

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

#### Importance des systèmes de défense contre les dérives de l'oxygènes dans la dégénérescence cellulaire

MICHIELS, Carine

*Award date:*  
1985

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTÉS UNIVERSITAIRES N.D. DE LA PAIX  
NAMUR  
FACULTÉ DES SCIENCES

---

**IMPORTANCE DES SYSTEMES DE DEFENSE  
CONTRE LES DERIVES DE L'OXYGENE DANS LA  
DEGENERESCENCE CELLULAIRE.**

Mémoire présenté pour l'obtention du grade  
de Licencié en Sciences  
biologiques  
par

**MICHIELS Carine**



Puis-je, au terme de ce travail, me permettre de remercier Monsieur le Professeur Remacle pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et m'avoir guidée tout au long de cette année.

Je voudrais également remercier Melle M. Raes pour ses judicieux conseils et pour ses encouragements.

Mes remerciements s'adressent aussi à Mme A. Houbion pour sa précieuse aide technique et à toute l'équipe du laboratoire pour l'ambiance agréable et constructive qui s'en dégage.

Je tiens à remercier Mr. J.M. Gohy et Mr. V. Bille pour m'avoir gentiment aidée dans le traitement statistique de mes données expérimentales.

A ma famille pour m'avoir permis d'entreprendre ces études et pour m'avoir soutenue tout au long de celles-ci.

## TABLE DES MATIERES

### I. INTRODUCTION

- 1.1. Les radicaux libres
- 1.2. Source des radicaux superoxydes
- 1.3. Cytotoxicité des radicaux libres
- 1.4. Toxicité de l'oxygène
- 1.5. Systèmes de défense cellulaires contre les radicaux libres
  - 1.5.1. Protections enzymatiques
    - 1.5.1.1. Les superoxydes dismutases
    - 1.5.1.2. La catalase
    - 1.5.1.3. Les peroxydases
  - 1.5.2. Protections non enzymatiques
    - 1.5.2.1. L' $\alpha$ -tocophérol
    - 1.5.2.2. L'acide ascorbique

### II. MATERIELS ET METHODES

- 2.1. Culture de fibroblastes WI-38
- 2.2. Culture sans oxygène
- 2.3. Micro-injection
- 2.4. Solutions injectées
- 2.5. Observation des cellules injectées
- 2.6. Solutions de vitamines
- 2.7. Dosage de la malonaldehyde
- 2.8. Traitements statistiques

### III. RESULTATS

- 3.1. Caractérisation du modèle expérimental : toxicité de l'oxygène pour les cellules en culture
  - 3.1.1. Evolution des protéines sur culture en masse
  - 3.1.2. Evolution du nombre de cellules en clonage
  - 3.1.3. Evolution morphologique
  - 3.1.4. Evolution de la peroxydation lipidique



### 3.2. Micro-injection des trois enzymes

#### 3.2.1. Effet de la présence simultanée des cinq systèmes de protection

##### 3.2.1.1.

##### 3.2.1.2. Analyse de la variance

#### 3.2.2. Effet des trois enzymes

##### 3.2.2.1.

##### 3.2.2.2. Analyse de la variance

### 3.3. Etude analytique des systèmes de protections

#### 3.3.1. L' $\alpha$ -tocophérol

##### 3.3.1.1. Influence de l' $\alpha$ -tocophérol sur culture en masse

##### 3.3.1.2. Influence de l' $\alpha$ -tocophérol sur cellules en clonage

#### 3.3.2. L'acide ascorbique

#### 3.3.3. La catalase

##### 3.3.3.1.

##### 3.3.3.2. Analyse de la variance

#### 3.3.4. La superoxyde dismutase

##### 3.3.4.1.

##### 3.3.4.2. Analyse de la variance

#### 3.3.5. La glutathion peroxydase

##### 3.3.5.1.

##### 3.3.5.2. Analyse de la variance

#### 3.3.6. Récapitulation

### 3.4. Effet simultané de deux systèmes protecteurs combinés

#### 3.4.1. Combinaisons de deux enzymes

##### 3.4.1.1.

##### 3.4.1.2. Analyse de la variance

#### 3.4.2. Combinaison d'une enzyme et d' $\alpha$ -tocophérol

##### 3.4.2.1.

##### 3.4.2.2. Analyse de la variance

### 3.5. Injections multiples

#### 3.5.1.

#### 3.5.2. Analyse de la variance

## IV CONCLUSIONS

## V BIBLIOGRAPHIE



## I. INTRODUCTION

### 1.1. LES RADICAUX LIBRES

Si la vie aérobie offre de nombreux avantages, elle n'en est pas pour autant sans danger. En effet, l'oxygène nécessaire à ce mode de vie est éminemment toxique : les organismes aérobies ne peuvent survivre que grâce à différents mécanismes de défense qu'une pression sélective rigoureuse a mis en place. La toxicité de l'oxygène n'est pas liée à la propre réactivité de cette molécule mais aux intermédiaires engendrés lors de sa réduction : les radicaux libres. La réduction de l'oxygène en eau est un processus monovalent (voir fig. 1) qui conduit d'abord à la formation du radical superoxyde ( $O_2 \cdot (-)$ ). Ce radical peut réagir avec d'autres molécules formant ainsi d'autres radicaux libres ... Ces molécules possèdent un électron non apparié sur leur orbite extérieure, ce qui leur confère une très grande réactivité.

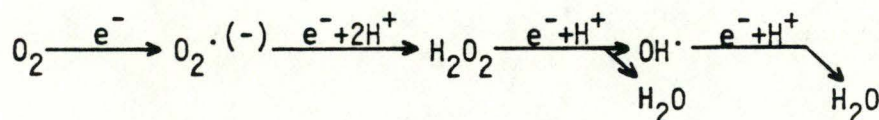
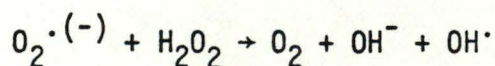


Figure 1 : voie de réduction univalente de l'oxygène.

Le radical superoxyde est aussi capable de réagir avec une molécule de peroxyde d'hydrogène pour produire un radical encore plus réactionnel, le radical hydroxyle. Cette réaction d'Haber-Weiss est en fait une réaction lente mais qui peut être catalysée par des traces de fer :



### 1.2. SOURCE DES RADICAUX SUPEROXYDES

Les enzymes de la respiration mitochondriale comme la cytochrome oxydase et de la chaîne des transporteurs d'électrons sont la principale source de radicaux superoxydes. Britton (1978) a démontré que 17 % de

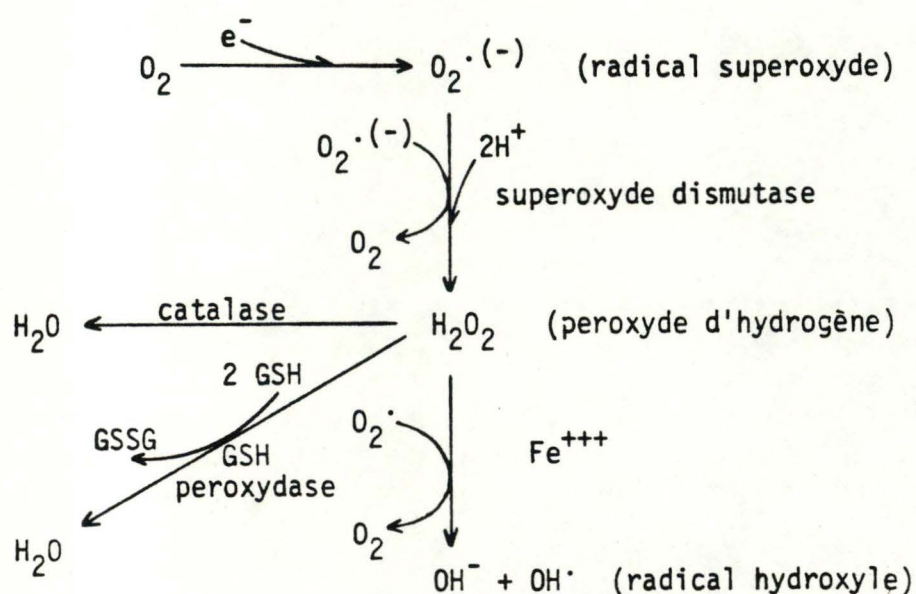


Figure 2 : production des radicaux superoxydes et hydroxyles et du peroxyde d'hydrogène.

l'oxygène consommé dans la respiration par Streptococcus faecalis se transforme en  $O_2 \cdot (-)$ .

La respiration n'est cependant pas l'unique source de radicaux : l'activité de nombreuses enzymes telles que la Xanthine oxydase, l'aldéhyde oxydase ... est associée à une production d' $O_2 \cdot (-)$  (Fridovich, 1978). L'autooxydation d'hydroquinones, de flavines, de ferrédoxines ou de composés chimiques tels que le paraquat ou certains antibiotiques (streptonigrine, adriamycine ...) engendre aussi des radicaux libres. Certains organites, les mitochondries et les chloroplastes, en produisent également. Les polymorphonucléaires neutrophiles et les macrophages en libèrent de larges quantités lors de la phagocytose de bactéries (Babior, 1977).

Comme on peut le voir ci-dessus, la cellule est confrontée à tous moments à l'attaque des radicaux libres : elle ne peut donc survivre que grâce à différents systèmes de défense élaborés.



### 1.3. CYTOTOXICITE DES RADICAUX LIBRES

L'induction d' $O_2 \cdot (-)$ , soit chimiquement, soit photochimiquement, a montré que ce radical occasionne de nombreux dégâts à la cellule : il est capable de tuer des bactéries, d'inactiver des virus, de lyser des érythrocytes, de détruire des cellules endothéliales en culture, d'endommager les membranes biologiques, d'attaquer les acides nucléiques et les polysaccharides...

Une des réactions les plus caractéristiques est, sans nul doute, la peroxydation lipidique : les radicaux libres attaquent les acides gras polyinsaturés au niveau des doubles liaisons, produisant aussi des peroxydes lipidiques. Ceux-ci peuvent se décomposer, conduisant ainsi à la formation d'aldéhydes, notamment la malonaldéhyde qui, liée aux phospholipides, aux acides nucléiques ou aux protéines, donne naissance à des pigments non dégradables, tels que la lipofuscine, qui s'accumulent progressivement dans les lysosomes (Tappel, 1972).

### 1.4. TOXICITE DE L'OXYGENE

L'oxygène est nécessaire à toute vie aérobie. Paradoxalement, à quelque concentration que ce soit, il est toxique. L'oxygène devient même létal si sa concentration s'élève un peu trop. De nombreuses expériences ont montré cette toxicité :

- des fibroblastes humains cultivés en présence de concentrations croissantes en oxygène montre une durée de vie d'autant plus courte que la concentration en oxygène est élevée (Honda, 1983, Packer, 1977). Il semble même que, remis en culture dans des conditions normales après un temps d'exposition suffisamment long, ces fibroblastes ne retrouvent jamais leur potentiel de multiplication initial (Balin, 1977).
- sous une atmosphère de 95 % en  $O_2$ , la croissance des cellules Hela est totalement arrêtée et les taux de synthèses de l'ADN, de l'ARN et des protéines sont fortement réduits (Haugaard, 1968).
- une augmentation de la concentration en  $O_2$  accélère l'accumulation de lipofuscine dans des cellules gliales en culture (Brunk, 1984).

Les mécanismes exacts de la toxicité de l'oxygène restent encore obscurs. Cependant, plusieurs hypothèses sont avancées (Halliwell, 1978) :



- l'oxygène augmenterait la production de radicaux libres et de peroxyde d'hydrogène,
- il inactiverait certaines enzymes en oxydant certains groupements essentiels à leur activité tels que les groupements thiols (-SH)
- il occasionnerait la peroxydation des lipides et, par conséquent perturberait l'intégrité des membranes biologiques.

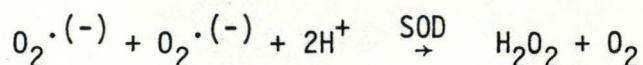
## 1.5. SYSTEMES DE DEFENSE CELLULAIRES CONTRE LES RADICAUX LIBRES

Les organismes aérobies ont mis au point, au cours de leur évolution différents systèmes pour se protéger contre l'attaque des radicaux libres; il s'agit, d'une part des systèmes enzymatiques : les superoxydes dismutases, la catalase et les peroxydases, et, d'autre part, des molécules anti-oxydantes ou trappeurs de radicaux comme l' $\alpha$ -tocophérol, l'acide ascorbique, l'acide urique ...

### 1.5.1. Protections enzymatiques

#### 1.5.1.1. Les superoxydes dismutases (SOD)

Les superoxydes dismutases sont les principales enzymes qui protègent la cellule contre les radicaux superoxydes (Fridovich, 1975, McCord, 1979). Elles catalysent la dismutation de deux molécules d' $O_2 \cdot (-)$  en une molécule d'oxygène et une molécule de peroxyde d'hydrogène :



Seules les cellules aérobies peuvent produire des  $O_2 \cdot (-)$  et doivent donc se protéger contre ceux-ci. Il est surprenant de remarquer que tous les organismes aérobies et anaérobies facultatifs possèdent de la superoxyde dismutase alors que tous les organismes anaérobies stricts en sont dépourvus (McCord et Fridovich, 1971).

Il existe trois formes de SOD : la SOD-fer, la SOD-magnesium et SOD-cuivre-zinc. On retrouve la SOD-fer uniquement chez les procaryotes; les eucaryotes disposent à la fois de la SOD-Cu-Zn et de la SOD-Mn. La première se situe dans le cytosol et l'espace intermembranaire des mitochondries et la deuxième dans la matrice mitochondriale (McCord, 1979).



La SOD-Mn est également présente chez certains procaryotes.

L'importance de la SOD n'est plus à réfuter :

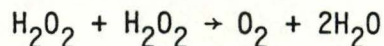
- Gregory et Fridovich (1973) ont découvert certains mutants d'Escherichia coli thermosensibles capables de vivre en aérobiose à basses températures mais non à hautes températures. Ces mutants se sont révélés être incapables de synthétiser la SOD à ces hautes températures. Il semble donc que la SOD soit nécessaire à la vie aérobie et que les cellules ne peuvent survivre que si elles détruisent les  $O_2^{(-)}$ .
- Certaines enzymes sont inductibles en présence de fortes concentrations en substrat : c'est le cas de la superoxyde dismutase. De hautes pressions en oxygène augmentent cette activité chez E. Coli et Streptococcus faecalis (Gregory et Fridovich, 1973) et dans le poumon de rat (Crapo, 1974), cette élévation de l'activité de la superoxyde dismutase a pu être corrélée avec une résistance accrue aux effets létaux des hautes pressions en oxygène.
- Induisant une augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase par une préexposition des rats à 85 % en oxygène, Crapo (1974) a montré que ces animaux devenaient résistants à une atmosphère composée à 100 % d'oxygène, atmosphère létale pour les rats non préexposés.

Toutes ces observations indiquent que la superoxyde dismutase constitue la première ligne de défense prévenant la cellule contre les dérivés radicalaires de l'oxygène. Cependant, par son activité, elle produit une molécule de peroxyde d'hydrogène pour deux molécules de radical superoxyde dismutées. Il faut par conséquent, que ce peroxyde soit détoxifié. Deux autres enzymes jouent ce rôle : la catalase et les peroxydases.

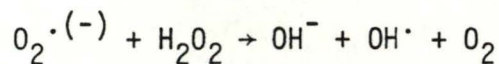
#### 1.5.1.2. La catalase

La respiration cellulaire ainsi que la superoxyde dismutase ou d'autres oxydases produisent du peroxyde d'hydrogène. Sa relative stabilité et sa toxicité nécessitent une prévention de son accumulation. C'est pourquoi la catalase est une enzyme essentielle dans la défense cellulaire; elle catalyse la transformation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène

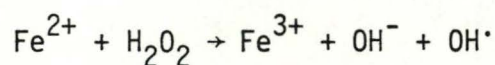
moléculaire par la réaction suivante :



De plus, la grande réactivité du peroxyde d'hydrogène vis-à-vis du radical superoxyde dans la réaction d'Haber-Weiss



ou vis-à-vis de l'ion ferreux dans la réaction de Fenton



engendre le radical hydroxyle ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) qui est un oxydant extrêmement réactif vis-à-vis des composants cellulaires et exige donc une détoxification immédiate. Ce radical hydroxyle est notamment responsable de l'hémolyse des érythrocytes humains, lyse qui peut être prévenue par l'addition de catalase dans le milieu (Stock, 1973).

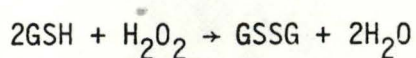
Le rôle de la catalase est connu depuis de nombreuses années : ainsi, Sevag (1934) avait déjà montré que l'addition de catalase dans le milieu de respiration de pneumocoques acatalasémiques peuvent, en prévenant l'accumulation de peroxyde d'hydrogène résultant de cette respiration, éviter l'inhibition de cette respiration et la perte de viabilité des bactéries.

Une autre classe d'enzymes, les peroxydases protège également la cellule contre le peroxyde hydrogène. Une relation étroite existe entre ces deux classes d'enzymes : on a, en effet, observé qu'une déficience en catalase était compensée par une augmentation de la glutathion peroxydase. C'est le cas notamment chez des mutants déficients en catalase dans l'espèce humaine et dans les érythrocytes de canards naturellement acatalasémiques (Aebi, 1972).



### 1.5.1.3. Les peroxydases

La glutathion peroxydase, enzyme à sélénium, utilise le pouvoir réducteur du glutathion pour réduire le peroxyde d'hydrogène, selon la réaction suivante :



Elle réduit aussi les peroxydes lipidiques et agit donc comme protecteur de l'intégrité des membranes biologiques (Ganther, 1975, Kosower, 1978).

De nombreuses expériences ont permis de mettre en évidence le rôle essentiel joué par la glutathion peroxydase (Flobé, 1982).

Dès que la concentration en glutathion approche de zéro, l'hémoglobine des érythrocytes est oxydée en méthémoglobine, et une hémolyse se produit.

Des patients déficients en glutathion peroxydase souffrent régulièrement d'hémolyse, particulièrement s'ils sont exposés à certaines substances xénobiotiques qui augmentent la production des radicaux.

La mitochondrie est le site principal de production de radicaux et est donc la cible privilégiée de leurs attaques. La détection de dommages membranaires dans les mitochondries de foie de rats déficients en sélénium montre bien l'importance de la glutathion peroxydase.

L'addition de cette enzyme purifiée permet d'éviter la peroxydation lipidique de mitochondries isolées, exposées aux radicaux libres.

Le rôle des différentes enzymes envisagées ci-dessus nous semble désormais acquis. En plus de celles-ci, la cellule possède un système de défense non enzymatique constitué par diverses molécules biologiques capables de capter les dérivés toxiques de l'oxygène et les inactiver.

## 1.5.2. Protections enzymatiques

### 1.5.2.1. L' $\alpha$ -tocophérol

Parmi ces molécules, la plus importante est, sans nul doute, l' $\alpha$ -tocophérol (Tappel, 1974, Diplock, 1973). Grâce à son caractère liposoluble, la vitamine E se place dans les membranes biologiques, les protégeant ainsi de la peroxydation lipidique en bloquant la propagation des radicaux peroxydes (fig. 3).

Il faut noter que l'oxydation d'une mole d' $\alpha$ -tocophérol en d' $\alpha$ -tocophéryl-quinone permet de réduire deux moles de radicaux. L'intermédiaire  $\alpha$ -tocophéryl formé par la première oxydation peut être réduit par le glutathion pour donner la vitamine E à nouveau active.

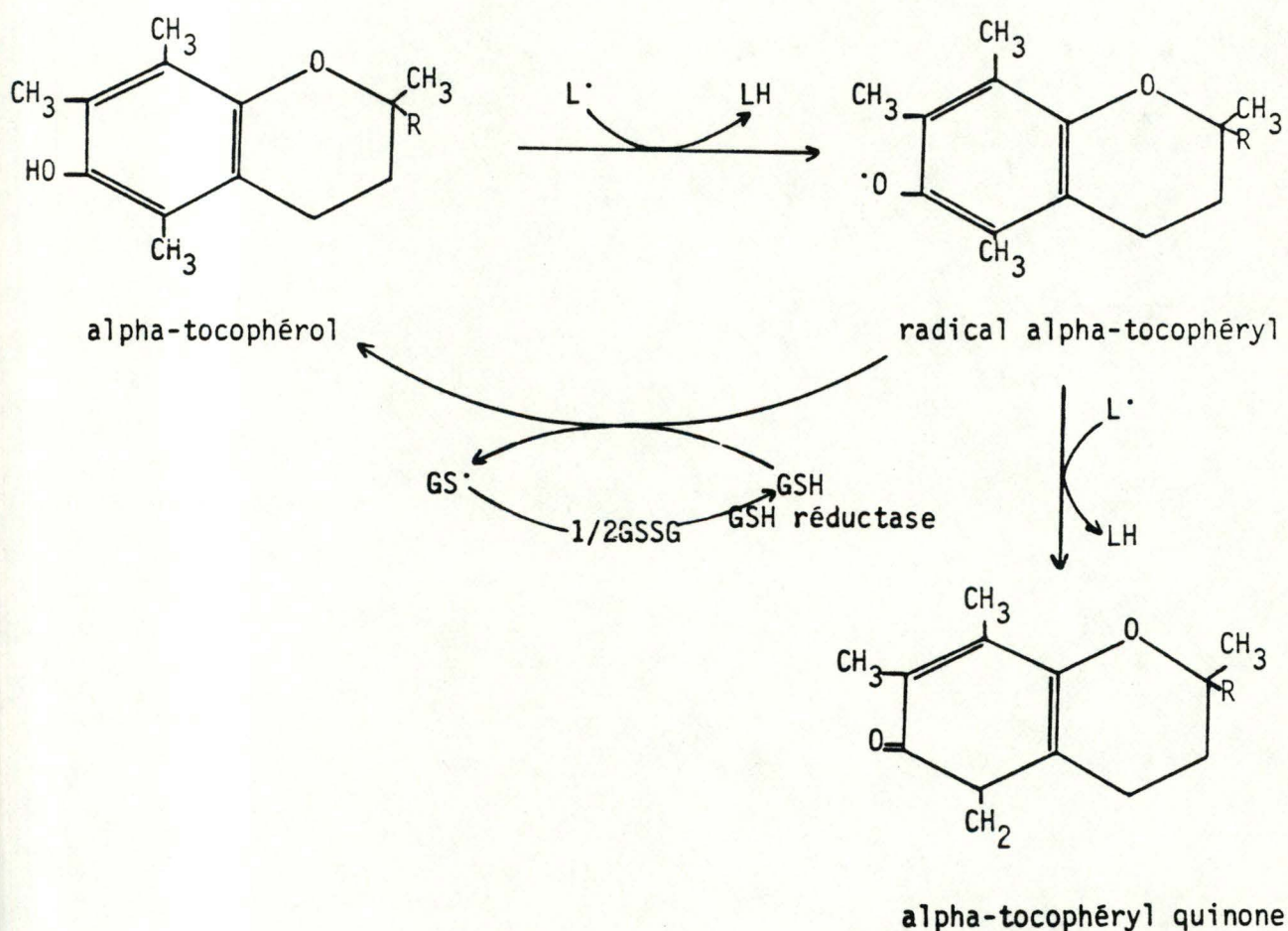


Figure 3 : mode d'action de l' $\alpha$ -tocophérol.



