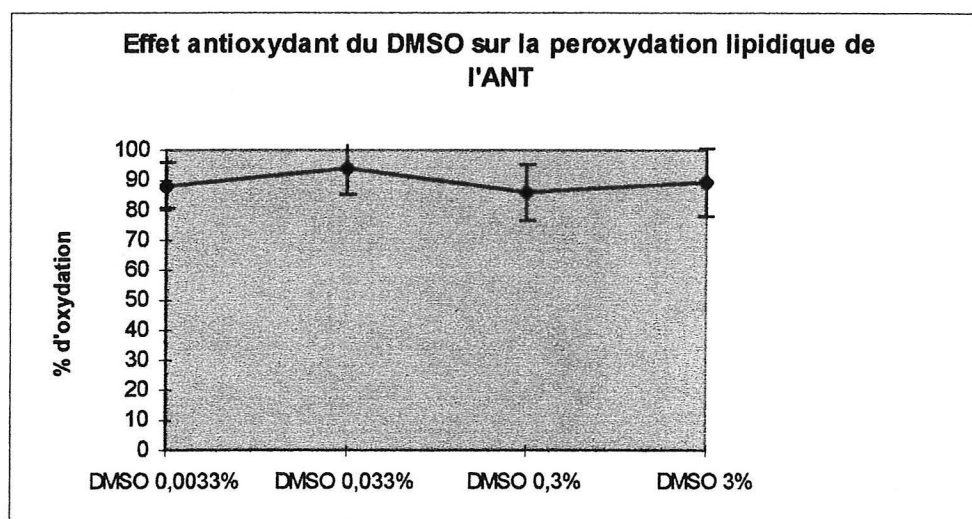


Figure 16 [Ant]=3.5µg/ml

La SOD et la Catalase n'ont montré aucune action antioxydante face à la formation de MDA. On peut comparer les antioxydants entre eux en se basant sur les pourcentages d'oxydation.

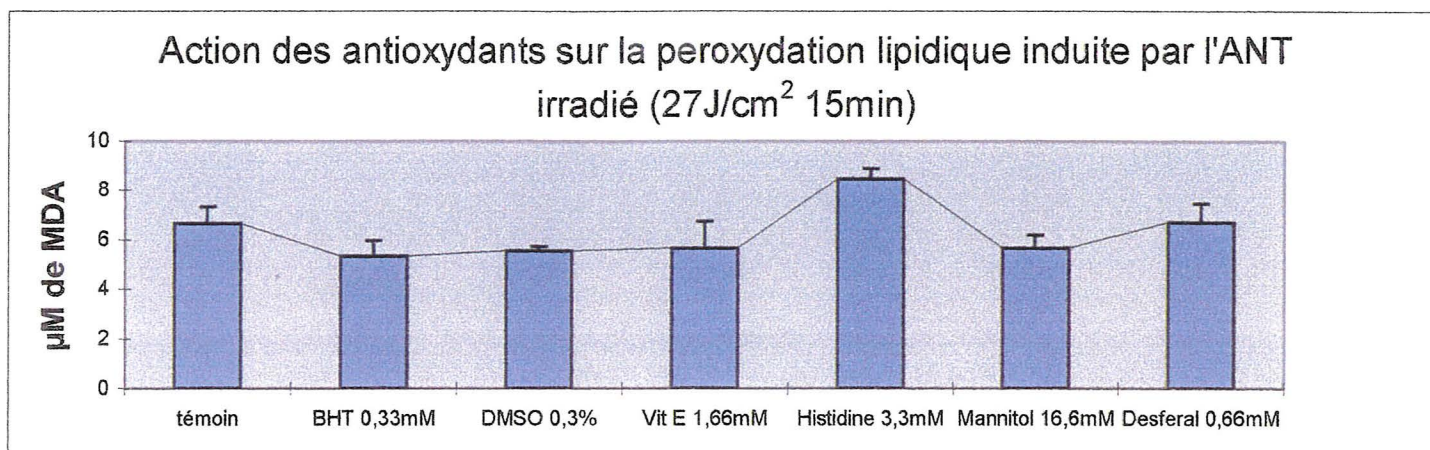


figure 17 [Ant]=3.5μg/ml

On peut donc remarquer que certains antioxydants possèdent un effet supérieur aux autres comme c'est le cas du BHT et de la vitamine E. (figure 17)

Mesure de la peroxydation protéique:

Tout comme les lipides, les protéines peuvent être les marqueurs d'une oxydation par les radicaux libres. La méthode utilisée en première intention est le dosage des carbonyles par la DNPH (32). Puis dans un second temps, il est envisagé la mise au point d'un dosage des carbonyles par une technique utilisant des anticorps spécifiques et un western blot (84). Cette méthode sera développée sur cellules en cultures.

La protéine choisie est l'albumine bovine à une concentration de 10 g/l (concentration utilisée pour la gamme étalon de la technique de dosage).

Comme pour les lipides, nous avons étudié l'influence de la concentration d'anthracène sur la production de groupements carbonyles (figure 18) ainsi que l'effet des antioxydants (figure 19).

influence de l'ANT sur la peroxydation protéique

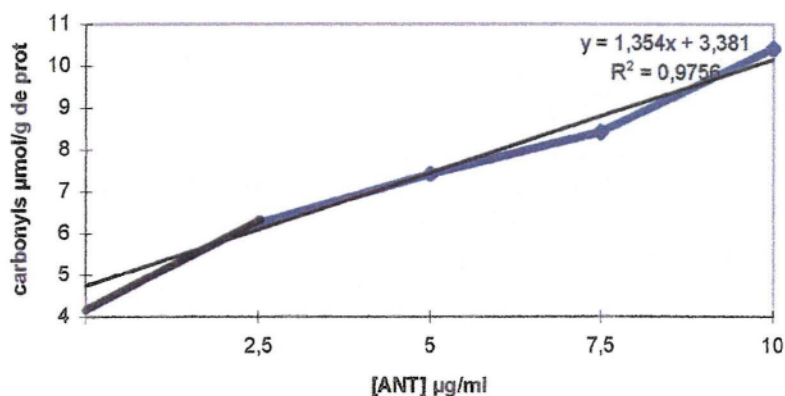


figure 18 UVA=27J/cm2

On peut donc constater que la concentration de groupements carbonyles varie avec la concentration d'anthracène. Il y a donc un effet dose d'anthracène dépendant. Une solution d'anthracène non irradiée aux même concentrations ne provoque pas d'oxydations protéiques.

[ANT]	témoin	DMSO	Histidine	BHT	Mannitol	Desféral	Vit E
3.5µg/ml	33.5	36.06	35.94	31.81	44.46	8.86	20.18
1.6 µg/ml	29.43	46.1	28.15	28.33	28.74	31.34	30

Les résultats sont donnés en µmol de carbonyles/ grammes de protéines.

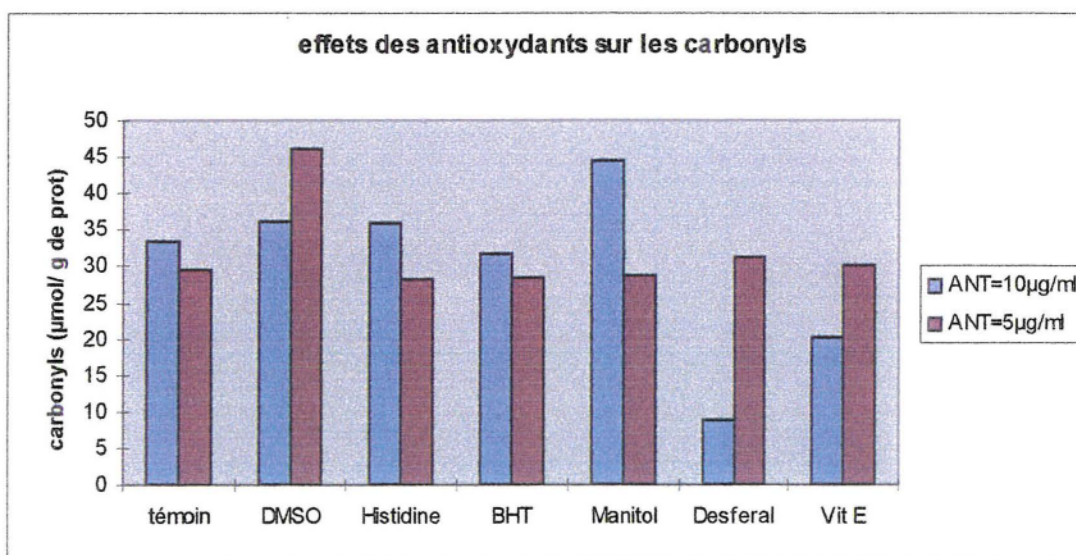


figure 19 [antioxydants] cf p 44

Seuls le desferal et la vitamine E ont une action évidente, faiblement le BHT et l'histidine. Cependant, ces résultats ne sont pas reproductibles et ne permettent pas une interprétation claire de l'action des antioxydants.

Nous avons réalisé en parallèle une étude similaire sur un autre marqueur de la peroxydation protéique. Notre choix s'est porté sur le dosage des groupements thiols présents dans l'albumine. Ces groupements existent sous forme réduite à l'état naturel. Sous l'action d'un oxydant, ils forment un pont disulfure qui ne peut plus réagir avec le réactif. On ne dose pas l'apparition d'une molécule mais sa disparition.

Nous avons donc étudié l'influence d'une concentration croissante d'anthracène soumis à une irradiation UVA (figure 20)

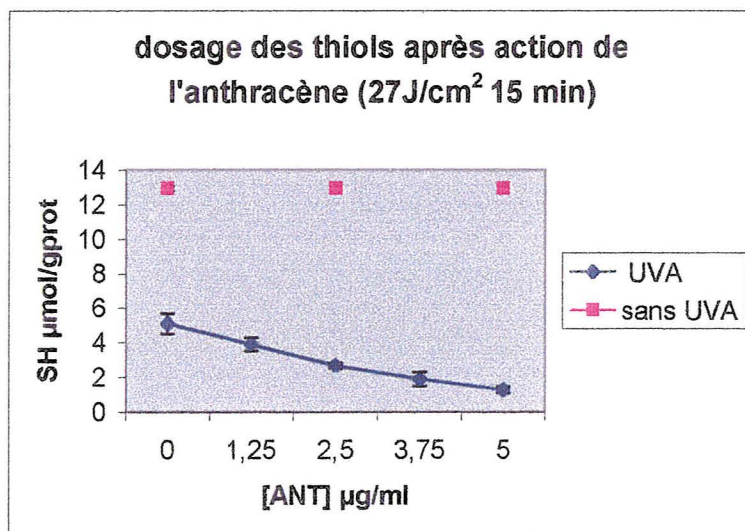


Figure 20

L'action des antioxydants précédemment utilisés avec les carbonyles a montré des résultats proches, cependant à interpréter avec précaution car les concentrations d'antioxydants n'étaient pas exactement identiques dans les deux essais. (figure 21). On peut cependant les comparer avec les résultats obtenus sur la peroxydation lipidique et noter qu'ils sont pratiquement identiques.

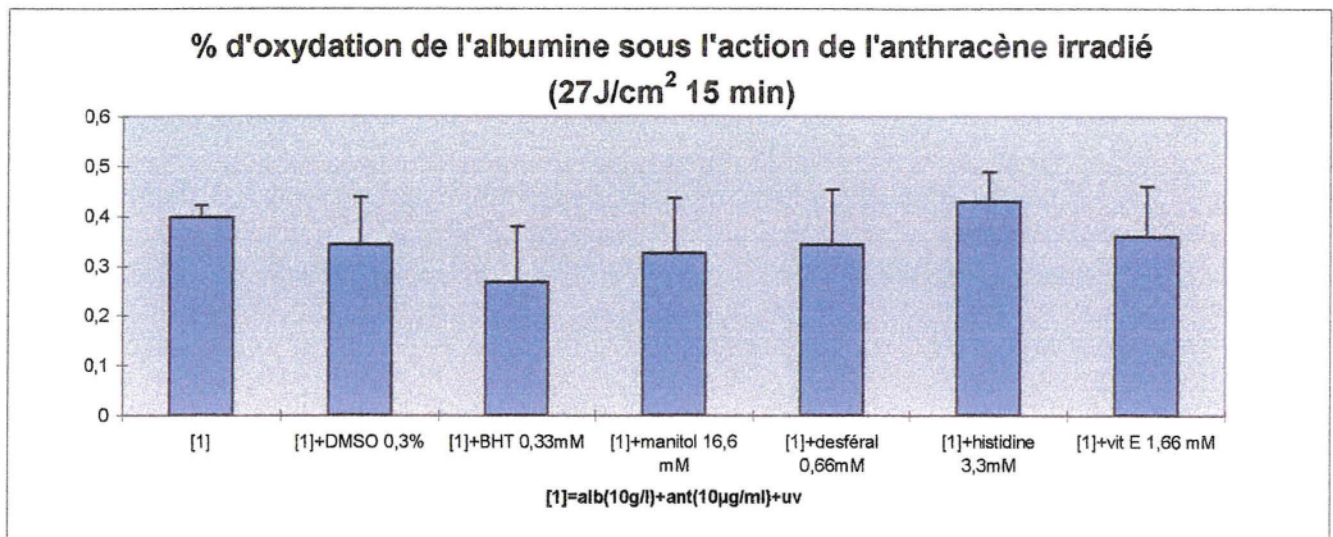


Figure 21 [Alb]finale=3.5 g/l,[Ant]finale=3.5µg/ml

Etude des cassures de l'ADN :

Les cassures de l'ADN ou strand-break sont étudiées par la technique de gel sur agarose. C'est une technique semi-quantitative qui permet cependant d'apprécier l'action de certains produits sur la formation de chaînes circulaire, linéaire ou semi-circulaire (95, 71).

La première étape a été la synthèse et la récupération d'un plasmide le PGL3 de 4800 pdb. L'utilisation de techniques de transfection d'*E. Coli* a permis d'obtenir un plasmide pur en fortes quantités (figure 22).

Des dépôts de concentrations croissantes d'anthracène n'ont montré de différence que pour la plus petite concentration (2.5 µg/ml). A cette concentration, on peut voir deux bandes dont une bande de faible intensité au niveau des témoins négatifs (ADN seul, ADN + ANT non irradiés, ADN irradié) représentant la forme surenroulée du plasmide. La seconde bande plus marquée est au niveau du témoin positif (ADN + ANT à 10 µg/ml irradié) représentant la forme circulaire du plasmide. Les autres concentrations présentent une seule bande au niveau du témoin positif. (figure 23)

L'utilisation des mêmes antioxydants que pour les protéines et les lipides a permis de mettre en évidence plusieurs faits:

- Il faut utiliser la concentration de 2.5 µg/ml d'anthracène pour éviter une destruction totale d'ADN malgré les antioxydants par rapport à l'anthracène. En effet, pour une concentration d'anthracène de 10µg/ ml on s'aperçoit que tous les antioxydants utilisés ne forment qu'une seule bande au niveau du témoin positif, il y a donc destruction de tout l'ADN par excès d'anthracène.
- Par appréciation de l'intensité des taches sur le gel, on peut définir un ordre de protection parmi les antioxydants que l'on retrouve dans plusieurs essais :

A une concentration d'anthracène de 5 µg/ ml on peut remarquer que tous les antioxydants ont réagit et ont formé deux bandes d'intensité différentes situées au niveau des témoins positifs et négatifs, la réaction n'a pas été totale ce qui permet de déterminer l'efficacité de l'antioxydant par rapport à l'importance des bandes. Plus les bandes situées vers le témoin négatif sont marquées, plus l'antioxydant est efficace (fig.24).

- On peut donc définir un ordre d'après le tableau suivant : DMSO> Desferal> Mannitol> BHT> Histidine> Vitamine E (tableau 2)

	DMSO	Histidine	BHT	Desferal	Mannitol	Vit E
essai 1	++++	+	++	+++	+++	+
essai 2	++++	+	++	+++	++	+

tableau 2

L'essai 2 a été effectué avec une solution d'anthracène à 2.5 µg/ ml et une concentration d'ADN deux fois supérieure à celle de l'essai 1 ce qui a permis d'obtenir des bandes plus intenses (figure 21).

Essai 1 : [Ant]=2.5 µg/ml et [ADN]=6ng/µl.

Enfin, un essai a été effectué avec irradiation par l'illuminateur à lumière froide. On peut constater qu'il ne se passe rien (échantillons identiques aux témoins) (figure 25).

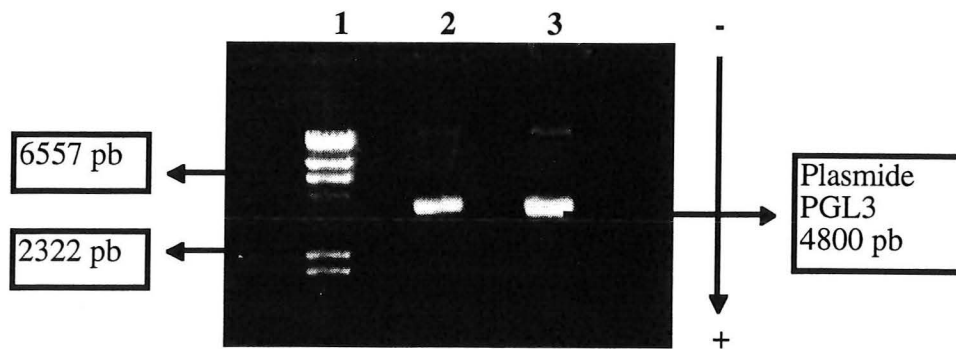


Figure 22 - Contrôle de l'extraction et de la purification du plasmide PGL3
 1: marqueurs de poids moléculaire ADN, MWMII (Boehringer); 2: PGL3 (2µl) 4800 pb; PGL3 (5µl)

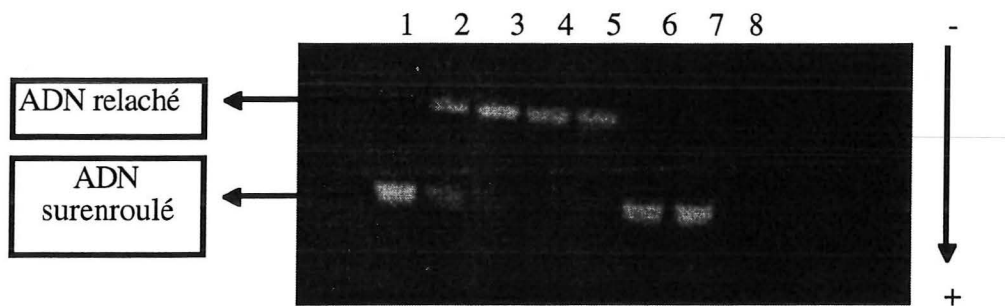


Figure 23 - Effet de l'antracène (ANT) irradié par les UVA sur la relaxation de l'ADN plasmidique surenroulé
 1: témoin ADN + UVA; 2: ADN + ANT 2,5 µg/ml + UVA; 3: ADN + ANT 5µg/ml + UVA; 4: ADN + ANT 7,5 µg/ml + UVA; 5: ADN + ANT 10 µg/ml + UVA; 6: témoin ADN non irradié; 7: témoin ADN + ANT 10 µg/ml non irradiés; 8: témoin positif ADN + H₂O₂ + Fer, non irradié