Le rôle de cette molécule n'est plus à réfuter : ainsi, une déficience en vitamine E résulte en une augmentation de la peroxydation des lipides et en accumulation de lipofuscine chez le rat (Tappel, 1973). Il est aussi prouvé que la vitamine E apporte une protection contre l'hémolyse induite par addition de peroxyde d'hydrogène et de rétinol (Mino, 1978).

#### 1.5.2.2. L'acide ascorbique

L'acide ascorbique est une molécule anti-oxydante ayant un caractère hydrophile. Il est généralement présent à forte concentration dans les tissus où il pourrait jouer un rôle de défense contre les radicaux libres (fig. 4).

Sa vitesse de réaction avec le radical superoxyde est relativement faible à côté de celle de la superoxyde dismutase mais cette faible réactivité est compensée par sa forte concentration (Nishikimi, 1977). De plus, la vitamine C peut capter d'autres radicaux comme les radicaux peroxydes. Comme la vitamine E, une mole d'acide ascorbique peut réduire deux moles de radicaux et être régénérée par la déhydroascorbate réductase en présence de deux moles de glutathion réduit.

Il existe aussi toute une série de molécules comme les flavonoïdes, les quinones, l'acide urique...dont le rôle dans la protection contre les radicaux libres est peu connu.

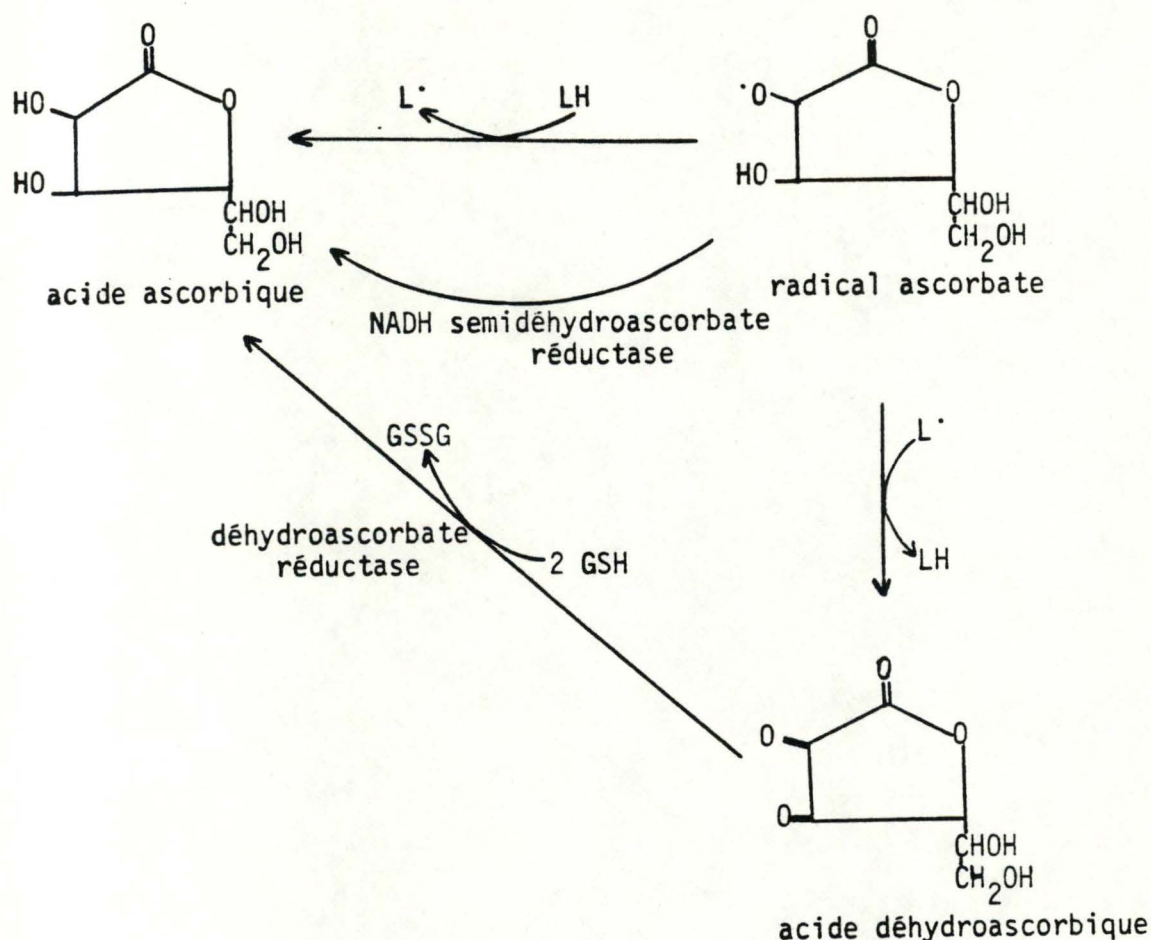


Figure 4 : mode d'action de l'acide ascorbique.

Si tout le monde s'accorde à dire que les radicaux libres jouent un rôle primordial dans la dégénérescence cellulaire, la plupart des travaux tirent leurs conclusions à partir d'expériences dans lesquelles ils observent une dégénérescence de cellules mises dans des conditions extrêmes, pathologiques ou en présence de produits chimiques toxiques. Ainsi de nombreuses questions et controverses subsistent, par exemple : quelle est réellement l'importance des radicaux libres dans une cellule normale? Les systèmes de défense ne sont-ils pas suffisants pour assurer la viabilité de la cellule? Quelle est l'importance des divers systèmes de défense? Peuvent-ils se compenser l'un l'autre?...

Nous avons voulu aborder ces questions de manière directe en utilisant la micro-injection d'enzymes dans la cellule et en examinant leur éventuelle protection face à l'attaque de radicaux libres engendrés par une forte concentration en oxygène.



## II. MATERIELS ET METHODES

### 2.1. CULTURE DE FIBROBLASTES WI-38

Les cultures de fibroblastes WI-38 ont été réalisées selon la méthode décrite par A. Houben (1976). Pour la micro-injection, les fibroblastes ont été repiqués, à une densité faible afin de permettre une localisation individuelle dans les boîtes de Pétri (Falcon) préalablement quadrillées. Ce quadrillage permet de repérer chaque cellule et d'éviter son passage d'un compartiment à un autre.

### 2.2. CULTURE SOUS OXYGENE

Après être restées 24 heures dans une étuve à CO<sub>2</sub>, à 37°C afin de permettre l'attachement des fibroblastes, les boîtes de Pétri sont placées dans une enceinte contenant 95 % d'O<sub>2</sub> et 5 % de CO<sub>2</sub> à une pression de 2 atmosphères. Le CO<sub>2</sub> est nécessaire pour éviter l'alcalinisation du milieu de culture. Cette enceinte, capable de résister aux pressions élevées, dispose de 2 entrées. L'oxygène est introduit par une des ouvertures, la seconde permettant l'évacuation de <sup>celle-ci</sup> celle-ci est ensuite fermée et l'oxygène introduit jusqu'à l'obtention de la pression désirée. Cette pression est contrôlée au niveau d'un manomètre situé sur le couvercle de cette enceinte.

### 2.3. MICRO-INJECTION

La technique de micro-injection d'une solution d'enzymes dans les fibroblastes a été mise au point par V. Henin (1981) selon un système décrit par Ansorge (1982) (fig. 5). Il s'agit de fabriquer des micropipettes de diamètre suffisamment petit pour percer la membrane plasmique sans léser la cellule et d'injecter ainsi une solution directement à l'intérieur du fibroblaste. Pendant l'injection, le milieu de culture est remplacé par la solution de Puck (CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 160 mg/l, KCl 400 mg/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 150 mg/l, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 154 mg/l, NaCl 8 mg/l, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 290 mg/l, glucose 1100 mg/l, pH7,2) dépourvue de bicarbonate. Les cellules sont ensuite rincées délicatement deux fois au PBS contenant 1000 U/ml de pénicilline et 1000 µg/l de streptomycine (Gibco) en vue d'éviter toute contamination ultérieure.

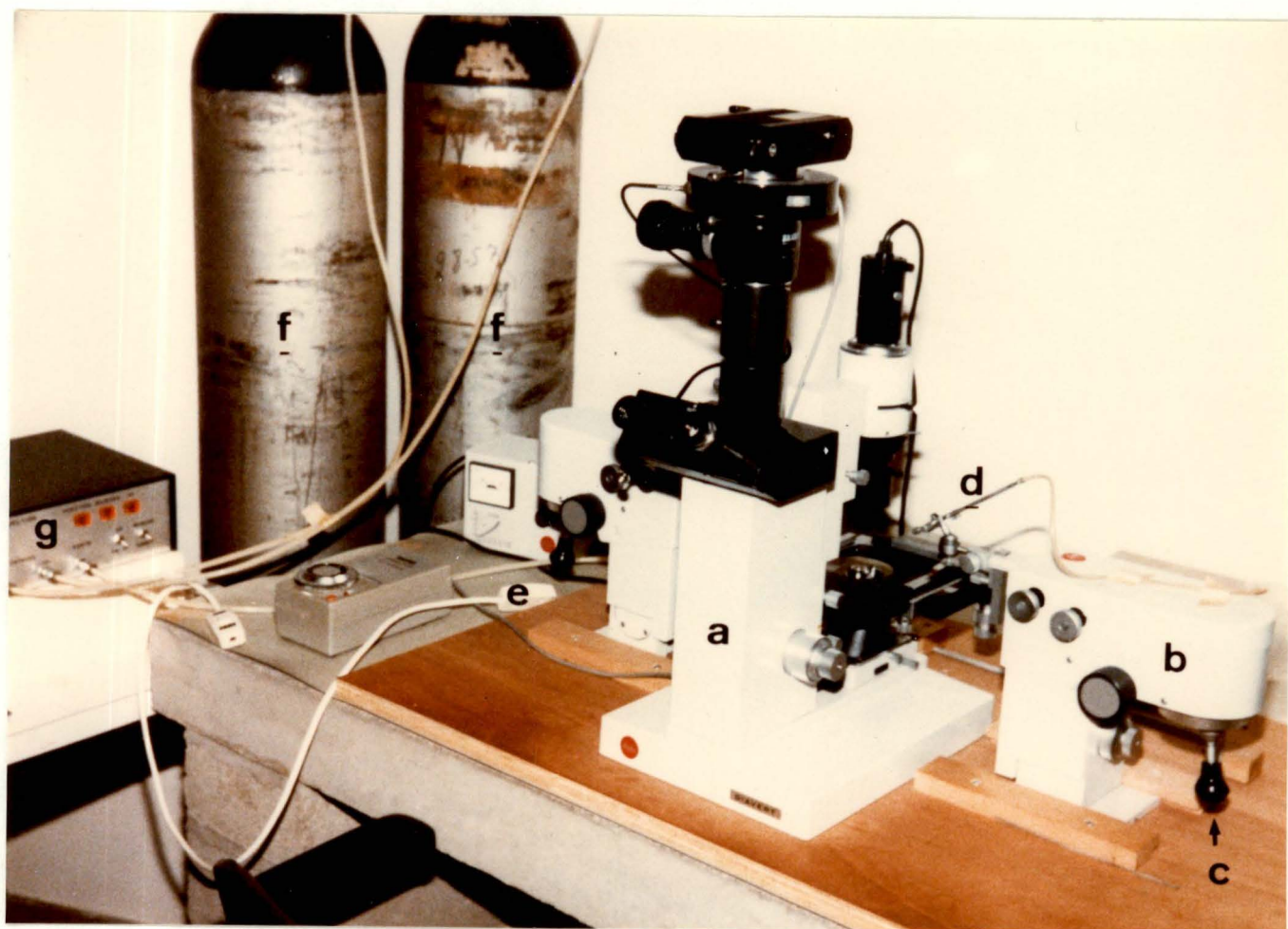


Figure 5 : ensemble de micro-injection.

- (a) microscope inversé DIAVERT Leitz
- (b) micromanipulateur Leitz
- (c) démultiplicateur de mouvement
- (d) support de la micropipette reliée à l'unité de pression
- (e) interrupteur d'injection (ON-OFF)
- (f) bombone d'azote
- (g) unité de pression à 3 sélections :
  - pression de maintien
  - pression d'injection
  - haute pression



## 2.4. SOLUTIONS INJECTEES

La solution de base que nous avons injectée contenait de la catalase, de la superoxyde dismutase et de la glutathion peroxydase (Plainchamp, 1984), produits obtenus auprès de la firme Sigma. Pour se rendre compte de la quantité d'enzymes que nous injectons dans un fibroblaste par rapport à la quantité contenue dans une cellule, nous avons dosé chaque enzyme, et dans la solution préparée, et dans un homogénat de fibroblastes (Tableau I)

	Solution	Homogénat	1 Cellule
Catalase	0,26 U/ml	0,028 U/ml	$0,26 \cdot 10^{-8}U$
SOD	$0,15 \cdot 10^6 U/ml$	3,8 U/ml	$0,36 \cdot 10^{-6}U$
GSH peroxydase	2 U/ml	0,06 U/ml	$0,55 \cdot 10^{-8}U$

Tableau I : concentration dans 3 enzymes envisagées dans la solution d'injection, dans un homogénat et dans une cellule.

V. Henin (1981) a démontré que nous parvenions à injecter un volume minimal de  $10^{-11}$  ml par cellule. Sachant que cet homogénat est extrait de 4 boîtes de culture contenant chacune  $4 \cdot 10^6$  fibroblastes, il nous est permis de calculer la concentration native que contient chaque cellule.

Nous avons pu ainsi établir que nous ajoutons, par rapport aux quantités contenues dans la cellule, 1/1000 de catalase, 1/190 de glutathion peroxydase et 4,3 fois la quantité native de superoxyde dismutase. Les rapports nous ont permis de mieux apprécier l'importance de ces différentes enzymes quant à leur protection.

Avant de commencer les expériences, nous avons voulu estimer la proportion de cellules qui meurent suite à cette manipulation; soixante fibroblastes ont donc été injectés avec du tampon d'injection ( $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  5,45 mM;  $KH_2PO_4$  4,55 mM; KCl 70,5 mM; NaCl 7,05 mM; pH 7,2) et

nous avons pu observer qu'en moyenne 17 % des cellules dépérissent suite à cette injection.

Il faut noter que les fibroblastes utilisés se situaient entre la trentième et la quarante-deuxième génération en culture. Il semble en effet que les cellules plus vieilles supportent moins bien l'injection.

## 2.5. OBSERVATION DES CELLULES INJECTÉES

Pour chaque solution d'enzymes testée, une trentaine de fibroblastes ont été injectés. Deux autres séries de cellules servent de témoins : l'une n'ayant subi aucune injection, l'autre ayant été injectée avec du tampon d'injection. Afin d'éviter la variabilité de boîte à boîte, variabilité due aux différences de manipulation soit pendant le repiquage soit pendant la micro-injection, ces trois groupes de fibroblastes se trouvent dans la même boîte de Pétri.

Le nombre de cellules vivantes dans chaque groupe a ensuite été compté chaque jour pendant une semaine : un éventuel effet de la solution injectée pourrait ainsi être mis en évidence.

Il est à noter que la viabilité des cellules est estimée du point de vue morphologique.

Stacey (1977) a montré que la plupart des protéines injectées dans des cellules HeLa sont autophagocytées après 2 ou 3 jours selon la nature de la molécule introduite. Nous avons donc calculé un pourcentage de protection de la manière qui suit :

$$\text{pourcentage de protection} : 1 - \frac{\frac{X_3}{Y_3} + \frac{X_4}{Y_4}}{2} \times 100$$

où  $X_3$  représente la proportion de cellules survivantes au jour 3 injectées avec les 3 enzymes

$X_4$  représente cette même proportion au jour 4

$Y_3$  représente la proportion de cellules survivantes au jour 3 injectées avec du tampon

$Y_4$  représente cette même proportion au jour 4

Nous avons constaté en effet, au regard de nos expériences, que la protection due aux enzymes injectées était maximale pendant les jours trois et quatre après l'injection.



## 2.6. SOLUTIONS DE VITAMINES

Afin de tester un éventuel effet protecteur de l' $\alpha$ -tocopherol et de l'acide ascorbique, des fibroblastes ont été cultivés sous atmosphère d'oxygène en présence de différentes concentrations de l'une ou l'autre de ces deux molécules. Un même nombre de cellules ont été repiquées dans les différentes cases d'une boîte à compartiments multiples (Stérilin). Après un jour dans une étuve à  $\text{CO}_2$ , le milieu conventionnel a été remplacé par un milieu dans lequel est dissoute une vitamine. Après 3 jours sous 2 atmosphères d'oxygène, un dosage de protéines selon la méthode de Folin nous a permis d'évaluer le nombre de cellules toujours attachées au support.

### 2.6.1. Vitamine E

Parce que liposoluble, la vitamine E (Sigma) doit d'abord être dissoute dans de l'éthanol 100 % à une concentration 0,2 M. Cette solution est ensuite diluée 200 X dans le milieu de culture pour obtenir une concentration de  $10^{-3}$  M. Il faut remarquer que des fibroblastes WI-38 ne sont jamais cultivés en présence d'une concentration en éthanol supérieure à 0,5 % afin d'éviter des effets secondaires dus à cet alcool.

### 2.6.2. Vitamine C

La vitamine C (Merck) est diluée dans du milieu à une concentration de  $10^{-2}$  M. La solution est ensuite stérilisée par filtration sur filtre 0,2  $\mu\text{m}$  Millipore puis portée à la concentration désirée.

## 2.7. DOSAGE DE LA MALONALDEHYDE

Les radicaux libres induisent la peroxydation lipidique. Afin d'estimer l'effet de la culture des fibroblastes sous 2 atmosphères d'oxygène sur cette peroxydation, nous avons dosé la malonaldehyde selon la méthode décrite par Placer (1966).

Pendant 4 jours, une boîte de culture (Stérilin) de fibroblastes à confluence contenant environ 4 millions de cellules est placée sous 2 atmosphères d' $\text{O}_2$  tandis qu'une boîte est conservée dans une atmosphère normale. Après ces quatre jours, la malonaldehyde est dosée : les cellules sont raclées dans du Tris 0,2M, KCl 0,16 M, pH 7,4 et centrifugées. Le culot



ainsi obtenu est suspendu dans ce même tampon et homogénéisé. On ajoute alors 0,5 ml de cet homogénat, à 0,9 ml d'une solution d'acide thiobarbiturique à 0,8 %. Deux moles d'acide thiobarbiturique réagissent avec une mole de malonaldehyde pour donner un composé dont l'absorbance est mesurable à 532 nm.

## 2.8. TRAITEMENT STATISTIQUE DES RESULTATS

Chaque expérience est constituée de 3 x 2 groupes de 15 cellules correspondant à l'injection d'enzyme(s), à l'injection de tampon et aux fibroblastes non injectés. Le nombre de cellules vivantes est compté chaque jour pendant 5 jours. Les valeurs ainsi obtenues sont transformées selon la formule  $2 \arcsin \sqrt{p}$ , où p représente la proportion de cellules vivantes, ceci afin d'éviter la dépendance entre les différents échantillons, dépendance due au fait que chaque mesure est prise à partir des mêmes 15 cellules, (Winer, 1971). De cette manière, nous établissons un tableau de données représentant une ANOVA à 3 critères de classification : les groupes de cellules (critère aléatoire) sont hiérarchisés avec différents types d'injection (critère fixe), tous deux sont croisés aux jours (critère fixe). Cette ANOVA a été traitée par BMDP 8V (1981). De plus, les facteurs "cellules injectées" et "cellules injectées avec du tampon" ont été traitées dans une ANOVA classique à 2 critères de classification croisées, fixes.



### III. RESULTATS

#### 3.1. CARACTERISATION DU MODELE EXPERIMENTAL : TOXICITE DE L'OXYGENE POUR LES CELLULES EN CULTURE

##### 3.1.1. Evolution des protéines sur culture en masse

Nous avons cultivé différentes boîtes de Pétri de 7 cm<sup>2</sup> de surface de fibroblastes à confluence ( $0,10 \cdot 10^{-5}$  cellules/cm<sup>2</sup>) et suivi l'évolution de la quantité de protéines en fonction du temps d'incubation sous 2 atm. d'O<sub>2</sub> à 95 % (fig. 6). *10<sup>5</sup> comparaison avec normal ?*

Comme nous pouvons le voir dans la figure 6, la quantité de protéines augmente pendant les premières 24 heures, se stabilise ensuite pendant 1 jour pour diminuer enfin jusqu'à disparition des cellules attachées au support après 8 jours d'incubation. Nous pouvons en conclure que, dans ces conditions, les cellules cultivées en masse continuent encore à se diviser pendant ce premier jour pour mourir ensuite avec un taux de mortalité qui augmente de jour en jour.