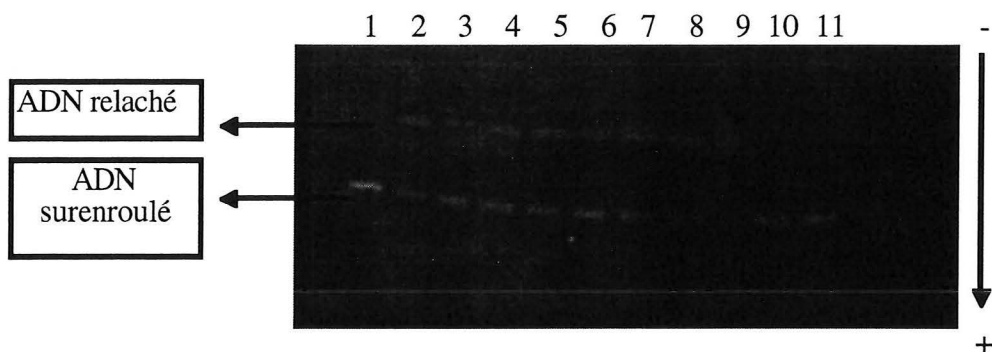


Figure 24 - Effet des antioxydants sur la relaxation de l'ADN par l'anthracène (ANT, 2,5 µg/ml) irradié par les UVA

1: témoin ADN + UVA; 2: témoin ADN + ANT + UVA; 3: ADN + ANT + DMSO + UVA; 4: ADN + ANT + Histidine + UVA; 5: ADN + ANT + BHT + UVA; 6: ADN + ANT + Desféral + UVA; 7: ADN + ANT + Mannitol + UVA; 8: ADN + ANT + Vit E + UVA; 9: témoin positif ADN + H₂O₂ + Fer, non irradié; 10: témoin ADN non irradié; 11: témoin ADN + ANT non irradiés

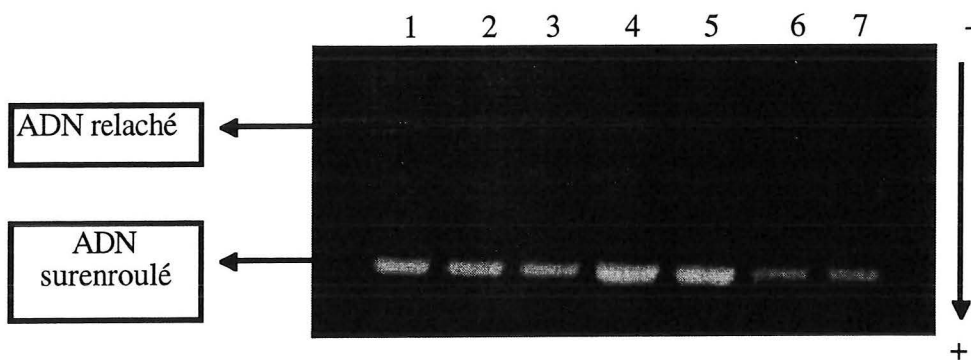


Figure 25 - Effet de l'anthracène (ANT) irradié par la lumière visible sur la relaxation de l'ADN plasmidique surenroulé

1: témoin ADN + UVA; 2: ADN + ANT 2,5 µg/ml + UVA; 3: ADN + ANT 5µg/ml + UVA; 4: ADN + ANT 7,5 µg/ml + UVA; 5: ADN + ANT 10 µg/ml + UVA; 6: témoin ADN non irradié; 7: témoin ADN + ANT 10 µg/ml non irradiés

DISCUSSION :

L'objectif de ce travail était d'étudier l'effet de l'anthracène sur les macromolécules biologiques lors de sa photodégradation en milieu aqueux par les rayonnements. L'anthracène fait partie d'une famille de molécules: les HAP qui sont retrouvés dans les sédiments de rivière (48, 49, 74, 60, 61) dont les potentialités toxiques sont très importantes.

L'anthracène est un produit très peu soluble dans l'eau, nous avons donc cherché un solvant répondant aux critères suivants: Ce solvant devait être inerte, miscible à l'eau en quantité importante, ne pas présenter d'interférences avec les techniques mises en œuvre et n'interférant pas avec l'objectif du travail.

Le solvant le plus utilisé est le Diméthylsulfoxyde (DMSO) dilué au 1/1000 ème dans de l'eau désionisée (74, 60, 61). La solution mère d'anthracène a une concentration de 10 g/litres de DMSO.

Bien que d'autres travaux (39, 56) préconisent l'acétonitrile comme solvant, et que le DMSO soit considéré comme un piègeur de radicaux libres, nous avons tenu à garder le DMSO pour plusieurs raisons:

- Le DMSO piège préférentiellement les radicaux libres de l'oxygène comme OH^\cdot et H_2O_2 (précurseur) et est un bon antioxydant comme l'indiquent les résultats. Cependant, la concentration utilisée dans nos expériences pour solubiliser l'anthracène (dilution au 1/1000 ème d'une solution pure de DMSO dans de l'eau désionisée) ne provoque à notre avis aucune interférence. Des concentrations similaires ont d'ailleurs déjà été utilisées au laboratoire dans le cadre d'essais portant sur d'autres molécules et les contrôles réalisés à cette occasion n'avaient pas montré d'interférences. Des essais complémentaires avec d'autres solvants comme l'acétonitrile pourraient confirmer cette hypothèse.
- Des témoins négatifs avec du DMSO ont été effectués et n'indiquent pas de différence significative avec un témoin sans DMSO.
- Le DMSO est le solvant le plus utilisé pour les cultures cellulaires et tous les milieux environnementaux car il n'est pas toxique. Dans l'éventualité d'expériences sur cellules, il est préférable d'avoir un solvant compatible.

Il est à noter une modification cristalline de la solution mère lors de sa conservation à + 4°C.

La solubilisation de l'anthracène dans le DMSO puis dans l'eau a été facilitée par un passage d'une heure au bain-marie à 60°C. (Cette température ne provoque pas de dégradation comme le prouve les résultats obtenus par HPLC sur la solution mère).

La concentration finale maximale d'utilisation est de 10 µg/ml, elle a été retenue d'après les données fournies par la littérature sur des essais de toxicité pratiqués sur des poissons ou des crustacés (49, 74, 60, 61).

Ayant défini les conditions de travail, nous avons étudié la dégradation de l'anthracène sous irradiation UVA ou visible. Les outils utilisés ont été la CLHP, la chimiluminescence ainsi que la RPE dans le but d'identifier les radicaux libres.

Le dosage et l'identification de l'anthracène par techniques séparatives a montré que la dégradation totale sous UVA a lieu après 15 minutes d'irradiation (27J/cm²). Cette dégradation rapide est retrouvée par certains auteurs: inférieure à une heure sous un mélange visible/ UVA/ UVB 100: 10: 1 d'une puissance de 1700µmol/ m² /s(29) et dégradation de 80% après 10 heures d'irradiation sous UVB à une puissance de 25 µmol/ m²/ s et 20 heures sous lumière visible (40 µmol/ m²/ s) (62).

Nous n'avons pu mettre en évidence les métabolites. Les résultats préliminaires utilisant la fluorimétrie montrent la présence d'un pic décalé par rapport à celui de l'anthracène. Ces résultats sont en accord avec ceux de Lin (56). La fluorimétrie permettrait donc de déterminer des pics d'absorption et d'émission des métabolites. Puis, par étude HPLC il serait possible d'isoler ce métabolite en s'aidant des caractéristiques fluorimétriques pour sa détection. La troisième étape serait la caractérisation du métabolite par spectrométrie de masse (SM) ou résonance magnétique nucléaire (RMN) si le composé est instable. Cette partie du travail sera approfondie ultérieurement.

La chimiluminescence s'est heurtée à plusieurs problèmes. Tout d'abord, on peut observer un blanc élevé quelle que soit la sonde utilisée. Ce phénomène est lié à la sensibilité importante de la technique. Les différences entre l'essai et le blanc sont faibles car la production de radicaux libres de l'oxygène est faible.

Les tracés de cinétique quels que soit la lampe utilisée sont assez déroutants par leur complexité. On peut toutefois noter qu'ils sont reproductibles (non en intensité mais d'aspect général). L'interprétation de ces tracés et des pic qui y figurent peut être expliquée par la dégradation de l'anthracène. Celle ci est très rapide et totale (15 minutes) sous UVA, ce qui

confirme les données de la littérature (48, 49, 62). Les dégradations par lampe visible montrent une série de pic apparaissant plus tardivement. On peut penser à l'apparition de composés intermédiaires (radicaux cationiques puis métabolites) avec formation de RL de l'oxygène (des cassures de cycle?). Cette hypothèse sera à confirmer par l'utilisation d'antioxydants spécifiques de certains radicaux libres.

L'identification des radicaux libres formés au cours de l'oxydation de l'anthracène a été tentée en RPE.

Les premiers essais ont montré que les piègeurs utilisés classiquement (POBN, DMPO et PBN) sont détruit partiellement par l'irradiation UV. Il est nécessaire d'introduire le piègeur avant l'irradiation UV afin de piéger directement les radicaux formés car leur demi-vie est très courte. Les résultats obtenus en ajoutant le piègeur après irradiation se sont révélés négatifs contrairement aux résultats obtenus par H. Oubrahim lors de son travail sur l'orellanine (70). Le spin trap alors utilisé était le DMPO placé après irradiation.

Très peu de données dans la littérature nous permettent de conclure. Il apparaît néanmoins que le nitrométhane et le 2 méthyl 2 nitrosopropane sont les seuls piègeurs utilisés lors d'irradiations UV.

Le second problème est la spécificité du piègeur: il faut un piègeur pouvant bloquer les radicaux cationiques formés par la dégradation de l'anthracène et/ou les RLO.

Cette étude permettrait de mettre en évidence les intermédiaires de réaction avant formation des métabolites. L'interprétation des spectres peut donner des indications sur la nature du radical mais l'identification des radicaux libres peut être faite de la même manière que les métabolites, à savoir SM et RMN.

La recherche d'une oxydation des macromolécules (protéines, lipides, ADN) placées au contact de l'anthracène irradié par des UVA nous a permis de montrer qu'il y avait bien mise en jeu de radicaux.