##### 3.1.2. Evolution du nombre de cellules en clonage

Dans cette expérience, nous avons suivi l'évolution de 50 cellules repérées sur les quadrillages d'une boîte de Pétri ( $0,25 \cdot 10^3$  cellules/cm<sup>3</sup>) en fonction du temps d'incubation sous 2 atm. d'O<sub>2</sub> (fig. 7).

Nous pouvons constater une diminution du nombre de cellules dès la mise sous oxygène jusqu'à leur disparition totale après 6 jours : les fibroblastes en clonage ne semblent donc pas se diviser, contrairement aux cellules cultivées en masse.

##### 3.1.3. Evolution morphologique

Nous avons suivi l'évolution morphologique de fibroblastes en présence de 2 atm. d'O<sub>2</sub>. Nous pouvons observer une évolution rapide vers la dégénérescence au bout de quelques jours.

Il est à noter que cette évolution est variable en temps et en aspect, d'une cellule à l'autre.

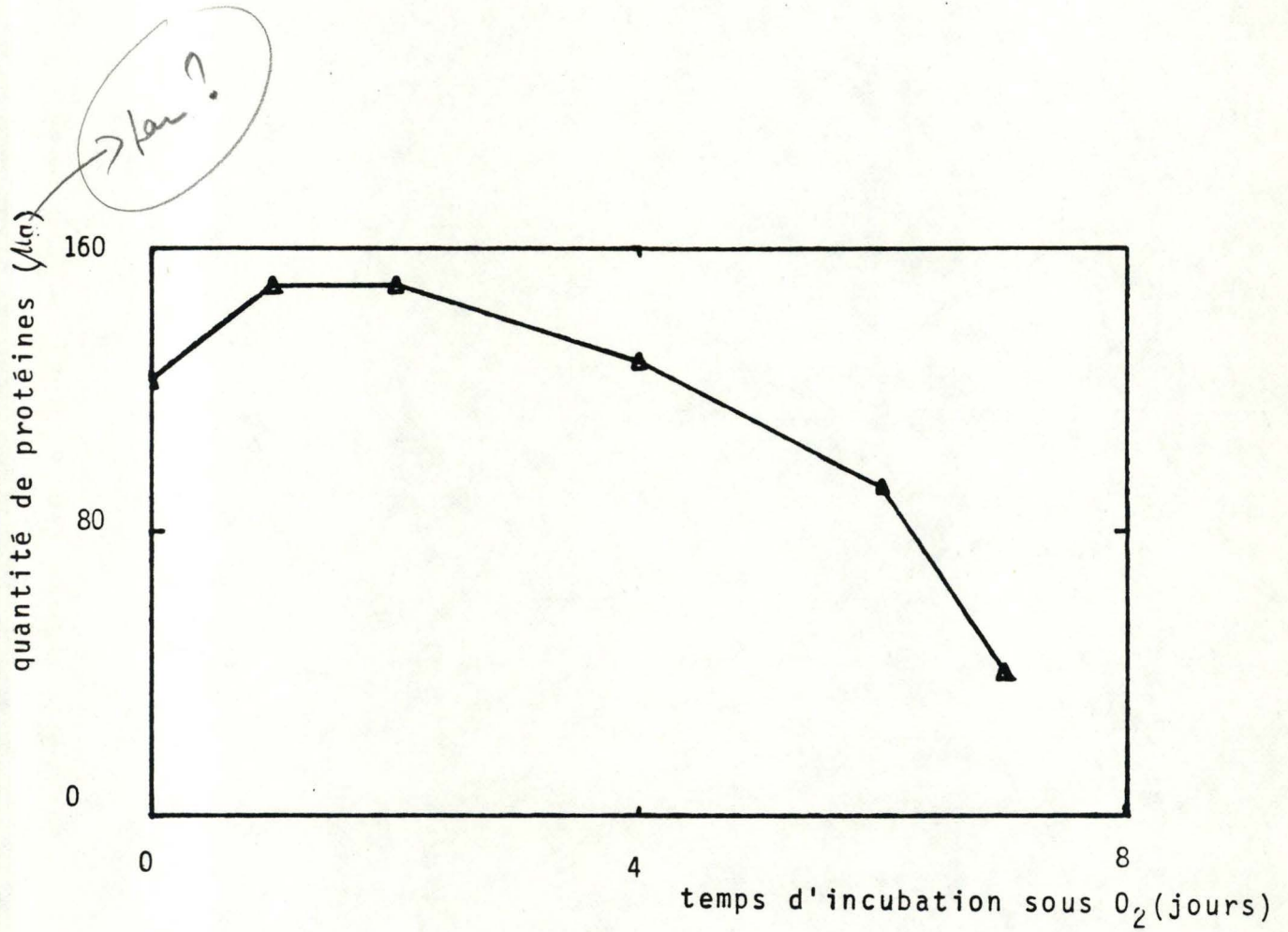


Figure 6 : évolution de la quantité de protéines sur culture en masse sous 2 atmosphères d'oxygène à 95%.



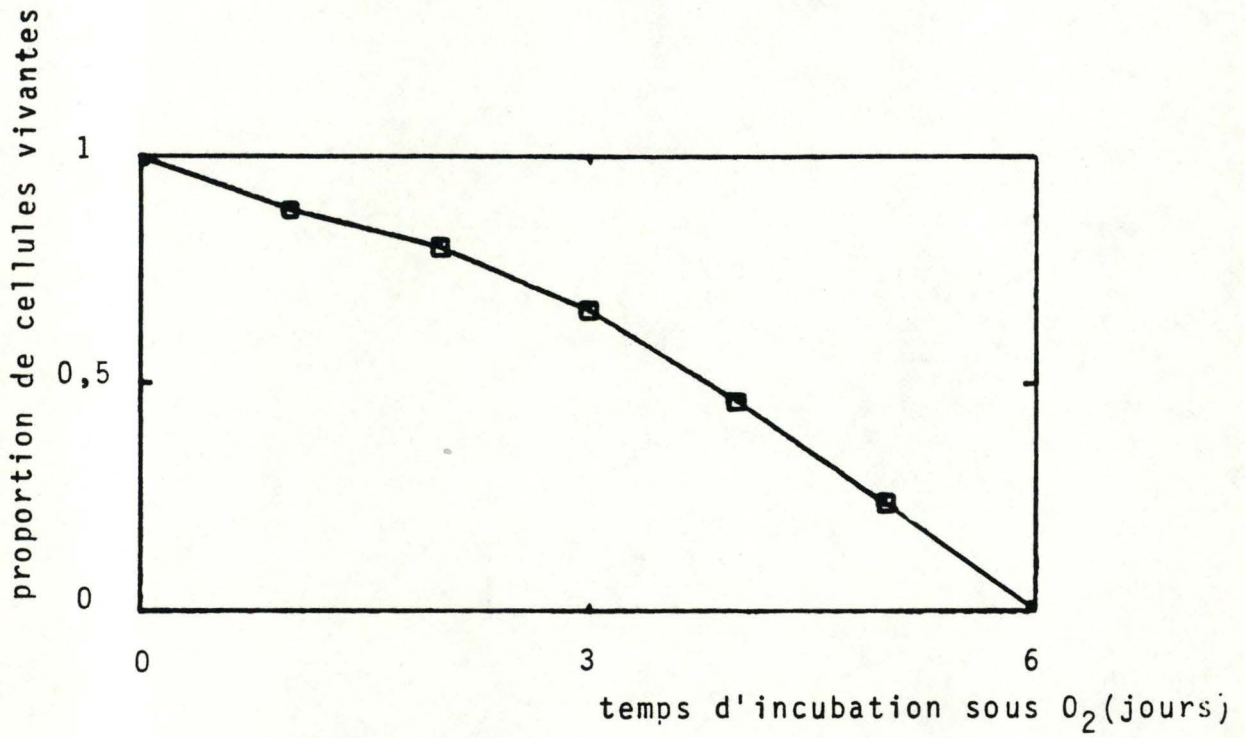


Figure 7 : évolution du nombre de cellules en clonage sous 2 atmosphères d'oxygène à 95%.

Cette évolution vers la dégénérescence consiste en une condensation du cytoplasme autour du noyau qui conserve une morphologie apparemment normale jusqu'à la mort.

Les cellules se détachent alors du support (fig. 8).

#### 3.1.4. Evolution de la peroxydation lipidique

Nous avons estimé la peroxydation lipidique par dosage de la malonaldéhyde après différents temps d'exposition à 2 atm. d' $O_2$  (fig. 9). Nous pouvons remarquer sur cette figure, une augmentation de la quantité de malonaldéhyde rapportée par  $\mu g$  de protéines en fonction du temps d'incubation sous  $O_2$ .

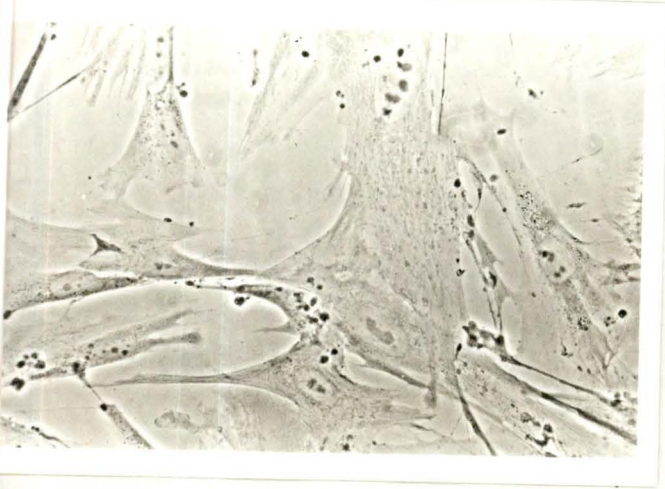
Cette augmentation n'est pas constante, elle s'accélère fortement après le troisième jour d'exposition, ce qui correspond à la période durant laquelle la disparition des cellules devient importante.

Ces différentes expériences nous ont permis de préciser notre modèle expérimental. Nous constatons effectivement que nous pouvons induire de manière reproductible une dégénérescence cellulaire en incubant les fibroblastes sous 2 atm. d'oxygène à 95 %. Dans ces conditions, les cellules cultivées à faible densité de population sont toutes mortes après 6 jours. On sait que les fortes pressions d' $O_2$  induisent la formation de radicaux dérivés de l' $O_2$  et, en voie de conséquence, la peroxydation des lipides : nous avons pu vérifier par la présence de malonaldéhyde en grande quantité après le 3<sup>e</sup> et le 4<sup>e</sup> jour d'incubation qu'il en était bien de même dans nos conditions de travail.

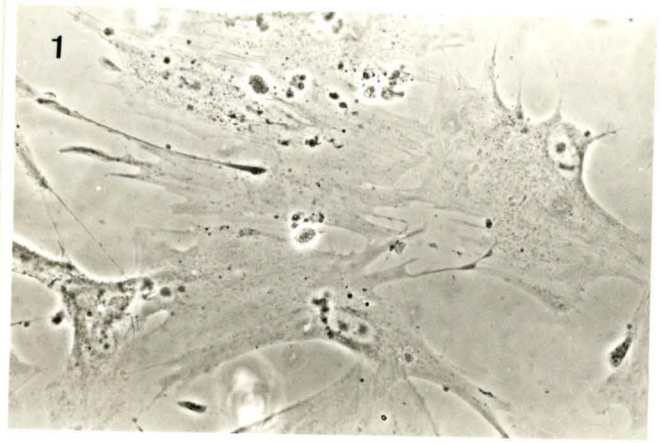
Nous pouvons donc à présent utiliser ce modèle afin de voir quelle est l'influence des divers systèmes naturels de protection sur cette dégénérescence cellulaire.



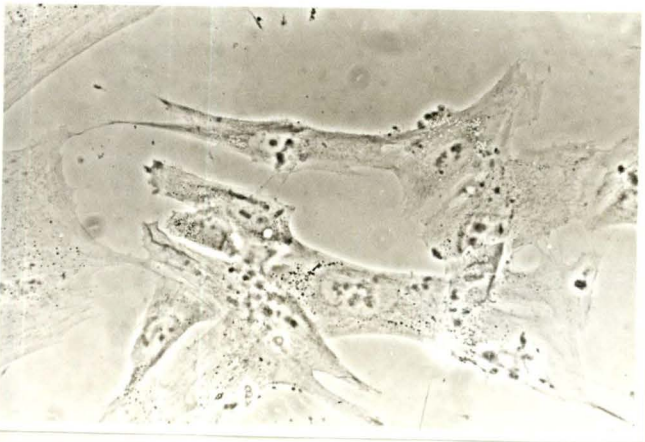
0



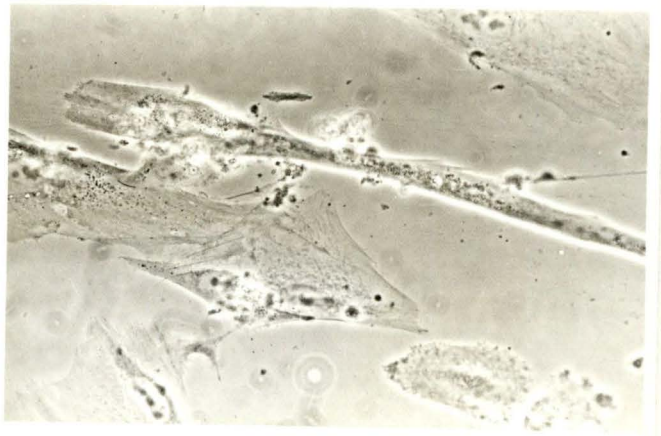
1



2



3



4



5 jours



Figure 8 : évolution morphologique de fibroblastes soumis à 2 atmosphères d'oxygène à 95%, grossissement 460X.

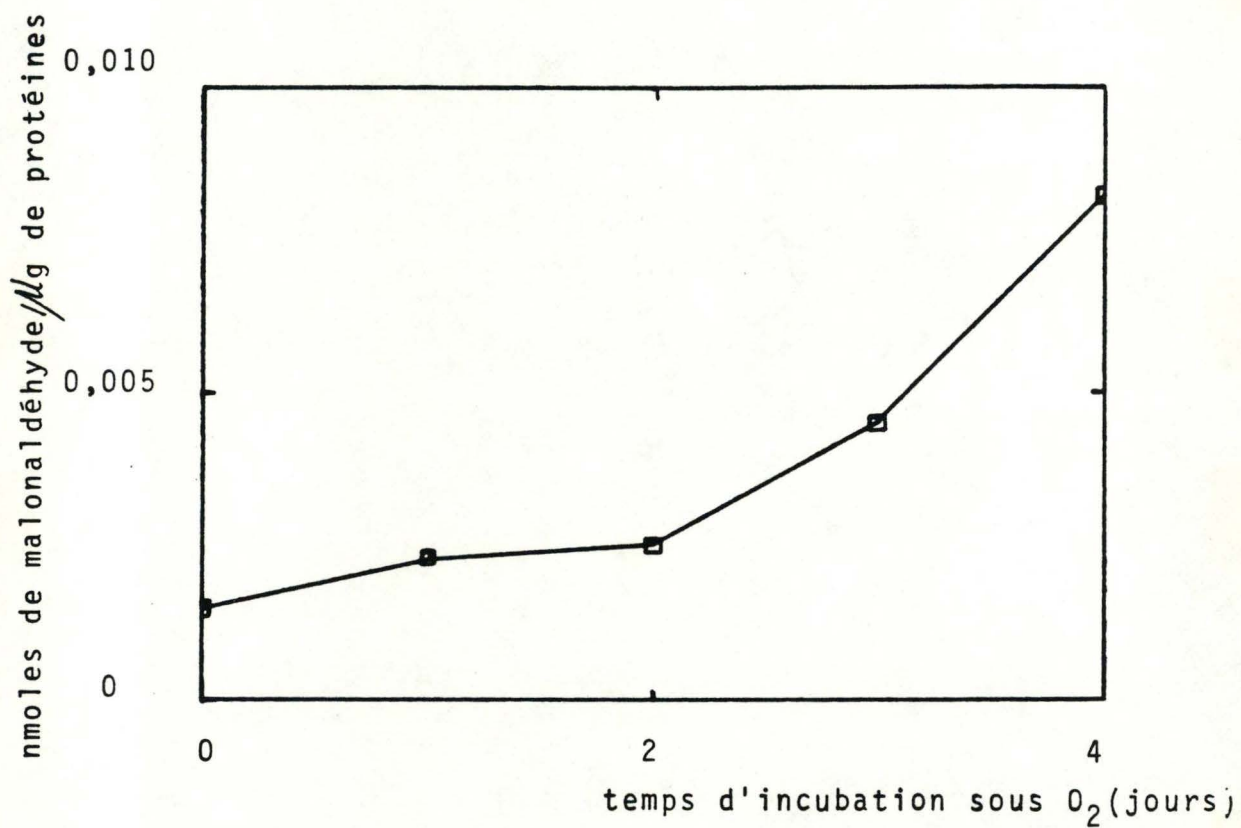


Figure 9 : évolution de la peroxydation lipidique sous 2 atmosphères d'oxygène à 95%.



### 3.2. MICRO-INJECTION DES TROIS ENZYMES

#### 3.2.1. Effet de la présence simultanée des 5 systèmes de protection

##### 3.2.1.1.

Nous avons injecté une solution contenant les 3 enzymes (voir matériels et méthodes) à différents moments par rapport à la mise sous oxygène c'est-à-dire un jour avant (fig. 10A), le jour même (fig. 10B), un jour (fig. 10C) et deux jours (fig. 10D) après la mise sous atmosphère d'oxygène.

De plus, les fibroblastes injectés baignaient dans un milieu de culture contenant de la vitamine E à une concentration de  $5.10^{-4}$  M et de la vitamine C à une concentration de  $10^{-4}$  M. Nous étions donc dans les conditions les plus favorables pour obtenir une protection des cellules, due à ces divers systèmes de défense.

Plusieurs témoins ont été réalisés : cellules non injectées baignant dans le milieu de culture contenant les deux vitamines, cellules non injectées ou injectées avec du tampon dans un milieu ne contenant pas de vitamine. Les vitamines sont ajoutées dans le milieu immédiatement après l'injection pour éviter une dissymétrie des effets protecteurs.

Les résultats montrent que, quel que soit le jour de l'injection, nous constatons que la plupart des fibroblastes sont morts au bout de six jours. Cependant, nous remarquons que l'injection de trois enzymes diminue le taux de mortalité principalement pendant les 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> jours après l'exposition. Pour mettre en évidence cette protection, nous avons porté en graphique le pourcentage de protection dû aux enzymes pendant ces deux jours c'est-à-dire le pourcentage des cellules injectées encore attachées au support par rapport aux cellules attachées non injectées baignant dans un milieu contenant les deux vitamines en fonction du jour de l'injection (fig. 11). Ce pourcentage doit être majoré des 17 % correspondant aux cellules qui meurent suite à l'injection. Ce graphique nous permet de déterminer le jour optimal auquel les cellules doivent être injectées pour leur apporter un maximum de protection.

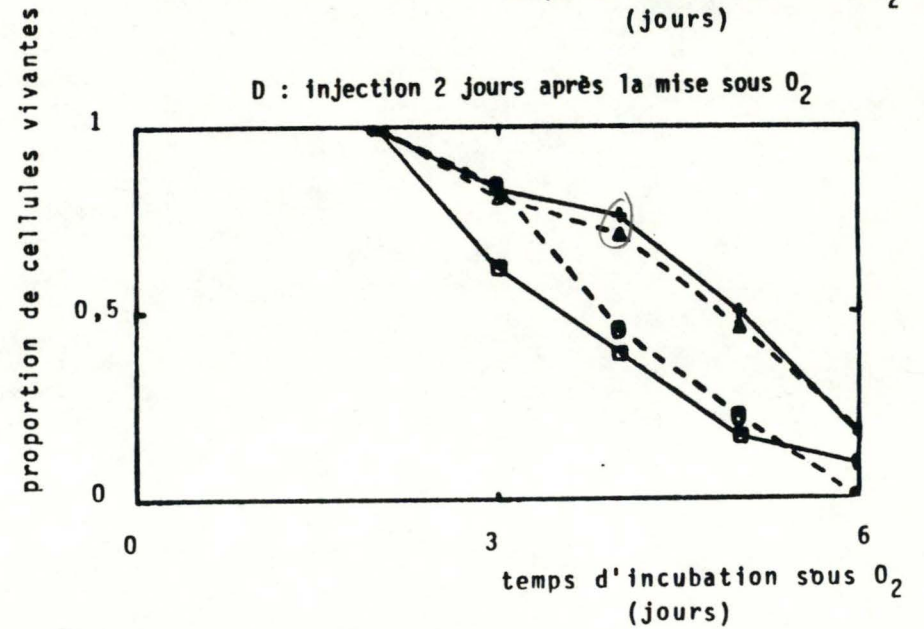
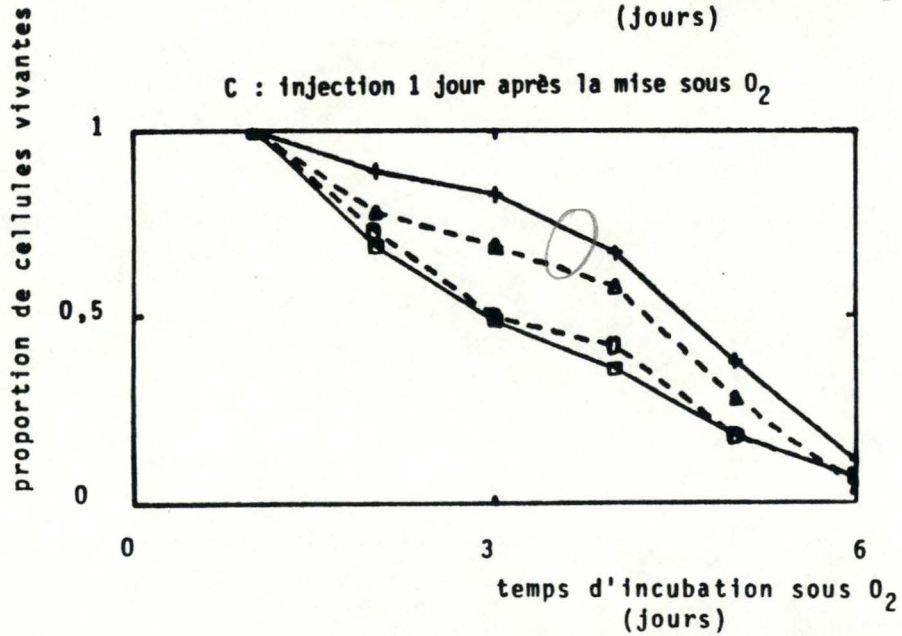
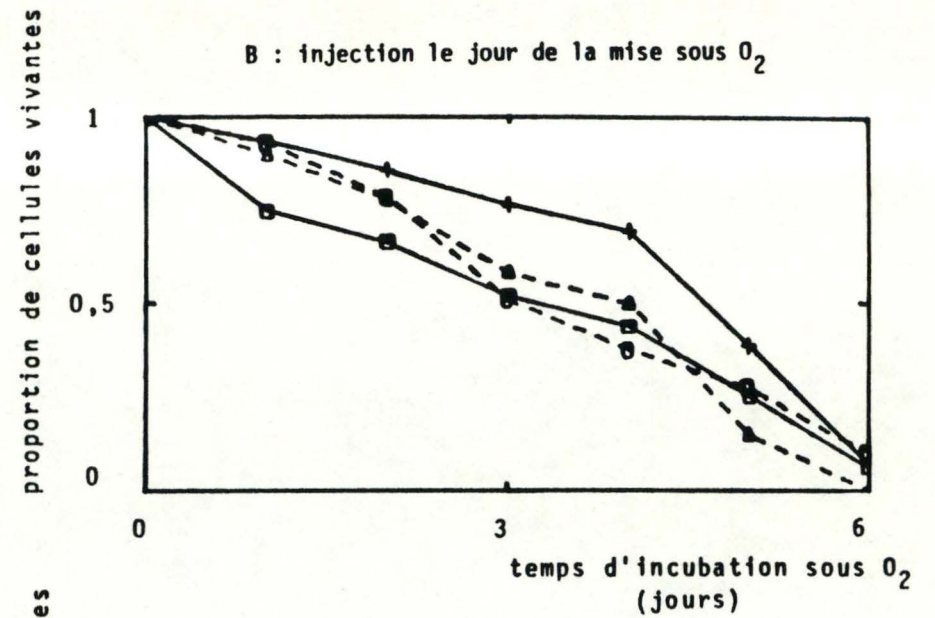
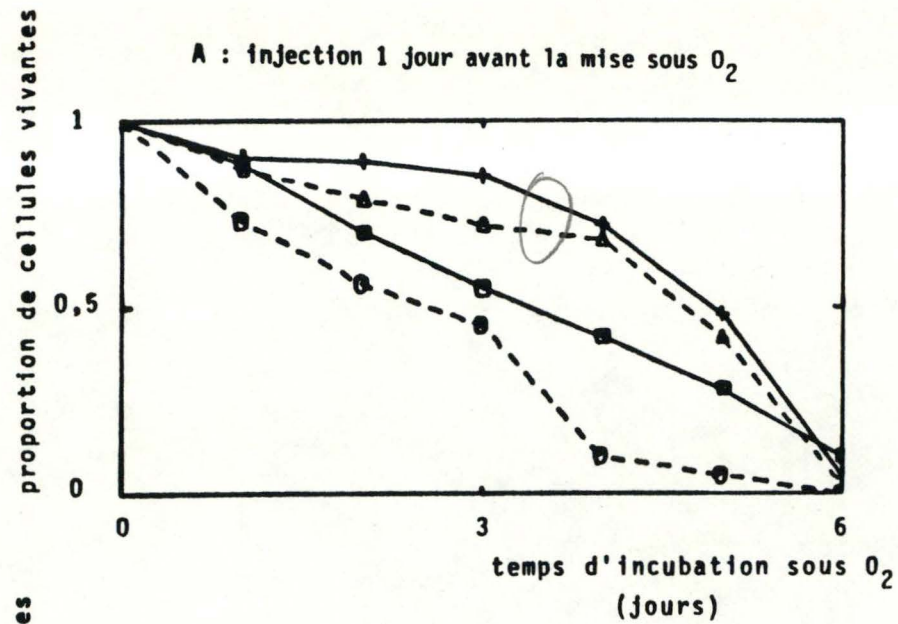


Figure 10 : évolution du nombre de cellules injectées avec la catalase, la SOD et la GSH peroxydase (+—+) et de cellules non injectées ( $\Delta$ -- $\Delta$ ) en présence de vitamines E et C, ainsi que du nombre de cellules injectées avec du tampon (o---o) et de cellules non injectées ( $\square$ — $\square$ )



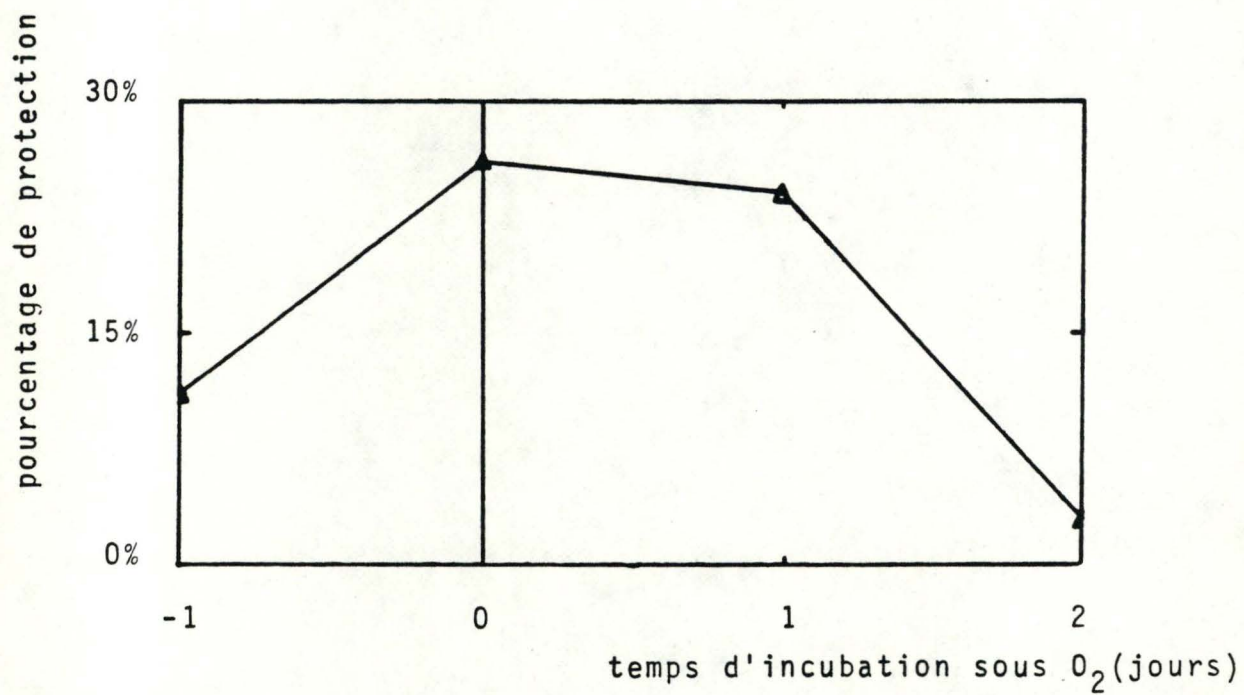


Figure 11 : évolution du pourcentage de protection dû aux 3 enzymes en fonction du jour de l'injection.

On remarque que c'est le jour où les cellules sont exposées à l'oxygène et le jour suivant qui donnent la meilleure protection.

Les différentes figures 10 montrent aussi que les vitamines apportent par elles-mêmes un effet protecteur parfois important comme on peut le voir sur les figures 10C et 10D où les cellules non injectées maintenues en présence de vitamines meurent moins vite que les cellules maintenues dans un milieu ne contenant pas ces vitamines.

### 3.2.1.2. Analyse de la variance

En considérant les différentes données obtenues pour les quatre groupes de cellules, nous avons établi un tableau d'ANOVA à 3 critères de classification (voir matériels et méthodes) pour chaque expérience (tableaux II à V).

*il*  
Le ressort de cette analyse que le facteur "type d'injection" est significatif (seuil de signification porté à 10 %) ce qui voudrait dire que les diverses populations considérées sont significativement différentes.

Etant donné que l'interaction entre le facteur "jour" et le facteur "type d'injection" est aussi significative, cette conclusion doit être prise avec toutes les réserves possibles. C'est pourquoi nous avons réalisé une analyse de la variance à 2 critères de classification, croisés, fixes entre les groupes de cellules injectées et baignant dans le milieu contenant les deux vitamines (tableaux VI à IX) ainsi qu'entre ce dernier groupe et celui des cellules non injectées baignant dans un milieu conventionnel (tableaux X à XIII).

Cette ANOVA II nous permet de rejeter l'hypothèse nulle avec un seuil de signification de 1 %, c'est-à-dire de considérer que les moyennes sont significativement différentes dans tous les cas où les enzymes sont injectées le jour même ou un jour après la mise sous  $O_2$ , ce qui correspond d'ailleurs à la courbe de protection présentée à la figure 11. Quant à l'influence des vitamines, elle est significative lorsque celles-ci sont ajoutées dans le milieu de culture un ou deux jours après l'exposition à l'oxygène.



sources de variation	F	Prob
type d'injection	4,05	0,1052
jour	154,90	0,0000
interaction	6,64	0,001

Tableau II : Analyse de la variance à 3 critères de classification lorsque l'injection se fait 1 jour avant la mise sous  $O_2$

sources de variation	F	Prob
type d'injection	5,12	0,0743
jour	144,93	0,0000
interaction	4,54	0,0010

∕

Tableau III : Analyse de la variance à 3 critères de classification lorsque l'injection se fait le jour même de la mise sous  $O_2$

sources de variation	F	Prob
type d'injection	19,99	0,0072
jour	4,49	0,0000
interaction	4,12	0,0019

Tableau IV : Analyse de la variance à 3 critères de classification lorsque l'injection se fait un jour après la mise sous  $O_2$

sources de variation	F	Prob
type d'injection	17,44	0,0092
jour	185,94	0,0000
interaction	4,44	0,0033

Tableau V : Analyse de la variance à 3 critères de classification lorsque l'injection se fait deux jours après le mise sous  $O_2$

sources de variation	F	
type d'injection	3,51	NS
jour	10,08	SS
interaction	0,21	NS

Tableau VI : ANOVA II : influence des 3 enzymes au jour - 1

sources de variation	F	
type d'injection	0,28	NS
jour	16,09	SS
interaction	2,12	NS

Tableau X : ANOVA II : influence des vitamines au jour - 1

sources de variation	F	
type d'injection	52,8	SS
jour	48,66	SS
interaction	2,39	NS

Tableau VII : ANOVA II : influence des 3 enzymes au jour 0

sources de variation	F	
type d'injection	4,7	NS
jour	89,18	SS
interaction	3,95	NS

Tableau XI : ANOVA II : influence des vitamines au jour 0



sources de variation	F	
type d'injection	29,83	SS
jour	146,73	SS
interaction	2,1	NS

Tableau VIII : ANOVA II :  
influence des 3  
enzymes au jour 1

sources de variation	F	
type d'injection	7,69	S
jour	97,96	SS
interaction	2,17	NS

Tableau XII : ANOVA II : influence  
des vitamines au jour 1

sources de variation	F	
type d'injection	0,53	NS
jour	107,68	SS
interaction	0,09	NS

Tableau IX : ANOVA II :  
influence des 3  
enzymes au jour 2

sources de variation	F	
type d'injection	42,46	SS
jour	57,76	SS
interaction	4,31	NS

Tableau XIII : ANOVA II : influence  
des vitamines au jour 2

### 3.2.2. Effets des enzymes

#### 3.2.2.1.

Afin de séparer un éventuel effet synergique des enzymes et des vitamines, nous avons injecté une quarantaine de fibroblastes avec une solution contenant des enzymes au jour 0 (fig. 12A) et au jour 1 (fig. 12B). Le milieu dans lequel furent cultivées ces cellules ne contenait aucun additif. Un même nombre de cellules non injectées et de cellules injectées avec du tampon constituait les témoins.

Comme nous le montre la figure 12, les cellules injectées avec les trois enzymes ont un taux de mortalité plus lent que les cellules injectées avec du tampon. Cependant, au bout de 6 jours, quel que soit le traitement subi par les fibroblastes, ceux-ci sont tous morts. Si l'injection est exécutée au jour 1, nous pouvons observer les mêmes effets. Nous avons pu mettre en évidence une protection non négligeable due à un mélange de

catalase, de superoxyde dismutase et de glutathion peroxydase : 47 % de protection si les enzymes sont injectées au jour 0 et 45 % s'il le sont au jour 1.

### 3.2.2.2. Analyse de la variance

Une analyse de la variance à 3 critères de classification nous confirme ( $\alpha = 10\%$ ) que les trois groupes de cellules sont différents (tableaux XIV et XV). Avec un seuil de signification de 1 %, cette conclusion est corroborée par l'ANOVA II qui compare les moyennes des cellules injectées avec les enzymes et les cellules injectées avec du tampon (tableaux XVI et XVII).

sources de variation	F	Prob
type d'injection	5,69	0,0952
jour	99,24	0,0000
interaction	1,00	0,4879

Tableau XIV : analyse de la variance à 3 critères de classification lorsque l'injection se fait au jour 0

sources de variation	F	Prob
type d'injection	9,06	0,0535
jour	89,03	0,0000
interaction	1,21	0,3708

Tableau XV : analyse de la variance à 3 critères de classification lorsque l'injection se fait au jour 1



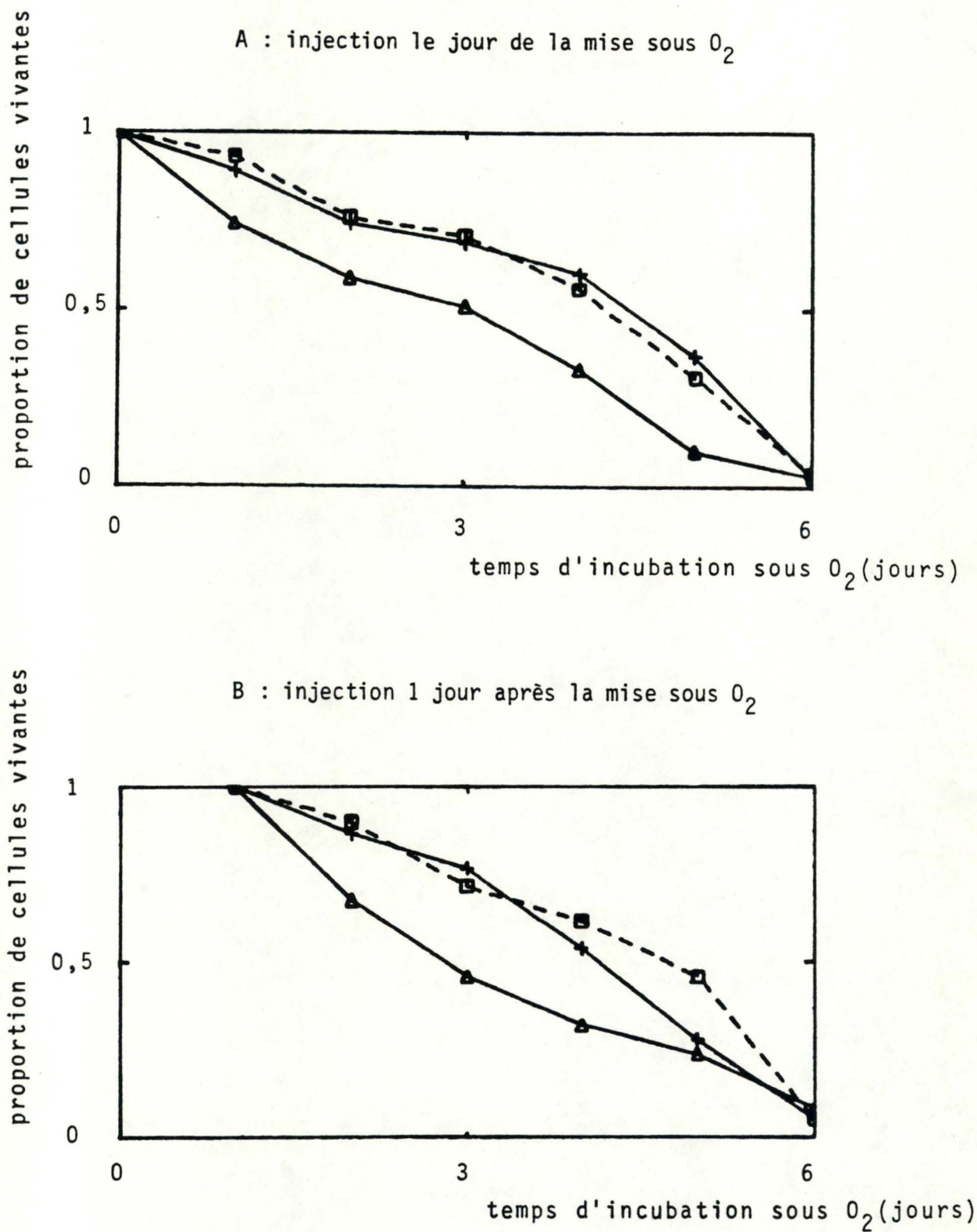


Figure 12 : évolution du nombre de cellules cultivées sous 2 atmosphères d'oxygène à 95% : +—+ cellules injectées avec les 3 enzymes, □--□ cellules non injectées, △—△ cellules injectées avec du tampon.

sources de variation	F	
type d'injection	21,17	SS
jour	40,74	SS
interaction	1,49	NS

Tableau XVI : ANOVA II lorsque l'injection se fait au jour 0

sources de variation	F	
type d'injection	28,98	SS
jour	130,5	SS
interaction	3,13	NS

Tableau XVII : ANOVA II lorsque l'injection se fait au jour 1

### 3.3. ETUDE ANALYTIQUE DES SYSTEMES DE PROTECTION

#### 3.3.1. L' $\alpha$ -tocophérol

##### 3.3.1.1. Influence de l' $\alpha$ -tocophérol sur culture en masse

Un même nombre de fibroblastes a été cultivé en présence de différentes concentrations en vitamine E (voir matériels et méthodes). Après trois jours d'exposition à 2 atmosphères d'oxygène à 95 %, la quantité de cellules survivantes a été estimée par un dosage de protéines.

Le pourcentage de production en fonction de la concentration en  $\alpha$ -tocophérol est représenté à la figure 13. Nous observons, ainsi un maximum de protection de 36 % à une concentration égale à  $5 \cdot 10^{-4}$  M. Aux concentrations inférieures et supérieures, cette protection tend à décroître, soit à cause d'une quantité de vitamine insuffisante, soit à cause d'une toxicité accrue.



### 3.3.1.2. Influence de l' $\alpha$ -tocophérol sur cellules en clonage

Ayant déterminé cette concentration optimale, nous avons voulu suivre l'évolution quantitative de fibroblastes cultivés en présence de cette concentration en  $\alpha$ -tocophérol, en fonction du temps (fig. 14).

Cette figure nous permet de mettre en évidence un plateau de 2 ou 3 jours durant lequel peu de cellules meurent. Ce plateau indiquerait une protection importante par la vitamine E.

Cependant le taux de mortalité des cellules non protégées est aussi assez faible au cours des 3 premiers jours, puis il s'accroît progressivement jusqu'à la mort de toutes les cellules. Il n'en reste pas moins vrai qu'à chaque moment, le taux de survie des cellules cultivées en présence de vitamine E est supérieur au témoin.

### 3.3.2. L'acide ascorbique

L'acide ascorbique, autre molécule antioxydante bien connue, a été testé de la même manière que la vitamine E. La quantité de protéines, correspondant aux cellules survivantes, en fonction de la concentration en vitamine C est reproduite à la figure 15. Une ligne horizontale y représente la quantité de protéine lorsque les fibroblastes sont cultivés sans acide ascorbique et ce pendant trois jours sous deux atmosphères d'O<sub>2</sub>. Nous n'avons pu mettre en évidence de protection significative due à l'acide ascorbique. De plus aux concentrations supérieures à  $7,5 \cdot 10^{-4}$  M, la vitamine C devient très toxique.

### 3.3.3. La catalase

#### 3.3.3.1.

Précédemment, nous avons montré qu'une injection simultanée des trois enzymes apportait une protection relativement conséquente aux fibroblastes soumis à deux atmosphères d'oxygène à 95 %. Il nous semblait intéressant d'essayer de disséquer cet effet protecteur en injectant une enzyme à la fois.

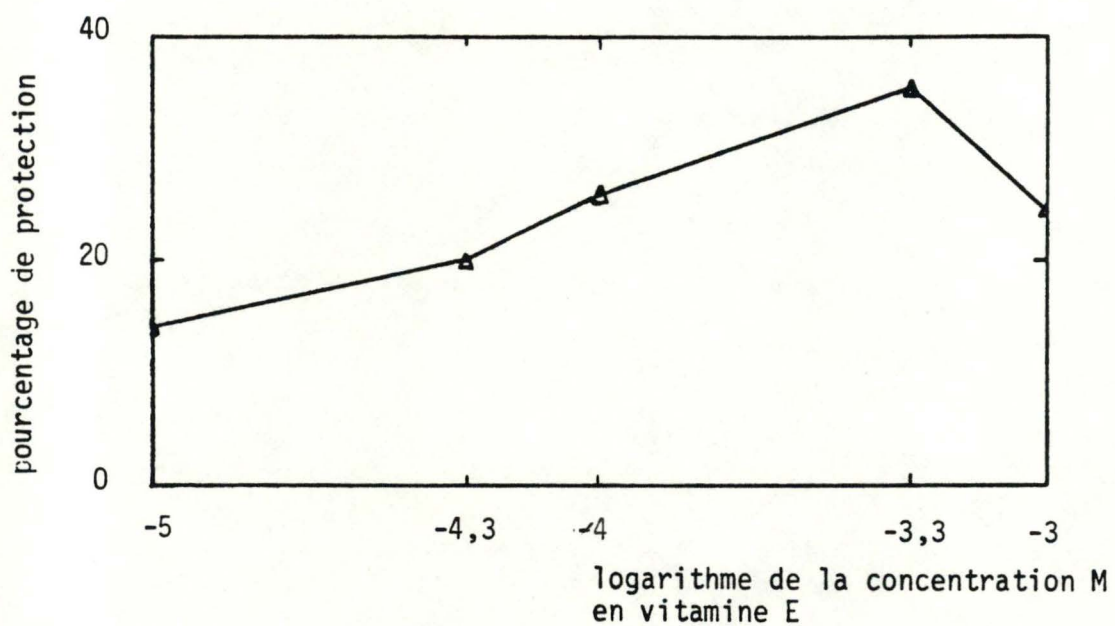


Figure 13 : évolution du pourcentage de protection en fonction de la concentration en vitamine E pour des cellules cultivées pendant 3 jours sous 2 atmosphères d'oxygène à 95%.