La mise en évidence de la peroxydation lipidique est faite par le dosage du malondialdéhyde. Une telle méthode nécessite des contrôles positifs et négatifs ainsi que des témoins pour pouvoir être interprétée. En effet, réalisée dans un milieu biologique tout groupement aldéhydique présent peut réagir et fausser le résultat, d'où la nécessité du témoin qui définit le bruit de fond de l'échantillon (76, 77). Dans le cadre de cette étude, les solutions utilisées ne contiennent qu'un mélange de lipides dilué dans de l'eau désionisée. Il n'existe en principe aucun autre groupement aldéhyde que ceux formés par l'oxydation des lipides. Des essais effectués avec un témoin contenant de l'intralipide seul non oxydé ont prouvé cette

affirmation. Cette technique a été validée et possède donc une bonne reproductibilité ainsi qu'une bonne répétabilité (76, 77). Il existe une autre technique plus adaptée aux milieux biologiques permettant d'éviter les interférences (76). L'HPLC est plus sensible et permet une meilleure séparation du MDA par rapport aux autres molécules ayant réagi avec l'acide thiobarbiturique. Dans ce travail, la pureté de l'échantillon de départ permet d'utiliser la méthode fluorimétrique classique.

Les lipides utilisés pour l'expérience font partie d'un mélange lipidique utilisé en nutrition parentérale. Ce sont donc des produits directement assimilables constitués d'un mélange d'acides gras essentiels (huile de soja et lécithine d'œuf cf. VIDAL®). Il y a donc un mélange d'acides gras saturés ou non à longueur de chaîne variable. Ce mélange nous semblait assez représentatif des lipides membranaires, cibles des attaques radicalaires et avait déjà été utilisé dans d'autres essais (40).

La dilution au 1/ 60^{ème} s'est imposée au vu des premiers résultats: un excès de lipides ne permettait pas de mettre en évidence l'action de l'anthracène mais seulement celles des UV sur les lipides (les UV sont connus pour provoquer une peroxydation lipidique importante).

L'anthracène seul ainsi que les UVA seuls n'ont pas donné de résultats.

Les essais effectués avec des quantités croissantes d'anthracène ont montré l'apparition d'un plateau dû à une saturation par excès d'anthracène par rapport à la quantité de lipides présents. Tous les lipides sont consommés dans la réaction.

La cinétique effectuée montre une augmentation continue de la production de MDA bien après 15 minutes, alors que tout l'anthracène présent a été détruit par les UVA (cf. résultats HPLC). Ceci suggère que les métabolites formés au cours de la dégradation de l'anthracène sont oxydants, ou sont transformés en métabolites secondaires eux-mêmes oxydants sous l'influence des UVA.

Les différents essais avec les antioxydants montrent clairement que la réaction est reproductible. On peut noter que ces produits ont un pouvoir antioxydant différent. Ceux qui sont les plus efficaces sont ceux qui agissent directement sur les radicaux alkyls ou aryles formés à partir des chaînes des acides gras (Vit E, BHT). La deuxième espèce radicalaire présente en quantités importantes serait l'ion hydroxyle OH° d'après les résultats obtenus avec le DMSO et le Mannitol.

La catalase et la SOD n'ont aucune action montrant de ce fait l'absence d' H_2O_2 et d'ion superoxyde intermédiaire.

Le Desféral chélateur du fer possède une action. Mais celle ci peut être due à son action directe sur l'ion hydroxyle (le Desféral possède une action conjointe sur le Fer et l'ion hydroxyle).

Le dosage du Fer dans le milieu aurait pu expliquer ce phénomène mais il n'a pas été pratiqué.

La technique de "coupure de chaîne" pratiquée sur de l'ADN a permis de confirmer les résultats obtenus avec la peroxydation lipidique.

Cette technique est une méthode simple classiquement utilisée bien que pas très quantitative. La technique utilisée dans ce travail a été inspirée de la technique des gels d'agarose utilisée par H.Oubrahim dans son travail sur l'orellanine (70). Le plasmide d'ADN est un outil facile à utiliser et à obtenir par des méthodes de transfection. Il est très représentatif de l'ADN nucléaire car il est double brin et sa structure lui permet une migration différentielle suivant sa conformation.

Nous avons optimisé les concentrations d'anthracène et d'ADN afin d'améliorer la lisibilité des gels de dégradation d'ADN.

Tout ceci afin d'éviter une saturation de la réaction provoquant une destruction totale de l'ADN (apparition de la forme circulaire relâchée et disparition totale de la forme surenroulée). Un mélange des deux formes est observable pour une quantité d'anthracène de 2,5 $\mu\text{g/ml}$. Cette réaction montre que l'anthracène provoque systématiquement une coupure de brins d'ADN. On peut noter que la coupure de l'ADN est de type monobrin car il n'y a pas apparition de la forme linéaire de l'ADN par cassure des deux brins. Suivant le type de radicaux libres et l'intensité de la réaction, on peut avoir disparition totale de l'ADN.

Cette forme peut être observée lorsque l'on fait agir un mélange H_2O_2/Fe sur de l'ADN. On remarque sur le gel la présence d'une tache diffuse qui s'allonge tout le long du gel. Il s'agit de l'ADN sous forme fragmenté.

Il faut cependant noter qu'à aucun moments y compris avec le témoin, il n'y a apparition de la forme linéaire du plasmide, forme que l'on doit normalement rencontrer sur le gel d'après la littérature. Ceci est peut être dû à un temps de contact inadéquat. Le fait de faire une cinétique d'irradiation permettrait peut être de montrer la forme linéaire.

Les expériences ont montré que les UVA n'ont pas d'action directe sur l'ADN en l'absence de photosensibilisants et que l'anthracène seul n'a pas d'action non plus. Par contre,

l'association des deux provoque une destruction du plasmide qui de la forme surenroulée de départ se retrouve sous forme circulaire confirmant les résultats publiés sur la photoinduction des HAP et les attaques de l'ADN (15, 98, 101).

Bien que semi-quantitative par appréciation de l'importance des bandes, l'étude des antioxydants montre une forte action du DMSO et du mannitol ainsi que du BHT. On peut donc comme pour les lipides dire qu'il y a présence de radicaux RO[•] provenant soit de l'ADN soit de l'anthracène ainsi que de l'ion hydroxyl. Dans l'étude sur l'ADN, le Desféréal, chélateur du Fer, limite voir annule les lésions de l'ADN. Ceci peut être dû à la chélation du fer présent dans l'ADN.

Les résultats obtenus lors de l'oxydation de l'ADN peuvent être corrélés à ceux obtenus lors de la peroxydation lipidique. On peut remarquer une action identique des antioxydants sur les deux macromolécules.

La peroxydation protéique n'a pas donné de résultats pouvant être comparés à ceux de la peroxydation lipidique. Néanmoins, les résultats indiquent une oxydation.

L'albumine a été choisie car elle est la protéine la plus abondante dans le règne animal. L'avantage d'une solution pure d'albumine est que l'on peut doser directement l'interaction de l'anthracène sur la protéine sans être obligé de soustraire un témoin. En effet, les tests ont prouvé l'absence de bruit de fond.

La technique de dosage par la DNPH été retenue car elle permet de mettre en évidence une action de l'anthracène photoinduit sur les protéines, étape préliminaire avant la mise au point d'une technique de dosage des carbonyles par immunologie (western blot ou Elisa) beaucoup plus sensible et spécifique et moins longue car il existe des anticorps spécifiques du groupement diphénylhydrazone. Cette technique permet une séparation des différentes protéines sur un gel d'acrylamide, puis de marquer par des anticorps spécifiques les protéines oxydées

Le dosage des carbonyles est une méthode longue qui nécessite beaucoup d'étapes intermédiaires, ce qui induit une mauvaise reproductibilité (Coefficient de Variation= 9%). Ce manque de reproductibilité se traduit au niveau des dosages par des variations très importantes et la nécessité d'avoir un témoin positif pour chaque expérience. Ceci malgré le changement de solution mère d'albumine à chaque expérience. On ne peut donc mettre en cause une oxydation de la solution mère due à une mauvaise conservation.

On peut noter que les témoins de carbonyles sont pratiquement identiques pour des concentrations d'anthracène variant du simple au double, ce qui indique un manque de sensibilité et de spécificité de cette méthode.

De ce fait, le système de calcul doit faire référence à la quantité de protéines présentes dans la solution. Il est à noter que le dosage de protéines est lui parfaitement reproductible et possède une bonne répétabilité au cours des expériences.

Les essais avec les antioxydants sont difficilement interprétables. On peut retrouver une faible action de l'histidine et du BHT indiquant la présence de cassures de chaînes (radicaux RO°) mais plus surprenant une forte action du desferal et de la vitamine E. Si on peut expliquer l'action de la vitamine E par son effet chélateur des radicaux RO° , l'action du desferal reste plus incertaine (action sur OH° alors que l'on n'observe aucune action avec le DMSO et le mannitol qui agissent normalement sur le même radical). L'albumine serait-elle complexée avec du Fer? Il faudrait doser le fer dans chaque échantillon et travailler avec du matériel et des réactifs exempts de traces de métaux.

L'utilisation de la technique dosant les groupements thiols permet de pallier le manque de spécificité et de sensibilité du dosage des carbonyles. Cependant, pour que cette méthode soit sensible, il est nécessaire que les protéines dosées possèdent des groupements thiols en quantité suffisante. De plus c'est une méthode efficace in vitro sur un système ne contenant qu'un type de protéines, mais dans un système plus complexe, on se heurte à l'interférence d'autres groupements réduits comme le glutathion.

D'autre part, cette méthode se heurte à quelques problèmes techniques :

- Certaines molécules peuvent absorber dans les mêmes longueurs d'onde (hémoglobine)
- Les groupements thiols sont très sensibles à l'oxydation. Il est nécessaire de travailler sur de la glace et d'éviter au maximum la présence d'ions métalliques.
- Le réactif d'Ellman (DTNB) est très sensible à la lumière (préparation extemporanée).
- Il est nécessaire d'effectuer une courbe d'étalonnage d'albumine ou de N acetyl cystéine pour chaque série de dosage ou de calculer les concentrations en utilisant le coefficient moléculaire d'absorption du DTNB, ce qui nécessite de tenir compte du pH et de la force ionique du milieu réactif.
- La coloration obtenue n'est pas stable dans le temps, une oxydation apparaît.