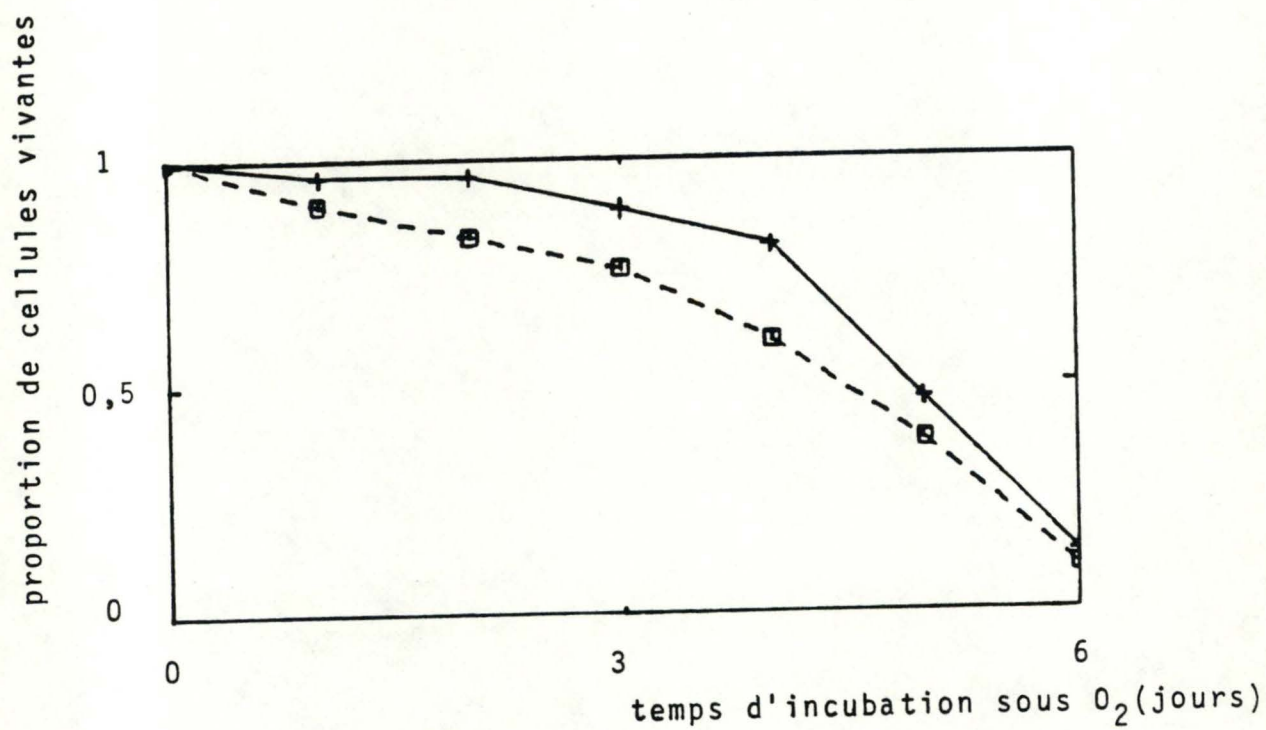


Figure 14 : évolution du nombre de cellules cultivées sous 2 atmosphères d'oxygène à 95% en présence (+—+) et en absence (□---□) de vitamine E à  $5 \cdot 10^{-4}$  M.

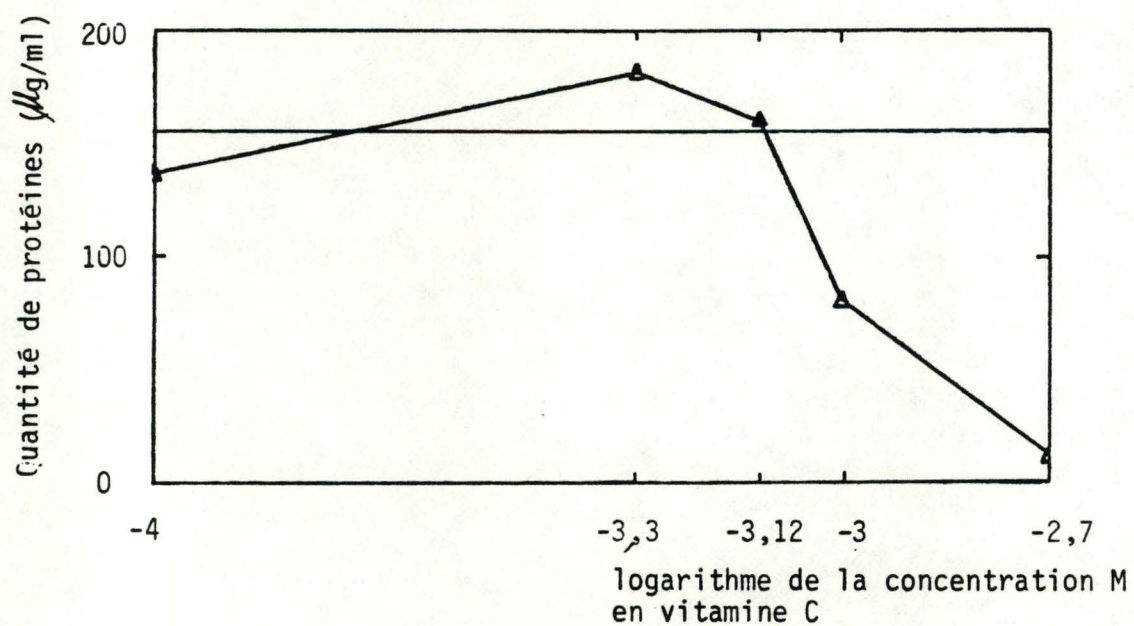


Figure 15 : évolution de la quantité de protéines en fonction de la concentration en vitamine C pour des cellules cultivées pendant 3 jours sous 2 atmosphères d'oxygène à 95%.



*longueur la @ m EJ?*

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à la catalase que nous avons injectée à partir de solutions contenant 0,77 ; 1,59 ; 3,85 et 7,7 unités/ml, c'est-à-dire respectivement 3,6,15 et 30 fois la concentration que contenait la solution avec laquelle nous avons réalisé les expériences précédentes (voir matériels et méthodes - 2.4.). Pour chaque concentration, une quarantaine de cellules ont été injectées. Deux autres groupes de fibroblastes constituaient les témoins; en l'occurrence, 40 cellules non injectées et 40 cellules injectées avec du tampon. Les résultats quantitatifs en fonction du temps d'exposition sont représentés respectivement aux figures 16A, 16B, 16C et 16D. En observant ces quatre figures, nous pouvons remarquer que la protection est nulle (figure 16A) ou négligeable (figure 16B) aux concentrations les plus basses. Cependant, en augmentant la concentration, la protection devient plus importante (figures 16C et 16D).

concentration en catalase	pourcentage de protection
0,77 U/ml	0 %
1,59 U/ml	13 %
3,85 U/ml	18 %
7,7 U/ml	43 %

*si on compare cell. injectées avec cell. injectées 7p*

Tableau XVIII : pourcentage de protection en fonction de la concentration en catalase injectée.

*donc effet protecteur 25*

Afin de rendre ces résultats plus explicites, nous avons porté en graphique le pourcentage de protection en fonction du rapport entre la concentration de la solution injectée et la concentration intracellulaire (fig. 20). L'augmentation de la protection en fonction de l'élévation de la concentration nous apparaît ainsi plus évidente.

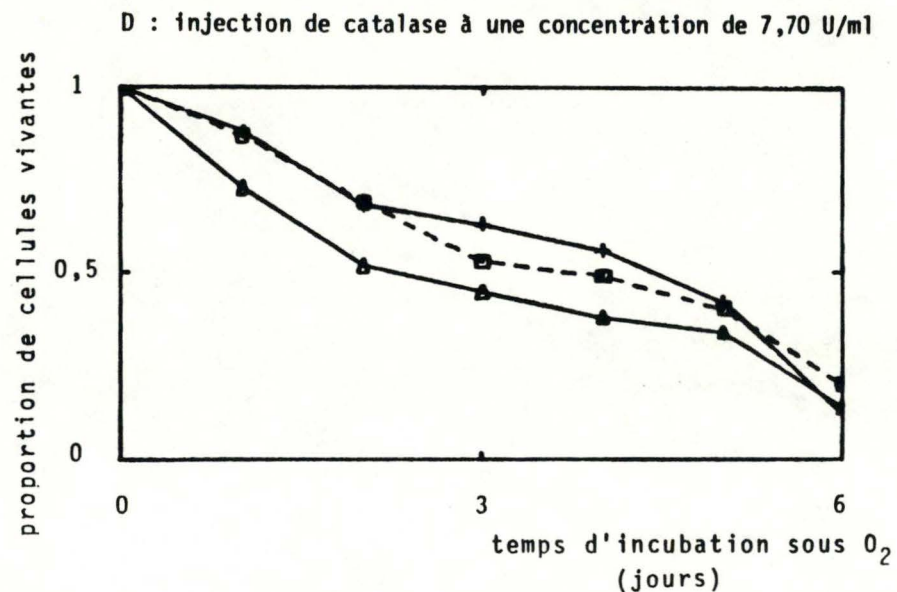
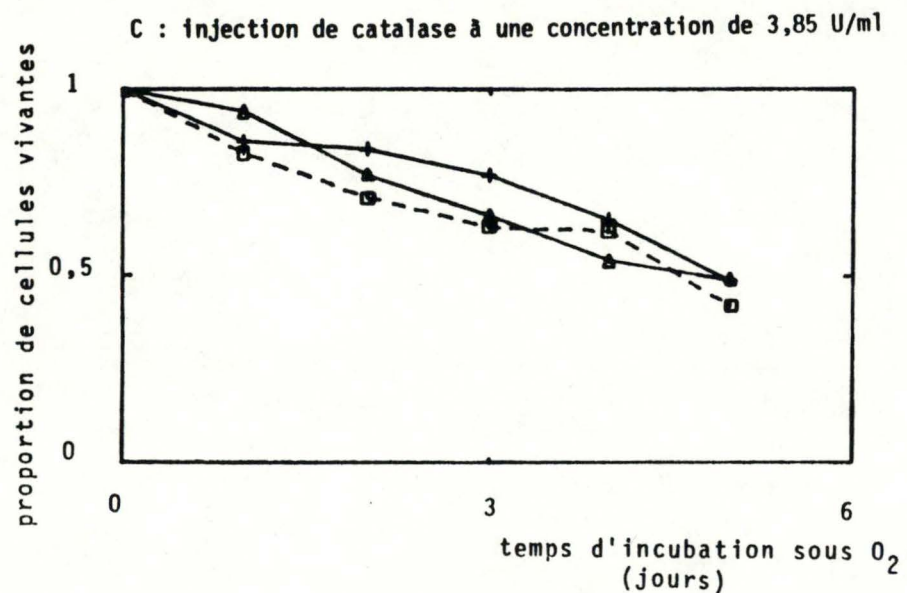
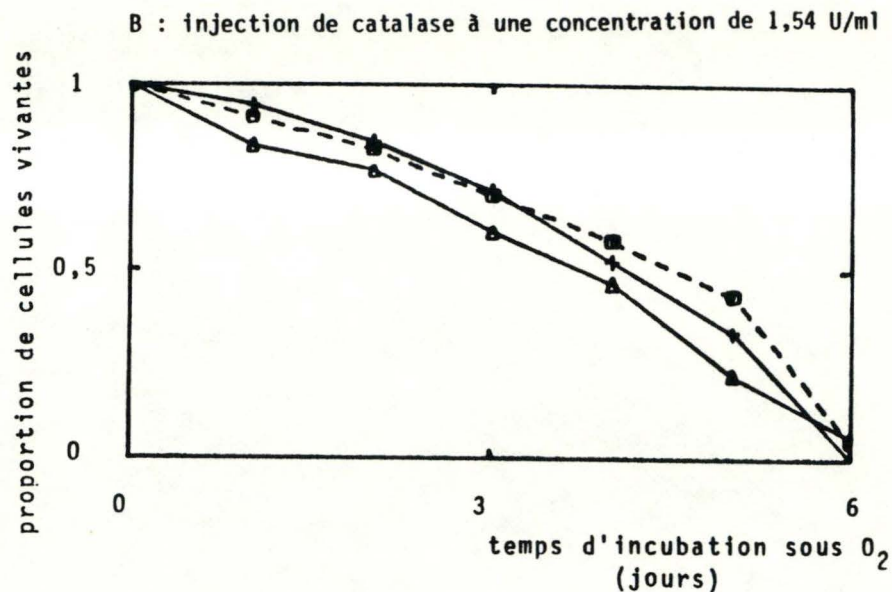
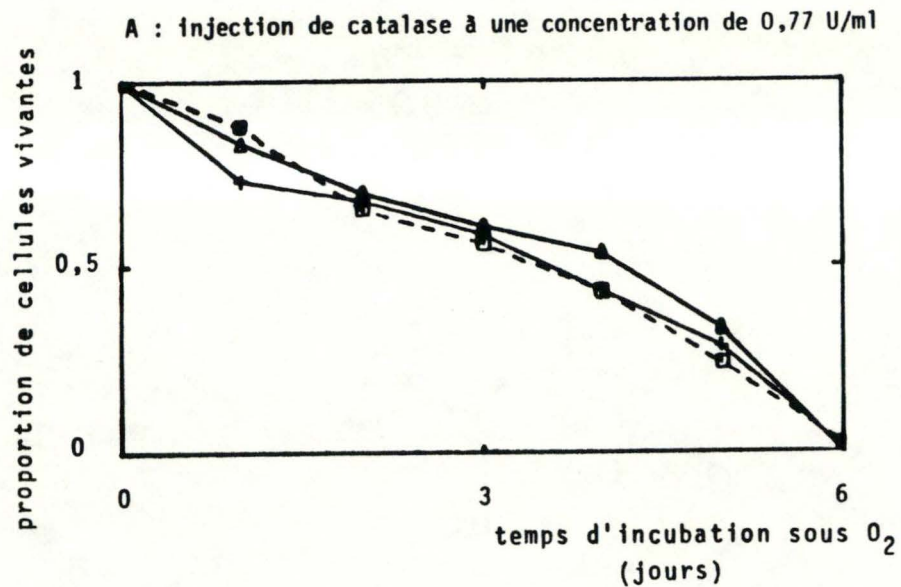


Figure 16 : effet de l'injection de catalase sur des cellules maintenues sous 2 atmosphères d'oxygène à 95%. Les courbes représentent les cellules non injectées (□---□), les cellules injectées avec l'enzyme (+—+) et les cellules injectées avec du tampon (△—△).



### 3.3.3.2. Analyse de la variance

Nous avons ensuite effectué une analyse statistique sur les tableaux de données engendrés par ces quatre expériences. Une analyse de la variance à trois critères de classification nous indique que seule l'injection de catalase à une concentration de 7,7 U/ml est significative ( $\alpha = 10\%$ ) mais avec une interaction également significative (tableaux XIX à XXII).

Comparant la moyenne des cellules injectées avec de la catalase et la moyenne des cellules injectées avec du tampon, l'ANOVA II confirme cette hypothèse avec un seuil de signification de 1% et une interaction non significative (tableaux XXIII à XXVI).

sources de variation	F	P
type d'injection	0,57	0,6172
jour	81,55	0,0000
interaction	0,82	0,6160

Tableau XIX: Analyse de la variance à 3 critères de classification pour une concentration en catalase de 0,77 U/ml

sources de variation	F	
type d'injection	0,26	NS
jour	63,94	SS
interaction	0,60	NS

Tableau XXIII: ANOVA II pour une concentration en catalase de 0,77 U/ml

sources de variation	F	P
type d'injection	0,63	0,8904
jour	60,78	0,0000
interaction	0,53	0,8401

Tableau XX: Analyse de la variance à 3 critères de classification pour une concentration en catalase de 1,59 U/ml

sources de variation	F	
type d'injection	2,5	NS
jour	31,9	SS
interaction	0,19	NS

Tableau XXIV: ANOVA II pour une concentration en catalase de 1,59 U/ml

critères de variation	F	P
type d'injection	1,14	0,4278
jour	41,51	0,0000
interaction	0,89	0,5637

Tableau XXI : Analyse de la variance à 3 critères de classification pour une concentration en catalase de 3,85 U/ml

critères de variation	F	
type d'injection	0,32	NS
jour	11,09	SS
interaction	0,55	NS

Tableau XXV : ANOVA II pour une concentration en catalase de 3,85 U/ml

critères de variation	F	P
type d'injection	5,81	0,0930
jour	254,72	0,0000
interaction	2,10	0,995

Tableau XXII : Analyse de la variance à 3 critères de classification pour une concentration en catalase de 7,7 U/ml

critères de variation	F	
type d'injection	28,63	SS
jour	65,04	SS
interaction	1,35	NS

Tableau XXVI : ANOVA II pour une concentration en catalase de 7,7 U/ml



### 3.3.4. La superoxyde dismutase

#### 3.3.4.1.

Ayant étudié l'influence de la catalase, nous nous sommes ensuite intéressés à la superoxyde dismutase.

Injectée à partir de solutions contenant  $0,45 \cdot 10^6$ ,  $0,9 \cdot 10^6$  et  $1,35 \cdot 10^6$  unités par ml, c'est-à-dire, correspondant à 3,6 et 9 fois la concentration (cfr. matériels et méthodes - 2.4) la superoxyde dismutase seule semble aussi protéger la cellule contre l'effet délétère de l'oxygène, (fig. 17A, 17B et 17C) et ce proportionnellement à la concentration injectée (tableau XXV).

Concentration en SOD	Pourcentage de protection
$0,45 \cdot 10^6$ U/ml	0 %
$0,9 \cdot 10^5$ U/ml	15 %
$1,35 \cdot 10^6$ U/ml	29 %

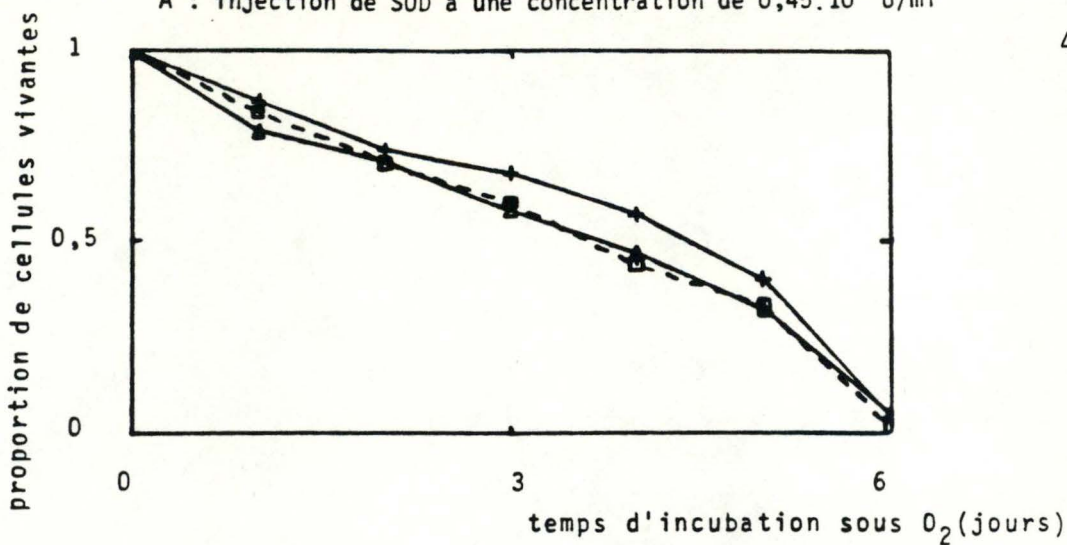
Tableau XXV : pourcentage de protection en fonction de la concentration en SOD injectée

Afin de mieux visualiser cette protection, nous avons calculé le pourcentage de protection en fonction du rapport de la concentration de la solution injectée et de la concentration intracellulaire (fig. 20).

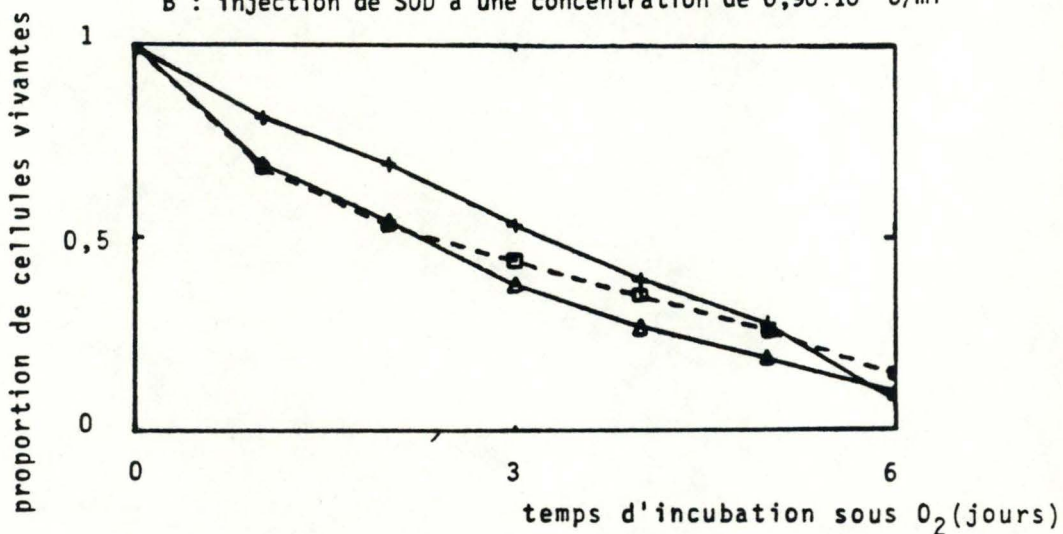
#### 3.3.4.2. Analyse de la variance

Considérant les données expérimentales, nous avons effectué une analyse de la variance à 3 critères de classification (tableaux XXVI à XXVIII).