CONCLUSION:

Les résultats obtenus au cours de cette étude montrent clairement que l'anthracène ne possède pas d'activité néfaste pour les macromolécules par lui-même mais qu'en présence de lumière et plus particulièrement d'UVA, un effet délétère apparaît. Celui-ci est concentration dépendant.

Les cinétiques effectuées montrent que l'activité toxique croît avec le temps malgré la dégradation rapide et totale de l'anthracène. Ceci prouve que les métabolites de dégradation, eux-mêmes irradiés, sont plus actifs que la molécule mère. Certains de ces métabolites sont probablement des radicaux libres qui n'ont pas tous été identifiés. Parmi ceux-ci, on peut retrouver des radicaux libres de l'oxygène comme l'ion hydroxyle. Nous n'avons pas mis en évidence une production d'oxygène singulet ni celle d'ion superoxyde.

Nous pouvons comparer certains de nos résultats avec ceux obtenus par Sinha B.K (1983)(87) sur la même molécule d'HAP. Son travail sur un plasmide d'ADN d'*E.Coli* irradié 30 minutes en présence de concentrations d'anthracène de 1 μ M montre la présence de cassures et d'adduits. De plus, il constate qu'en présence d'oxygène, les dommages sont plus importants que la même réaction sous conditions anaérobies. Ce qui lui permet de déduire à la présence de RLO. Sinha utilise un gel de polyacrilamide (après extraction) pour mettre en évidence une agrégation de l'albumine humaine ainsi que des complexes anthracène-proteine. Les concentrations utilisées sont comparables à celles utilisées dans notre travail. Les conclusions sont identiques et ne peuvent par contre mettre en évidence la présence de RLO, la présence ou non d'oxygène modifiant peu les résultats. La peroxydation lipidique a été étudiée sur des liposomes issus de foie de rat et déterminée par réaction avec le TBA. Les résultats montrent une peroxydation avec l'anthracène sous irradiation. L'utilisation d'enzymes connues pour bloquer les RLO (SOD, catalase) n'induit aucun changement. Nous ne pouvons cependant pas réellement comparer ces résultats aux notre car le temps d'irradiation ainsi que les concentrations utilisées sont différentes. Dans l'ensemble, on peut dire que les résultats sont complémentaires.

Certaines études laissent supposer indirectement la formation de radicaux libres par exemple l'observation d'une diminution très nette de la toxicité de l'anthracène dans des écosystèmes

riches en acides humiques, qui pourraient se comporter comme des piègeurs de radicaux libres (59).

La photoactivation des HAP par les UV pose un problème dans le cadre de la pollution de l'environnement. C'est pourquoi, des travaux sont réalisés pour étudier une possibilité de dégrader les HAP par des moyens chimiques ou microbiologiques. Dans cette optique, des essais de dégradation par un procédé oxydatif ont été effectués. Il s'agit de détruire l'HAP à l'aide d'une réaction de Fenton (production de radicaux hydroxyls) et de potentialiser cette dégradation avec des surfactants comme le sodium dodécylsulfate (SDS) (59).

D'autres travaux utilisent des souches de micromycètes ayant la faculté de dégrader les hydrocarbures par digestion enzymatique. Dans ce cadre, il peut être intéressant d'étudier les métabolites produits afin de les comparer avec ceux résultant d'une photodégradation et vérifier s'ils ne sont pas plus toxiques que le produit de départ.

Cependant, rien n'indique que les métabolites retrouvés lors d'une dégradation photochimique soient identiques à ceux retrouvés lors d'une biodégradation, ni que leur toxicité respective soit proche.

Les systèmes de détoxification cellulaire étant multiples, il y a une multitude de voies de dégradations utilisant des enzymes spécifiques que l'on peut retrouver localisées dans certains tissus.

On peut cependant considérer que le système de détoxification principal utilisé dans les cellules eucaryotes est le système utilisant la famille des cytochromes et essentiellement le cytochrome P450 et sa réductase associée. Certaines études ont ainsi montré que ce cytochrome était impliqué dans la métabolisation des HAP.

Dans la suite de ce travail, nous comparerons les résultats obtenus sous UVA avec ceux obtenus par l'utilisation d'un système simplifié de microsomes ne comportant que le cytochrome P450A1 et son cofacteur NADPH. Les résultats obtenus seront comparés avec ceux de l'irradiation UV.

En parallèle, nous essayerons de mettre en évidence les métabolites formés lors des dégradations photochimiques et enzymatiques par fluorimétrie et spectrométrie ainsi que par analyse HPLC.

Les métabolites séparés par HPLC seront étudiés par Spectrométrie de Masse et Résonance Magnétique Nucléaire afin de déterminer leur structure.

Ces tests *in vitro* seront suivis d'essais *in vivo* sur cultures cellulaires avec mesure des marqueurs spécifiques du stress comme le taux de Glutathion intracellulaire, l'activité de certaines enzymes: Glutathion peroxydase, Super Oxyde Dismutase, catalase.

Sur ces mêmes cellules, nous pourrions également mettre en évidence et doser les effets d'une oxydation cellulaire notamment en dosant les groupements thiols intracellulaires, les MDA reflète d'une oxydation lipidique. Le dosage des groupements carbonyles par des méthodes utilisant des anticorps marqués permettra d'apprécier l'oxydation protéique en éliminant le bruit de fond dû aux acides et cétones présents dans le cytoplasme. Les carbonyles proviennent de l'oxydation des groupements alcools présents sur les protéines.

Nous étudierons les effets sur l'ADN cellulaire par différentes méthodes:

Nous utiliserons la technique COMET d'électrophorèse sur gel afin de déterminer le taux de cassure de l'ADN (la migration de l'ADN du noyau étant plus ou moins forte selon l'importance des cassures).

Ensuite, après extraction de l'ADN, nous pourrions doser les bases oxydées comme la 8-hydroxyl-2-deoxyguanosine et la 5-hydroxyméthyl-2-déoxyuridine.

Enfin, le comportement apoptotique des cellules sera aussi étudié.

D'autre part, les essais de RPE et de chimiluminescence vont être repris en vue de détecter, d'identifier et de comparer les espèces radicalaires formées lors de la dégradation de l'anthracène *in vitro* et par les systèmes cellulaires.

Les perspectives d'un tel travail sont multiples :

Tout d'abord, il permettra d'apporter une meilleure connaissance sur la toxicité des HAP et de leurs métabolites après photodégradation.

Par ailleurs, certains tests une fois standardisés pourront être appliqués non seulement à tous les hydrocarbures mais aussi être étendus à d'autres familles chimiques comme les solvants et autres produits utilisés en quantité dans l'industrie chimique. On peut envisager de tester de nouveaux produits avant leur commercialisation ce qui permettrait de déceler rapidement une toxicité éventuelle évitant ainsi une perte de production. On pourrait mettre en évidence la toxicité de certains métabolites formés dans des conditions particulières, par exemple vérifier l'absence de toxicité l'innocuité de certains métabolites formés dans des sols retraités chimiquement ou après dégradation bactérienne ou fongique.

BIBLIOGRAPHIE :

4. **Ankley G.T, Collyard S.A**; Influence of ultraviolet light on the toxicity of sediments contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons; 1994 *Environ.Toxicol.Chem*; 13 (11) : 1791-6
5. **Baird WM et al**; Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts by postlabelling with the weak beta-emitters ³⁵S-phosphorothioate and ³²P-phosphate, immobilized boronate chromatography and high-performance liquid chromatography ; *IARC Sci Publ* 1993;(124):217-26
6. **Baynes JW**; Role of oxidative stress in development of complications in diabetes ;1991 ;*Diabetes* ;40 :405-12
7. **Berger M et al** ;radical oxidation reactions of the purine moiety of 2'deoxyribinucleosides and DNA by iron containing minerals ;1993 ;*Carcinogenesis* ;14 :41-6
8. **Berlett BS,Stadtman ER**;Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress ;1997 ;*J. Biol. Chem* ;272 :20313-6
9. **Bu-Abbas A, Ioannides C, Walker R**; Evaluation of the antimutagenic potential of anthracene: in vitro and ex vivo studies; 1992; *Mutation Res*; 309; 101-7
10. **Burcham PC, Kuhan YT**;Diminished susceptibility to proteolysis after protein modification by the lipid peroxidation product malondialdehyde :inhibitory role for crosslinked and noncrosslinked adducted proteins ;1993 ;*Arch. Biochem. Biophys* ;340 :331-7
11. **Burton GW, Ingold KV** ;Beta caroten :an unusual type of lipid antioxidant ;1984 ;*Science* ;224 :569-73
12. **Cadet J et al**; Oxydations radicalaires photo et radio induites des bases pûriniques et pyrimidiques des acides nucléiques ;1991 ;*J Chim Phys* ;88 :1021-42
13. **Cadet J, Weinfeld M**;detecting DNA damage ;1993 ;*Anal Chem* ;65 :675-82

14. **Cadet J et al**;The Photochemistry of nucleic acids ;1990 ;in *Bioorganic Photochemistry (Morrison Ed.) Vol 1, Wiley-Interscience, New-York* :1-272
15. **Cavaliere EL, Rogan EG**; Central role of radical cations in metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons; 1995; *Xenobiotica*; Vol 25 N°7; 677-688
16. **Cerniglia CE** ;Biodegradation of polycyclic hydrocarbons ; 1992 ;*Biodegradation* ; 3 :227-43
17. **Chakravarti D et al** ;Relating aromatic hydrocarbon-induced DNA adducts and c-H-ras mutations in mouse skin papillomas : the role of apurinic sites ; 1995 ;*Proc Natl Acad Sci USA*;92(22):10422-26
18. **Chance B,Sies H, Boveris A** ;Hydroperoxide metabolism in mammalian organs ;1979 ;*Physiol Reviews* ;59(3) :527-604
19. **Chapman ML ,Rubin BR, Gracy RW** ;Increased carbonyl content of proteins in synovial fluid from patients with rhumatoid arthritis ;1989 ;*J. Rheumatol* ;16 :15-18
20. **Chiu D, Kuypers F, Lubin B** ;Lipid peroxidation in human red cells ;1989 ;*Seminars in hematology* ;26(4) :257-76
21. **Chmura J, Slawinski J** ; Assay of antioxydants by the quenching of the anthracene-sensitized electrochemiluminescence; 1994; *J Biol Chem* ; 9(4); 1-6
22. **Clark JM** ;The toxicity of Oxygen ;1974 ;*Am Rev Resp Dis* ;110 :40-50
23. **Davies KJ** ;Protein modification by oxidants and the role of proteolytic enzymes ;1993 ;*Biochem. Soc. Trans* ;21 :346-53
24. **Deby C, Pencemail J** ;Toxicité de l'oxygène, radicaux libres et moyens de défense ;1986 ;*Presse Med* ;31 :1468-73
25. **Dillard C, Tappel L** ;Lipid peroxidation products in biological tissues ;1989 ;*Free Rad Biol Med* ;7 :193-96
26. **Don PS et al** ; benzo(a)pyrene metabolism, DNA-binding and UV-induced repair of DNA damage in cultured skin fibroblasts from a patient with unilateral multiple basal cell carcinoma ; 1989; *Br J Dermatol* 120(2)161-71
27. **Emerit J et al** ;Les radicaux libres dérivés de l'oxygène et la peroxydation lipidique. Rôle en biologie et en physiopathologie ;1986 ;*Presse Med* ;15(16) :751-54
28. **Enrique C** ;Biochemistry of oxygen toxicity ;1989 ;*Annu Rev Biochem* ;58 :79-100

29. **Erickson RJ et al** ; Additive toxicity of binary mixtures of phototoxic polycyclic aromatic hydrocarbons to the oligochaete *lumbriculus variegatus* ; 1999;*Toxicol Appl Pharmacol* 154(1):97-105
30. **Esterbauer H,Schaur RJ,Zollner H** ;Chemistry and biochemistry of 4 hydroxynonenal, malonaldehyde,and related aldehydes ;1991 ;*Free. Radic. Biol. Med* ;11 :81-128
31. **Esterbauer H, Kevin Cheeseman**; Determination of aldehydic lipid peroxydation products : Malonaldehyde and 4 hydroxynonenal in *Methods in Enzymology*, vol 186 Oxygen radicals in Biological Systems; Academic Press, INC
32. **Esterbauer H, Schaur R, Zollner H**; Chemistry and biochemistry of 4 hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes; 1991; *Free. Radic. Biol. Med* ;11 : 81-128
33. **Esterbauer H**; Estimation of peroxydative damage. A critical review. Symposium conférences lilly 1995; *Pathologie Biologie*; 1996; 44 (1); 25-28
34. **Favier.A** ;Le stress oxydant :intérêt de sa mise en évidence en biologie médicale et problèmes posés par le choix d'un marqueur ;1997 ;*Ann ; Biol ; Clin* ;55(1):9-16
35. **Fisher MT, Stadtman ER** ;Oxidative modification of E.Coli glutamine synthetase ; Decreases in the thermodynamic stability of protein structure and specific changes in the active site conformation ;1992 ;*J Biol Chem* ;267 :1872-80
36. **Fong AT et al** ; Carcinogenicity, metabolism and Ki-ras proto-oncogene activation by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in rainbow trout embryos ; 1993 ;*Carcinogenesis* ;14(4):629-35
37. **Foye WO, Karnik PS, Sengupta SK** ; DNA-binding abilities of bisguanyllhydrazones of anthracene-9,10-dicarboxaldehyde ; 1986 *Anticancer Drug Des* ;1(2):65-71
38. **Frenkel K, Wei L, Wei H** ; 7,12-dimethylbenz[a]anthracene induces oxidative DNA modification in vivo ; 1995 ; *Free Rad Biol Med* ;19(3):373-80
39. **Gala W.R, Giesy J.P**; Flow cytometric determination of the photoinduced toxicity of anthracene to the green alga *Selenastrum capricornutum*; 1994; *Environ.Toxicol.Chem*; 13 (5) : 831-840
40. **Gay B**; Screening de l'activité antioxydante des flavonoïdes et validation sur culture de fibroblastes; DEA de Biologie cutanée et cosmétologie; 1992
41. **Gill RD et al** ; Analysis of point mutations in murine c-H-ras of skin tumors initiated with dibenz[a,j]anthracene and derivatives ; 1992 ; *Mol Carcinog* ;6(1):53-9

42. **Gutteridge JMC, Halliwell B** ;The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems ;1990 ;*Trends Biochem Sci* ;15(4) :129-35
43. **Halliwell B, Gutteridge JMC** ;Oxygen radicals and the nervous system ;1985 ;*Trends Neurosci* ;8 :22-26
44. **Halliwell B, Gutteridge JMC** ;Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases :an overview ;1990 ; *in methods in Enzymology Vol 186, Academic press, New York* :1-85
45. **Halliwell B, Gutteridge J.M.C**; Second edition; 1989; *Free Rad Biol Med* Clarendon Press Oxford
46. **Harvey RG, Cortez C, Sugiyama T**; Biologically active Dihydrodiol metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons structurally related to the potent carcinogenic hydrocarbon 7,12 dimethylbenz[a]anthracene; 1988; *J Med Chem*; 31 :154-159
47. **Hida.H** ; Anticancereux et espèces réactives de l'oxygène :Etude de l'effet des antioxydants sur la peroxydation microsomale induite par l'adriamycine ; Thèse de Doctorat Université Joseph Fourier, GRENOBLE, UFR de Pharmacie; 1993
48. **Huang X.D, Dixon G, Greenberg B.M**; Impacts of UV radiation and photomodification on the toxicity of PAHs to the higher plant *Lemna gibba*; 1993; *Environ.Toxicol.Chem*; 12 :1067-1077
49. **Huang XD, Dixon G**; Increased polycyclic aromatic hydrocarbon toxicity following their photomodification in natural sun light: Impacts on the duckweed *Lemna gibba* LG3; 1995; *Ecotox Environ Saf*; 32 :194-200
50. **Huberman E** ; Mammalian cell transformation and cell-mediated mutagenesis by carcinogenic polycyclic hydrocarbons ; 1975 ; *Muta Res* ;(2):285-91
51. **Husain Z et al** ; Role of ultraviolet radiation in the induction of melanocytic tumors in hairless mice following 7,12-dimethylbenz(a)anthracene application and ultraviolet irradiation ; 1991 ; *Cancer Res* ;51(18):4964-70
52. **Kalf DF, Crommentuijn T, van de Plassche EJ**; Environmental quality objectives for 10 polycyclic aromatic hydrocarbons; 1997 ; *Ecotox Environ Saf*;36 :89-97
53. **Kenneth SG, Channa R, Richard W** ;Reduced glutathione effects on alpha tocopherol concentrations of rat liver microsomes undergoing NADPH dependent lipid peroxidation ;1989 ;*Lipids* ;24(11) :909-14

54. **Koley AP, Robinson RC, Markowitz A**; Interaction of polycyclic aromatic hydrocarbons and flavones with cytochromes P450 in the endoplasmic reticulum: effect on CO binding kinetics; 1995; *Biochemistry*; 34 :1942-47
55. **Levine RL et al**; Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins ;1996 ;*Proc Natl Acad Sci USA* ;93 :15036-40
56. **Lin E.L.C, Cormier S.M, Racine N.R**; Synchronous fluorometric measurement of metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in the bile of brown bullhead; 1994; *Environ.Toxicol.Chem*;13 (5) :707-15
57. **Machala M, Matlova L, Svoboda I**; Induction effects of polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons and other widespread aromatic environmental pollutants on microsomal monooxygenase activities in chick embryo liver; 1996; *Arch Toxicol*; 70 :362-367
58. **Maher VM** ; Effect of DNA repair on the cytotoxicity and mutagenicity of polycyclic hydrocarbon derivatives in normal and xeroderma pigmentosum human fibroblasts ; 1977 ;*Muta Res* ;43(1):117-38
59. **Martens D.A, Frankenberger T**; Enhanced degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil treated with an advanced oxidative process- Fenton's reagent; 1995 ;*J Soil Cont*; 4 (2) :175-90
60. **Mccloskey JT, Oris JT**; Effect of anthracene and solar ultraviolet radiation exposure on gill ATPase and selected hematologic measurements in the bluegill sunfish; 1993; *Aquatic Toxicol*; 24 :207-18
61. **Mccloskey JT, Oris JT**; Effect of water temperature and dissolved oxygen concentration on the photo-induced toxicity of anthracene to juvenile bluegill sunfish; 1991; *Aquatic Toxicol*; 21 :145-56
62. **Mekenyan OG, Ankley GT**; QSARs for photoinduced toxicity: Acute lethality of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Daphnia magna*; 1994 ; *Chemosphere*; 28 :567-82
63. **Menzi C.A, Potocki BB**; Exposure to carcinogenic PAHs in the environment ;1992 ;*Environ. Sci. Technol* ;26(7) :1279-84
64. **Mouret JF et al** ;P32 postlabeling measurement of adenine N oxide in cellular DNA exposed to hydrogen peroxide ;1990 ;*Chem Res Toxicol* ;3 :102-10