De cette analyse, ne ressort aucune différence significative. Par contre, l'ANOVA II nous montre qu'avec un seuil de 1 %, l'injection de SOD aux concentrations de 7,6 et 11,4 U/ml nous donne une moyenne significativement différente de celle obtenue dans le cas des témoins injectés avec du tampon (tableaux XXIX à XXXI).



B : injection de SOD à une concentration de  $0,90 \cdot 10^6$  U/ml



C : injection de SOD à une concentration de  $1,35 \cdot 10^6$  U/ml

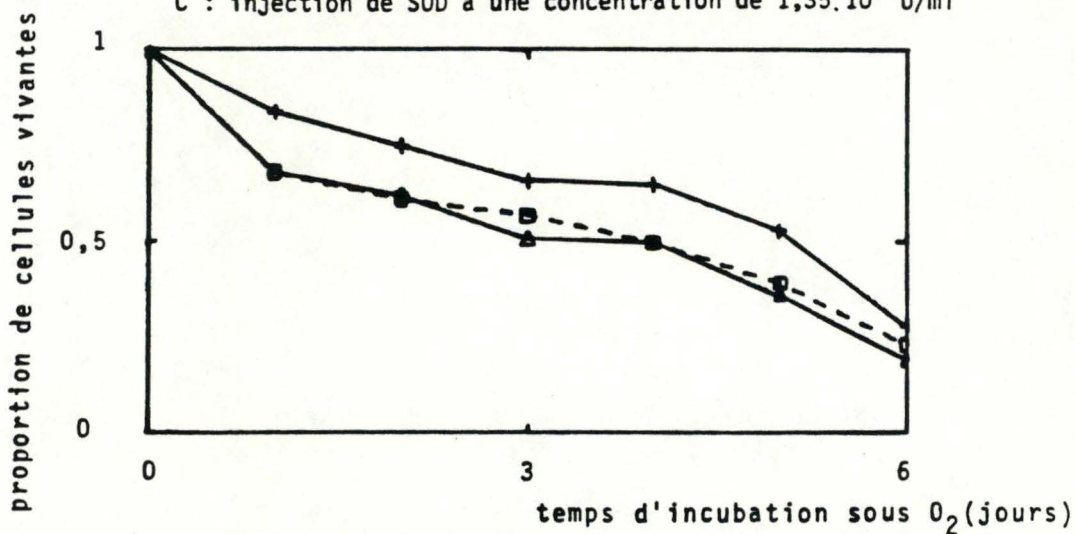


Figure 17 : effet de l'injection de SOD sur des cellules maintenues sous 2 atmosphères d'oxygène à 95%. Les courbes représentent les cellules non injectées (□--□), les cellules injectées avec l'enzyme (+—+) et les cellules injectées avec du tampon (△—△).



sources de variation	F	P
type d'injection	1,37	0,3784
jour	68,21	0,0000
interaction	1,05	0,4523

Tableau XXVI : analyse de la variance à 3 critères de classification pour une concentration en SOD de  $0,45 \cdot 10^6$  U/ml

sources de variation	F	
type d'injection	13,4	SS
jour	33,92	SS
interaction	0,69	NS

Tableau XXXIX : ANOVA II pour une concentration en SOD de  $0,45 \cdot 10^6$  U/ml

sources de variation	F	P
type d'injection	0,86	0,5063
jour	122,55	0,0000
interaction	0,60	0,7878

Tableau XXVII: analyse de la variance à 3 critères de classification pour une concentration en SOD de  $0,9 \cdot 10^6$  U/ml

sources de variation	F	
type d'injection	4,69	NS
jour	37,45	SS
interaction	0,28	NS

Tableau XXX : ANOVA II pour une concentration en SOD de  $0,9 \cdot 10^6$  U/ml

sources de variation	F	P
type d'injection	2,10	0,2687
jour	98,50	0,0000
interaction	1,48	0,2404

Tableau XXVIII: analyse de la variance à 3 critères de classification pour une concentration en SOD de  $1,35 \cdot 10^6$  U/ml

sources de variation	F	
type d'injection	12,32	SS
jour	14,58	SS
interaction	0,56	NS

Tableau XXXI : ANOVA II pour une concentration en SOD de  $1,35 \cdot 10^6$  U/ml

### 3.3.5. La glutathion peroxydase

#### 3.3.5.1.

Après la catalase et la superoxyde dismutase nous avons étudié l'effet de différentes concentrations en glutathion peroxydase c'est-à-dire de solution contenant 1,50, 3, 6 et 12 unités/ml, soit respectivement 0,75; 1,50; 3 et 6 fois la concentration de solution initiale (fig. 18A, 18B, 18C et 18D) (cfr. matériels et méthodes - 2.4.). Comme précédemment, la production augmente avec la concentration de la solution injectée pour atteindre une valeur relativement élevée (tableau XXXII).

concentration en GSH peroxydase	pourcentage de protection
1,5 U/ml	0 %
3 U/ml	30 %
6 U/ml	40 %
12 U/ml	67 %

Tableau XXXII : pourcentage de protection en fonction de la concentration en GSH par oxydase

De même que pour deux autres enzymes, nous avons exprimé le pourcentage de protection en fonction du rapport de la concentration injectée et de la concentration intracellulaire à la figure 20.



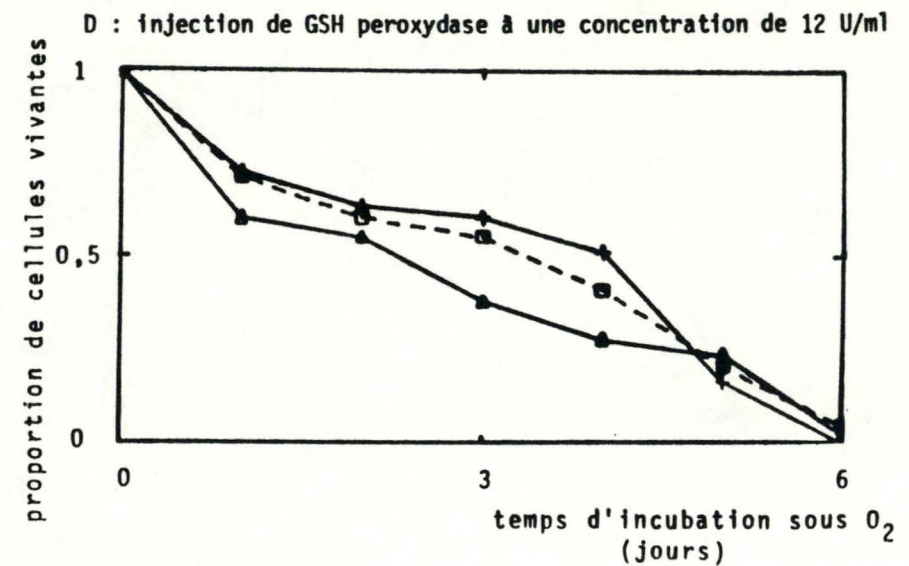
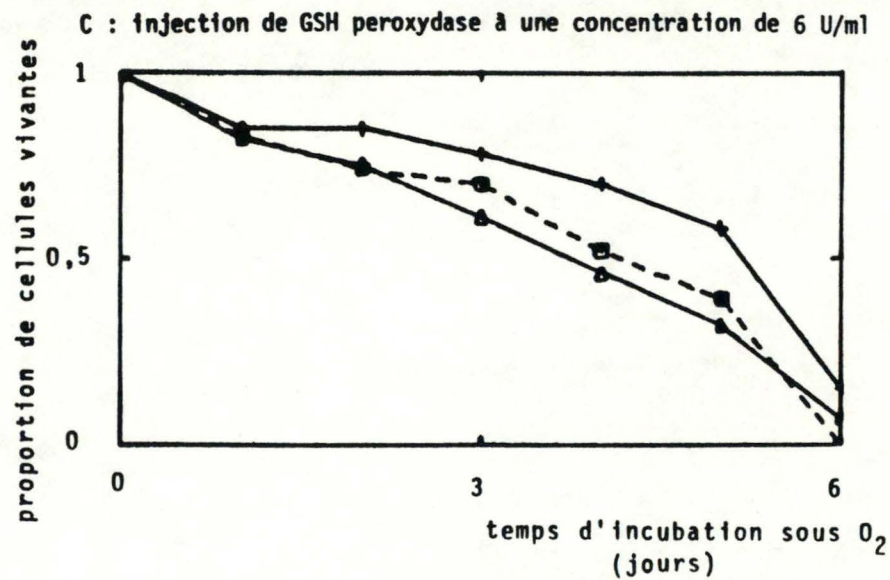
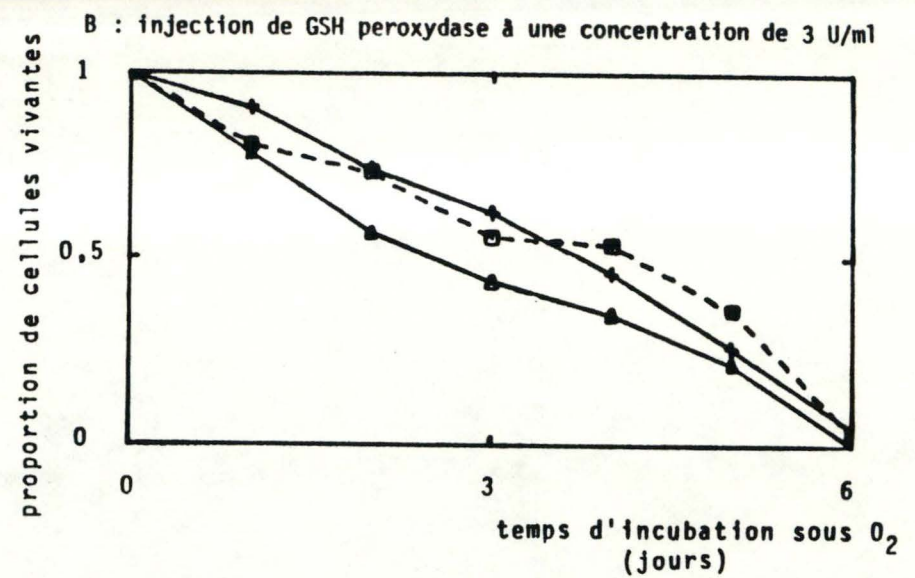
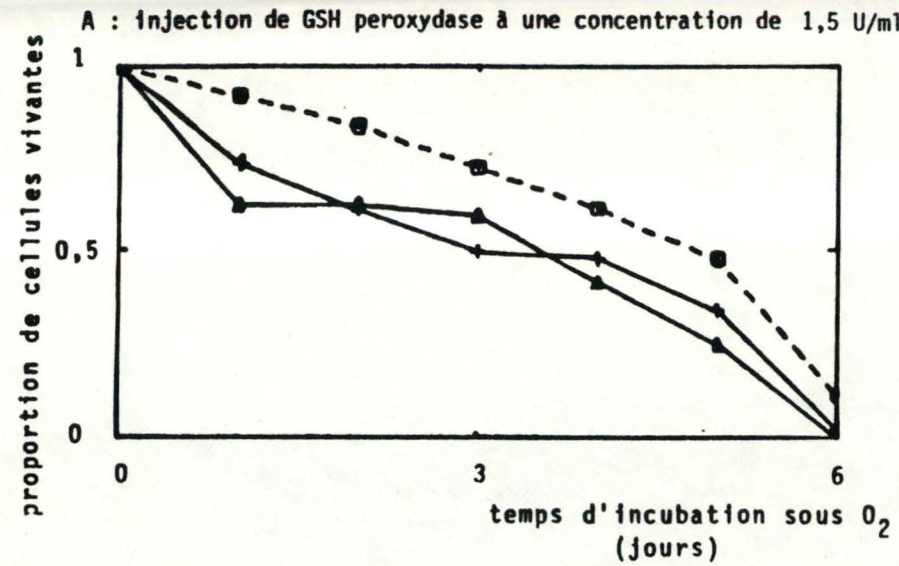


Figure 18 : effet de l'injection de GSH peroxydase sur des cellules maintenues sous 2 atmosphères d'oxygène à 95%. Les courbes représentent les cellules non injectées (□---□), les cellules injectées avec l'enzyme (+—+) et les cellules injectées avec du tampon (Δ—Δ).

### 3.3.5.2. Analyse de la variance

Les données de ces expériences nous ont permis d'exécuter une analyse de la variance à 3 critères de classification (tableaux XXXIII à XXXVI ) Cette analyse ne nous donne aucun résultat significatif. C'est pourquoi nous avons réalisé une ANOVA II; nous pouvons ainsi confirmer une protection de la glutathion peroxydase aux trois concentrations plus élevées, avec un seuil  $\alpha$  de 1 % (tableaux XXXVII à XL).

sources de variation	F	P
type d'injection	0,93	0,4855
jour	38,58	0,0000
interaction	0,74	0,6809

Tableau XXXIII : analyse de la variance à 3 critères de classification pour une concentration en GSH peroxydase de 1,5 U/ml

sources de variation	F	
type d'injection	2,08	SS
jour	14,35	SS
interaction	0,38	NS

Tableau XXXVII: ANOVA II pour une concentration en GSH peroxydase de 1,5 U/ml

sources de variation	F	P
type d'injection	4,53	0,1241
jour	56,69	0,0000
interaction	1,15	0,3919

Tableau XXXIV : analyse de la variance à 3 critères de classification pour une concentration en GSH peroxydase de 3 U/ml

sources de variation	F	
type d'injection	22,61	SS
jour	40,59	SS
interaction	1,48	NS

Tableau XXXVIII: ANOVA II pour une concentration en GSH peroxydase de 3 U/ml



sources de variation	F	P
type d'injection	1,00	0,4645
jour	66,86	0,0000
interaction	1,05	0,4528

Tableau XXXV : analyse de la variance à 3 critères de classification pour une concentration en GSH peroxydase de 6 U/ml

sources de variation	F	
type d'injection	10,52	SS
jour	20,97	SS
interaction	0,62	NS

Tableau XXXIX: ANOVA II pour une concentration en GSH peroxydase de 6 U/ml

sources de variation	F	P
type d'injection	2,54	0,2258
jour	246,54	0,0000
interaction	4,66	0,0039

Tableau XXXVI : analyse de la variance à 3 critères de classification pour une concentration en GSH peroxydase de 12 U/ml

sources de variation	F	
type d'injection	15,02	SS
jour	56,08	SS
interaction	3,17	NS

Tableau XL : ANOVA II pour une concentration en GSH peroxydase de 12 U/ml

### 3.3.6. Récapitulation

Afin de mieux visualiser l'effet individuel de chacune des trois enzymes envisagées ci-dessus, nous avons porté le pourcentage de protection dû à chacune d'entre elles en solution injectée et leur concentration cellulaire native (fig. 20). ~~Cependant, en fonction du rapport entre la concentration dans la solution injectée et leur concentration cellulaire native (fig.20).~~ Cependant, une trop grande différence d'échelle ne nous permet pas de mettre les trois enzymes sur le même graphique avec la même précision. C'est pourquoi, nous avons agrandi à la figure 20B le début de cette échelle. Ce rapport a été calculé sur base de données de V.Henin (1981) qui a montré que la microinjection permettait d'introduire  $10^{-11}$  ml de solution par cellule.

	activité dans la solution injectée	activité dans une cellule	quantité de radicaux ou de H <sub>2</sub> O détruite par une unité enzymatique	quantité de radicaux ou de H <sub>2</sub> O détruite dans la solution/minute	quantité de radicaux ou de H <sub>2</sub> O détruite dans la cellule/minute	quantité de radicaux ou de H <sub>2</sub> O correspondant à 20 % de protection
Catalase	0,26 U/ml	$0,26 \cdot 10^{-8} U$	67,5 $\mu$ moles	17,55 $\mu$ moles	$17,55 \cdot 10^{-8} \mu$ moles	270
SOD	$0,15 \cdot 10^6 U/ml$	$0,36 \cdot 10^{-6} U$	0,070 $\mu$ mole	$0,01 \cdot 10^6 \mu$ mole	$0,2 \cdot 10^{-6} \mu$ mole	65.000
GSH peroxydase	2 U/ml	$0,55 \cdot 10^{-8} U$	1 $\mu$ mole	2 $\mu$ moles	$0,55 \cdot 10^{-8} \mu$ mole	2,1

Tableau XLI : correspondance entre les unités enzymatiques et la quantité de radicaux ou de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> détruite par minute.



De plus, pour mieux se rendre compte de l'équivalence entre les unités enzymatiques couramment utilisées et la quantité correspondante de radicaux ou de peroxyde d'hydrogène détruite, nous avons calculé cette quantité pour chaque enzyme qui apporte aux fibroblastes injectés une protection de 20 % (Tableau XLI ).

Nous pouvons ainsi remarquer qu'une très faible quantité de catalase ou surtout de glutathion peroxydase apporte à la cellule une importante protection tandis qu'il faut ajouter énormément de superoxyde dismutase pour n'observer qu'une moindre protection. Cette quantité à injecter pour obtenir 20 % de protection correspond donc à 270  $\mu$ moles de  $H_2O_2$  détruites pour la catalase, 65.000  $\mu$  moles de radicaux superoxydes pour la superoxyde dismutase et 2,1  $\mu$  mole de radicaux peroxydes pour la glutathion peroxydase. Cette dernière enzyme serait donc la plus efficace pour protéger la cellule contre l'action délétère des radicaux.

Pour interpréter valablement ces comparaisons, il faut se rappeler qu'un fibroblaste contient environ  $1,75 \cdot 10^{-9}$  unité de catalase,  $0,4 \cdot 10^{-6}$  U de SOD et  $1,25 \cdot 10^{-9}$  U de GSH peroxydase, c'est-à-dire que l'activité de la SOD est environ 300 fois supérieure à celle des deux autres enzymes.

Il semblerait donc que ce soient surtout les enzymes qui, au départ, se trouvent en concentration faible qui soient les plus efficaces pour protéger la cellule.

### 3.4. EFFET SIMULTANE DE DEUX SYSTEMES PROTECTEURS COMBINES

#### 3.4.1. Combinaison de deux enzymes

##### 3.4.1.1.

Voulant mettre en évidence un effet éventuel de synergie entre deux enzymes, nous avons injecté différents groupes d'une quarantaine de fibroblastes avec des mélanges de deux enzymes. Nous avons repris pour ces expériences des concentrations en enzyme qui donnent une protection suffisante pour être détectée et de même ordre de grandeur : 3,85 U/ml pour la catalase,  $0,9 \cdot 10^6$  U/ml pour la superoxyde dismutase et 3 U/ml pour la glutathion peroxydase (fig. 21A, 21B, 21C).

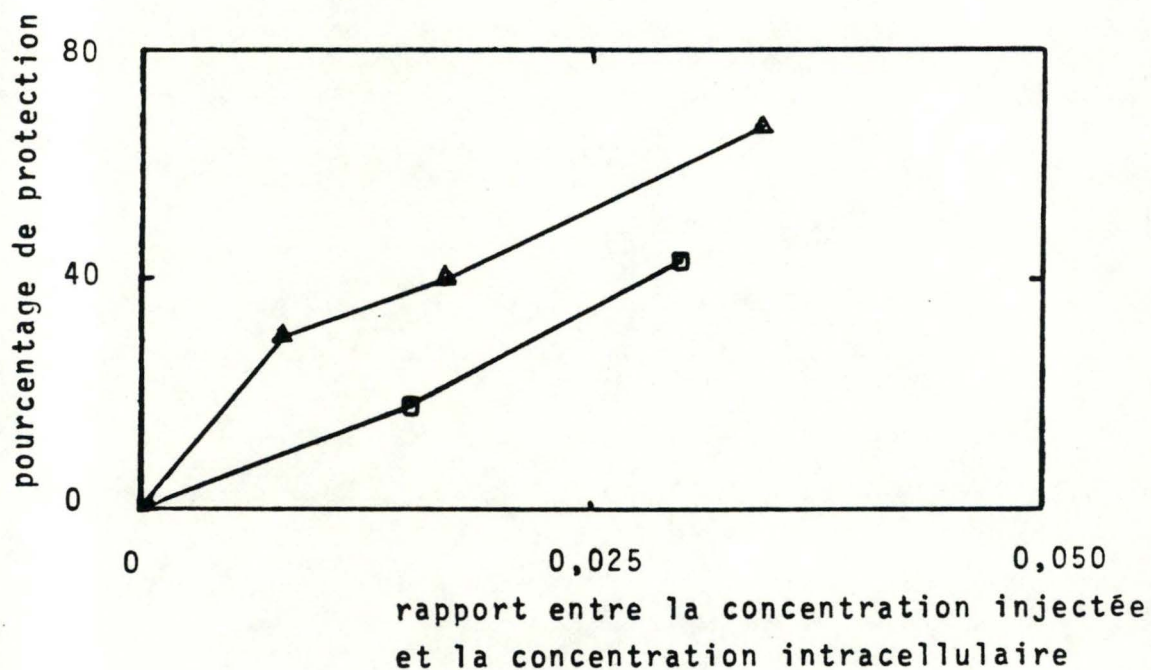
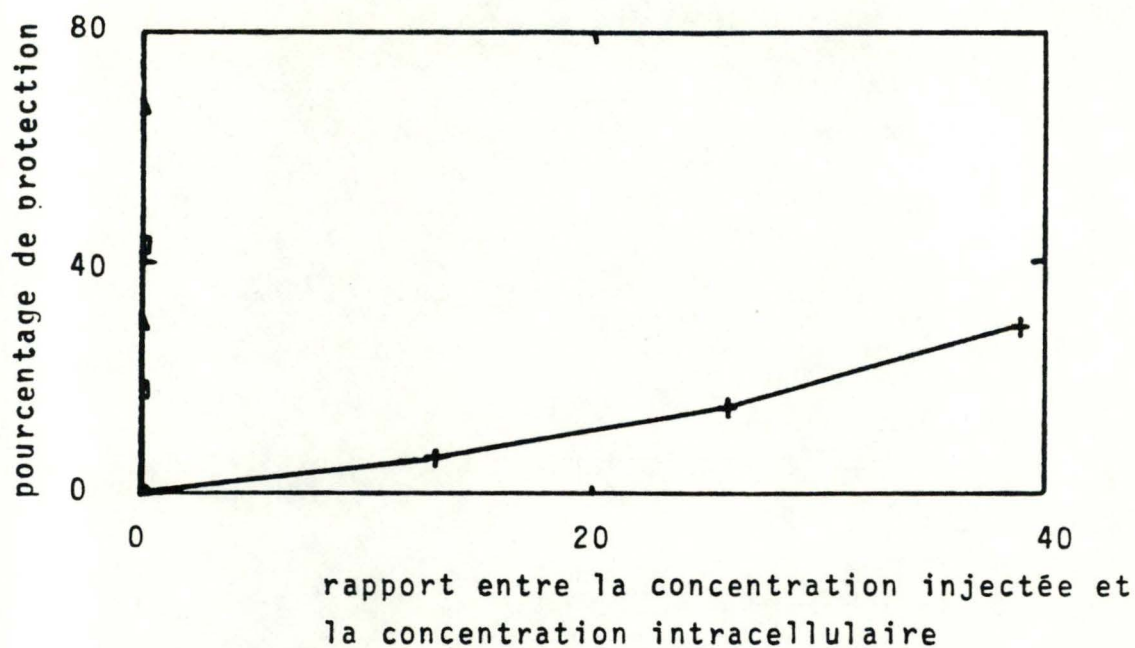


Figure 19 : pourcentage de protection des 3 enzymes en fonction de leur concentration intracellulaire au cours de l'incubation des cellules sous 2 atmosphères d'oxygène à 95%. Les courbes représentent la catalase (□), la SOD (+) et la GSH peroxydase (Δ) .



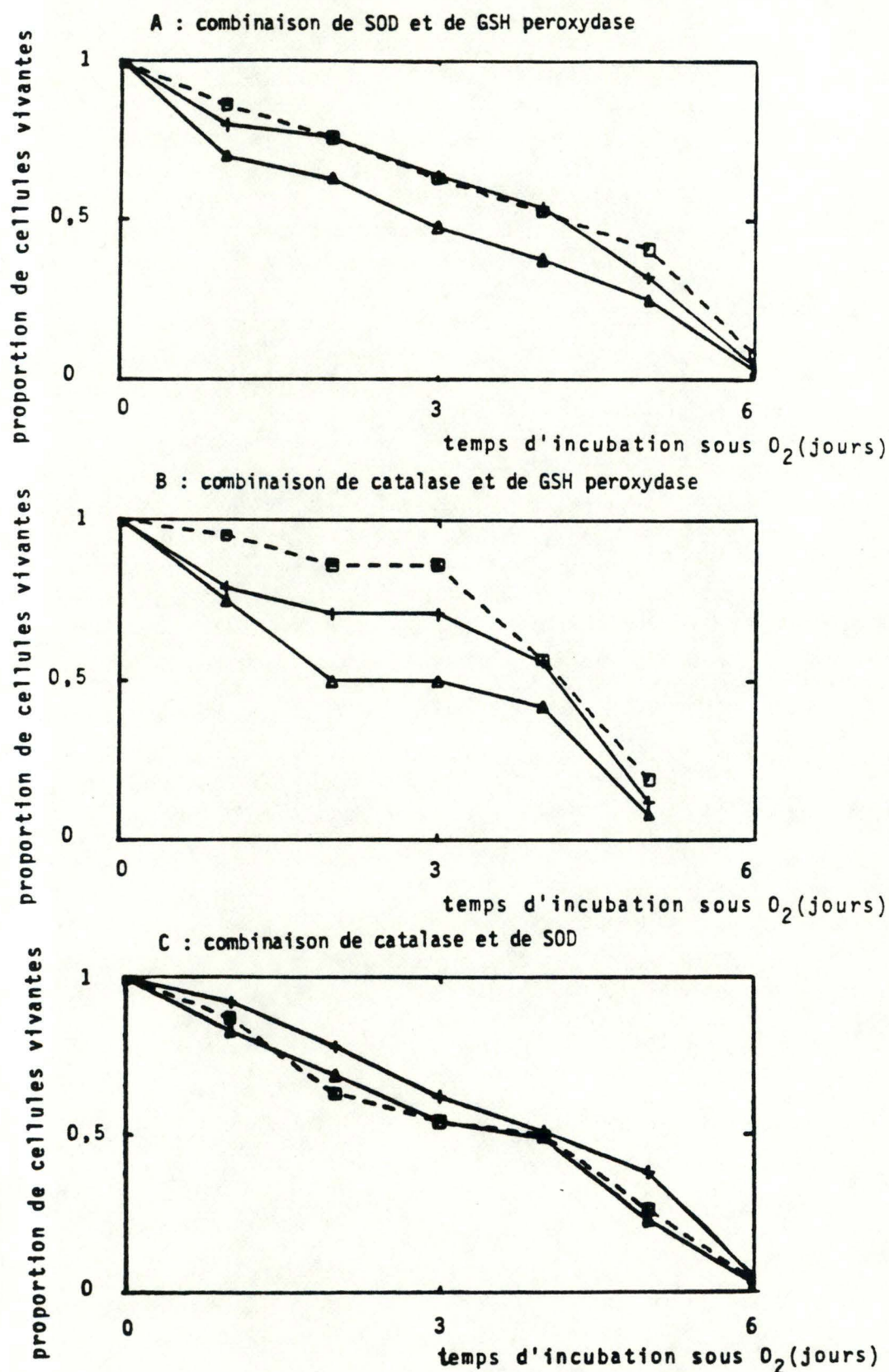


Figure 20 : effet de l'injection de 2 enzymes sur des cellules maintenues sous 2 atmosphères d'oxygène à 95%. Les courbes représentent les cellules non injectées (□--□), les cellules injectées avec les enzymes (+—+) et les cellules injectées avec du tampon (△—△).

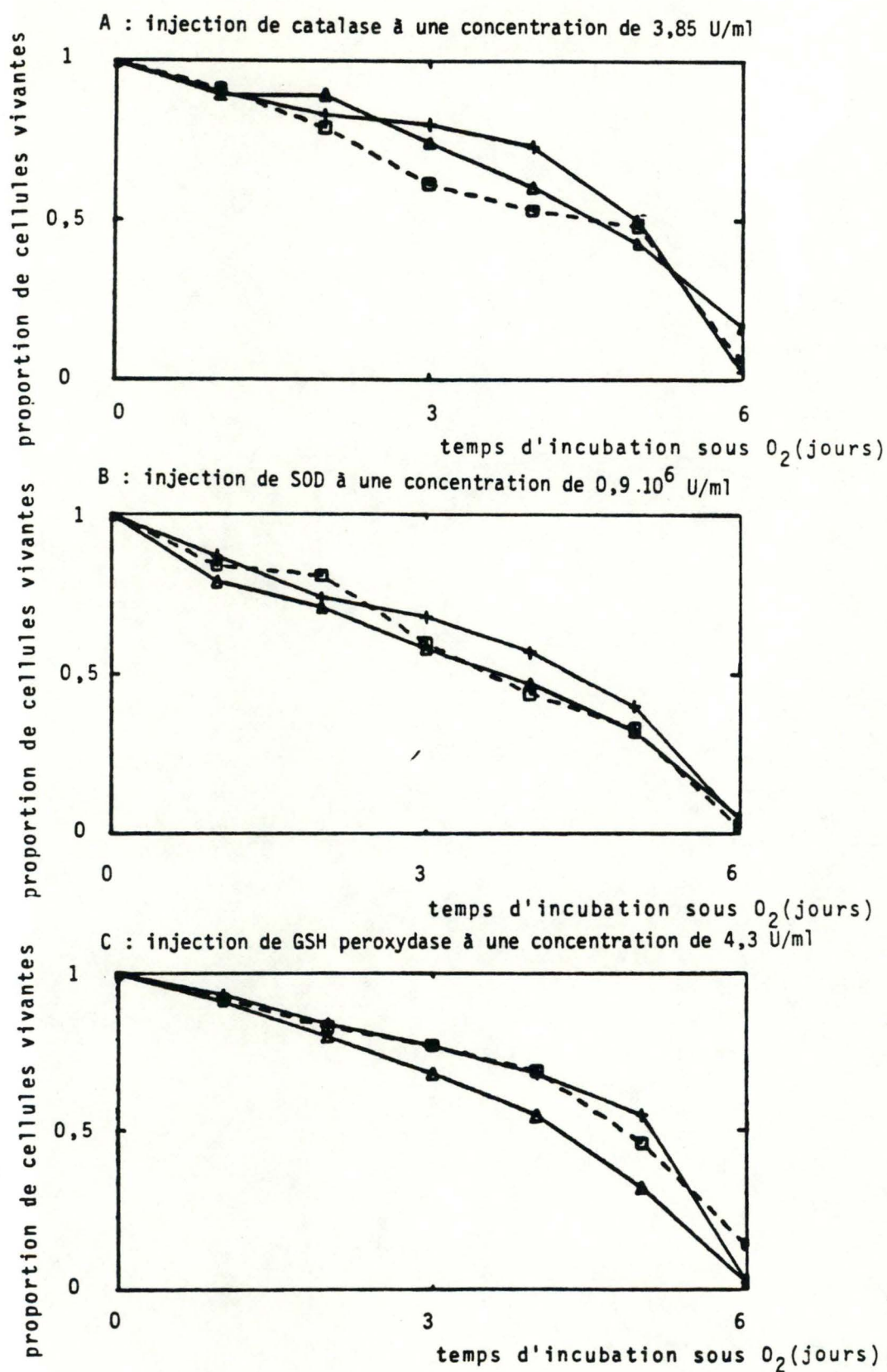


Figure 21 : effet de l'injection de chaque enzyme séparément sur des cellules maintenues sous 2 atmosphères d'oxygène à 95%. Les courbes représentent les cellules non injectées ( $\square$ -- $\square$ ), les cellules injectées avec l'enzyme ( $+---$  $+$ ) et les cellules injectées avec du tampon ( $\triangle$ -- $\triangle$ ).



Pour éviter la trop grande variabilité, soit entre générations, soit entre expériences, nous avons injecté à nouveau des solutions de mêmes concentrations d'enzyme pure, (fig. 22A, 22B, 22C). De plus, à chaque solution injectée, correspondent deux groupes de cellules témoins : cellules non injectées et cellules injectées avec du tampon.

Le pourcentage de protection a été calculé pour chacune des injections (Tableau XLII).

solution injectée	pourcentage de production
GSH peroxydase + SOD	38 %
GSH peroxydase + catalase	39 %
SOD + catalase	9 %
catalase	15 %
SOD	19 %
GSH peroxydase	19 %

Tableau XLII : pourcentage de protection selon les solutions injectées.

Aucune interaction de synergie ne semble se dégager de ce tableau. Les protections dues aux mélanges de catalase et de glutathion peroxydase ainsi que de celle-ci et de superoxyde dismutase sont exactement de même ordre de grandeur que la somme des protections individuelles. Par contre, la protection due au mélange de catalase et de SOD est nettement inférieure à la somme des deux enzymes séparées. Cette observation devra être vérifiée ultérieurement.

Une explication possible de ce phénomène serait de considérer que la glutathion peroxydase protège la cellule au niveau de ses membranes tandis que la superoxyde dismutase et la catalase fonctionnent plutôt dans les compartiments hydrophiles.

L'activité de la glutathion peroxydase serait donc additive à celle d'une des deux autres enzymes tandis que les activités de ces deux dernières ne le seraient pas.

#### 3.4.1.2. Analyse de la variance

L'analyse de la variance à trois critères de classification ( $\alpha = 12\%$ ) (Tableaux XLII à XLIV) et l'ANOVA II ( $\alpha = 1\%$ ) (Tableaux XLV à XLVII) confirment les conclusions tirées ci-dessus. Les combinaisons entre la superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase et entre cette dernière et la catalase sont significativement différentes de leurs témoins respectifs. Il faut cependant noter que le mélange glutathion peroxydase et de catalase semble plus efficace.

#### 3.4.2. Combinaison d'une enzyme et d' $\alpha$ -tocophérol

##### 3.4.2.1.

Dans le même but, nous avons voulu savoir si la vitamine E et la superoxyde dismutase pourraient agir en synergie. Pour cela, nous avons injecté cette enzyme en présence et en absence d' $\alpha$ -tocophérol ( $5 \cdot 10^{-4}M$ ) (fig. 23A et B). Les concentrations en enzyme ainsi que les témoins sont ceux utilisés dans l'expérience précédente.

Le pourcentage de protection (tableau XLVIII) permet de mieux mettre en évidence les effets obtenus.

nature de la protection	pourcentage de protection
SOD en absence de vitamine E	14 %
SOD en présence de vitamine E	21 %

Tableau XLVIII : pourcentage de protection en fonction de la nature de celle-ci.



sources de variation	F	P
type d'injection	4,82	0,1156
jour	110,10	0,0000
interaction	1,09	0,4257

Tableau XLII: analyse de la variance à 3 critères de classification : combinaison de GSH peroxydase et de SOD

sources de variation	F	
type d'injection	17,57	SS
jour	65,6	SS
interaction	1,12	NS

Tableau XLV : ANOVA II : combinaison de GSH peroxydase et de SOD

sources de variation	F	P
type d'injection	36,82	0,0077
jour	194,85	0,0000
interaction	3,68	0,0116

Tableau XLIII: analyse de la variance à 3 critères de classification : combinaison de GSH peroxydase et de catalase

sources de variation	F	
type d'injection	51,55	SS
jour	249,63	SS
interaction	3,14	NS

Tableau XLVI : ANOVA II : combinaison de GSH peroxydase et de catalase

sources de variation	F	P
type d'injection	2,00	0,2803
jour	75,06	0,0000
interaction	0,57	0,8135

Tableau XLIV : analyse de la variance à 3 critères de classification : combinaison de catalase et de SOD

sources de variation	F	
type d'injection	4,97	NS
jour	31,97	SS
interaction	0,55	NS

Tableau XLVII : ANOVA II : combinaison de catalase et de SOD

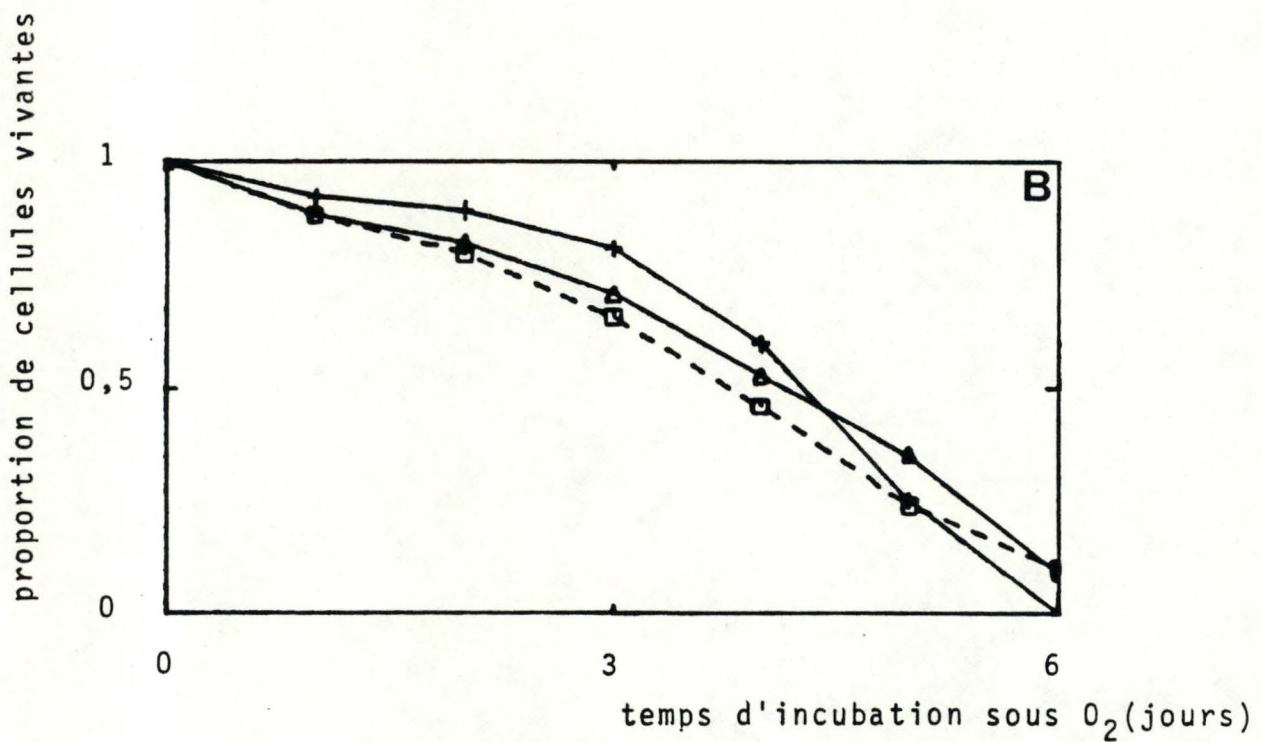
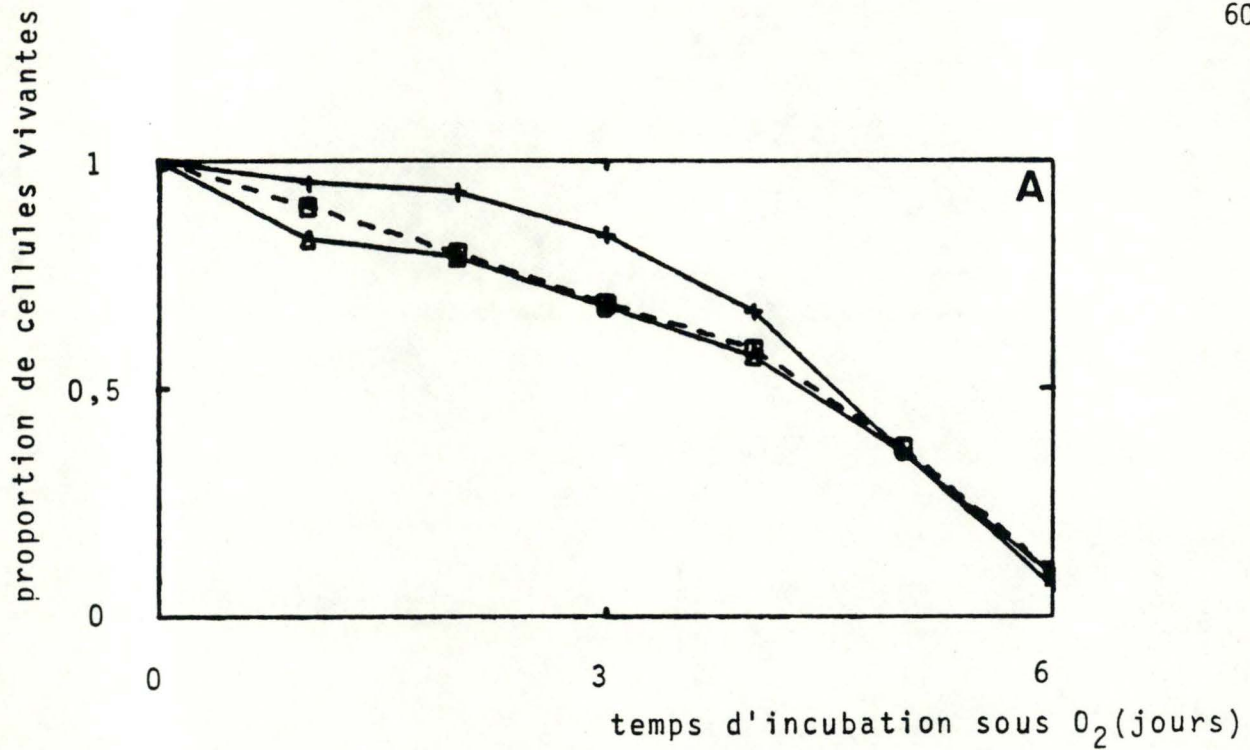


Figure 22 : effet de l'injection de SOD à une concentration de  $0,9 \cdot 10^6$  U/ml en présence (A) et en absence (B) de vitamine E ( $5 \cdot 10^{-4}$  M) sur des cellules maintenues sous 2 atmosphères d'oxygène à 95%. Les courbes représentent les cellules non injectées (□--□), les cellules injectées avec la SOD (+—+) et les cellules injectées avec du tampon (△—△).



Une constatation importante ressort de ce tableau. La protection de la superoxyde dismutase en présence d' $\alpha$ -tocophérol : il apparaît que cette enzyme est plus efficace en sa présence qu'en son absence. Cela pourrait signifier que, si la cellule est protégée au niveau de ses membranes par la vitamine E, un apport supplémentaire de protection dans ses compartiments hydrophiles rend la cellule beaucoup plus résistante à l'attaque des radicaux libres.

Les combinaisons entre chacune des deux autres enzymes et l' $\alpha$ -tocophérol devront être ultérieurement étudiées. Certaines expériences préliminaires semblent indiquer que la présence de vitamine E diminue fortement la protection due à la glutathion peroxydase.

#### 3.4.2.2. Analyse de la variance

L'analyse à trois critères de classification (tableau XLVIII) avec un seuil de 12 % et l'ANOVA II (tableau IL) avec un seuil de 1 % confirment toutes deux que la protection de SOD en présence de vitamine E est hautement significative.

sources de variation	F	P
type d'injection	4,82	0,1156
jour	120,1	0,0000
interaction	1,09	0,4257

Tableau XLVIII : analyse de la variance à 3 critères de classification : combinaison de SOD et de vitamine E

sources de variation	F	
type d'injection	10,06	SS
jour	10,59	SS
interaction	0,97	NS

Tableau IL : ANOVA II : combinaison de SOD et de vitamine E

*Successus*

### 3.5. INJECTIONS MULTIPLES

#### 3.5.1.

Stacey (1977) avait montré que des protéines injectées dans le cytoplasme des cellules Hela étaient autophagocytées entre le deuxième et le troisième jour suivant la micro-injection.