65. **Mukherjee PS; HT Karnes;** Ultraviolet and fluorescence derivatization reagents for carboxylic acids suitable for high performance liquid chromatography: a review; 1996; *Biomed Chromatogr* ; 10(5); 193-204
66. **Narbonne JF et al** ; Accumulation kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons adsorbed to sediment by the mollusk *corbicula fluminea* ; 1999 ; *Ecotox Environ Saf* ;42(1):1-8
67. **Nesnow S, Ross JA, Stoner GD, Mass MJ** ; Mechanistic linkage between DNA adducts, mutations in oncogenes and tumorigenesis of carcinogenic environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in strain A/J mice ; 1995 ; *Toxicology* ;105(2-3):403-13
68. **Nesnow S, Ross JA, Stoner GD, Mass MJ** ;Mechanistic relationships between DNA adducts, oncogene mutations, and lung tumorigenesis in strain A mice ; 1998 ; *Exp Lung Res* ;24(4):395-405
69. **Nielsen T et al** ; City air pollution of polycyclic aromatic hydrocarbons and other mutagens : occurrence, sources and health effects ; 1996; *Science Tot Env* ;189/90:41-49
70. **Oubrahim H;** Etude des mécanismes d'activation de l'orellanine, néphrotoxine d'origine fongique. Détection et dosage dans les milieux biologiques; Thèse de Doctorat Université Joseph Fourier, GRENOBLE, UFR de Pharmacie; 1996
71. **Ozawa T, Ueda J;** DNA single damage strand breakage by copper (II) complexes and hydrogen peroxide at physiological conditions; 1993; *Biochem Mol Biol Int*;31 (3) :455-61
72. **Penning.TM et al** ; Dihydrodiol Dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation : generation of reactive and redox active o-quinones ; 1999 ; *Chem Res Toxicol* ;12(1) :1-18
73. **Ren L, Zeiler LF, Dixon G;** Photoinduced effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on *Brassica napus* (*Canola*) during germination and early seedling development; 1996; *Ecotox. Environ Saf*, 33; 73-80
74. **Renier G, Anne Cécile Desfaits, Anick Lambert;** Role of oxidant injury on macrophage lipoprotein lipase (LPL) production and sensitivity to LPL; 1996 ; *J Lipid Res*, 37, 799-807
75. **Richard M.J** ;Micronutriments et radicaux libres ; 1996 ; *Alcoologie* ; 18(1)137-43
76. **Richard MJ, P Guiraud, A Favier;** High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasmas and human cells) using a commercially available reagent; 1992 ; *J Chromatography*, 577 :9-18

77. **Richard MJ, Portal B, Favier A**; Malonaldehyde kit evaluated for determining plasma and lipoprotein fractions that react with thiobarbituric acid; 1992; *Clinical Chemistry*; 38 :704-709
78. **Safa B, Lee C, Riddick DS**; Role of the aromatic hydrocarbon receptor in the suppression of cytochromof nitrodibenzopyranonese P450 2C11 by polycyclic aromatic hydrocarbons; 1997; *Toxicology Letters*; 90 :163-75
79. **Samuni A, C. Murali Krishna, John Cook**; On radical production by PMA-stimulated neutrophils as monitored by luminol-amplified chemiluminescence; 1991 *Free Rad Biol Med* ; 10 :305-313
80. **Sarasin A, Robert-Knebelmann C, Stary A**; La réparation de l'ADN et les réparatoses ;1992 ;*Path Biol* ;40 :169-77
81. **Schraufstatter UI et al** ;Hydrogen peroxide induced injury of cells and its prevention by inhibitors of poly (ADP ribose) polymerase ;1986 ;*Proc Natl Acad Sci USA* ;83 :4908-12
82. **Scott Ireland D, Allen Burton G**; In situ toxicity evaluations of turbidity and photoinduction of polycyclic aromatic hydrocarbons; 1996; *Environ.Toxicol.Chem*; 15 (4) :574-81
83. **Serbinov AE, Kafan V, Hand D, Packer L** ;Free radical recycling and intramembrane mobility in the antioxydant properties of alpha tocopherols and alpha tocotrienol ;1991 ;*Free Rad Biol Med* ;10 :263-75
84. **Shacter E, Joy A Williams, Michael Lim**; Differential susceptibility of plasma proteins to oxydative modification : examination by western blot immunoassay ;1994 ; *Free Rad Biol Med* ,17 (5) :429-37,
85. **Sikka HC, Rutkowski JP**; Comparative metabolism of benzo[a]pyrene by liver microsomes from bullhead and carp, 1990; *Aquatic toxicol*; 16 :101-12
86. **Simic M.G, Bergtold D.S, Karam L.R**; Generation of oxy radicals in biosystems; 1989 ;*Mutation research*; 214 :3-12
87. **Sinha B.K** ;Binding of anthracene to cellular macromolecules in the presence of light ; 1983 ;*Photochem Photobiol* ; 37(1) :33-37
88. **Sinks G.D, Schultz T.W, Hunter R.S**; UVb induced toxicity of PAHs: Effects of substituents and heteroatom substitution; 1997; *Bull Environ Contam Toxicol*; 59 :1-8
89. **Slater F**; Overview of methods used for detecting lipid peroxydation; 1984; *Methods in enzymology*; vol 105; 283-305

90. **Smith MA et al** ;oxidative damage in Alzheimer's ;1996 ;*Nature* ;382 :120-1
91. **Stadtman ER** ;Oxidation of free amino acids and amino acids residues in proteins by radiolysis and by metal catalyzed reactions ;1993 ;*Annu Rev Biochem* ;62 :797-821
92. **Szweda LI, Stadtman ER** ;Iron catalyzed oxidative modification of glucose 6 phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. Structural and functional changes ;1992 ;*J Biol Chem* ;267 :3096-100
93. **Teebor G.W, Boorstein R.J, Cadet J** ; The reparability of oxydative free radical mediated damage to DNA: a review; 1988; *J. Radiat. Biol*; 54(2); 131-50
94. **Thomas JA, Chai YC, Jung CH** ;Protein S thiolation and dethiolation ;1994 ;*Methods Enzymol* ;233 :385-95
95. **Toyokuni S, Sagripanti JL**; Iron mediated DNA damage: Sensitive detection of DNA strand breakage catalyzed by iron; 1992; *J Inorg Biochem*; 47 :241-48
96. **Tyrrell RM** ;A common pathway for protection of bacteria against damage by solar UVA and an oxidizing agent ;1985 ;*Mutat Res* ;145 :129-36
97. **Upham B.L, Weis L.M**; The effects of anthracene and methylated anthracenes on gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells; 1996; *Fund Appl Toxicol*;341 : 260-264
98. **Watanabe T, Kaji H**; metabolic activation of 2 and 3 nitrodibenzopyranone isomers and related compounds by rat liver S9 and the effect of S9 on the mutational specificity of nitrodibenzopyranones; 1997; *Mutation Res*; 388 :67-78
99. **Weis L.M, Rummel A.M**; Bay or baylike regions of polycyclic aromatic hydrocarbons were potent inhibitors of gap junctional intercellular communication; 1998; *Environmental Health Perspectives*; 106 (1) :17-21
100. **Willett KL, Gardinali PR**; Characterization of the H4IIE rat hepatoma cell bioassay for evaluation of environmental samples containing polynuclear aromatic hydrocarbons; 1997; *Arch Environ Contam .Toxicol*; 32 :442-48
101. **Winker N, Weniger P**; Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons exposure damage using different methods in laboratory animals; 1995; *J Appl Toxicol*; 15(1) :59-62

ANNEXES:

Annexes 1: dosage des MDA

Acide perchlorique 7%:

Diluer au 1/10 dans une fiole jaugée de 100 ml l'acide perchlorique 70% (conservation 1 mois à 4 degrés).

soude 10 N :

peser 200 g de soude et qsp 500 ml d'eau désionisée.

Acide thiobarbiturique TBA :

dissoudre 800 mg de TBA dans 80 ml d'eau avec 500 µl de NaOH 10N.

Ajuster le pH à 7.4 avec l'acide perchlorique 7%.

Ajuster le volume à 100 ml (conservation 4°C pendant 1 mois).

Solution de TEP 20mM :

Dans une fiole jaugée de 100 ml, mettre 480 µl de TEP et ajuster au volume avec de l'éthanol.

Aliquoter par fractions de 2 ml.

Mélange TBA/ Acide perchlorique 7% (2v/1v) :

Mélanger extemporanément 10 ml de solution TBA et 5 ml d'acide perchlorique.

Préparation des échantillons :

Mettre 100 µl du mélange anthracène/ lipide + 750 µl de mélange TBA/Ac Perchlorique dans un tube en polyéthylène.

Fermer les tubes et mettre le tube dosage 1 heure au bain marie à 95°C. Le tube témoin est laissé une heure à 4°C.

Ajouter 2 ml de Butanol 1 dans chaque tube. Extraire en agitant 2 minutes au vortex puis centrifuger 10 minutes à 3500 tours/min. à 18°C.

Préparation de la gamme :

A partir de la solution mère de TEP (20mM), préparer une solution fille I à 200µM (1 ml dans 100 ml d'eau distillée).

Préparer une solution fille II (10µM) en diluant la solution fille I (1 ml dans 20 ml d'eau).

Etablir une gamme de TEP de 0 à 8 µM. Chaque solution de calibration est traitée comme les tubes échantillons et est portée au bain marie 95°C pendant 1 heure.

Annexes 2: gels d'agarose

Préparation du tampon de migration TAE(Tris/ Acide Acétique/ EDTA) :

Dans un ballon jaugé de 2 litres sont introduits, 9.69 g de Tris préalablement dissous dans 50 ml d'eau bidistillée à 50°C. Environ 1.5 l d'eau bidistillée sont ensuite rajoutés. Puis 4 ml d'une solution d'EDTA 0.5 M à pH 8 (3.722 g/ 20 ml d'eau en modifiant le pH avec NaOH 2N) et 2.28 ml d'Acide Acétique glacial sont introduits dans le ballon. Le mélange est complété à 2 litres avec de l'eau bidistillée.

Préparation du Tampon de charge :

Afin de mieux visualiser le dépôt et la migration de l'échantillon, du bleu de bromophénol est utilisé. Pour que l'échantillon descende bien au fond du puits lors du dépôt à travers le tampon de migration, du glycérol doit être ajouté afin de l'alourdir. La composition du tampon est donc : 1 mg de bleu de bromophénol, 200 µl de Glycérol et 900 µl d'eau bidistillée. Une fois préparée, cette solution est gardée au froid à 4°C pendant plusieurs mois.

Préparation du gel d'agarose :

Dans 100 ml de tampon de migration sont ajoutés 0.8 g d'agarose et 1 µl d'une solution de bromure d'éthidium (10 mg/ ml d'eau distillée). Le mélange est chauffé jusqu'à dissolution totale de l'agarose et coulé aussitôt dans le support de gel.

Révélation des gels après électrophorèse :

Après traitement des échantillons, 10 µl de tampon de charge sont ajoutés. Puis 10 µl du mélange sont prélevés, après agitation douce sur vortex, et déposés dans un puits du gel. La migration électrophorétique, sous une différence de potentiel de 120 V dure environ 1 heure.

La révélation des différentes bandes d'ADN est réalisée en exposant le gel aux rayons UV d'un transilluminateur. Le bromure d'éthidium, produit qui s'intercale entre deux brins d'ADN, émet une fluorescence de couleur orange sous l'action des UV de longueur d'onde 312 nm.

Le gel est immédiatement photographié à l'aide d'un appareil Polaroid équipé d'un filtre orange anti-UV (KODAK® Wratten 22 A) en utilisant des films Polaroid.

Annexes 3: Dosage des carbonyles

Tampon phosphate 20mM :

Peser 544 mg de KH_2PO_4 , les dissoudre dans environ 180 ml d'eau désionisée.

Ajuster le pH à 2.3 avec de l'acide chlorhydrique dilué.

Ajuster à 200 ml avec de l'eau désionisée.

Acide trichloracétique 10% :

Diluer au demi avec de l'eau désionisée de l'acide trichloracétique 10%

Acide chlorhydrique 2M :

A partir d'acide chlorhydrique 36%, faire une dilution au 1/6 dans de l'eau désionisée.

DNPH 10 mM (0.2%) :

PM = 198.14

peser 20 mg de 2.4 DNPH. Les dissoudre extemporanément dans de l'acide chlorhydrique 2M qsp 10 ml et bien agiter. Conservation de quelques heures.

Mélange éthanol/Acétate d'éthyle :

Mélange volume à volume sous une hotte d'acétate d'éthyle et d'éthanol dans une flacon en verre

Guanidine 6M :

Peser 1.14 g de chlorure de Guanidine. Les dissoudre dans du tampon phosphate 20mM de pH 2.3 qsp 2 ml. Conservation une semaine à 4°C.

Solution d'albumine 10 g/l :

Peser 200 mg d'albumine et les dissoudre dans 20 ml d'eau désionisée.

Préparation des échantillons :

Préparer deux tubes en polypropylène par dosage (un pour le dosage, l'autre pour le témoin).
dans chaque tube, mettre 200 µl d'échantillon et 800 µl d'eau désionisée.

Ajouter 1 ml d'acide trichloracétique 10 %.

Agiter au vortex 30 secondes minimum.

Centrifuger 5 minutes à 3000 tours/min. à 4°C.

Enlever le surnageant à la pastette.

Ajouter 1 ml de 2.4 DNPH 10 mM dans le tube dosage et 1 ml d'HCl 2 M dans le tube témoin.

Agiter sur vortex 20 secondes.

Mettre 50 minutes au bain-marie à 37°C.

Ajouter 1 ml d'acide trichloracétique 10% dans les deux tubes.

Ajouter 1 ml du mélange éthanol / acétate d'éthyle.

Agiter 30 secondes au vortex pour bien remettre le culot en suspension.

Centrifuger 5 à 7 minutes à 3000 tours/ min. à 4°C.

Enlever le surnageant avec une pipette pasteur.

Recommencer des lavages avec le mélange éthanol/ acétate d'éthyle jusqu'à l'obtention d'un culot blanc et d'un surnageant clair (environ 6 fois).

Ajouter 1 ml de Guanidine 6 M

Agiter au vortex 30 secondes.

Mettre 30 minutes au bain-marie à 37°C.

Centrifuger 10 minutes à 3000 tours/min. à 4°C.

Récupérer le surnageant et le transvaser dans des tubes en polypropylène.

Lecture des carbonyles :

La lecture se fait à 380 nm pour les groupements carbonyles et à 280 nm pour les protéines.

Le surnageant est transféré dans des microcuvettes en quartz. Le temps d'intégration de l'appareil est de 2 secondes. L'autozéro est effectué sur l'air.

calcul des carbonyles :

carbonyles ($\mu\text{mol/l}$) = [DO * Dilution (5) * 1000] / 22

Puis ramener en $\mu\text{mol / g}$ de protéines :

[carbone dosage / protéine dosage] - [carbone témoin / protéine témoin]

Annexes 4 : Dosage des Thiols

Préparation des solutions Tampon Phosphate 0.05M pH=8

6.8 g de KH₂PO₄ dans 1000 ml (sol A)

8.89 g de Na₂HPO₄ dans 1000 ml (Sol B)

Dans une fiole de 100 ml on ajoute 5,5 ml de solution A, 29 mg d'EDTA et 94.5 ml de la solution B. Vérifier que le pH est à 8.

Préparation du réactif d'Ellman

10 mg de DTNB dans 10 ml de tampon Phosphate pH 8.

Préparation de la gamme de NAC (N acétyl cystéine)

Préparation d'une solution mère à 100mM (163.2mg dans 10 ml d'eau désionnisée).

Dilution au 1/100ème et préparation d'une gamme de 0 à 0.1 mM de SH.

[SH] mM	0	0.02	0.04	0.08	0.1
Tampon µl	2500	2940	2880	2760	2700
NAC µl	0	60	120	240	300

Préparation des échantillons

- Dans des micro-cuves rajouter:
 - pour la gamme: 750 µl de tampon Phosphate + 500µl du point de gamme
 - Pour le dosage: 1200 µl de tampon Phosphate + 50µl de l'échantillon.
- Agiter doucement et lire l'absorbance à 412 nm: DO1
- Rajouter 250 µl de DTNB, agiter.
- Laisser 15 min à l'abri de la lumière.
- Lire l'absorbance à 412 nm

Calcul des Thiols

Sur la courbe d'étalonnage lire $DO = DO_1 - DO_2$, la concentration en SH µmol/ml est donnée sur la courbe *10(dilution).

Après avoir dosé les protéines:

$SH \text{ µmol/g de proteines} = (SH \text{ µmol/ml} * 1000) / \text{Prot g/l}$.

CONCLUSION

THESE SOUTENUE PAR: Sentenac Xavier

TITRE: Etude *in vitro* de la phototoxicité des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP): Application à l'Anthracène.

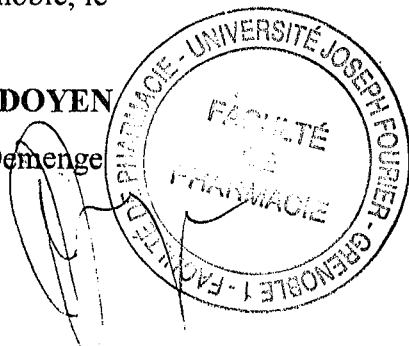
Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont une classe importante de xénobiotiques présents dans l'environnement à l'état naturel ou produits par combustion à partir de tous procédés industriels. La toxicité de ces produits ainsi que leurs voies de dégradation et les métabolites en résultant sont mal connues. L'anthracène, HAP de faible poids moléculaire n'est pas connu pour être mutagène ou cancérigène. Cependant, des études ont montré la toxicité de cette molécule sur la faune et la flore aquatique après photodégradation ou photoactivation. Dans ce contexte, notre hypothèse de travail est basée sur la formation de radicaux libres après photooxydation de l'anthracène. Ces radicaux libres sont capables d'altérer les macromolécules biologiques. Après avoir étudié la dégradation de l'anthracène lors d'une irradiation sous UVA et lumière visible par chimiluminescence et Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) dans le but de mettre en évidence des radicaux libres de l'oxygène et/ ou la formation d'un radical organique, nous avons quantifié leurs actions sur les lipides, les protéines et l'ADN. Les résultats montrent que l'anthracène n'est pas toxique par lui même mais uniquement après photodégradation. Cette toxicité est dose dépendante et semble provoquée par les métabolites formés. Les résultats obtenus avec des antioxydants sont en faveur d'une formation de radicaux libres de l'oxygène (OH°) ainsi que des radicaux organiques (RO°) au cours de la photodégradation de l'anthracène.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le

LE DOYEN

P. Demenge



LE PRESIDENT DE THESE

Pr. A. Favier

RESUME :

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont une classe importante de xénobiotiques présents dans l'environnement à l'état naturel ou produits par combustion à partir de tous procédés industriels. La toxicité de ces produits ainsi que leurs voies de dégradation et les métabolites en résultant sont mal connues. L'anthracène, HAP de faible poids moléculaire n'est pas connu pour être mutagène ou cancérigène. Cependant, des études ont montré la toxicité de cette molécule sur la faune et la flore aquatique après photodégradation ou photoactivation. Dans ce contexte, notre hypothèse de travail est basée sur la formation de radicaux libres après photooxydation de l'anthracène. Ces radicaux libres sont capables d'altérer les macromolécules biologiques. Après avoir étudié la dégradation de l'anthracène lors d'une irradiation sous UVA et lumière visible par chimiluminescence et Résonance Paramagnétique Electronique (RPE) dans le but de mettre en évidence des radicaux libres de l'oxygène et/ ou la formation d'un radical organique, nous avons quantifié leurs actions sur les lipides, les protéines et l'ADN. Les résultats montrent que l'anthracène n'est pas toxique par lui même mais uniquement après photodégradation. Cette toxicité est dose dépendante et semble provoquée par les métabolites formés. Les résultats obtenus avec des antioxydants sont en faveur de la formation de radicaux libres de l'oxygène (OH°) ainsi que des radicaux organiques (R°) au cours de la photodégradation de l'anthracène.

MOTS CLES:

HAP, Anthracène, U.V., Photoactivation, Protéines, lipides, ADN

JURY:

Président : Monsieur le Professeur A. Favier

Membres : Monsieur le professeur J. Calop

Monsieur le Professeur G. Blake

Madame le Docteur P. Guiraud (directeur de thèse)

Date de soutenance: le 2 juin 1999