Nous pourrions donc penser que les enzymes injectées apportaient leur protection pendant quelques jours avant d'être détruites; la cellule n'était alors plus protégée et mourrait. Nous avons voulu faire quelques expériences préliminaires en injectant les fibroblastes une deuxième fois, deux jours après la première injection. Nous espérions ainsi prolonger la protection et donc la vie des cellules. Les témoins furent également injectés deux fois avec du tampon.

Les résultats de cette double injection sont représentés à la figure 24B; la figure 24A nous rappelle les courbes obtenues lorsque les cellules ne subissent qu'une injection.

La figure 24B ne nous montre pas une prolongation de la vie des fibroblastes malgré leur double injection. De plus, de 47 % lors d'une seule injection, le pourcentage de protection tombe à 30 %. Il apparaît donc que, plutôt que d'augmenter la défense des cellules, une double injection ne soit guère plus favorable à la survie de celles-ci tout en les protégeant encore.

Deux hypothèses, non exclusives, peuvent être envisagées pour expliquer cette observation.

La première serait de dire que le fait d'injecter une solution quelle qu'elle soit, par deux fois, dans son cytoplasme constitue, à lui seul, un stress trop grand pour la cellule. Cependant, il semble que les cellules injectées deux fois avec du tampon n'en souffrent pas outre mesure.

La seconde hypothèse pourrait être que l'injection d'enzymes au deuxième jour survient trop tard par rapport au temps d'exposition sous oxygène et donc que ceux-ci n'apporteraient plus leur effet protecteur. Nous avons déjà démontré auparavant qu'une injection au deuxième jour d'incubation ne protégeait plus les fibroblastes.

Ceci reste donc un résultat préliminaire qui nécessiterait d'être étudié de manière plus systématique.



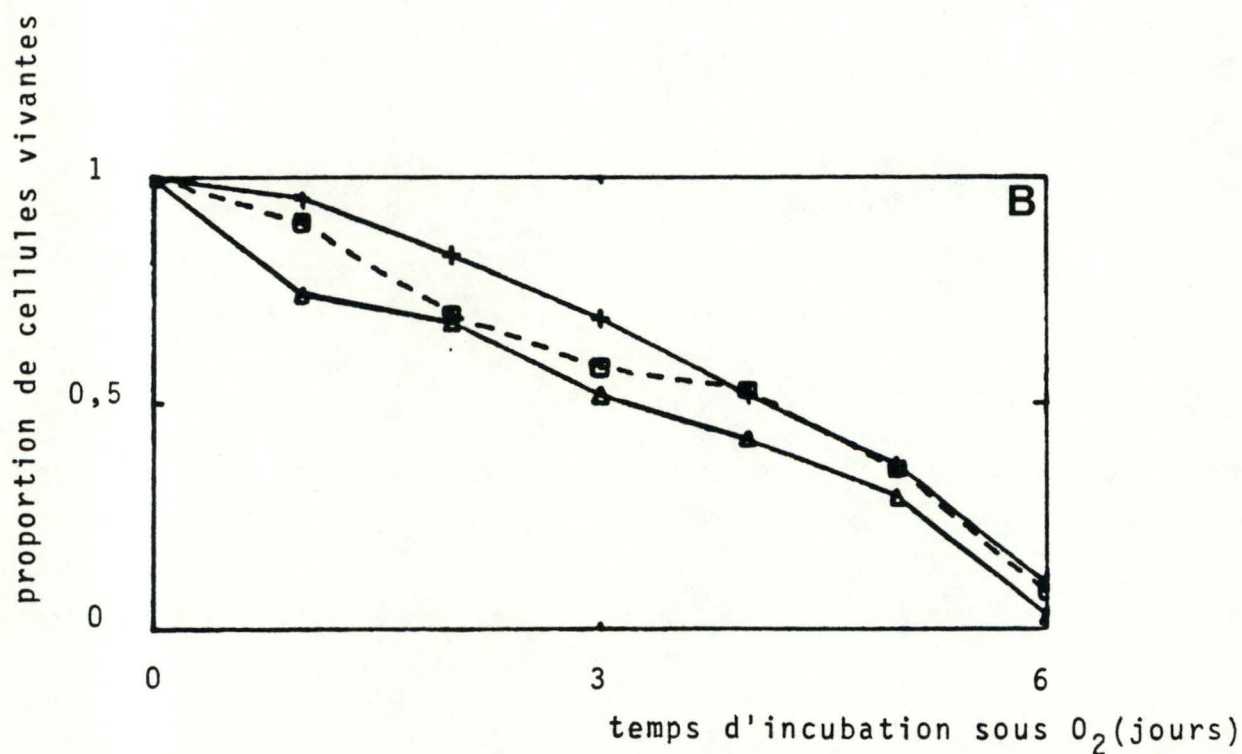
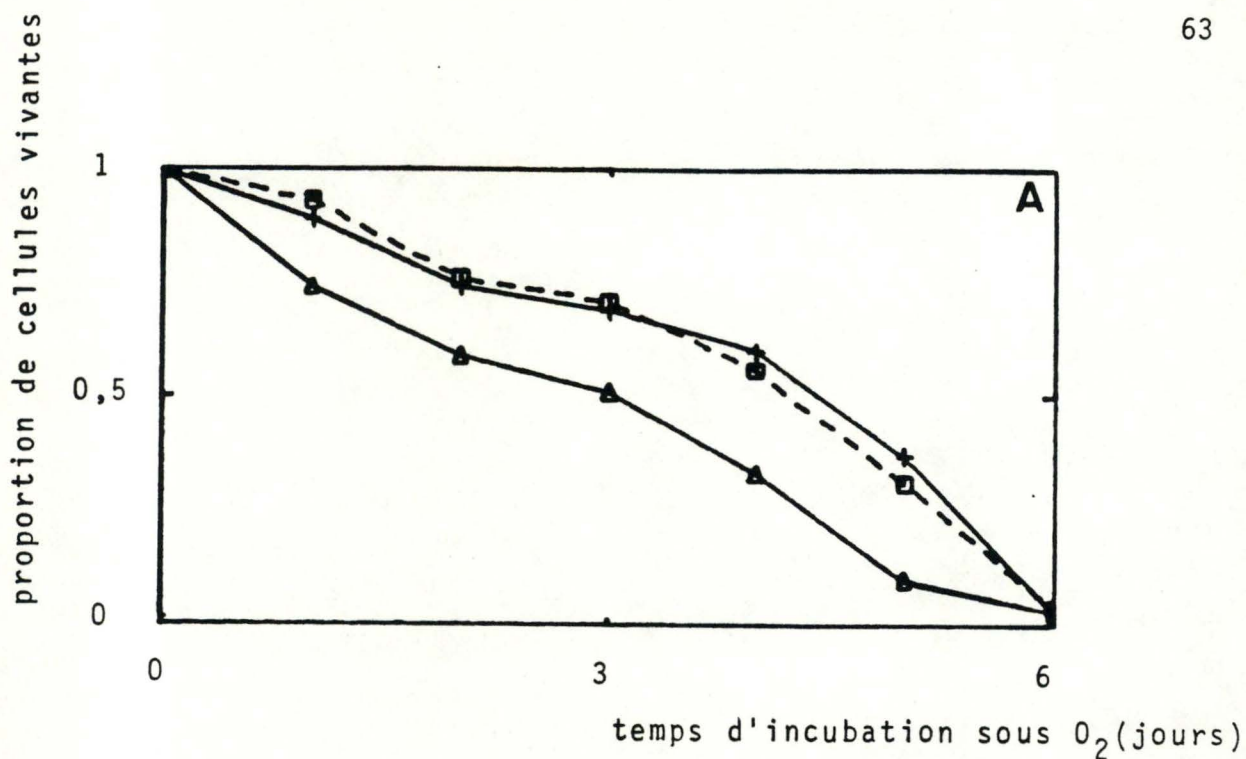


Figure 23 : effet d'une simple (A) et d'une double (B) injection d'une solution des 3 enzymes sur des cellules maintenues sous 2 atmosphères d'oxygène à 95%. Les courbes représentent les cellules non injectées ( $\square$ --- $\square$ ), les cellules injectées avec les 3 enzymes ( $+$ — $+$ ) et les cellules injectées avec du tampon ( $\triangle$ — $\triangle$ ).

### 3.5.2. Analyse de la variance

L'analyse de la variance à 3 critères de classification (tableau L) et l'ANOVA II (tableau LI) montrent toutes deux avec un seuil de signification inférieure à 1 %, que les 30 % de protection apportés par une double injection sont hautement significatifs.

sources de variation	F	P
type d'injection	164,50	0,0009
jour	40,00	0,0000
interaction	1,46	0,2452

Tableau L : analyse de la variance à 3 critères de classification : double injection

sources de variation	F	
type d'injection	37,16	SS
jour	72,85	SS
interaction	3,38	NS

Tableau LI : ANOVA II : double injection



#### IV. CONCLUSION

Au cours de millions d'années d'évolution, la cellule a dû mettre au point des systèmes de protection pour se défendre contre l'attaque des dérivés de l'oxygène qui commençaient à s'accumuler dans l'atmosphère résultant de la photosynthèse nouvellement apparue. Deux voies se sont développées : l'une enzymatique avec la catalase, la superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase, et l'autre, chimique qui utilise des molécules capables de piéger les radicaux libres et de les détoxifier comme par exemple l' $\alpha$ -tocophérol et l'acide ascorbique.

Dans ce travail, nous avons voulu aborder le rôle des réactions radicalaires dans la dégénérescence cellulaire et connaître l'importance des divers systèmes de défense que possède la cellule pour maintenir son homéostasie. Contrairement aux approches indirectes relevées dans la littérature, nous avons envisagé ce problème d'une manière directe en utilisant les perspectives qui nous sont offertes par la technique de micro-injection. Cette technique nous a permis d'introduire directement les enzymes étudiées dans la cellule en faisant abstraction d'une série de paramètres dont doivent tenir compte les méthodes utilisées jusqu'à présent.

Il nous fallait également un modèle d'attaque radicalaire. Pour cela, nous avons mis au point un système qui permettait de soumettre des fibroblastes humains WI-38 à deux atmosphères d'oxygène à 95 % et d'observer une dégénérescence reproductible de ceux-ci au bout de 6 jours. Ce modèle nous donnait donc la possibilité de tester l'importance des différentes enzymes et molécules que possède la cellule pour se protéger.

Nous avons pu ainsi démontrer que l'addition d' $\alpha$ -tocophérol dans le milieu de culture ainsi que la micro-injection de catalase de superoxyde dismutase et de glutathion peroxydase, conjointement ou séparément, nous apportait une protection des cellules contre l'attaque des dérivés de l'oxygène.

D'autre part, l'étude analytique de ces différents systèmes de défense et leurs combinaisons respectives nous a permis de mieux comprendre leur importance respective.



Nous avons pu ainsi montrer qu'il suffit d'une faible quantité de catalase ou surtout de glutathion peroxydase par rapport à ce que contient normalement un fibroblaste pour lui apporter une importante protection.

Par contre, il faut ajouter une quantité proportionnellement énorme de superoxyde dismutase pour n'observer qu'une faible protection. Ces constatations, sont à mettre en relation avec les concentrations natives très basses en catalase et en glutathion peroxydase et très élevées en superoxyde dismutase que contient une cellule. En effet, ces deux premières enzymes pourraient être tellement efficaces qu'une très faible quantité d'enzymes suffit à la cellule pour se protéger dans les conditions normales de vie; de même une très faible quantité apportée à cette cellule par la micro-injection lui confère une protection importante lors d'une attaque radicalaire exhaussée. A l'inverse, la superoxyde dismutase injectée ne semble pas si efficiente puisque la cellule en synthétise 300 fois plus et puisqu'il faut en ajouter une quantité énorme pour ne protéger que peu la cellule quand elle est exposée aux deux atmosphères d'oxygène.

Il faut cependant souligner que, malgré ces différences quantitatives, les trois enzymes jouent un rôle de protection contre les attaques radicalaires, protection que l'on peut accroître par la micro-injection de ceux-ci en cas d'attaques radicalaires importantes.

Une autre observation importante concerne la combinaison de deux systèmes de protection : ainsi on n'observe pas de complémentarité entre la catalase et le superoxyde dismutase mais bien une additivité entre la catalase ou le superoxyde dismutase et la glutathion peroxydase : de même existe une synergie entre le superoxyde dismutase et l' $\alpha$ -tocophérol. Pour expliquer ces observations, il faut savoir que la catalase et le superoxyde dismutase protègent la cellule au niveau de ses compartiments hydrophiles tandis que la glutathion peroxydase le fait au niveau des parties hydrophobes et particulièrement au niveau de ses membranes. Il semble donc que lorsqu'on protège un fibroblaste à la fois aux niveaux hydrophile et hydrophobe, la protection obtenue pourrait être égale ou supérieure à la somme des deux protections isolées : il est logique, en effet, de penser que, dans ce cas, les deux protections se complètent et puissent même offrir une protection égale ou supérieure à la somme de chacun des deux systèmes pris isolément.



Ayant établi un modèle d'attaques radicalaires, il nous a été permis de disséquer et d'analyser chacun des différents systèmes que possède la cellule pour se défendre contre les dérivés de l'oxygène et de mieux en comprendre leur importance respective.

Dans un proche avenir, il nous paraît intéressant de vérifier l'importance de ces systèmes de protection en utilisant d'autres sources de radicaux telles que le paraquat, la xanthine oxydase, la nitrofurantoïne ...

Une autre expérience serait de diminuer la pression en oxygène pour maintenir les cellules en vie plus longtemps en se trouvant dans des conditions qui permettraient de mettre en évidence une meilleure protection de l'un et/ou l'autre des systèmes de défense étudiés ci-dessus.

D'autres perspectives plus lointaines peuvent également être envisagées : par exemple, travailler sur des cellules maintenues dans des conditions de vie normale mais en diminuant leurs protections naturelles au moyen d'anticorps spécifiques ou en diminuant la concentration cellulaire en glutathion.

Cet ouvrage a permis de montrer qu'il était possible de mettre en évidence un effet de protection direct par l'utilisation de la micro-injection; ce système pourra donc être étendu à d'autres situations et nous permettra de donner une réponse plus directe à des questions qui jusqu'à aujourd'hui restaient sans réponse.

## V. BIBLIOGRAPHIE

1. AEBI, H. , SUTER, H. (1972)  
in : The Metabolic Basis of Inherited Disease , p. 1710  
ed : McGraw-Hill, New York.
2. ANSORGE, W. (1982)  
Improved system for capillary micro-injection in living cells.  
Experimental Cell Research, 140, 31-37.
3. BABIOR, B.M., KIPNES, R.S., CURNUTTE, J.T. (1973)  
Biological Defense Mechanisms. The Production by leukocytes  
of Superoxide, a Potential Bactericidal Agent.  
Journal of Clinical Investigations, 52, 741-744.
4. BALIN, A.K., GOODMAN, D.B., RASMUSSEN, H., CRISTOFALO, V.J.  
The Effect of Oxygen and Vitamin E on the Lifespan of Human  
Diploid Cells in Vitro.  
The Journal of Cell Biology, 74, 58-67.
5. BMDP Statistical Software (1981)  
ed : Dixon, W., University of California Press.
6. BRITTON, L., MALINOWSKI, D., FRIDOVICH, I. (1978)  
Superoxide Dismutase and Oxygen Metabolism in Streptococcus  
faecalis and Comparisons with other Organisms.  
Journal of Bacteriology, 134, 229-236.
7. CRAPO, J.D., TIERNEY, D.F. (1974)  
Superoxide Dismutase and Pulmonary Oxygen Toxicity.  
American Journal of Physiology, 226 (6), 1401-1407.
8. DIPLOCK, A.T., LUCY, J.A. (1973)  
The Biochemical Modes of Action of Vitamin E and Selenium :  
a Hypothesis.  
FEBS Letters, 29 (3), 205-210.



9. FLOHE, L. (1982)  
Glutathione Peroxydase Brought into Focus.  
in : Free Radicals in Biology, vol V  
ed : Pryor, W., Academic Press.
10. FRIDOVICH, I. (1975)  
Superoxide Dismutase.  
Animal Review of Biochemistry, 44, 147-159.
11. FRIDOVICH, I. (1976)  
Oxygen Radicals, Hydrogen Peroxide and Oxygen Toxicity.  
in : Free Radicals in Biology, vol I , p. 239-277.  
ed : Pryor, W., Academic Press.
12. FRIDOVICH, I. (1978)  
The Biology of Oxygen Radicals.  
Science, 201, 875-880.
13. GANTHER, H.E. (1975)  
Selenoproteins.  
Chemica Scripta, 8A, 79-84.
14. GREGORY, E.M., FRIDOVICH, I. (1973)  
Induction of Superoxide Dismutase by Molecular Oxygen.  
Journal of Bacteriology, 114 (2), 543-548.
15. HALLIWELL, B. (1978)  
Biochemical Mechanisms Accounting for the Toxic Action of  
Oxygen on Living Organisms : The Key Role of Superoxide  
Dismutase.  
Cell Biology International Reports, 2 (2), 113-126.

16. HAUGAARD, N. (1968)  
Cellular Mechanisms of Oxygen Toxicity.  
Physiological Reviews, 48, 311-375.
17. HENIN, V. (1981)  
Micro-injection du Cytochrome b5 dans les Fibroblastes WI-38  
et Etude de sa Distribution sur les Membranes Subcellulaires.  
F.N.D.P., Namur.
18. HOUBEN, A. (1976)  
Modifications Enzymatiques Liées au Vieillissement des  
Cellules en Culture.  
F.N.D.P., Namur.
19. HONDA, S., MATSUO, M. (1983)  
Shortening of the in Vitro Lifespan of Human Diploid Fibro-  
blasts Exposed to Hyperbaric Oxygen.  
Experimental Gerontology, 18, 339-345.
20. KOSOWER, N.S., KOSOWER, E.M. (1978)  
The Glutathione Status of Cells.  
International Review of Cytology, 54, 109-160.
21. LEIBOVITZ, B.E., SIEGEL, B.V. (1980)  
Aspects of Free Radical Reactions in Biological Systems : Aging.  
Journal of Gerontology, 35 (1), 45-56.
22. McCORD, J.M., KEELE, B.B., Fridovich, I. (1971)  
An Enzyme-Based Theory of Obligate Anaerobiosis : The Physio-  
logical Function of Superoxide Dismutase.  
Proceedings of the National Academy of Sciences, 48, 1024-1027.



23. McCORD, J.M. (1979)  
SOD : Occurrence, Structure, Function and Evolution.  
Isoenzymes : Current Topics in Biological and Medical  
Research, 1, 1-21.
24. MINO, M. , SUGITA, K. (1978)  
The Membrane Action of Alpha-tocopherol upon Oxidative  
Damage in Erythrocytes.  
in : Tocopherol, Oxygen and Biomembranes, p. 71-81  
ed : de Duve, C. , Hayaishi, O. , Elsevier/ North Holland.  
Biomedical Press.
25. NISHIKIMI, M. , YOGI, K. (1977)  
Oxidation of Ascorbic Acid and Alpha-tocopherol by Superoxide.  
in : Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen, p. 79-87  
ed : Hayaishi, Asada, University Park Press.
26. PACKER, L. , FUEHR, K. (1977)  
Low Oxygen Concentration Extends the Lifespan of Cultured  
Human Diploid Cells.  
Nature, 267, 423-425.
27. PLACER, Z.A. , CUSHMAN, L.L. , JOHNSON, B.C. (1966)  
Estimation of Product of Lipid Peroxidation (Malonyl Dialdehyde)  
in Biochemical Systems.  
Analytical Biochemistry, 16, 359-364.
28. PLAINCHAMP, D. (1984)  
Importance de la SOD et de la Catalase comme Défense de la  
Cellule contre les Radicaux Libres.  
F.N.D.P., Namur.

29. SCOTT, D.L. , KELLEHER, J. , LOSOWSKY, M.S. (1977)  
The Influence of Dietary Selenium and Vitamin E on Glutathione Peroxidase and Glutathione in the Rat.  
*Biochemica et Biophysica Acta*, 497, 218-224.
30. SEVAG, M. , MAIWEZ, L. (1934)  
*Journal of Experimental Medicina*, 60, 95.
31. STACEY, D.W. , ALLFREY, V.G. (1977)  
Evidence for the Autophagy of Microinjected Proteins in Hela Cells.  
*The Journal of Cell Biology*, 75, 807-817.
32. STOCKS, J. , DORMANDY, T. (1973)  
*British Journal of Haematology*, 20, 95.
33. TAPPEL, A.L. (1973)  
Lipid Peroxidation Damage to Cell Components.  
*Federation Proceedings*, 32 (8), 1870-1874.
34. TAPPEL, A.L. , FLETCHER, B. , DEAMER, D. (1973)  
Effect of Antioxidants and Nutrients on Lipid Peroxidation Fluorescent Products and Aging Parameters in the Mouse.  
*Journal of Gerontology*, 28 (4), 415-424.
35. TAPPEL, A.L. (1974)  
Selenium-Glutathione Peroxidase and Vitamin E.  
*The American Journal of Clinical Nutrition*, 27, 960-965.
36. THAW, H.H. , COLLINS, V.P. , BRUNK, U.T. (1984)  
Influence of Oxygen Tension, Pro-oxidants and Antioxidants on the Formation of Lipid Peroxidation Products in Individual cultivated Human Glial Cells.  
*Mechanisms of Ageing and Development*, 24, 211-223.



37. WINER, B. (1971)

in : Statistical Principles in Experimental Design.

ed : Mc Graw Hill, New York.

ERRATA.

Page 45 : Tableau XXV :  $0,9 \cdot 10^5$  devient  $0,9 \cdot 10^6$

Paragraphe 3.3.4.2. : 5e ligne : 7,6 et 11,4 U/ml deviennent  
 $0,9 \cdot 10^6$  et  $1,35 \cdot 10^6$  U/ml

Page 51 : supprimer la phrase : "Cependant, ... (fig20)."